

# PRESENÇA DE CLOSTRIDIUM EM SILAGEM DE MILHO COLHIDO EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO<sup>1</sup>

HUGO TOSI<sup>2</sup>, RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO<sup>3</sup> e JOSÉ PAULO RAVAZZI<sup>4</sup>

RESUMO - O milho (*Zea mays* L.) foi ensilado em sacos de polietileno em cinco diferentes estádios de maturidade e de umidade com o objetivo de determinar o número de esporos de bactérias do gênero *Clostridium* presentes. Paralelamente, foram determinados os parâmetros químicos de avaliação das silagens: teor de proteínas, matéria seca, umidade, pH e NH<sub>3</sub>/N. Pelos resultados obtidos concluiu-se que o milho apresentou teor ótimo de matéria seca para ensilagem (35%) entre 15 e 16 semanas após o plantio, no estágio de grãos farináceos. A elevada acidez da massa ensilada (pH = 3,96 - 4,10) foi responsável pela inibição da germinação dos esporos de *Clostridium* sp. presentes. O número de esporos viáveis na massa ensilada diminuiu à medida que aumentou o teor de matéria seca, com coeficiente de correlação (r = -0,7949\*\*) estatisticamente significativo.

Termos para indexação: sacos de polietileno, esporos, matéria seca, grãos farináceos, *Zea mays* L.

## PRESENCE OF CLOSTRIDIUM IN CORN SILAGE CUT AT DIFFERENT STAGES OF MATURITY

ABSTRACT - Corn (*Zea mays* L.) was ensiled in plastic bags at five maturity stages and different moisture contents with the objective of determining the number of *Clostridium* spores present. Chemical analyses were made in the silage material to determine the protein content, dry matter, moisture, pH and NH<sub>3</sub>/N. According to the results obtained, it was concluded that the corn presented an optimum level of dry matter (35%) for ensilage between 15 and 16 weeks after planting, in the stage of farinaceous grains. The high acidity of the ensiled mass (pH 3,96 - 4,10) was responsible for the inhibition of the germination of *Clostridium* sp. spores. The number of viable spores in the ensiled mass decreased with the increase of the dry matter content with the correlation coefficient (r = -0,7949\*\*) statistically significant.

Index terms: silage, plastic bags, spores, dry matter, farinaceous grains, *Zea mays* L.

## INTRODUÇÃO

No processo de ensilagem a inibição da fermentação butírica é fundamental para conservação da massa ensilada. Whittenbury et al. (1967) relataram que essa fermentação se deve às bactérias do gênero *Clostridium* que provocam a degradação de proteínas e aminoácidos, transformando-os em produtos prejudiciais à saúde animal. Os mesmos autores citaram que essas bactérias são sensíveis à pressão osmótica e, em meio úmido, toleram concentrações elevadas de ácidos orgânicos. Gordon et al. (1961) e McDonald et al. (1966) observaram que

plantas com elevado teor de umidade produzem silagens de baixa qualidade, devido às perdas de nutrientes, formação de ácido butírico e degradação protéica. A anômia é um produto final da decomposição das proteínas que contribui para elevação do pH. Miller et al. (1966) consideraram a presença dessa substância muito importante na avaliação das silagens, como indicativo da atividade de bactérias butíricas. Gordon et al. (1967) observaram que as silagens com teores de 30 a 40% de matéria seca estão sujeitas à fermentação butírica pouco pronunciada.

Este trabalho teve como objetivo determinar a presença de bactérias do gênero *Clostridium*, em amostras de milho ensilado em diferentes estádios de maturidade e umidade, e seu efeito sobre os parâmetros químicos de avaliação de silagens.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias "Campus" de Jaboticabal.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 24 de março de 1982  
<sup>2</sup> Eng.<sup>o</sup> Agr.<sup>o</sup>, Prof. Adj., Dep. de Prod. Animal, Fac. de Ciências Agrárias e Vet. "Campus" de Jaboticabal/UNESP, CEP 14870 - Jaboticabal, SP.  
<sup>3</sup> Eng.<sup>o</sup> de Alimentos, Ph.D., Dep. de Microb., Fac. de Ciências Agrárias e Vet. "Campus" de Jaboticabal.  
<sup>4</sup> Zotec., Fac. de Ciências Agrárias e Vet., "Campus" de Jaboticabal.

bal-UNESP. O milho utilizado foi o híbrido HMD 79/74, plantado em solo classificado como Latossolo Roxo, a uma distância de 1 metro entre linhas, adubado com 300 kg/ha da fórmula 4-30-16 no plantio e 200 kg/ha em cobertura com sulfato de amônio, 40 dias após emergência das plântulas.

O primeiro corte foi efetuado 90 dias após o plantio, no estágio de grãos leitosos. Os demais cortes foram realizados semanalmente até o 118<sup>o</sup> dia, perfazendo um total de cinco cortes. Por ocasião da ensilagem, foram colhidas amostras de 500 g de forragem, nas quais foram determinados os teores de matéria seca e de proteína bruta, segundo técnicas descritas no Association of Official Agricultural Chemists (1970).

Os silos foram confeccionados em sacos de plástico, com 4 kg de capacidade, armazenados durante 100 dias à temperatura ambiente. Após esse período, foram colhidas amostras de cada silo para determinação dos teores de matéria seca e de proteína bruta, segundo técnica citada anteriormente. Também foram determinados o pH e os teores de nitrogênio amoniacal, usando o método preconizado por Tosi (1973).

Para as análises bacteriológicas foram triturados 50 g de amostra de silagem em 200 ml de solução salina até a formação de uma suspensão homogênea. De cada amostra, 2 ml da suspensão foram colocados em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de enriquecimento (Manual... 1972). Em seguida, foram selados com vas-par para aumentar o grau de anaerobiose (Weiss 1957). Logo após, os tubos foram submetidos a choque térmico (80 - 85°C durante 15 minutos e resfriamento a 30°C com água corrente), para destruir microorganismos não esporulados (Ando 1973). Em seguida, foram incubados a 35-37°C durante 72 horas, observando-se o crescimento bacteriano, pela turbidez do meio e presença de gás (Bryan et al. 1971).

Com o material colhido dos tubos com crescimento bacteriano fizeram-se esfregaços em lâminas, que foram coradas pelo método de Gram, observando-se a morfologia, presença e posição de endosporos para caracterização do gênero *Clostridium*.

Nas amostras positivas de *Clostridium* foram feitas as contagens de bactérias, através de diluições em série, e semeadura de 0,1 ml em placas-de-petri contendo meio de ágar *Clostridium* incubadas anaerobicamente em jarras Gas-Pak a 35-37°C, durante 12-24 horas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são mostrados os resultados das análises das forragens utilizadas para ensilagem. O teor de matéria seca apresentou uma elevação substancial da 13<sup>a</sup> para a 17<sup>a</sup> semana, contada a partir da data do plantio do milho. A análise de variância revelou significância estatística entre os valores de-

TABELA 1. Composição da forragem colhida em diferentes estádios de desenvolvimento, contados a partir da data do plantio.

Estádios	Matéria seca %	Proteína <sup>1</sup> %
13 semanas	25,07 a	10,65 a
14 semanas	31,90 b	13,96 a
15 semanas	35,68 bc	9,14 ab
16 semanas	38,56 c	9,20 ab
17 semanas	49,76 d	8,21 b
Média	36,22	9,51
DMS	6,58	1,84
s	1,93	0,84
CV%	5,62	8,83

<sup>1</sup> Dados expressos em percentagem na matéria seca.

Médias seguidas da letra em comum na coluna não diferem estatisticamente (P < 0,5).

terminados para as diferentes idades. Verificou-se que a planta de milho alcançou teor satisfatório de matéria seca para ensilagem com 15-16 semanas após o plantio.

Coppock & Stone (1966) deram destaque ao fato de que o milho deve ser ensilado com 35% de matéria seca, pois, nesse estágio (grãos farináceos), as condições para armazenamento são ideais, com boa conservação, mínimo de perdas e um máximo rendimento agrícola de matéria seca de forragem. Segundo os mesmos autores, o teor de matéria seca está positivamente correlacionado com o consumo do alimento conservado, sendo os maiores valores obtidos com silagens de maior teor de matéria seca.

Na Tabela 2, são apresentados os resultados das análises químicas das silagens bem como a contagem de esporos de *Clostridium* presentes. Os teores de matéria seca e de proteína bruta nas silagens mostraram pequenas variações em relação aos valores determinados nas forragens.

O teor de proteína diminui progressivamente da 13<sup>a</sup> para 17<sup>a</sup> semana de idade, havendo significância estatística entre a 16<sup>a</sup> e 17<sup>a</sup> semana, devido ao acréscimo na fração fibrosa pela maior maturidade da planta (Soest 1968). Os valores médios de proteína bruta obtidos (9,51%) na forragem e (9,58%)

TABELA 2. Composição, pH, NH<sub>3</sub>/N total e contagem do número de esporos de *Clostridium* em silagem de milho cozido em diferentes estádios de desenvolvimento.

Estádios	Matéria seca %	Proteína bruta <sup>1</sup> %	NH <sub>3</sub> /N total %	pH	Nº de esporos <sup>2</sup> /g de M.S.
13 semanas	22,41 a	10,37 a	10,59 a	3,96 a	1.182.244 a
14 semanas	30,84 b	9,85 ab	8,16 a	4,00 a	543.037 ab
15 semanas	35,12 c	9,41 ab	7,22 a	4,05 a	501.886 ab
16 semanas	38,20 c	9,21 ab	5,36 a	4,09 a	248.674 ab
17 semanas	45,21 d	8,95 b	7,31 a	4,10 a	110.601 b
Média	34,36	9,58	7,73	4,04	517.288
DMS	4,22	1,29	-	-	(1,66)
s	1,93	0,59	3,46	0,08	0,76
CV%	5,62	6,18	44,76	2,07	5,97

<sup>1</sup> Dados expressos em percentagem na matéria seca.

<sup>2</sup> Número de esporos por grama de matéria seca.

Médias seguidas de letra em comum não diferem estatisticamente (P < 0,05).

nas silagens foram elevados, comparados com os resultados de outros autores que trabalharam com a mesma espécie (Azevedo et al. 1974, Tosi et al. 1975, Bertocco 1976). O fato de ser o teor protéico um pouco mais elevado do que o normal, de certa forma, veio favorecer os objetivos desta pesquisa, pois se pretendia estudar a ação de bactérias butíricas que utilizam proteína e aminoácidos como substrato para produção de ácido butírico e outros compostos (Whittenbury et al. 1967).

As silagens trabalhadas podem ser classificadas como de muito boa qualidade dentro dos parâmetros sugeridos por McCullough (1977).

O conteúdo de bases voláteis apenas superou 10% de NH<sub>3</sub>/N total na silagem produzida com a forragem mais nova; nas demais idades, os valores foram baixos e variaram de 8,16% a 7,73% com uma tendência de diminuição, correspondente ao aumento no teor de matéria seca das silagens, porém sem significância estatística.

Trabalhando com a mesma espécie, Tosi et al. (1975) obtiveram 10,47 de NH<sub>3</sub>/N total e pH de 3,87. No presente trabalho, o pH variou de 3,96 a 4,10, sem mostrar diferença estatisticamente significativa entre os vários estádios de maturidade.

O índice pH atingiu valores satisfatórios para a conservação da massa ensilada (McCullough 1977).

A elevada acidez da massa ensilada inibiu a germinação dos esporos de *Clostridium*. O número de esporos variou de 1.182.244 a 110.601/g de matéria seca, com diferença estatisticamente significativa entre os estádios de maturidade e com uma tendência de redução dos valores da 13ª para 17ª semana, à medida que houve uma diminuição na umidade da massa ensilada. Como era grande o número de esporos presentes, infere-se que estes não germinaram, permanecendo em estado de latência devido ao baixo pH alcançado. Outra evidência da inibição desses esporos foi dada pelo baixo conteúdo de nitrogênio amoniacal determinado.

Na Tabela 3, os parâmetros da forragem e das silagens foram correlacionados, podendo-se observar que poucos coeficientes apresentaram valores elevados e significativos.

A correlação entre o teor de matéria seca e o número de esporos de *Clostridium* apresentou coeficiente de correlação alto e negativo (r = -0,7949\*\*), indicando uma redução no número de esporos viáveis à medida que diminui o teor de umidade da massa ensilada.

TABELA 3. Coeficiente de correlação entre os parâmetros da forragem e da silagem.

Parâmetros	Coeficientes de correlação	
	Forragem	Silagem
Matéria seca		
Proteína bruta		-0,6975**
Matéria seca		
pH		0,6513**
% NH <sub>3</sub> /N total		-0,3675 <sup>ns</sup>
Nº de esporos		-0,7949**
Proteína bruta		-0,6476**
pH		
% NH <sub>3</sub> /N total		-0,1380 <sup>ns</sup>
Nº de esporos		-0,4222 <sup>ns</sup>
Proteína bruta		-0,1607 <sup>ns</sup>
% NH <sub>3</sub> /N total		
Nº de esporos		0,2228 <sup>ns</sup>
Proteína bruta		0,1581 <sup>ns</sup>
Nº de esporos		
Proteína bruta		0,4293 <sup>ns</sup>

## REFERÊNCIAS

- ANDO, Y. Studies on germination of spores of clostridial species capable of causing food poisoning. I. Factors affecting the germination of spores of *Clostridium botulinum* type in a chemically defined medium. *J. Food. Hyg. Soc., Japan*, 14:457-61, 1973.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, Washington, EUA. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 11. ed. Washington, 1970. 1015p.
- AZEVEDO, A.R.; COELHO SILVA, J.F. & SILVA, D.J. Estudos da digestibilidade e correlação entre os nutrientes digestíveis do capim-guatemala (*Tripsacum fasciculatum* Trin), do capim-elfante "Napier" (*Pennisetum purpureum* Schum) e das silagens de sorgo (*Sorghum vulgare* Pers) e do milho (*Zea mays* L.). *Rev. Soc. Bras. Zoot.*, Viçosa, 3(2):172-90, 1974.
- BERTOCCO, J.M. Constituintes da parede celular e digestibilidade das silagens de três variedades de milho (*Zea mays* L.). Jaboticabal, S.P., Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, "Campus" de Jaboticabal, 1976. 54p.
- BRYAN, A.H.; BRYAN, C.A. & BRYAN C.G. Bacteriologia. 6.ed., México, CECSA, 1971. 595p.
- COPPOCK, C.E. & STONE, J.B. Corn silage in the ration of dairy cattle: a review. New York, College of Agric., Cornell Miscellaneous, 1966. 36p. (Bol. 89).
- MANUAL Dehydrated culture media and reagents. 9.ed. Detroit, Michigan, DIFCO, 1972. 350p.
- GORDON, C.H.; DERBYSHIRE, J.C.; WISEMAN, H.G.; KANE, E.A. & MELIN, C.G. Preservation and feeding value of alfalfa stored as hay, haylage and direct-cut silage. *J. Dairy Sci.*, Baltimore, 44:1299-311, 1961.
- GORDON, C.H.N.; DERBYSHIRE, J.C. & NENEAR, J. R. Conservation and feeding value of low moisture orchardgrass stored in gastight and bunker silos. *J. Dairy Sci.*, Baltimore, 50:1109-15, 1967.
- MCCULLOUGH, M.E. Silage and silage fermentation. *Feedstuffs*. Mar. 49-52, 1977.
- MCDONALD, P.; WATSON, S.J. & WHITTENBURY, R. The principles of ensilage. *Misc. Publ. Edinb. Sch. Agric.*, Edinburgh, 375:1-110, 1966.
- MILLER, W.J.; CLIFTON, C.M.; FOWLER, P.R. & CAMERON, N.W. Ensiling characteristics of tift sudan and coastal bermuda grass. *J. Dairy Sci.*, Baltimore, 49:477-85, 1966.
- SOEST, P.J. van. Structural and chemical characteristics which limit the nutritive value of forage. *Forage Econ. Qual. Bull*, Madison, 13:63-76, 1968.
- TOSI, H. Ensilagem de gramíneas tropicais sob diferentes tratamentos. Botucatu, SP, Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, 1973. 107p. Tese Doutorado.
- TOSI, H.; SILVEIRA, A.C.; DE FARIA, V.P. & PEREIRA, R.L. Avaliação do girassol (*Helianthus annuus*) como planta para ensilagem. *Rev. Soc. Bras. Zoot.*, Viçosa, 1(4):39-48, 1975.
- WEISS, F.A. Maintenance and preservation of cultures. In: *MANUAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS*. London, McGraw-Hill 1957. 315p.
- WHITTENBURY, R.; MCDONALD, P. & BRYAN-JONES, G. A short review of some biochemical and microbiological aspects of ensilage. *J. Sci. Fd. Agric.*, London, 18:1441-4, 1967.