

CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS E MICROBIOLÓGICAS DE SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR ADITIVADAS COM ÁCIDO PROPIONICO E *Lactobacillus buchneri* (UFLA SIL 72)

BEATRIZ FERREIRA CARVALHO¹, CARLA LUIZA DA SILVA ÁVILA²; JOSÉ CARDOSO PINTO³; CIBELLI PAULA DE CASTRO⁴; JARDEL NERI⁵; ROSANE FREITAS SCHWAN⁶

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos da adição de ácido propiônico [1% com base na matéria natural (MN)] e de uma nova cepa de *Lactobacillus buchneri* (UFLA SIL 72) (média de $1,55 \times 10^6$ ufc/g de forragem) sobre os parâmetros fermentativos e microbiológicos de silagens de cana-de-açúcar após 60 e 170 dias de fermentação. Utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso, com arranjo fatorial 2 x 2 x 2 dos tratamentos. A adição de ácido propiônico reduziu a viabilidade celular de todos microrganismos avaliados. A aplicação da cepa de *L. buchneri* no tratamento com ácido propiônico não foi capaz de aumentar no número de bactérias lácticas na silagem. Ambos aditivos inibiram o crescimento de clostrídios, sendo observado um maior efeito quando utilizados simultaneamente. A aplicação de ácido propiônico e da cepa indígena de *L. buchneri* é uma alternativa viável para o controle do crescimento de leveduras e clostrídios em silagens de cana-de-açúcar.

Palavras-chaves: ácidos orgânicos, leveduras, clostrídios, bactérias do ácido láctico

INTRODUÇÃO

No processo fermentativo da sacarose, conduzido majoritariamente por leveduras, ocorre perda acentuada de matéria seca (MS) e de conteúdo energético, devido à conversão de açúcares em etanol, CO₂ e água (Kung Junior & Stanley, 1982). A importância desses microrganismos no processo fermentativo da silagem está relacionada com perdas, durante a fermentação e deterioração aeróbia durante a desensilagem, porque esse grupo de microrganismo é capaz de exercer sua atividade metabólica tanto na presença quanto na ausência de oxigênio (McDonald et al., 1991). Em condições aeróbias, as leveduras podem degradar o ácido láctico com consequente aumento nos valores de pH promovendo, assim, condições para que outros microrganismos deterioradores se estabeleçam (McDonald et al., 1991).

Ácidos orgânicos são aditivos classificados como inibidores de fermentação. São utilizados tanto como antimicrobianos quanto como acidificadores. Com isso podem modificar a fermentação da silagem. O ácido propiônico, utilizado como inibidor do crescimento de leveduras e mofos, aumenta a estabilidade aeróbia das silagens. Esse ácido é considerado um fungicida ou um fungistático (Kung Junior et al., 2003). A utilização de ácidos orgânicos em silagem de cana-de-açúcar teria o intuito de acelerar a queda no valor de pH e reduzir, principalmente, a população epifítica de microrganismos indesejáveis evitando seu crescimento.

A inabilidade de bactérias do ácido láctico (BAL) homofermentativas, em promover a estabilidade aeróbia de silagens, despertou o interesse da pesquisa pelo uso de bactérias heteroláticas,

¹ Doutoranda em Microbiologia Agrícola, DBI/ UFLA beatrizfcarvalho@uol.com.br

² Pós-Doutoranda em Zootecnia DZO/UFLA csilvaavila@gmail.com.br

³ Professor Associado, DZO/UFLA josecard@ufla.br

⁴ Graduanda em Zootecnia, DZO/UFLA cibellizoo@yahoo.com.br

⁵ Mestrando em Ciências Veterinárias, DMV/UFLA jardelneri@hotmail.com

⁶ Professor Associado, DBI/UFLA rschwan@ufla.br

capazes de produzir ácidos com efeito antifúngico e, ao mesmo tempo, estáveis em meio aeróbio (Kung Junior et al., 2003). A espécie *L. buchneri* tornou-se uma opção como aditivo, pois, além de produzir ácido acético, que é comprovadamente um antifúngico (Danner, 2002), não produz (ou produz em menor concentração) etanol, em função da ausência da enzima acetaldeído desidrogenase.

O uso conjunto de ácido propiônico e de uma cepa de BAL heterolática, produtora de ácido acético, poderia promover a redução do crescimento de leveduras e clostrídios durante a ensilagem de cana-de-açúcar. Além de garantir um menor pH final da silagem. O objetivo desse trabalho foi avaliar o uso desses aditivos e suas combinações em silagem de cana-de-açúcar em dois tempos de ensilagem.

MATERIAL E MÉTODOS

A cana-de-açúcar foi colhida manualmente e triturada em picadeira de forragem. Os tratamentos foram: uma cepa indígena de *L. buchneri* (UFLA SIL 72, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG) e ácido propiônico, na dosagem de 1% na matéria natural. O experimento foi conduzido em um delineamento de blocos casualizados, sendo formados quatro blocos (um por dia). Os tratamentos foram dispostos em um arranjo fatorial do tipo 2 (adição ou não de ácido propiônico) x 2 (adição ou não de *L. buchneri*) x 2 (avaliação com 60 ou 170 dias), totalizando oito combinações.

Após ter sido realizada a contagem microbiana em laboratório, as seguintes dosagens de inoculante foram homogeneizadas à cana: de $1,15 \times 10^8$ ufc/mL, no primeiro dia, $1,9 \times 10^8$ ufc/mL, no segundo dia, $1,7 \times 10^8$ ufc/mL, no terceiro e quarto dias de incubação. Como silos experimentais foram utilizados baldes plásticos com volume de 15L, que foram vedados com lona plástica e fita adesiva. Para a determinação dos ácidos graxos voláteis, ácido láctico e etanol, foram utilizadas técnicas de cromatografia líquida de alta precisão (HPLC), para isso extratos aquosos das amostras de silagens foram obtidos homogeneizando 30g da amostra com 270 mL de água destilada. Do volume final obtido para cada amostra, foram retiradas duas porções, uma foi utilizada para leitura de etanol. A outra porção, utilizada para mensuração de ácidos graxos voláteis e lactato, foi acidificada com 10 μ L de ácido sulfúrico na concentração de 50% (v/v) (Canale et al., 1984). O teor de MS foi mensurado por desidratação a 55° C por 72 horas, seguida de desidratação a 100° C por 24 horas da amostra pré-seca e triturada. O teor de fibra em detergente neutro (FDN) da amostra pré-seca foi mensurado com um determinador de fibra (Tecnal Equipamentos para Laboratório Ltda, Piracicaba, SP). Para mensuração do pH, 100 mL de água destilada foram adicionados a 15 g da amostra; a solução foi mantida em agitação por 10 minutos, quando se procedeu a leitura do pH.

Para as análises microbiológicas, 70g da amostra foram colocadas em Erlenmeyers com 630 mL de água peptonada estéril (1% de peptona e 5% de NaCl, esterilizada a 121°C por 15 min.) e agitadas durante 20 minutos. A partir desta amostra foram preparadas diluições seriadas para se proceder o plaqueamento. Para contagem de BAL foi utilizado o meio MRS (Difco), acrescido de nistatina (4 mL/L). O meio YEPG, acrescido de cloranfenicol (0,1 g/L), foi utilizado para contagem de leveduras. As placas foram incubadas a 28°C e a contagem efetuada após 48 horas de incubação. Para a quantificação de clostrídios utilizou-se o caldo DRCB (Differential Reinforced Clostridial Broth)(Himedia) acrescido de ágar (16 g/L). As placas foram incubadas por 7 dias a 37°C, em cubas de anaerobiose, empregando, para isto saches AnaeroGen™ (Oxoid).

Os dados foram analisados pelo procedimento GLM do SAS por modelo contendo os efeitos fixos de inoculante (*L. buchneri* UFLA SIL 72), ácido propiônico e as interações entre inoculante microbiano e ácido propiônico e inoculante microbiano, ácido propiônico e tempo de ensilagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa (Tabela 2) entre todos os fatores avaliados (ácido, inoculante microbiano e dia) sobre o número de células viáveis de clostrídios e BAL. O tratamento com ácido propiônico e *L. buchneri* teve efeito em reduzir o número desses microrganismos, essa redução foi mais acentuada com 170 dias de ensilagem. Esse efeito tardio da inoculação com *L. buchneri* também foi observado por Schmidt et al. (2009), indicando, assim, uma maior tolerância às condições ácidas.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

A adição de ácido propiônico reduziu o número de células viáveis de leveduras, BAL e clostrídios, a aplicação desse aditivo aumentou os teores de ácido butírico e etanol na silagem (Tabela 1). A cepa de *L. buchneri* avaliada reduziu a população de leveduras e clostrídios e também o teor de etanol na silagem. Ávila et al. (2009) também observaram menor teor de etanol e redução na população de leveduras com a utilização dessa mesma cepa.

Tabela 1 Composição química e microbiológica de silagem de cana-de-açúcar tratada com propionato ou inoculante microbiano, em dois tempos de ensilagem.

Variável	TE ¹ (dias)	Média	Com inoculante		Sem inoculante		EPM ²
			Com ácido	Sem ácido	Com ácido	Sem ácido	
%MS ³	60	22,4	21,7	22,6	22,1	23,2	
	170	21,1	20,4	21,0	20,8	22,2	
	Média		21,1	21,8	21,5	22,7	0,27
%FDN ⁴	60	56,8	57,4	57,7	59,1	52,9	
	170	61,1	63,5	59,5	63,5	57,8	
	Média		60,5	58,6	61,3	55,4	1,50
Leveduras (log ufc ⁵ /g silagem)	60	5,41	4,59	6,11	4,84	6,08	
	170	4,78	3,71	5,32	4,41	5,66	
	Média		4,15	5,72	4,63	5,87	0,26
BAL (log ufc/g silagem)	60	8,58	8,46*	8,66*	8,48*	8,70*	
	170	7,85	6,91*	8,27*	7,80*	8,41*	
	Média		7,69	8,47	8,14	8,56	0,13
<i>Clostridium</i> (log ufc/g silagem)	60	8,30	8,16*	8,45*	8,05*	8,55*	
	170	7,75	6,43*	8,31*	7,83*	8,44*	
	Média		7,30	8,38	7,94	8,50	0,11
pH	60	3,91	3,85	3,98	3,87	3,95	
	170	3,92	3,85	4,00	3,85	3,97	
	Média		3,85	3,99	3,86	3,96	0,02
Ác. Lático (% MS)	60	6,75	7,07	6,09	6,56	7,27	
	170	7,22	7,56	7,14	7,03	7,14	
	Média		7,32	6,62	6,80	7,21	0,32
Ác. Acético (%MS)	60	3,68	3,85	4,01	3,14	3,73	
	170	5,30	6,96	4,95	4,89	4,39	
	Média		5,41	4,48	4,02	4,06	0,38
Ác. Propiônico (% MS)	60	2,55	5,07	0,88	3,46	0,78	
	170	3,08	4,91	1,94	4,00	1,47	
	Média		4,99	1,41	3,73	1,13	0,58
Ác. Butírico (% MS)	60	0,33	0,43	0,08	0,65	0,14	
	170	0,66	1,00	0,68	0,48	0,46	
	Média		0,72	0,38	0,57	0,30	0,16
Etanol (% MS)	60	4,62	4,92	3,28	6,49	3,80	
	170	3,89	4,12	2,97	5,57	2,88	
	Média		4,52	3,13	6,03	3,34	0,54

¹TE – tempo de ensilagem; ²EPM – erro padrão das médias; ³MS – Matéria seca; ⁴FDN – Fibra em detergente neutro; ⁵ufc – unidade formadora de colônia. *P < 0,01 – para interação entre três fatores.

Com 170 dias de fermentação, a menor população de BAL foi observada no tratamento com inoculante e ácido (6,91 log ufc/g silagem). Na silagem sem adição de inoculante ou ácido, as contagens de BAL foram altas (Tabela 1). Ressalta-se que, tanto na presença quanto na ausência do inoculante, a adição de ácido causou uma redução na contagem de BAL aos 170 dias (Tabela 1).

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

A adição de inoculante microbiano no tratamento com ácido propiônico não teve efeito na contagem total de BAL até os 60 dias da ensilagem; com 170 dias essa combinação resultou em decréscimo na população de bactérias lácticas. A justificativa para esse fato seria uma seleção de espécies, em que as cepas mais resistentes às condições ácidas, porém, com menor viabilidade ao longo da fermentação, dominaram o processo fermentativo. Nos tratamentos apenas com inoculante e apenas com ácido, foram observadas menores produções de ácido láctico, quando comparados com a silagem sem tratamento (Tabela 1).

Tabela 2 Probabilidade para os efeitos contidos no modelo

Variável	P I¹	P A²	P IxA³	P IxAxD⁴
%MS	<0,01	<0,01	0,34	0,5
%FDN	0,27	<0,01	0,05	0,24
Leveduras	0,09	<0,01	0,38	0,91
BAL	<0,01	<0,01	0,06	0,04
<i>Clostridium</i>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
pH	0,44	<0,01	0,21	0,84
Ác. Láctico	0,87	0,51	0,02	0,22
Ác. Acético	<0,01	0,11	0,08	0,32
Ác. Propiônico	0,07	<0,01	0,24	0,54
Ác. Butírico	0,31	0,01	0,78	0,32
Etanol	0,03	<0,01	0,10	0,75

¹PI=Probabilidade para o efeito de inoculante.²PA=Probabilidade para o efeito de aditivo.³PIA=Probabilidade interação entre inoculante e aditivo ⁴PIxAxD=Probabilidade interação entre inoculante, aditivo e dias de ensilagem.

CONCLUSÃO

O uso dos aditivos avaliados demonstrou ser uma estratégia plausível para reduzir a presença de microrganismos indesejáveis em silagens de cana de açúcar. A adição dessa cepa de *L. buchneri* também foi capaz de reduzir o teor de etanol nessas silagens.

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

ÁVILA, C. L. S.; PINTO, J. C.; FIGUEIREDO, H. C. P.; SCHWAN, R. F. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 384-394, Dec. 2009.

CANALE, A.; VALENTE, M. E.; CIOTTI, A. Determination of volatile carboxylic acids (C₁-C₅) and acid lactic in aqueous acid extracts of silage by high performance liquid chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 35, n. 5, p. 1178-1182, May 1984.

DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 562-567, Jan. 2002.

KUNG JUNIOR, L.; STANLEY, R. W. Effect of stage of maturity on the nutritive value of whole-plant sugarcane preserved as silage. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 54, n. 4, p. 689-696, Apr. 1982.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

KUNG JUNIOR, L.; STOKES, M. R.; LIN, C. J. Silage additives. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Wisconsin: ASA, 2003. p. 305-360.

MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **Biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcombe, 1991. 340 p.

SCHMIDT, R. J.; HU, W.; MILLS, J. A.; KUNG JÚNIOR, L. The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 10, p. 5005-5010, Oct. 2009.