

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
LÁCTICAS NA ENSILAGEM DE PALMA FORRAGEIRA**

JOYCE PEREIRA ALVES

AREIA - PB

2018

JOYCE PEREIRA ALVES

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
LÁCTICAS NA ENSILAGEM DE PALMA FORRAGEIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Zootecnia no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de graduado em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Mauro Santos

AREIA - PB

2018

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.

A474i Alves, Joyce Pereira.
Isolamento, identificação e caracterização de bactérias lácticas na ensilagem de
palma forrageira / Joyce Pereira Alves. - Areia: UFPB/CCA, 2018.
38 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Zootecnia) - Centro de Ciências
Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2018.

Bibliografia.

Orientador: Edson Mauro Santos.

1. Palma forrageira – *Lactobacillus plantarum* 2. Ensilagem – Bactérias lácticas 3.
Cactácea – Silagem I. Santos, Edson Mauro (Orientador) II. Título.

UFPB/CCA

CDU: 636.085

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DO CURSO DE ZOOTECNIA

DEFESA DO TRABALHO DE GRADUAÇÃO

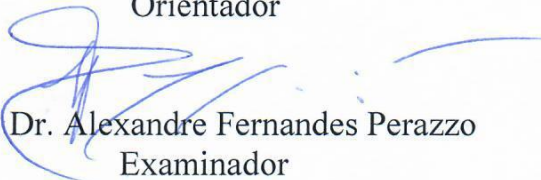
Aprovada em 02/02/2018.


**“ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTÉRIAS LÁCTICAS NA ENSILAGEM DE PALMA
FORRAGEIRA”**


Autora: **JOYCE PEREIRA ALVES**

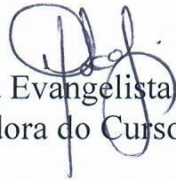
Banca Examinadora:


Prof. Dr. Edson Mauro Santos
Orientador


Prof. Dr. Alexandre Fernandes Perazzo
Examinador


Dr. Rafael de Paula Xavier de Andrade
Examinador


Josemberto Rosendo da Costa
Secretário do Curso


Profª. Adriana Evangelista Rodrigues
Coordenadora do Curso

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, com profundo amor, admiração e gratidão pela incansável presença e alicerce na realização de mais essa conquista minha.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela dádiva da vida, pelo amor incondicional, pelos planos “maiores” que os meus, por sempre está comigo e também por me presentear com todas as pessoas, grupos e instituições abaixo citados, os quais me permitiram está, nesse momento, vencendo essa etapa da minha história.

A minha família por representarem a figura da fundação de uma sólida construção a que eu posso espelhar-me e retirar todo o apoio, humildade, perseverança e amor necessário para alcançar cada um dos meus sonhos. Em especial, ao “casal 20” que mais amo, painho Reinaldo Pereira e mainha Marlene Alves pela ternura, dedicação, educação e paciência; aos meus irmãos, Juliana Alves, minha “grandalhona” mais destemida e, Jonas Alves, meu vaqueiro mais “xarope”; a minha vovó, Laureniza Calado por ser um exemplo na fé; as tias Ana Cristina e Joaquina Eliete e aos primos, em especial, Davi Fernandes pelos momentos fraternos compartilhados.

Aos amigos, minha segunda família, a quem pude contar com o ombro, momentos de descontração e dividir os risos e os choros nesses pouco mais de 4 anos de graduação, Begna, Emanuela, Kelliane (turma D6) Suany, Dornelles e Renan. A minha Best Ana Claudia, a qual eu desejo herdar um pouquinho do seu espírito aventureiro, pelo carinho, chatices, zelo e por me ensinar o significado do verbo “sonhar”. Aos colegas de curso que “moram no meu coração sem pagar aluguel” e que me provaram que a Zootecnia pode ser uma profissão ainda mais prazerosa, Janylle (mais Jackeline), Tacieli (mais Dona Célia e Tainá), José Maria, José Danrley, Ataliba, Anderson e também Alberto e Ana Paula.

Aos professores que tive o prazer de passar pelas mãos, livros, gizes, quadro negro e que compartilharam além da teoria em transmitir informações, saberes e valores morais e éticos, conduzindo-me até a chegada desta reta final do ensino superior, em especial: Núbia (pioneira), Erenilde, Maria José, Pinheiro, Joana, Luciano, Julicelly, Cíntia e, especificamente aos docentes do Centro de Ciências Agrárias (CCA) nas pessoas de Maria Betânia, Fernanda, Patrícia, Felipe, Emanuelle, Cauby e Juliana.

Ao meu orientador Professor Dr. Edson Mauro Santos pelos ensinamentos, profissionalismo, amizade e confiança em meu trabalho. Também agradeço pela grande aprendizagem e oportunidade de participar das atividades do Grupo de Pesquisa em Forragicultura (GEF).

Ao órgão Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo “saudoso” apoio financeiro às minhas pesquisas acadêmicas.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para o meu aprendizado pessoal, tratamento e recuperação da minha saúde (comunidade de Catolé do Rocha e famílias Maia e Almeida).

“Agora, portanto, permanecem estas três coisas: a fé, a esperança e o amor. A maior delas, porém, é o amor”

1 Coríntios 13:13

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. A importância da ensilagem nas regiões áridas e semiáridas	17
2.2. Uso da palma forrageira na forma de silagem	19
2.3. Características químicas da palma forrageira favoráveis e desfavoráveis à ensilagem	20
2.4. Estudo da microbiota autóctone das silagens	21
2.5. As culturas lácticas para uso como inoculante	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÕES	34
6. REFERÊNCIAS	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Testes bioquímicos para a identificação dos isolados de silagem de palma forrageira	27
Tabela 2 – Conteúdo (mg/dm ³) de ácido láctico, acético e relação ácido láctico/acético por estirpes de bactérias do ácido láctico (BAL) em suco de palma forrageira	28
Tabela 3- Identificação molecular de cepas de bactérias do ácido láctico (BAL) isoladas da planta e da silagem de palma forrageira	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – ácido acético

AL – ácido láctico

BAL – bactérias do ácido láctico

CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos

CNF – carboidratos não fibrosos

CS – carboidratos solúveis

EMEPA – Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba

EM – energia metabólica

FDN – fibra em detergente neutro

Lb. – Lactobacillus

MRS – formulações de deMan, Rogosa e Sharpe

MS – matéria seca

PB – proteína brutaPVC – policloreto de vinila

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

UFV – Universidade Federal de Viçosa

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – graus Celsius

% - percentual

cm - centímetro

CO₂ – molécula de gás carbônico

mg/dm³ – miligrama por decímetro cúbico

g – grama

ha – hectare

kg – quilograma

km - quilômetro

L – litro

mL - mililitro

mmol – milimol

mEq – mili equivalente

mm - milímetro

NH₃ – nitrogênio amoniacal

nm – nanômetro

O₂ – molécula de oxigênio

pH – potencial hidrogeniônico

ton - tonelada

ufc/g – unidade formadora de colônia por grama

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS NA ENSILAGEM DE PALMA FORRAGEIRA

RESUMO: Objetivou-se isolar, identificar e caracterizar as estirpes das culturas lácticas na ensilagem da palma forrageira a partir do fermentado da palma forrageira espécie *Nopalea cochenillifera* Salm Dyck cv. Miúda. As populações de bactérias lácticas foram quantificadas nas forragens, antes da ensilagem e nas silagens utilizando-se meio de cultura seletivo. Os dados obtidos foram agrupados e discutidos através da análise estatística descritiva. Os isolados das silagens foram classificados como bactérias gram positivas, catalase negativas e com formato de bacilos. Foram utilizadas 39 estirpes cultivadas em caldo MRS, onde destas escolheram-se as 20 melhores cepas de bactérias lácticas com base na sua capacidade de produção de ácido láctico e acético. Foram determinadas as concentrações de ácido láctico e acético, variando de 1866,62 a 186,98, 594,60 a 46,38 mg/dm³, respectivamente. Observou-se uma diversidade microbiana na ensilagem de palma forrageira, com predominância de bactérias heterofermentativas na planta, do gênero *Weissella* e bactérias homofermentativas na silagem, da espécie *Lactobacillus plantarum*. A bactéria identificada da espécie *Weissella cibaria* destacou-se, quando comparada com as demais, por produzir elevada quantidade de ácido acético e permanecer na massa ensilada após o período de fermentação. Enquanto que *Lactobacillus plantarum* foi a espécie homofermentativa predominante na silagem de palma forrageira.

Palavras-chave: cactácea, estirpes, *Lactobacillus plantarum*, silagem, *Weissella cibaria*

ISOLATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LACTIC BACTERIA IN FORAGE PALM

ABSTRACT: The objective of this study was to isolate, identify and characterize the strains of lactic cultures in forage palm (*Nopalea cochenillifera* Salm Dyck cv. Miúda) ensilage from the fermented juice. The populations of lactic bacteria were quantified before and after of the forage palm ensilage using selective culture medium. The obtained data were grouped and discussed through descriptive statistical analysis. The isolates from the silages were classified as gram positive, negative catalyses and bacilli form. Thirty-nine strains were cultivate in MRS broth and selected twenty strains based on their lactic and acetic acid production capacity. The lactic and acetic acid concentrations varied of 1866.62 to 186.98 and 594.60 to 46.38 mg/dm³ respectively. It was observed a microbial diversity in forage palm ensilage with predominance of heterofermentative bacteria (*Weissella*) and homofermentative bacteria (*Lactobacillus plantarum*) in the plant. The bacteria specie *Weissella cibaria* was featured by produce in high amount of acetic acid and remained in the silage after the fermentation period, when compared with others. *Lactobacillus plantarum* was the homofermentative specie predominant in the forage palm silage.

Key words: cactus, strains, *Lactobacillus plantarum*, silage, *Weissella cibaria*

1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta clima tropical e privilegiado no que diz respeito ao cultivo de forrageiras nativas e ou cultivadas para a alimentação animal, devido à diversidade climática que possui, com várias particularidades em cada região. O Nordeste Brasileiro, nesse aspecto, durante o período de estiagem, depara-se com dificuldades para alimentar os animais, tendo a técnica da conservação de forragem na forma de silagem, uma importante alternativa para a preservação de alimentos a serem destinados à alimentação animal.

Os custos com a alimentação animal representam a maior parte dos investimentos totais de produção. Porém, é essencial o emprego de tecnologia apropriada na produção de alimentos. Nesse sentido, as forragens conservadas podem ter seu valor nutricional bastante variado em decorrência dos procedimentos, adotados para a sua produção e conservação, e dos fenômenos bioquímicos e microbiológicos que ocorrem no processo. A resposta do animal à silagem, em geral, está sujeita ao padrão de fermentação que, por sua vez, afeta a forma do alimento, a concentração de nutrientes e a sua ingestão (JOBIM *et al.* 2007).

O processo de ensilagem pode ser compreendido como um técnica de conservação de alimentos que consiste no armazenamento da forragem em ambiente anaeróbico, com a finalidade do desenvolvimento de bactérias produtoras de ácido láctico (que promovem redução do pH e, conseqüentemente, inibição de microrganismos deletérios indesejáveis), com a utilização de substratos como açúcares solúveis e compostos nitrogenados solúveis. Geralmente, as plantas forrageiras já possuem em seu conteúdo microrganismos epífitos e o desenvolvimento de cada tipo dos mesmos derivará das condições meio ao qual foram expostos (SANTOS *et al.*, 2010). O alto teor de matéria seca, a microflora epifítica equilibrada, e a quantidade de carboidratos solúveis são características desejáveis para que ocorra um adequado processo fermentativo (SANTOS & ZANINE, 2007).

Por sua vez, a palma forrageira destaca-se por ser uma cactácea com grande potencial para utilização na dieta de ruminantes e que pode ser utilizada estrategicamente para produção de silagem. Em seu conteúdo, as altas frações de carboidratos solúveis (CS) e o baixo teor de matéria seca (MS) são fatores preponderantes à atuação de culturas microbianas indesejáveis, provocando a deterioração da massa ensilada. No entanto, no interior da sua epiderme encontram-se substâncias contidas na mucilagem, a qual é constituída de glicoproteínas, ácidos orgânicos, açúcares e outros carboidratos, que possui capacidade de retenção de água (SANTOS, 2012) e implica na baixa resistência da cactácea a queda do pH, inibindo o desenvolvimento de leveduras.

Como observado por Nogueira (2015), ao avaliar a ensilagem de palma forrageira aditivada com farelo de trigo e, ou, uréia, observaram valores de pH oscilando entre 3,8 e 4,2, dentro da faixa considerada ideal para produção de ácido láctico. De fato, observaram valores elevados do percentual de ácido láctico próximos a 100 g/kg de matéria seca de silagem. A palma utilizada no trabalho supracitado apresentava 120 g/kg de matéria seca, um teor de carboidratos solúveis de 130 g/kg de matéria seca e uma capacidade tamponante de 22 mEq/100g MS. A combinação dessas três características pode resultar em uma elevada capacidade fermentativa, sem, no entanto, desencadear fermentações alcólicas.

O estudo da microbiota de silagens de forrageiras tropicais possibilita a compreensão da dinâmica do processo de ensilagem, durante a fase de fermentação, bem como após a exposição da silagem ao ar. A prospecção de bactérias lácticas permite compreender as relações das espécies dominantes na planta e em cada fase do processo de ensilagem, possibilitando selecionar aquelas bactérias mais adaptadas com potencial de utilização como inoculante microbiano. Estudos dessa natureza são incipientes e de fundamental importância com algumas plantas forrageiras, principalmente na condição do semiárido brasileiro, e com relação à ensilagem de palma pesquisas dessa natureza são inexistentes.

Por isso, surge a necessidade de estudar as bactérias lácticas autóctones da palma forrageira, com a hipótese de que os grupos microbianos selecionados com real potencial para produção de ácidos otimizem o perfil fermentativo da ensilagem e, logo, proporcione melhorias na qualidade das silagens e sanidade animal.

Com este trabalho objetivou-se, no geral, avaliar as culturas lácticas da microbiota autóctone na ensilagem de palma forrageira e, especificadamente, isolar as estirpes de culturas lácticas presentes do processo de ensilagem de palma forrageira; identificar as estirpes de culturas lácticas isoladas; caracterizar as culturas lácticas isoladas e selecionar por meio da técnica de produção de ácidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A importância da ensilagem nas regiões áridas e semiáridas

As regiões áridas e semiáridas constituem-se de zonas dispersas por toda a superfície do globo terrestre, e 41,3% corresponde a percentagem de terras do planeta consideradas secas (hiperáridas, áridas, semiáridas ou subúmidas secas), acolhendo ainda, em média, 35,5% de toda a população mundial (UNITED NATIONS, 2011).

De acordo com o Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE, 2016), essas zonas expressam os maiores índices de pobreza, estão susceptíveis aos diversos vetores de pressão sobre os seus recursos naturais, principalmente a água, o solo e a biodiversidade e, ainda é assolada pelo processo de desertificação, oriundo da degradação da terra em consequência das mudanças climáticas e as atividades humanas.

Por sua vez, inserido no bioma caatinga, o Semiárido Brasileiro, possui uma extensão territorial de 980.133,079 km², 1.135 municípios integrantes distribuídos por oito estados da região Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe) mais o Norte de Minas Gerais, da região Sudeste e uma população de 22.598.318 habitantes, representando 11,85% da população brasileira (MEDEIROS *et al.*, 2012).

Segundo Silva *et al.*, (2010), nessa área, boa parte dos seus habitantes está envolvida diretamente à atividades agropastoris e tem seu sustento atrelado à exploração de recursos naturais existentes em suas propriedades ou no entorno destas, e ressalta-se que, apesar de ainda prevalecer sistemas agrícolas pouco eficientes e negligentes quanto à sustentabilidade, nos últimos anos o semiárido não tem se limitado exclusivamente ao segmento da produção (“dentro da porteira”) e sim, crescido para o desenvolvimento de polos agroindustriais, com destaque para a cadeia produtiva dos lácteos.

O Semiárido Brasileiro é marcado pela precipitação pluviométrica com frequente ocorrência de dias sem chuva e períodos de “seca”, em que esta variabilidade está associada a elevados valores da temperatura média anual do ar. Tais elementos climáticos são determinantes para o sucesso, ou não, da produção agropecuária, além de estarem diretamente relacionados à disponibilidade de forragem que, conseqüentemente, define o manejo dos rebanhos (CORREIA *et al.*, 2011).

Os rebanhos de pastoreio explorados extensivamente na caatinga são submetidos, a um sistema de criação fundamentado no extrativismo e, sua base alimentar, em sua maioria, é a vegetação nativa. A mesma oferece uma baixa capacidade de suporte, por sua característica caducifolia o que torna delicada o suprimento das exigências nutricionais destes e a

programação dessas atividades pelo pequeno produtor rural que almeja uma regularidade de oferta na sua produção (SALIN *et al.*, 2012).

Em contraposição à interferência climática nos sistemas de produção nessas regiões, a conservação de forragem, seja por fenação ou ensilagem, é uma estratégia bastante recomendada como principal recurso na tomada de decisão para suporte nutricional do rebanho e contornar o elevado custo desses insumos. Quando comparada com a fenação, a ensilagem é considerada mais apropriada para o semiárido, já que a água contida na forragem é conservada no processo fermentativo e colabora assim, para a dessedentação do rebanho, muito embora que a anterior apresente maiores facilidades operacionais e a ensilagem mostre-se complexa e sujeita a vários fatores, tais como a espécie forrageira (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2013). Entretanto, ressalta-se ainda que técnica da ensilagem, vantajosamente, não exige grandes investimentos e encontra-se ao alcance de pequenos produtores.

Embora não seja uma técnica muito difundida em algumas regiões, o método de ensilagem mostra-se vantajoso, pois, além de conservar o alimento, possibilita a preservação “do que há de mais valioso no período seco, a água” (MACÊDO *et al.*, 2017). Deste modo, a tradicional e milenar produção de silagem vem apresentar-se como uma opção viável à manutenção dos sistemas de forrageamento, por encurtar o tempo de carência alimentar e ainda favorecer a melhora dos índices zootécnicos do rebanho nacional (Machado *et al.*, 2011), em contraposição ao elevado custo desses insumos.

A forragem ensilada é conservada através de fermentações, submetendo-se a diversas fases, cada uma com enorme efeito na qualidade final do produto. Segundo Neiva & Neiva (2006), este processo fermentativo é constituído de cinco fases: a) fase aeróbia (durante o enchimento e fechamento do silo, prevalece a respiração celular e a utilização dos carboidratos solúveis como substrato principal); b) fase anaeróbia I (com duração de 2 a 3 dias em casos de processos bem conduzidos, caracteriza-se pelo começo do crescimento dos microrganismos adaptados ao novo meio – enterobactérias, geralmente – e pela produção de ácido acético, especialmente, de etanol, de ácido láctico e CO₂ e queda do pH); c) fase anaeróbia II (prevalece a atividade das bactérias produtoras de ácido láctico, a qual impulsiona a diminuição do pH); d) fase de estabilidade (baixa atividade de microrganismo quando a massa alcança o pH oscilando entre 3,8 a 4,2) e, e) fase de fermentações após a abertura (com a retirada da silagem, novamente tem-se o crescimento das populações de bactérias aeróbias, fungos e leveduras e deterioração do material).

2.2. Uso da palma forrageira na forma de silagem

Também conhecida como “ouro verde do semiárido”, a palma forrageira, que possui origem no período pré-hispânico no México, exerce papel de destaque na economia agrícola com sua utilização pelo homem para as mais variadas finalidades – alimentação humana, uso medicinal, indústria de cosméticos, produção de aditivos naturais e, como importante alimento dos rebanhos, independentemente da época do ano. Em cultivos bem conduzidos pode-se produzir uma biomassa superior a 150 toneladas de matéria verde/ha/ano de palma forrageira (ou 15 toneladas de matéria seca/ha/ano) e em explorações racionais, esta tem contribuição na conservação do meio ambiente e na segurança alimentar dos lotes (LOPES, 2012).

A palma apresenta grande representatividade no grupo de alimentos, fornecidos aos animais durante o período de estiagem nas regiões semiáridas, visto seu aspecto fisiológico potencial, quanto à adaptabilidade (aos rigores de climáticos das referidas zonas), sua alta produtividade, absorção, eficiência, aproveitamento e perda de água, suprimindo grande parte da água necessária para a dessedentação dos rebanhos, além ser bastante rica em mucilagem e resíduo mineral, apresentar alto coeficiente de digestibilidade da matéria seca, culminando também numa maior taxa de passagem e, assim, em um consumo semelhante ao dos concentrados, e alta produtividade. Entretanto, recomenda-se que a palma não seja fornecida aos animais de forma exclusiva, em razão de algumas limitações, quanto a sua composição químico-bromatológica, no que diz respeito ao seu conteúdo protéico e de fibra fisicamente efetiva (SILVA & SANTOS, 2007).

Em estudo da composição nutricional e a aceitabilidade de silagem mista de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) associada a feno de leguminosas (*Acacia angustissima*, *Leucaena leucocephala*, *Calliandra callothrysus* e *Macroptilium Atropurpureum*) Gusha *et al.* (2013), observaram que as silagens dessas espécies têm o potencial de contornar o déficit da alimentação dos ruminantes, especialmente nas áreas propensas à seca, pois constataram que as mesmas apresentaram oscilação 4,0 a 4,23 do pH, podendo estar atribuída a concentração elevada de açúcares solúveis da cactácea o que aumentou a concentração de íons de hidrogênio a um nível no qual as bactérias indesejáveis são inibidas e, ainda verificaram variação dos teores de MS de 37 a 43%, o que em suma constituem bons indicadores do padrão fermentativo da silagem. Além disso, as categorias de animais leiteiros utilizadas no ensaio (bovinas e ovinas) apresentaram consumo satisfatório da silagem e, destacou-se a ocorrência de nenhum problema de efeitos laxantes, pelo alto teor de água contida na

cactácea, com a adição de feno de leguminosas.

Embora a prática da utilização da silagem a base de palma não seja muito difundida no Brasil e os estudos com a conservação desta cactácea na forma de silagem sejam escassos, em outros países, tais como Zimbábue, México, na região do Marrocos na África, na província de North-West, África do Sul, Turquia, entre outros, o conhecimento acerca da mesma vem sendo propagado. Todavia vêm crescendo os estudos sobre essa temática. Albuquerque (2016) avaliando o efeito dos níveis de silagem de palma forrageira na dieta e oferta intermitente de água para caprinos confinados concluiu que a silagem de palma representa uma importante fonte de água para os animais submetidos às condições de oferta intermitente de água até 48 horas e pode ser incluída na proporção de até 42% da MS em dietas para caprinos sem afetar o desempenho e o consumo de MS, favorecendo o aumento da digestibilidade de grande parte dos nutrientes e sem prejudicar os parâmetros sanguíneos.

Tanto do ponto de vista produtivo dos palmais, como da conservação do valor nutricional da forrageira, a ensilagem da palma proporcionaria a maximização do uso dos recursos naturais encontrados no Semiárido Brasileiro, possibilitando aos agropecuaristas uma nova alternativa de conservação de alimentos ricos em água e energia, o que agrega mais valor à cactácea nas regiões áridas e semiáridas. Além disso, a ensilagem de palma permitiria a colheita de todo o palmal, uniformizando e aumentando a capacidade de rebrotação, e, conseqüentemente a produtividade, além de diminuir a mão-de-obra com colheita e fornecimento periódico, ao longo do período de estiagem.

2.3. Características químicas da palma forrageira favoráveis e desfavoráveis à ensilagem

Um aspecto a ser avaliado no processo de ensilagem da palma forrageira está relacionado ao seu percentual de carboidratos solúveis. A palma é uma forrageira que possui concentração elevada de polissacarídeos pécnicos e essas pectinas são açúcares esterificados ricos em galactose, arabinose, xilose e frutose (HABIBI *et al.*, 2004). Ribeiro *et al.* (2010) mostraram em estudo da composição de carboidratos contidos na *Opuntia ficus-indica* a presença, principalmente, de glicose, frutose, galactose, xilose, e arabinose nos cladódios de palma forrageira em diferentes períodos do ano. Esses açúcares podem ser utilizados como substratos durante o processo de fermentação pelas bactérias lácticas, possibilitando uma fermentação ideal da massa ensilada.

Da Silva *et al.*, (2015) avaliando as características físicas, químicas e bromatológicas de palma gigante (*Opuntia ficus-indica*) e miúda (*Nopalea cochenillifera*) oriundas do estado

da Paraíba, encontraram para os conteúdos de sólidos solúveis, pH, umidade, MS, cinzas, cálcio, fósforo, proteína total, fibra bruta e lipídeos totais para a palma miúda as concentrações 5,60%; 4,70; 89,67%; 10,33%; 1,17%; 7,20%; 0,10%; 0,86%; 1,37% e 0,27%, respectivamente.

Pesquisando sobre o valor nutricional dos cladódios da *Opuntia ficus-indica*, Rodrigues *et al.* (2016), verificaram que essa *Opuntia* apresentou um baixo teor de MS, proteína bruta (PB) fibra em detergente neutro (FDN) e alto teor de carboidratos não fibrosos (CNF) e energia metabólica (EM). Os níveis de MS, FDN, PB e minerais variaram de 14,58% \pm 1,14 para 12,85% \pm 1,62, 164,67 \pm 16,12 g/kg MS para 198,99 \pm 13,35 g/kg MS, 68,01 \pm 5,11 g/kg MS e 82,52 \pm 9,55 g/kg MS respectivamente. Çürek & Özen (2004) e Gusha *et al.* (2013), observaram valores de pH de silagem de palma de 3,8 e 4,0, respectivamente.

Todavia, em decorrência da baixa concentração de matéria seca e dos elevados valores de carboidratos solúveis no conteúdo da palma forrageira, subteve-se uma predisposição à ocorrência de fermentação alcoólica. Contudo, a presença de substâncias tamponantes e da mucilagem (carboidrato complexo com potencial hidrocolóide) (SÁENZ *et al.*, 2004), por exemplo, pode controlar o desenvolvimento de leveduras, através do tamponamento da massa ensilada, diminuindo a movimentação da água, favorecendo a produção de ácido láctico e, assim, diminuindo as perdas por efluentes durante a ensilagem.

Nogueira (2015) avaliando o perfil fermentativo e a composição química de silagens de palma forrageira enriquecidas com fontes proteica, energética e fibrosa, após o rompimento das células vegetais do cladódio observou a formação de gel emulsificante com propriedade de absorção de água, consequentemente acarretando em baixas perdas por efluentes entre 22 e 25 kg/ton de matéria natural, próximas aos encontrados por Oliveira *et al.* (2010) em silagens de milho, sorgo e girassol.

2.4. Estudo da microbiota autóctone das silagens

A fermentação pode ser compreendida como um processo facultativo de obtenção de energia utilizado por alguns microrganismos, dentre eles, bactérias anaeróbias obrigatórias e aeróbias, incluindo nesse último grupo alguns tipos de fungos (leveduras). Dentre os fatores intrínsecos das plantas forrageiras, responsáveis pelo bom padrão de fermentação no silo está a população epífita original das plantas (JOBIM & NUSSIO, 2014), sujeita à influência dos fatores ambientais e com variação conforme a composição da planta, especificadamente,

podendo interferir diretamente nos processos bioquímicos e microbiológicos desde o momento da colheita da forragem até o fornecimento da silagem ao animal.

Geralmente, as plantas forrageiras são colonizadas por microrganismos autóctones e o desenvolvimento de cada tipo deste estar preso às condições encontradas no meio, em especial, a presença ou ausência de O₂ no interior do silo, durante a ensilagem, mesmo que de forma temporária. Por sua vez, as bactérias ácido lácticas (BALs) são os principais microrganismos influentes no processo fermentativo para a conservação das forrageiras. (SANTOS *et al.*, 2010).

As BALs, constituem um conjunto de bactérias (dos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*) comumente encontrados na silagem (Pahlow *et al.*, 2003). Elas dominam a fermentação da massa ensilada a partir de estabelecidas condições anaeróbias no silo. Como se dá seu domínio não é exatamente compreendido, porém, pode apenas depender do rápido crescimento em condições anaeróbias (MUCK, 2010). Sendo o principal objetivo da ensilagem a otimização da preservação original dos nutrientes oriundos na forragem fresca, durante o armazenamento, com o menor número de perdas de MS e energia, uma população adequada BAL, nesse sentido, é essencial para promover uma boa produção de ácido láctico, garantindo uma diminuição mais rápida no pH e inibindo a proliferação de microrganismos deletérios à silagem, tais como enterobactérias, bactérias clostrídicas e outros (PEREIRA *et al.*, 2007).

2.5. As culturas lácticas para uso como inoculante

Os inoculantes compreendem o grupo de aditivos dominantes de silagens. Estes agem complementando a cultura a ser ensilada com estirpes selecionadas de bactérias do ácido láctico existentes naturalmente na colheita e auxilia a obter uma fermentação consistente no silo. O padrão comercial de inoculante de silagem geralmente contém uma ou mais espécies de bactérias homofermentativas. *Lactobacillus plantarum* é a espécie mais comum usada. Todavia, *Lactobacillus casei*, e outras espécies de *Pediococcus* e *Enterococcus faecium* são podem ser incluídas nestes produtos. Recentemente, a espécie heterofermentativa *Lactobacillus buchneri*, começou a ser comercializada isoladamente ou em combinação com espécies homofermentativas (MUCK, 2010).

Destaca-se como importante função dos aditivos, a promoção de uma fermentação desejável e/ou a inibição da fermentação indesejável da forragem ensilada provocada pelo crescimento de microrganismos formadores de ácido acético, ácido butírico e álcool,

causadores de perdas significativas na qualidade da forragem. As alterações durante o processo de fermentação de silagens quando feita a aplicação de aditivos podem modificar a composição final do alimento e comprometer o consumo de MS e da digestibilidade de nutrientes. Diferentes aditivos químicos tem sido utilizados em silagens com finalidades distintas, tais como a uréia, o carbonato de cálcio, benzoato de sódio, pirossulfito de sódio, hidróxido de sódio, ácido fórmico e o formol (NEUMANN *et al.*, 2010).

Os inoculantes microbianos compreendem as bactérias homofermentativas, heterofermentativas, ou a combinação destas. Os microrganismos homofermentativos diferenciam-se, principalmente, pela mais rápida taxa de fermentação, e o metabolismo quase que na sua totalidade voltado para a produção de ácido láctico, no qual, os heterofermentativos são caracterizados pela utilização do ácido láctico e glicose como substrato para produção de ácido acético e propiônico. Pela especificidade entre a planta e sua microflora epifítica, tem-se buscado isolar e identificar os principais grupos microbianos atuantes no processo de ensilagem e, avaliar o efeito das BALs na fermentação das silagens, tendo em vista que não existe um padrão das respostas e sim a relação de interdependência da cultura utilizada, da estirpe do microrganismo e da sua concentração no momento da inoculação (SILVA *et al.*, 2011).

Uma gama de pesquisas têm sido desenvolvidas com a finalidade de avaliar o uso de inoculantes microbianos. Sabe-se que quando comparada à população microbiana encontrada durante o processo de fermentação ou na silagem, a microbiota da cultura forrageira antes da ensilagem é alterada completamente, seja em número ou taxonomicamente. Foi evidenciado que a inoculação do *Lactobacillus plantarum* da microbiota autóctone em silagem de capim-mombaça tem papel positivo no desenvolvimento de bactérias lácticas e promove menores perdas de matéria seca na silagem de capim-mombaça, melhorando o perfil fermentativo, segundo os valores de pH, NH₃, ácido láctico e ácido acético (PENTEADO *et al.*, 2007).

Segundo Carvalho *et al.*, (2014), os variados comportamentos das cepas de BAL durante a fermentação de carboidratos e durante todo o período de ensilagem reforçam a importância da utilização de estirpes específicas para cada forrageira. Ainda de acordo com os resultados dos mesmo autores, em avaliação ao perfil microbiológico e químico de fermentação da silagem de cana-de-açúcar inoculada com cepas de bactérias lácticas, as silagens inoculadas com cepas de *Lb. plantarum* produziram maiores concentrações de ácido láctico do que as silagens inoculadas com cepas de *Lb. brevis* e *Lb. hilgardii*.

A respeito da ensilagem de palma forrageira e de sua grande contribuição para a segurança alimentar dos rebanhos, faz-se necessário viabilizar o uso de inoculantes para

ensilagem desta, que tem sua utilização dificultada pela não compatibilidade da cultura láctica com a espécie em estudo, além da ausência do potencial de crescimento e antimicrobiano dessas culturas decorrentes da inexistência de pesquisas dessa natureza voltadas para a palma.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nas dependências do setor de Forragicultura, pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), situada em Areia-PB. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Forragicultura e Microbiologia da Silagem da Universidade Federal de Viçosa (UFV), situado em Viçosa-MG.

Foram utilizadas amostras da planta inteira de palma forrageira da espécie *Nopalea cochenillifera* Salm Dyck cv. Miúda, obtidas da Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA-PB), no município de Tacima-PB, com uma idade de rebrota de dois anos. Foram colhidos todos os cladódios, preservando-se um apenas a planta mãe junto com o cladódio primário por planta.

As plantas foram processadas em uma fatiadora com sistemas de navalhas, que permite processar os cladódios em cubos de 2 x 2 cm, e em seguida, ensiladas em silos experimentais (três por tratamento). Os silos onde o material de estudo foi ensilado foram confeccionados em material de policloreto de vinila (PVC) com 15 cm de diâmetro e 40 cm de altura, providos de tampas permitindo vedação adequada. Nas tampas foi realizado um pequeno orifício, onde adaptou-se uma mangueira de borracha com um corte longitudinal, formando uma válvula tipo *Bunsen*, para permitir o escape dos gases resultantes da fermentação.

O tempo de abertura dos silos foi de trinta dias e as populações de bactérias lácticas foram quantificadas nas forragens, antes da ensilagem e nas silagens utilizando-se meios de cultura seletivos – MRS Ágar (baseado nas formulações de deMan, Rogosa e Sharpe), contendo 0,1% de cisteína-HCl e 0,4% de ciclohexamida 0,4%.

As estirpes de bactérias lácticas foram isoladas a partir de amostras das plantas de palma forrageira e do processo fermentativo. Uma fração de 25g do material ensilado foi homogeneizada em 225mL de “*Ringer’s solution*” estéril, obtendo-se a diluição 10^{-1} , usada para as diluições subsequentes (10^{-2} a 10^{-10}). Alíquotas de 1mL de cada diluição foram utilizadas para o plaqueamento pelo método “*pour-plate*”, em meio de cultura ágar MRS. Cada plaqueamento foi realizado em duplicata e as placas incubadas de acordo com o procedimento supracitado.

A enumeração dos grupos microbianos foi realizada a partir de 25g de uma amostra de cada silo (KUNG JUNIOR, 1996). Em seguida, diluições sucessivas foram realizadas, objetivando-se obter diluições variando de 10^{-1} a 10^{-10} e o cultivo realizado em placas de Petri estéreis. As placas foram incubadas a 30°C durante 48 horas sob condições de anaerobiose. O número de colônias selecionadas correspondeu à raiz quadrada do número total de colônias

nas placas contendo de 30 a 300 unidades formadoras de colônias por grama do material (ufc/g) e retiradas aleatoriamente para identificação, sendo purificadas em Agar MRS (ÁVILA *et al.*, 2014). Em seguida, foram realizadas duas estrias sucessivas em placas contendo meio MRS, para reisolamento e obtenção de culturas puras. As culturas lácticas que mais cresceram e apresentaram resultado positivo para a produção de ácido foram submetidas ao teste da catalase, coloração diferencial de Gram e análise microscópica para avaliar a presença de contaminantes. As culturas puras dos isolados foram congeladas a -20°C no mesmo meio de cultivo *in vitro*, acrescido de 20% de glicerol, para realização dos testes de identificação e caracterização.

Foram cultivadas 40 estirpes, as 20 primeiras isoladas da planta e as 20 demais isoladas da silagem, em caldo MRS durante 24 horas a 35°C . Após este período, o inóculo foi padronizado usando um espectrofotômetro (600 nm) a uma óptica densidade de 1,0. Subsequentemente, cerca de 500g/L de cada estirpe foi utilizada para preparação do suco da palma forrageira (extrato aquoso para fermentação obtido por meio de picagem e trituração da cactácea com o auxílio de um liquidificador doméstico), do qual foi homogeneizado em 2 litros da água destilada que e incubada a 35°C . Foram escolhidas as 20 melhores cepas de BAL com base na sua capacidade de produção de ácido láctico e acético, sendo selecionadas as 10 cepas que produziram maior quantidade de ácido láctico e 10 que produziram maior quantidade de ácido acético.

O DNA dos isolados foi extraído com a utilização de kit comercial (Wizard Genomic DNA Purification kit, Promega, Madison, USA), com modificações em alguns passos do protocolo. Os isolados foram cultivados em 5mL de caldo MRS e incubados a 37°C por 14 horas. A cultura crescida foi centrifugada (Mikro 200 R, Hettich) a 10.000 g por 5 minutos, e em seguida lavada uma vez com solução salina 0,85 %. O sedimento de células obtido foi ressuspensionado em 480 μL de EDTA (50mm) e imediatamente adicionado 50 μL de lisozima a 50mg mL⁻¹. A partir desta etapa o procedimento de extração de DNA foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração de DNA extraído foi avaliada em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific 2000) e estocado a -20°C .

A região codificadora do rDNA 16S foi amplificada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Dois microlitros do DNA diluído foram utilizados como template para as reações da PCR. Os primers utilizados na PCR foram p027F (GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT) (HEUER *et al.*, 1997). A reação PCR foi realizada em tubos de microcentrífuga de capacidade de 0.2mL contendo 50 μL da mistura de reação: DNA (aproximadamente 60 ng); tampão 10X

(Tris-HCl 0,1 mol l⁻¹, pH 8,0, KCl 0,5 mol l⁻¹); MgCl₂ 1,5 mmol l⁻¹, pH8,0); dNTP mix (Promega, Madison WI USA); Taq polimerase (Promega, Madison, USA) (1 U); primer p027f (0,6 μmol l⁻¹) e 1492 (0,6 μmol l⁻¹). O volume da mistura de reação foi completado para 50 μL com água milli-Q autoclavada. A PCR foi realizada em termociclador (Eppendorff), e as condições de reações empregadas foram: 94°C/5 minutos; 30 ciclos (desnaturação: 94°C/30 segundos; 60°C por 30 segundos); polimerização: 72°C/2 minutos; extensão final: 72°C/5 minutos. Uma alíquota de 4 μL da mistura de reação PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose (1,4 %) em tampão de Tris Borato EDTA (TBE). O gel foi corado com 0,5 μg mL⁻¹ de brometo de etídio e as bandas foram visualizadas sobre iluminação UV. O produto PCR obtido foi encaminhado à empresa Macrogen, na Coreia, para purificação e sequenciamento das amostras.

As sequências obtidas de cada isolado foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados do GenBank, e alinhadas usando o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos. As sequências do gene rRNA 16S que apresentaram similaridade igual ou maior que 97% foram consideradas como pertencentes a uma mesma Unidade Taxonômica Operacional (UTO) (ALTSCHUL *et al.*, 1990). O método de Neighbor-joining (SAITOU & NEI, 1987) foi utilizado para reconstrução da árvore filogenética. O *Bacillus subtilis* NCDO 1769 foi utilizado como organismo pertencente ao grupo externo (DUAN *et al.*, 2008). A topologia da árvore foi avaliada pela análise de bootstrapping das sequências baseada em 1000 repetições. As sequências de nucleotídeos para o gene rRNA 16S descritas neste estudo foram depositadas no GenBank.

Os dados obtidos foram agrupados e discutidos através da análise estatística descritiva e os valores numéricos quantitativos organizados através de tabelas, calculadas a partir de dados populacionais como medidas descritivas de assimetria.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados dispostos na (Tabela 1), dos 40 isolados provenientes palma e do processo fermentativo da silagem, quanto à coloração de gram, todos isolados foram classificados como gram positivos, apresentando coloração azulada. No que diz respeito à prova bioquímica de catalase, todos isolados reativados, foram classificados como catalase negativos, não sendo constatado o borbulhamento ou efervescência em decorrência à liberação do oxigênio pela ausência da enzima catalase. De forma geral, as culturas puras apresentaram formato de bacilos, arranjados em cadeias ou aglomerados, aos pares ou irregulares.

Esses resultados assemelham-se aos de Ávila (2007), quando avaliou o isolamento e uso de *Lactobacillus buchneri* na ensilagem de capim-mombaça e cana-de-açúcar e obteve todos seus 72 isolados das silagens de cana classificados como bactérias gram positivas, com forma de bacilo, catalase, oxidase e motilidade negativas. De fato, o meio MRS mostra-se amplamente seletivo para culturas lácticas.

Tabela 1 – Testes bioquímicos para a identificação dos isolados de silagem de palma forrageira.

Identificação BAL	Formato	Arranjo	Coloração de Gram	Prova de catalase
1	Bacilo	¹ Nd	Gram +	Negativo
2	Bacilo	Nd	Gram +	Negativo
3	Bacilo	² G. aos pares em cadeia	Gram +	Negativo
4	Bacilo	Nd	Gram +	Negativo
5	Bacilo	³ P. aos pares em cadeia	Gram +	Negativo
6	Bacilo	G. aos pares em cadeia	Gram +	Negativo
7	Bacilo	Aos pares em cadeia	Gram +	Negativo
8	Bacilo	Aos pares em cadeia	Gram +	Negativo
9	Bacilo	Esferas irregulares	Gram +	Negativo
10	Bacilo	Aos pares em cadeia	Gram +	Negativo
11	Bacilo	Aos pares	Gram +	Negativo
12	Bacilo	Aos pares	Gram +	Negativo
13	Bacilo	Aos pares	Gram +	Negativo
14	Bacilo	Nd	Gram +	Negativo
15	Bacilo	Nd	Gram +	Negativo
16	Bacilo	Aos pares	Gram +	Negativo
17	Bacilo	Nd	Gram +	Negativo
18	Bacilo	Nd	Gram +	Negativo
19	Nd	Nd	Gram +	Negativo
20	Bacilo	Nd	Gram +	Negativo
21	Bacilo	Nd	Gram +	Negativo
22	Bacilo	Nd	Gram +	Negativo
23	Bacilo	Curtos	Gram +	Negativo
24	Bacilo	Aglomerados	Gram +	Negativo
25	Bacilo	Aglomerados	Gram +	Negativo
26	Bacilo	Aglomerados	Gram +	Negativo
27	Bacilo	Nd	Gram +	Negativo
28	Bacilo	P. em cadeia	Gram +	Negativo
29	Bacilo	Pequenos	Gram +	Negativo
30	Bacilo	Aglomerados	Gram +	Negativo
31	Bacilo	Nd	Gram +	Negativo
32	Bacilo	Nd	Gram +	Negativo
33	Bacilo	Nd	Gram +	Negativo
34	Bacilo	Nd	Gram +	Negativo
35	Bacilo	Bem pequenos	Gram +	Negativo
36	Bacilo	Nd	Gram +	Negativo
37	Bacilo	Nd	Gram +	Negativo
38	Bacilo	P.aglomerados	Gram +	Negativo
39	Bacilo	P. aglomerados	Gram +	Negativo
40	Bacilo	P. aglomerados	Gram +	Negativo

1 = não definido; 2.= grandes; 3.= pequenos;

1 a 20 = isoladas da planta.

21 a 40 = isoladas da silagem.

Após preliminar diferenciação das espécies bacterianas, no teste de fermentação do suco da palma forrageira, na (Tabela 2) observou-se a concentração de ácido láctico, acético e de pH e a relação ácido láctico/acético para as variadas estirpes de bactérias lácticas da microbiota autóctone da palma forrageira.

Tabela 2 – Conteúdo (mg/dm³) de ácido láctico, acético e relação ácido láctico/acético por estirpes de bactérias do ácido láctico (BAL) em suco de palma forrageira.

Estirpe BAL	Ácido láctico	Ácido acético	pH	Láctico/Acético
1 ¹	206,40	570,83	4,79	0,36
2 ¹	885,17	594,60	4,84	1,49
3 ¹	1180,99	451,38	4,89	2,61
4 ¹	1171,44	355,26	5,24	3,29
5 ¹	1097,54	136,98	4,59	8,01
6	1272,38	267,77	5,06	4,75
7 ¹	935,49	46,38	4,85	20,17
8	536,22	192,13	4,94	2,79
9	186,98	134,62	4,94	1,39
10 ¹	2042,05	240,50	5,14	8,49
11	1184,32	207,69	4,97	5,70
12	906,43	212,87	5,02	4,26
13	1027,02	90,84	5,01	11,30
14	446,09	189,35	4,97	2,35
15 ¹	947,22	532,96	7,82	1,78
16	1064,66	100,36	4,47	10,61
17	1074,73	158,79	4,81	6,77
18 ²	1042,32	73,63	4,44	14,16
19 ¹	960,81	133,04	4,65	7,22
20	421,38	207,11	4,95	2,03
21 ²	1604,99	82,29	4,35	19,50
22 ²	1316,39	69,75	4,36	18,87
23 ²	1450,64	64,71	4,35	22,42
24 ²	1672,25	77,37	4,35	21,61
25	1497,57	49,30	4,43	30,37
26 ¹	1317,07	485,03	4,37	2,71
27	1636,46	93,03	4,31	17,59
29	1866,62	114,57	4,44	16,29
30 ²	1511,13	71,04	4,34	21,27
31 ²	1419,78	67,24	4,36	21,11
32 ²	1296,65	110,75	4,39	11,71
33	1282,88	97,52	4,38	13,15
34	1365,88	112,42	4,37	12,15
35	1423,10	95,40	4,38	14,91
36	1401,22	89,56	4,37	15,64
37 ²	1680,59	72,73	4,41	23,11
38 ²	1409,94	73,71	4,39	19,13
39 ²	1627,51	81,25	4,36	20,03
40	1503,11	79,99	4,33	18,79

1 = As estirpes mais produtoras de ácido acético; 2 = As estirpes mais produtoras de ácido láctico.

1 a 20 = isoladas da planta.

21 a 40 = isoladas da silagem.

Dos 40 isolados de BAL, um (1) não apresentou crescimento nas condições do meio e, dos demais, os valores de ácido láctico e acético apresentaram variação de 1866,62 a 186,98, 594,60 a 46,38 mg/dm³, respectivamente. A relação entre ácido láctico e acético variou de 0,36 a 30,37 e apresentou-se maior para as BAL homofermentativas isoladas da silagem, via de regra.

As BAL são bactérias gram-positivas, não produzem esporos e o resultado do seu metabolismo é a maior produção de ácido láctico, mas algumas cepas podem produzir mais ácido acético (REINA ASA *et al.*, 2010). Como as hexoses e pentoses (açúcares) constituem a fonte de energia para esses microrganismos, os mesmos são classificados como, homofermentativo, heterofermentativo facultativo e obrigatório. No que se refere aos inoculantes microbianos oriundos de BAL homofermentativas, ao produzir quase que na sua totalidade ácido láctico, implica na diminuição do pH, todavia, no caso de silagens com baixa estabilidade aeróbia, faz-se mais eficiente a utilização de um inoculante de BAL heterofermentativa, pela produção de ácido acético, atuando no controle de fungos e leveduras (CARVALHO *et al.*, 2014).

Como esperado, o desenvolvimento das BAL, a partir de substratos como açúcares solúveis, ácidos orgânicos e compostos nitrogenados solúveis evidenciou o resultado em que as cepas que produziram mais ácido láctico apresentaram um menor pH do meio, variando de 4,35 a 4,44, enquanto que as que mais produziram ácido acético, apresentaram um maior pH, oscilando de 4,37 a 7,82. Como relatado por Gusha *et al.* (2013), as concentrações de pH da silagem de *Opuntia ficus-indica* foram propostas dentro do considerado bom, no que diz respeito aos indicadores da qualidade do produto conservado, oscilando de 3,97 para 4,11, considerando que o baixo pH inibe atividades microbianas indesejáveis.

Após a seleção das 20 cepas de BALs mais produtoras de ácidos estão dispostas na Tabela 3 a identificação genômica destas.

Tabela 3 - Identificação molecular de cepas de bactérias do ácido láctico (BAL) isoladas da planta e da silagem de palma forrageira

Cepas	Espécies	Código ¹ NCBI	% de identificação
GP1	<i>Weissella confusa</i>	XWEDU6KA015	99
GP2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	XWK3VBWV015	96
GP3	<i>Weissella confusa</i>	XWJZWCY4014	99
GP4	<i>Weissella paramesenteroides</i>	XWG4J3Y4014	99
GP5	<i>Weissella confusa</i>	XWJVYX6XD14	98
GP7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	XWGSB8M4015	98
GP10	<i>Weissella confusa</i>	XWG9P2BX01R	97
GP15	<i>Weissella paramesenteroides</i>	XWEKSX3M014	97
GP18	<i>Lactobacillus plantarum</i>	XWHHGDBV015	98
GP19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	XWGDW63601R	99
GP21	<i>Lactobacillus plantarum</i>	XWJ8WKAV015	98
GP22	<i>Lactobacillus plantarum</i>	XWJ5A2F7014	99
GP23	<i>Lactobacillus plantarum</i>	XWJN6V6S01R	98
GP24	<i>Lactobacillus plantarum</i>	XWJH0MTE015	98
GP26	<i>Weissella cibaria</i>	XWGY2HDT01R	97
GP30	<i>Lactobacillus plantarum</i>	XWE854EZ014	98
GP31	<i>Lactobacillus plantarum</i>	XWJD8VB801R	99
GP37	<i>Lactobacillus plantarum</i>	XWHRW4FN015	98
GP38	<i>Lactobacillus plantarum</i>	XWJ0PVEH014	96
GP39	<i>Lactobacillus plantarum</i>	XWHDNH33014	98

1= Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (National Center for Biotechnology Information)

*Cepas com numeração entre 1 e 20 = isoladas da planta.;

21 a 40 = isoladas da silagem.

Neste estudo, os principais isolados identificados pertencem às espécies *Lactobacillus plantarum* (13), *Weissella confusa* (4) *Weissella paramesenteroides* (2) e *Weissella cibaria* (1). Destacou-se a cepa GP26, identificada como sendo pertencente à espécie *Weissella Cibaria*, a de maior potencial para uso como inoculante bacteriano produtor de ácido acético, pois trata-se de um microrganismo heterofermentativo, isolado da própria silagem (onde esperava-se que este estivesse presente na planta), com grande produção de ácido acético, e, especialmente, por permanecer ativo na silagem, em ambiente de baixo pH. A sobrevivência desse microrganismos a acidez o caracteriza como potencial inoculante heterofermentativo e sua importância está atribuída à inibição de leveduras e fungos e aumento da estabilidade aeróbia, principalmente no momento da abertura dos silos. Também sobressaiu-se a GP18, da espécie *Lactobacillus plantarum*, uma bactéria homofermentativa, isolada da própria planta, por possuir tendência a crescer rapidamente e ter produzido grande quantidade de ácido láctico. Nessas condições, ela seria considerada uma cultura apta para promover rápida acidificação da massa ensilada, muito importante para aumentar a população microbiana inicial autóctone, reduzir o desenvolvimento de enterobactérias e clostrídios e perdas de MS.

O inoculante de silagem tipo padrão comercializado durante várias décadas contém uma ou mais espécies homofermentativas de bactérias do ácido láctico. O *Lactobacillus plantarum* é a espécie mais comum utilizada (MUCK, 2010). Silva (2014) em estudo da bioprospecção de bactérias lácticas e utilização de isolados bacteriocinogênicos como inoculante em silagem de alfafa identificou semelhantemente a este experimento bactérias da espécie *Lactobacillus plantarum*, *Weissella cibaria*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus casei*; a autora ainda ressalta que as condições que predominam durante o processo fermentativo (pH, baixa concentração de oxigênio, etc) significativamente não afetam o crescimento da espécie *L.b plantarum*, devido sua resistência a várias condições de estresse, tais como, o estresse ácido, que permite proteção a sua viabilidade.

Ávila *et al.* (2014), em estudo da utilização de lactobacilus como culturas iniciais para otimizar a qualidade da silagem da cana-de-açúcar, identificou as cepas, após a seleção com base na produção de ácido acético, láctico e propiônico, como pertencente às seguintes espécies isoladas da própria planta: *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* e *Lb. hilgardii*.. Quando inoculada a silagem de cana de açúcar, apresentou melhor resultado com a adição das cepas heterofermentativas obrigatórias, em termos de recuperação de MS, estabilidade aeróbia e perfil fermentativo, do que quando comparada às heterofermentativas facultativas.

Espera-se, com o emprego das culturas lácticas isoladas da palma, que apresentaram maior potencialidade para uso como inoculante microbiano, resultados semelhantes aos supracitados sejam obtidos, obtendo-se melhorias do perfil fermentativo, diminuição das perdas por gases, efluentes e maior recuperação de matéria seca da silagem de palma forrageira, como também incremento da estabilidade aeróbia das silagens.

5. CONCLUSÕES

Observou-se uma diversidade microbiana na ensilagem de palma forrageira, com predominância de bactérias heterofermentativas na planta, do gênero *Weissella* e bactérias homofermentativas na silagem, da espécie *Lactobacillus plantarum*.

A bactéria identificada como sendo da espécie *Weissella cibaria* (GP26), isolada da silagem, destacou-se, quando comparada com as demais heterofermentativas, pelo seu maior potencial de uso como inoculante microbiano autóctone, enquanto que a espécie de *Lactobacillus plantarum* (GP18), isolada da planta, se sobressaiu, no grupo das homofermentativas.

Maiores testes são necessários para verificar os efeitos da adição destas cepas com potencialidade para uso como inoculante bacteriano na produção de silagem da palma e, posteriormente, estudos para utilização das mesmas na conservação de demais forrageiras.

6. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, I. R. R. **Silagem de palma na dieta de caprinos submetidos a ofertas intermitentes de água**. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, 2016. Disponível em: <https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=4216276>. Acesso em: 29 dez. 2017.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283605803602>>. Acesso em: 14 out. 2017.
- ÁVILA, C.L.S.; CARVALHO, B.F.; PINTO, J.C.; DUARTE, W.F.; SCHWAN, R.F. The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 940-951, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030213008485>>. Acesso em: 14 out. 2017.
- ÁVILA, C.L.S. **Isolamento e uso de *Lactobacillus buchneri* na ensilagem de capim-mombaça e cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- CARVALHO, B. F.; ÁVILA, C. L. S.; PINTO, J. C.; NERI, J.; SCHWAN, R. F. Microbiological and chemical profile of sugar cane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, v.195, p. 1-13. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840114001230>>. Acesso em: 12 out. 2017.
- Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). Desertificação, degradação da terra e secas no Brasil – Brasília, 2016. Disponível em: <<https://www.cgee.org.br/documents/10195/734063/DesertificacaoWeb.pdf>> Acesso em: 14 out. 2017.
- CORREIA, R. C.; KIILL, L. H. P.; MOURA, M. S. B. de; CUNHA, T. J. F.; JESUS JUNIOR, L. A. de; ARAUJO, J. L. P. A região semiárida brasileira. Embrapa Semiárido, 2011. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/916891/a-regiao-semiarida-brasileira>>. Acesso em: 14 out. 2017.
- ÇÜREK, M.; ÖZEN, N. Feed Value of Cactus and Cactus Silage Research Article Mustafa. **Turk J Vet Anim Sci**, v. 28, p. 633–639, 2004. Disponível em: <<http://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/issues/vet-04-28-4/vet-28-4-1-0111-5.pdf>>. Acesso em: 03 dez. 2017.
- DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.E.; SHARPE. A medium for the cultivation of lacto-bacilli. **Journal Applied Bacteriology**, 23, p. 130-135, 1960.
- DUAN, W.; GU, B.; WHINSTON, A. B. The dynamics of online word-of-mouth and product sales—An empirical investigation of the movie industry. **Journal of retailing**, v. 84, n. 2, p. 233-242, 2008. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022435908000171>>. Acesso em: 14 out. 2017

GUSHA, J.; KATSANDE, S.; ZVINOROVA, P.I.; NCUBE, S. The nutritional composition and acceptability of cacti (*Opuntia ficus indica*) – legume mixed silage. *Online Journal of Animal Feed Res.* v. 3, p. 116–120, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/255960311_THE_NUTRITIONAL_COMPOSITION_AND_ACCEPTABILITY_OF_CACTI_Opuntia_ficus_indica-LEGUME_MIXED_SILAGE>. Acesso em: 03 dez. 2017.

HABIBI, Y.; HEYRAUD, A.; MAHROUZ, M.; VIGNON, M. R. Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Carbohydrate Research*, v. 339, n. 6, p. 1119–1127, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621504000680>>. Acesso em: 14 out. 2017.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gelelectrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, p. 3233–3241, 1997. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/63/8/3233.full.pdf+html>>. Acesso em: 14 out. 2017.

JOBIM, C. C.; NUSSIO, L. G.; Princípios básicos da fermentação na ensilagem. In: REIS, R. A.; BERNADES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. *Forragicultura: Ciência, Tecnologia e Gestão dos Recursos Forrageiros* – UFV - Universidade Federal de Viçosa. FUNEP, 1ª ed., p. 649-660, 2014.

JOBIM, C.C.; NUSSIO, L.G.; REIS, A.R.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, p. 101-119, 2007.

KUNG JR., L. Preparation of silage water extracts for chemical analyses. **Standard operating procedure** – 001 2.03.96. Worrilow: University of Delaware, Ruminant Nutrition Laboratory, 309p., 1996.

LIMA JÚNIOR, D. M.; NASCIMENTO RANGEL, A. H.; URBANO, S. A.; OLIVEIRA, J. P. F.; ARAÚJO, T. L. A. C. Silagem para vacas leiteiras no semiárido. *Agropecuária científica no semiárido*, v. 9, n. 2, p. 33-42, 2013. Disponível em: <<http://revistas.ufcg.edu.br/acsa/index.php/ACSA/article/view/286/pdf>> Acesso em: 14 out. 2017.

LOPES, E. B (Org.). *Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no Semiárido nordestino*. João Pessoa: EMEPA-PB, 2012.

MACÊDO, A. J. D. S., SANTOS, E. M. Microbiologia de silagens: Revisão de Literatura. *REDVET -Revista eletrônica de Veterinária*. v. 18, n. 9, 2017. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090917/091764.pdf>> Acesso em: 26 nov. 2017.

MACHADO, F.S.; RODRÍGUEZ, N.M.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUES, J.A.S.; RIBAS, M.N; PÔSSAS, F.P.; GUIMARÃES JÚNIOR, R.; JAYME, D.G.; PEREIRA, L.G.R. Consumo e digestibilidade aparente de silagens de sorgo em diferentes estádios de maturação.

Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.63, p.1470 - 1478, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v63n6/26.pdf>>. Acesso em: 28 nov. 2017.

MEDEIROS, S. S.; CAVALCANTE, A. M. B. C.; MARIN, A. M. P.; TINÔCO, L. B. M.; SALCEDO, I. H.; PINTO, T. F. Sinopse do Censo Demográfico para o Semiárido Brasileiro — Campina Grande: INSA, 2012. 103p.

MUCK, R.E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 183-191, (supl. especial) 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v39spe/21.pdf>>. Acesso em: 02 dez. 2017.

NEIVA, A.C.G.R; NEIVA, J.N.M. Do campus para o campo: tecnologias para a produção de leite. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora Ltda., 2006.

NEUMANN, M.; OLIBONI, R.; OLIVEIRA, R.M.; FARIA, M.V.; UENO, R.K.; REINERH, L.L.; DURMAN, T. Aditivos químicos utilizados em silagens. **Pesquisa aplicada & Agrotecnologia**, v. 3, n. 2, 2010. Disponível em: <<http://revistas.unicentro.br/index.php/repaa/article/viewFile/1155/1230>> Acesso em: 28 nov. 2017.

NOGUEIRA, M.S. **Perfil fermentativo e composição química de silagens de palma forrageira enriquecidas com fontes proteica, energética e fibrosa**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB, 2015.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F. *et al.* Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Eds.) *Silage science and technology*. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America - p.31-93, 2003.

PENTEADO, D. C. S.; SANTOS, E. M.; CARVALHO, G. G. P.; OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; PEREIRA, O. G.; FERREIRA, C. L. L. F. Inoculação com *Lactobacillus plantarum* da microbiota em silagem de capim-mombaça. **Archivos de Zootecnia**, v. 56, n. 214, 2007. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/pdf/495/49521409.pdf>>. Acesso em: 14 out. 2017.

PEREIRA, O. G.; ROCHA, K. D.; FERREIRA, C. L. L. F. Composição química, caracterização e quantificação da população de microrganismos em capim-elefante cv. Cameroon (*Pennisetum purpureum*, Schum.) e suas silagens Chemical composition, characterization, and population of microorganisms on elephantgrass. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 1742-1750, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v36n6/a06v36n6.pdf>>. Acesso em: 02 dez. 2017.

REINA ASA, T. A.; UEHARA, A.; SHINZATO, I.; TORIDE, Y.; USUI, N.; HIRAKAWA, K.; TAKAHASHI J. Effects of Protease-resistant Antimicrobial Substances Produced by Lactic Acid Bacteria on Rumen Methanogenesis Asian Australas. **Journal of Animal Science**. v. 23, n. 6, 2010. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.971.1991&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 02 dez. 2017.

RIBEIRO, E. M. D. O.; SILVA, N. H. D.; LIMA FILHO, J. L. D.; BRITO, J. Z. D.; SILVA, M. D. P. C. D. Study of carbohydrates present in the cladodes of *Opuntia ficus-indica* (fodder

palm), according to age and season. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 30, n. 4, p. 933–939, 2010. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cta/v30n4/v30n4a15.pdf>> Acesso em: 14 out. 2017.

RODRIGUES, A.M.; PITACAS, F.I.; REIS, C.M.G.; BLASCO, M. Nutritional value of opuntia ficus-indica cladodes from portuguese ecotypes. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 22, n. 1, p. 40-45, 2016. Disponível em: < <http://repositorio.ipcb.pt/handle/10400.11/3810>>. Acesso em: 14 out. 2017.

SÁENZ, C.; SEPÚLVEDA, E.; MATSUHIRO, B. Opuntia spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives. **Journal of Arid Environments**, v. 57, n. 3, p. 275–290, maio 2004. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/223535614_Opuntia_spp_mucilage%27s_A_Functional_Component_with_Industrial_Perspectives>. Acesso em: 10 jan. 2018.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molec Biol. Evol.** 4:406-425. 1987.

SALIN, T.C.; FERREIRA, R.L.C.; DE ALBUQUERQUE, S.F.; DA SILVA, J.A.A.; ALVES JUNIOR, T. Caracterização de sistemas agrícolas produtivos no Semiárido Brasileiro como bases para um planejamento agroflorestal. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 2, p. 109-118, mar.-jun., 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/277072392_CHARACTERIZACAO_DE_SISTEMAS_AGRICOLAS_PRODUTIVOS_NO_SEMIARIDO_BRASILEIRO_COMO_BASES_PARA_UM_PLANEJAMENTO_AGROFLORESTAL> Acesso em: 26 nov. 2017.

SANTOS, T.N. **Avaliação da biomassa de sorgo sacarino e palma forrageira para produção de etanol em Pernambuco**. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2012. Disponível em: <http://www.repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/10471/Taciana_do_Nascimento_Santos%20Disserta%c3%a7%c3%a3o.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 20 jan. 2018.

SANTOS E.M.; ZANINE, A.M. Silagem de gramíneas tropicais. **Colloquium Agrariae**, v. 2, n. 1, p. 32- 45, 2007. Disponível em: <<http://revistas.unoeste.br/revistas/ojs/index.php/ca/article/viewFile/107/533>>. Acesso em: 14 out. 2017.

SANTOS, M.V.F.; GÓMEZ, A.G.; PEREA, J.M.; GARCÍA, A.; GUIM, A.; PÉREZ, M. Fatores que afetam o valor nutritivo da silagens de forrageiras tropicais. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, p. 25-43, 2010. Disponível em: < <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/3689>>. Acesso em: 14 out. 2017.

SILVA, V. P. **Bioprospeção de bactérias lácticas e utilização de isolados bacteriocinogênicos como inoculante em silagem de alfafa**. Dissertação (Magister Scientiae em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2014. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/8266/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

SILVA, C.C.F.; SANTOS, L.C. Palma forrageira (*Opuntia Ficus-Indica Mill*) como alternativa na alimentação de ruminantes. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 8, n. 5,

2007. Disponível em: < www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101006/100609.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2017

SILVA, A. P. G.; SOUZA, C. C. E.; RIBEIRO, J. E. S.; SANTOS, M. C. G.; SOUZA PONTES, A. L.; MADRUGA, M. S. Características físicas, químicas e bromatológicas de palma gigante (*Opuntia ficus-indica*) e miúda (*Nopalea cochenillifera*) oriundas do estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 9, n. 2, 2015. Disponível em: <<https://revistas.utfpr.edu.br/rbta/article/view/1616/2942>>. Acesso em: 14 out. 2017.

SILVA, P. C. G.; MOURA, M. S. B.; KIILL, L. H. P.; BRITO, L. T. de L.; PEREIRA, L. A.; SA, I. B.; CORREIA, R. C.; TEIXEIRA, A. H. de C.; CUNHA, T. J. F.; GUIMARÃES FILHO, C. Caracterização do Semiárido brasileiro: fatores naturais e humanos - Embrapa Semiárido, 2010. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-publicacao/861906/caracterizacao-do-semiarido-brasileiro-fatores-naturais-e-humanos>> Acesso em: 14 out. 2017.

SILVA, T.C.; SILVA, M. V. B.; FERREIRA, E. G.; PEREIRA, O. G.; FERREIRA, C. L. L. F. Papel da fermentação láctica na produção de silagem. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 1, Ed. 148, Art. 998, 2011. Disponível em: < <http://www.pubvet.com.br/artigo/1223/papel-da-fermentaccedilatildeo-laacutetica-na-produccedilatildeo-de-silagem>>. Acesso em: 14 out. 2017.

UNITED NATIONS. Environment Management Group. Global drylands: a UN system-wide response. Geneve, SW. 132p, 2011.