



**CARACTERÍSTICAS DE SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR
ADITIVADAS COM CAL, PROPIONATO E *Lactobacillus buchneri***

BEATRIZ FERREIRA CARVALHO

2010

BEATRIZ FERREIRA CARVALHO

**CARACTERÍSTICAS DE SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR
ADITIVADAS COM CAL, PROPIONATO E *Lactobacillus buchneri***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Dr. José Cardoso Pinto

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Carvalho, Beatriz Ferreira.

Características de silagens de cana-de-açúcar aditivadas com cal, propionato e *Lactobacillus buchneri* / Beatriz Ferreira Carvalho. – Lavras : UFLA, 2010.

71 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: José Cardoso Pinto.

Bibliografia.

1. Ácidos orgânicos. 2. Clostrídios. 3. Bactérias lácticas. 4. Óxido de cálcio. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.08552

BEATRIZ FERREIRA CARVALHO

**CARACTERÍSTICAS DE SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR
ADITIVADAS COM CAL, PROPIONATO E *Lactobacillus buchneri***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 22 de Fevereiro de 2010

Prof^a. Dr^a. Rosane Freitas Schwan

UFLA

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira

UFLA

Dr^a. Carla Luiza da Silva Ávila

Prof. Dr. José Cardoso Pinto

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

OFEREÇO

A DEUS, por iluminar meus passos
e me dar forças para jamais desistir

DEDICO

Aos meus pais, pelo incentivo e amor
A minha irmã, pelo companheirismo
A Carla Luiza, pelos ensinamentos
Aos meus amigos, pelos momentos inesquecíveis.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela formação profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa.

Ao meu orientador, Prof. José Cardoso Pinto, pela confiança, dedicação, amizade e exemplo de profissionalismo.

Ao Prof. Marcos Neves Pereira, pela orientação e pelas valiosas sugestões que contribuíram para realização desse trabalho.

À Prof^a, Rosane Freitas Schwan, pela confiança, pelos ensinamentos e por permitir que o trabalho fosse conduzido no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia.

Ao meu pai, Heber, pelo exemplo, companheirismo, pela grande ajuda nos experimentos, por fazer sempre as perguntas mais difíceis e me fazer buscar as respostas.

À minha mãe, Sueli, pela força, incentivo e por estar sempre presente.

À minha irmã, Débora, pelos conhecimentos compartilhados, pela grande ajuda nos experimentos e, principalmente, pela amizade e companheirismo.

À Carla, pela amizade, paciência, exemplo de determinação e pelos ensinamentos não só na parte profissional, mas também pelos ensinamentos que vão ficar para a vida.

A todos os professores dos Departamentos de Biologia e Zootecnia da UFLA.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia, principalmente, ao José Virgílio.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Biologia, principalmente, à Ivani e Cidinha, pelo carinho e por sempre estarem prontas a ajudar.

Aos meus amigos de longa data, Olinto, Pefa e Diogo, pelo apoio nas horas mais difíceis e por, simplesmente, estarem presentes.

Aos meus recentes amigos e companheiros de laboratório, Cláudia, Gabi, Dani, Leandro, Lílian, Euziclei, Mari, Marcela, Sílvio, Angélica, Francesca, Sarita, Ana Luiza, Tiago, Emerson, Mariana, Carol e Livia, pelas agradáveis muitas horas de convívio.

À Dr^a Simone e à Prof^a. Cristina, pela grande ajuda, amizade e ensinamentos.

Ao amigo Whasley, pela grande contribuição com os dados de cromatografia, pela disponibilidade em ajudar e, principalmente, pelas risadas.

Aos amigos de Pós-Graduação, Fabrício, Rafael e Marcelo, pela amizade e conhecimentos compartilhados.

Às melhores amigas Vanessa, Camila Moraes, Raquel, Camila Meneghetti e Ozana. Obrigada pelo convívio, com vocês, os dias foram mais felizes e o tempo passou bem mais rápido.

A todos meus tios, tias, primos e primas que torceram e rezaram por mim.

Aos amigos e às pessoas importantes, que me fizeram crescer e, nesse caso, dispensam citações.

A todos que torceram pela realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Silagem de cana-de-açúcar.....	3
2.2 Fermentação e microrganismos envolvidos.....	4
2.2.1 Microrganismos desejáveis.....	4
2.2.2 Microrganismos indesejáveis.....	7
2.2.2.1 Bactérias esporogênicas.....	7
2.2.2.2 Leveduras e fungos filamentosos.....	12
2.2.2.3 Listéria.....	15
2.2.2.4 Enterobactérias.....	15
2.3 Silagem de cana-de-açúcar na alimentação animal.....	16
2.4 Presença de etanol na silagem de cana-de-açúcar.....	18
2.5 Uso de aditivos em silagens de cana-de-açúcar.....	20
2.5.1 Aditivos microbianos.....	20
2.5.1.1 Inoculação com bactérias homofermentativas.....	21
2.5.1.2 Inoculação com bactérias heterofermentativas.....	21
2.5.1.3 Efeitos do uso de inoculantes microbianos no desempenho animal.....	24
2.6 Óxido de cálcio.....	25
2.7 Ácido propiônico.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32

3.1 Delineamento experimental.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5 CONCLUSÕES.....	60
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Inibição de microrganismos pelo ácido propiônico.....	39
Tabela 2: Variáveis químicas e microbiológicas da cana-de-açúcar antes da ensilagem.....	39
Tabela 3: Valores de <i>P</i> para os tratamentos estudados.....	42
Tabela 4: Composição química e microbiológica de silagem de cana-de-açúcar tratada com cal, propionato ou inoculante microbiano, em dois tempos de ensilagem.....	42
Tabela 5: Composição química da silagem de cana-de-açúcar tratada com cal, propionato ou inoculante microbiano, em dois tempos de ensilagem.....	52
Tabela 6: Composição química e microbiológica de silagem de cana-de-açúcar tratada com propionato ou inoculante microbiano, em dois tempos de ensilagem.....	54

RESUMO

CARVALHO, Beatriz Ferreira. **Características de silagens de cana-de-açúcar aditivadas com cal, propionato e *Lactobacillus buchneri***. 2010. 71 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG¹.

O corte concentrado da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), para ensilagem, pode facilitar o manejo nutricional dos rebanhos, comparativamente ao uso tradicional da forrageira fresca. No entanto, essas silagens apresentam grande perda de matéria seca (MS), menor estabilidade aeróbia e alta redução no conteúdo energético do alimento. Objetivou-se, neste trabalho, avaliar os efeitos da adição de ácido propiônico (1% da MN) e de uma cepa local de *Lactobacillus buchneri* (UFLA SIL 72) ($1,55 \times 10^6$ ufc/g de forragem), previamente isolada de silagem de cana, em silagens tratadas com óxido de cálcio (cal virgem micronizada) [1% com base na matéria natural (MN)] e os efeitos desses tratamentos combinados dois a dois, na composição química e microbiológica de silagens de cana-de-açúcar, após 60 e 170 dias de fermentação. Utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso, com arranjo fatorial $2 \times 2 \times 2 \times 2$ dos tratamentos. As silagens tratadas com cal apresentaram maior população de bactérias do ácido lático (BAL), leveduras e clostrídios, maior concentração de ácido lático e ácido acético, e menor concentração de ácido propiônico e etanol. O tratamento com cal resultou em silagens com menor teor de FDN, maior valor de pH, maior teor de cinzas e MS. A aplicação de ácido propiônico, nas silagens tratadas com cal, reduziu a população de leveduras e aumentou a concentração de ácido butírico, ácido propiônico e etanol. A aplicação do inoculante microbiano nas silagens tratadas com cal reduziu a população de clostrídios e as concentrações de etanol e de ácido butírico e aumentou a concentração de ácido propiônico na silagem. As silagens aditivadas com inoculante microbiano apresentaram menor população de BAL e clostrídios. A aplicação de ácido propiônico, nessas silagens, reduziu ainda mais a viabilidade desses microrganismos. Os tratamentos com inoculante microbiano e com ácido propiônico resultaram em silagens com maior teor de FDN. De 60 para 170 dias de ensilagem, houve aumento no teor de FDN, redução no teor de MS e na população de microrganismos. As concentrações de ácido lático e ácido acético aumentaram e a de etanol diminuiu de 60 para 170 dias.

¹ Comitê Orientador: José Cardoso Pinto – UFLA (Orientador); Rosane Freitas Schwan – UFLA; Marcos Neves Pereira – UFLA.

A utilização de óxido de cálcio melhorou as características químicas e nutricionais das silagens de cana-de-açúcar, no entanto, favoreceu o crescimento de microrganismos indesejáveis. O uso de ácido propiônico promoveu uma redução na população de microrganismos, porém, não foi capaz de reduzir a fermentação alcoólica das silagens. A cepa indígena de *L. buchneri* estudada melhorou a qualidade das silagens de cana-de-açúcar e os resultados dessa inoculação foram melhores após 170 dias de fermentação. A aplicação dessa cepa, associada ao tratamento com óxido de cálcio, é promissora na melhoria da qualidade microbiológica dessas silagens.

ABSTRACT

CARVALHO, Beatriz Ferreira. **Characteristics of sugarcane silage added with lime, propionate and *Lactobacillus buchneri***. 2010. 71 p. Dissertation (Master in Animal Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG².

The concentrated harvesting of the sugarcane for ensilaging can facilitate the management of nutrition of herd, compared to the traditional use of fresh forage. However, these silages have high loss of dry matter (DM), lower aerobic stability and high reduction in energy content of food. This study aimed to evaluate the effects of addition of propionic acid (1% of FW) and a local strain of *Lactobacillus buchneri* (SIL UFLA 72) (1.55×10^6 cfu / g forage) previously isolated from sugarcane silage in silages treated with calcium oxide (lime micronized) [1% based on fresh matter (FW)], and the effects of these treatments combined two by two in the chemical composition and microbial silage from sugar cane at 60 and 170 days of fermentation. A randomized block design with factorial arrangement 2 x 2 x 2 x 2 treatments was used. The silage treated with lime showed higher population of lactic acid bacteria (LAB), yeasts and clostridia, highest concentration of lactic acid and acetic acid, and lower concentration of propionic acid and ethanol. Treatment with lime resulted in silages with lower NDF content, higher pH, higher content of ash and DM. The application of propionic acid in silage treated with lime reduced the population of yeast and increased the concentration of butyric acid, propionic acid and ethanol. The application of microbial inoculant in silage treated with lime reduced the population of clostridia and the concentrations of ethanol and butyric acid and increased the concentration of propionic acid in silage. Silages added with microbial inoculant had a lower population of LAB and clostridia, the application of propionic acid in these silages further reduced the viability of these microorganisms. Treatments with microbial inoculant and propionic acid resulted in silage with higher content of NDF. From 60 to 170 days of fermentation there was an increase in NDF content, reduction in DM content and in population of microorganisms. The concentrations of lactic acid and acetic acid increased and ethanol reduced from 60 to 170 days. The use of calcium oxide improved the chemical and nutritional characteristics of silages cane sugar, but favored the growth of undesirable microorganisms. The use of propionic acid decreased in the population of microorganisms, but was not able to reduce the alcoholic fermentation of the silage. The indigenous strain of *L. buchneri* studied improved the quality of sugarcane silage, and the results of

² Guidance Committee: José Cardoso Pinto – UFLA (Adviser); Rosane Freitas Schwan – UFLA; Marcos Neves Pereira – UFLA.

inoculation were higher after 170 days of fermentation. The application of this strain associated with treatment with calcium oxide is promising in improving the microbiological quality of these silages.

1 INTRODUÇÃO

A importância da agricultura canavieira para o desenvolvimento sócio-econômico sustentável do agronegócio brasileiro tem sido evidenciada. Ressalta-se o fato de a cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) possuir alto potencial de produção de matéria seca (MS) e energia por unidade de área.

A ensilagem da cana-de-açúcar tem se apresentado como opção alternativa ao corte diário, para fornecimento *in natura* aos animais, principalmente, em decorrência dos benefícios operacionais. A ensilagem permite o aproveitamento do excesso de forragem produzida; possibilita o uso da forrageira durante todo o ano; maximiza a eficiência dos tratos culturais. No entanto, o processo de fermentação da silagem de cana-de-açúcar é instável. Nessa silagem, ocorre intensa fermentação alcoólica por leveduras (Kung Junior & Stanley, 1982), que resulta em alta perda de MS, com conseqüente acúmulo dos componentes da parede celular e redução da digestibilidade. Além disso, essas silagens apresentam alto teor de carboidratos residuais e ácidos orgânicos, que podem ser utilizados por microrganismos deterioradores após a abertura do silo. Assim, torna-se necessário o uso de algum aditivo que favoreça a fermentação, com o objetivo de reduzir as perdas totais e melhorar a digestibilidade e o valor nutritivo da silagem obtida. Agentes alcalinizantes vêm sendo empregados como forma de melhorar a fermentação dessas silagens. O óxido de cálcio, na forma de cal virgem micronizada, tem promovido redução nos teores de fibra que favorece a qualidade nutricional, no entanto, silagens tratadas com óxido de cálcio apresentam um pH final alto que pode favorecer o crescimento de microrganismos indesejáveis durante a ensilagem. A associação entre cal e outros aditivos, capazes de induzir queda mais acentuada no pH inicial da silagem de cana, pode ser interessante como estratégia, para reduzir o teor de fibra no alimento, sem o risco de fermentação indesejável.

A utilização de inoculantes microbianos pode ser uma opção, para aumentar a velocidade e a amplitude na queda do pH de silagens, tratadas com cal. Cepas de bactérias lácticas específicas como a *Lactobacillus buchneri* UFLA SIL 72 isolada da própria silagem de cana-de-açúcar pode apresentar resultados superiores a outras cepas isoladas de silagens de outras forrageiras.

Os ácidos orgânicos fracos, também, são utilizados como aditivos em silagens, eles atuam como antimicrobianos e acidificadores. Entre os ácidos acético, láctico e propiônico, este último apresenta melhores resultados com relação à redução da viabilidade de leveduras.

Objetivou-se, nesta pesquisa, avaliar os efeitos da adição de uma cepa local de *L. buchneri* e ácido propiônico, em silagens de cana-de-açúcar, tratadas com óxido de cálcio.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Silagem de cana-de-açúcar

A ensilagem é baseada na fermentação de carboidratos solúveis (CHO-sol) por bactérias do ácido lático (BAL), produzindo ácidos orgânicos, principalmente, ácido lático, sob condições anaeróbias. Como resultado, observa-se queda do pH, com conseqüente controle do desenvolvimento de microorganismos indesejáveis e redução no metabolismo celular nos tecidos da planta colhida (McDonald et al., 1991). A taxa e extensão de declínio do pH são influenciadas por vários fatores, dentre eles estão os relacionados à planta, como teor de MS, concentração de açúcares fermentescíveis, capacidade tampão e população epífita de microorganismos. Além desses existem os fatores relacionados ao processo de ensilagem, como tamanho de partícula e compactação. Dessa forma, a manutenção da anaerobiose e a queda dos valores de pH são os principais fatores responsáveis pela preservação do material estocado.

No processo fermentativo da silagem, os microorganismos de maior importância são as bactérias ácido lácticas, as bactérias formadoras de esporos (clostrídios e bacilos), as bactérias coliformes e os fungos (leveduras e fungos filamentosos). A fermentação da cana-de-açúcar diferencia das demais forrageiras, principalmente, na qualidade e na quantidade de carboidratos não fibrosos (CNF) disponíveis como fonte de energia para microorganismos. A sacarose, um dissacarídeo de glicose e frutose, é predominante na composição da cana-de-açúcar e favorece o crescimento da população de leveduras durante a fermentação. A principal fermentação conduzida por leveduras ocorre com a utilização de glicose, obtendo, como produtos finais, energia na forma de ATP, CO₂, água e etanol, exemplo típico de fermentação alcoólica, que resulta em perdas de MS (Woolford, 1984).

A grande disponibilidade de substrato potencialmente fermentescível, presente na cana-de-açúcar, faz com que seu processo fermentativo não se estabilize e seja caracterizado por uma sucessão de espécies de microrganismos em que a forragem está mais sujeita às perdas nutritivas e à ocorrência de fermentações secundárias (Ávila et al., 2009). Kung Junior & Stanley (1982) consideraram a cana-de-açúcar uma forrageira inadequada para a ensilagem, em virtude das grandes perdas de MS e da alta quantidade de etanol produzida durante a fermentação. No entanto, a ensilagem da cana-de-açúcar deve ser estudada como uma opção, para ser utilizada em fazendas com grande número de animais, ou como uma alternativa em casos de excesso de produção ou acidentes, como incêndios e geadas no canavial.

2.2 Fermentação e microrganismos envolvidos na ensilagem

São escassos os trabalhos que apresentam adequada caracterização e identificação da microbiota total presente durante a fermentação de silagens de gramíneas tropicais. Trabalhos conduzidos com forrageiras temperadas indicam uma variação nas espécies de microrganismos, de acordo com cada forrageira ensilada (Woolford, 1984). No geral, a microbiota presente na silagem pode ser dividida em dois grupos: os microrganismos desejáveis e os indesejáveis.

2.2.1 Microrganismos desejáveis

As bactérias do ácido lático constituem o principal grupo de microrganismos que atua no processo fermentativo das forrageiras. Os gêneros, envolvidos no processo de fermentação de forrageiras, são *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*. No início predominam as BAL do gênero *Streptococcus*, seguidas por *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Pediococcus*, que são mais resistentes às condições ácidas (Hammes & Hertel, 2003).

As diferentes espécies de BAL podem utilizar um grande número de substratos, tais como carboidratos, ácidos orgânicos e aminoácidos, no entanto, a maioria delas obtém energia somente do metabolismo de açúcares (hexoses e pentoses), consequente e usualmente são restritas aos habitats em que açúcares estão presentes (Madigan et al., 1997).

As duas vias principais de utilização de açúcares pelas BAL são a glicólise ou Via de Embden-Meyerhof Parnas e a Via das Pentoses Fosfato. De acordo com as vias utilizadas, as BAL são divididas em homofermentativas, heterofermentativas obrigatórias e heterofermentativas facultativas.

As BAL homofermentativas só fermentam açúcares por meio da glicólise, em que um mol de glicose (ou frutose) é fermentado em dois moles de lactato; ao final da reação há um ganho líquido de dois ATP por molécula de glicose fermentada. As BAL heterofermentativas obrigatórias não possuem a enzima aldolase e são incapazes de quebrar a frutose bifosfato à triose fosfato, portanto, utilizam a Via das Pentoses Fosfato para fermentar açúcares. Na fermentação da glicose, por essa via, inicialmente, ocorre a desidrogenação com a formação de 6-fosfogluconato, seguida pela descarboxilação. A pentose-5-fosfato formada é, então, dividida em gliceraldeído-3-fosfato e acetil fosfato. O gliceraldeído-3-fosfato é metabolizado pela via glicolítica resultando na formação de ácido láctico. Quando não há aceptor de elétrons disponível, o acetil fosfato é reduzido a etanol. Este metabolismo leva à formação de CO₂ e etanol; além do ácido láctico, o ganho líquido de ATP é de apenas um mol, por molécula de glicose fermentada (Axellson, 1998). Quanto às BAL heterofermentativas, a espécie *Lactobacillus buchneri* não possui a enzima acetaldeído desidrogenase, responsável pela redução de acetaldeído a etanol. Desse modo, a produção de etanol é praticamente nula (Elferink et al., 2001) e, consequentemente, ocorre aumento na concentração de ácido acético como produto final de sua fermentação (McDonald et al., 1991). Em decorrência da menor eficiência das BAL

heterofermentativas, em produzir ATP, seu crescimento é mais lento quando comparado com o das BAL homofermentativas.

As BAL heterofermentativas facultativas assemelham-se às homofermentativas por possuírem a enzima aldolase constitutiva, resultando no uso da glicólise para fermentação de hexoses. No entanto, as pentoses induzem à síntese de fosfoquetolase, resultando em uma fermentação heterolática (Axellson, 1998). Segundo Bolsen (1995), as BAL normalmente são encontradas em número relativamente pequeno nas culturas ($<3,0$ log ufc/g), porém, o corte e a picagem da forragem provocam a liberação de sucos da planta, que pode aumentar o número prévio dessas bactérias na ensilagem.

Em silagens de cinco variedades de cana-de-açúcar, ensiladas sem aditivos, a população de BAL, após 30 dias de fermentação, foi de, aproximadamente, 8,62 log ufc/g silagem; nas silagens com 1% de sulfato de amônio e 1% de uréia a contagem de BAL foi 6,4 e 6,54 log ufc/g silagem, respectivamente (Bravo-Martins et al., 2006). Pedroso et al. (2005) observaram uma população inicial de BAL igual a 4,58 log ufc/g de cana-de-açúcar; três dias após a ensilagem a população cresceu para 7,47 log ufc/g silagem. A contagem de BAL decresceu até o quadragésimo quinto dia de fermentação onde foram enumerados 3,6 log ufc/g silagem, esse número permaneceu constante até 180 dias de fermentação. Os autores atribuíram essa redução na população de BAL à queda no pH.

Em um estudo, que buscou isolar e identificar BAL presentes, durante a fermentação da cana-de-açúcar, Ávila et al. (2009), encontraram uma população de, aproximadamente, 9 log ufc/g silagem com 5, 20 e 40 dias de fermentação. Decorridos 80 dias do fechamento dos silos, observou-se um decréscimo na população de BAL e foram contadas 7,8 log ufc/g silagem. Nesse mesmo trabalho, os autores obtiveram 72 isolados que foram identificados, entre outros,

como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus buchneri*, dentre outras espécies.

Ávila et al. (2010), ao estudar inoculantes bacterianos laboratoriais e comerciais, durante 90 dias de fermentação da silagem de cana-de-açúcar, obtiveram contagem de BAL variando de 7,2 log ufc/g de silagem inoculada com *L. paracasei* (cepa laboratorial) a 9,96 log ufc/g de silagem inoculada com *L. buchneri* (Pioneer®).

2.2.2 Microrganismos indesejáveis

2.2.2.1 Bactérias esporogênicas

Bactérias capazes de formar esporos são indesejáveis em qualquer processo de conservação de alimentos. A forma esporulada, além de facilitar a passagem desses microrganismos de um ambiente para outro, tem alta resistência ao oxigênio, ao calor, aos ácidos orgânicos e às enzimas digestivas (Pahlow et al., 2003).

Os gêneros *Bacillus* e *Clostridium* são bactérias formadoras de esporos que ocorrem na silagem (Woolford, 1984). Clostrídios são bactérias móveis, gram-positivas, formadoras de esporos, com forma morfológica de bastonetes. O gênero *Clostridium* inclui espécies psicotróficas, mesófilas e termófilas, que crescem em condições de baixo oxigênio e fermentam açúcares, ácidos orgânicos ou proteínas. Geralmente, a presença de clostrídios na planta forrageira é baixa e sua ocorrência na silagem, provavelmente, decorre de contaminações por solo ou fezes (McDonald et al., 1991).

Após o enchimento do silo, os clostrídios podem se multiplicar tão rápido quanto as outras bactérias. Os clostrídios causam fermentações secundárias, cujo ácido láctico é convertido em ácido butírico e aminoácidos são degradados a aminas e amônia. Esse consumo de ácido láctico promove aumento no pH da silagem e a degradação de aminoácidos reduz o valor nutricional da mesma.

Os clostrídios são, fisiologicamente, divididos em dois grupos: 1- Clostrídios sacarolíticos, que fermentam, principalmente, carboidratos e ácidos orgânicos; e 2- Clostrídios proteolíticos, que fermentam, principalmente, proteínas. Algumas espécies, como *Clostridium perfringens* têm atividade proteolítica e sacarolítica (McDonald et al., 1991). As espécies do gênero *Clostridium*, presentes na silagem de cana-de-açúcar, ainda, não foram identificadas, no entanto, presume-se que sejam espécies do grupo sacarolítico diante da baixa concentração de proteína nesse alimento. Açúcares e ácido lático são utilizados como fonte de energia por uma via similar, em que os principais produtos finais obtidos são ácido butírico, gás carbônico e hidrogênio (Pahlow et al., 2003).

Dois fatores podem influenciar no crescimento dessas bactérias como as condições de acidez na silagem e o teor de MS da massa ensilada. Clostrídios requerem condições úmidas para crescer, pois, são sensíveis à baixa disponibilidade de água (McDonald et al., 1991). No entanto, Pahlow et al. (2003) reconheceram que alguns grupos de clostrídios são capazes de crescer em pH baixo. Entre as espécies desses grupos são citadas *C. butyricum* e *C. tyrobutyricum* ambos, frequentemente, identificados em silagens (Rossi & Dellaglio, 2007; Julien et al., 2008).

Outro ponto importante a ser considerado é a capacidade tampão da planta ou o emprego de aditivos que impeçam uma queda rápida e suficiente no pH. Alguns aditivos têm caráter básico e podem impedir a queda no pH como uréia, óxido e hidróxido de cálcio, hidróxido de sódio dentre outros (Santos et al., 2008).

A disponibilidade de carboidratos e a temperatura no silo, também, estão relacionadas ao desenvolvimento de clostrídios. A temperatura ótima para crescimento desses microrganismos situa-se ao redor de 37°C; em geral, altas

temperaturas provocadas pela excessiva fermentação de açúcares favorecem o crescimento de clostrídios (Hippe et al., 2003; McDonald et al., 1991).

A inoculação de *L.plantarum* e *L. buchneri*, em silagens de sorgo (*Sorghum* spp.) e milho (*Zea mays* L.), foi avaliada por Tabacco et al. (2009). Os autores obtiveram 2,74 log ufc/g de silagem de milho e 1,47 log ufc/g de silagem de sorgo. Após 90 dias de fermentação, foram estimados de 1,84 e 1,22 log ufc/g nas silagens controle de milho e sorgo, respectivamente. A presença de clostrídios foi maior nas silagens inoculadas; 1,84 e 1,74 log ufc/g nas silagens de milho e 1,22 e 1,26 log ufc/g nas silagens de sorgo inoculadas, respectivamente, com *L. buchneri* e *L. plantarum*.

Além dos prejuízos relacionados às perdas durante a fermentação, a presença de bactérias do ácido butírico (BAB) na silagem provoca contaminação do leite, causando prejuízos, principalmente, na fabricação de queijos finos. Esse parâmetro de qualidade do leite, ainda, não é adotado no Brasil, no entanto, nos países europeus o número de esporos de clostrídios, encontrados no leite, é considerado como fator de pagamento e aceitabilidade do leite nas indústrias produtoras de queijos finos (Vissers et al., 2007a; Vissers et al., 2007b). A indústria de lácteos na Holanda preconiza um limite máximo de esporos de 3 log esporos/L.

Vissers et al. (2007b) avaliaram a relação entre a concentração de esporos de BAB no ambiente de 24 fazendas e a população final encontrada no leite amostrado no tanque de resfriamento. Foram coletadas amostras de solo, fezes, material usado como cama para as vacas, leite do tanque de resfriamento e silagem mista de gramíneas e milho. A concentração de esporos na silagem foi a única variável que relacionou, significativamente, com a concentração de esporos de BAB no leite amostrado. A contaminação do leite acontece, porque os esporos sobrevivem à passagem, mediante o trato gastrointestinal e são excretados junto com as fezes. A transmissão para o leite ocorre via contaminação fecal. Os

esporos presentes no leite sobrevivem ao tratamento térmico e durante a fermentação dos queijos produzidos com o leite contaminado. Essas bactérias encontram condições ideais para retomar seu metabolismo e voltar a se multiplicar. Esse crescimento altera o sabor do queijo e promove uma formação excessiva de gás, durante a maturação, que faz com que o queijo “inche” e o defeito é denominado de “estufamento tardio” (Vissers et al., 2007a). Esses autores avaliaram a presença de clostrídios, em silagens produzidas na Itália e observaram a maior presença de esporos em amostras de áreas mofadas do silo. Foram encontrados 3,9 log esporos/g de silagem de gramíneas e 5,5 log esporos/g de silagem de milho, utilizando para isso a estimativa pelo método do número mais provável.

Rossi & Dellaglio (2007) analisaram a qualidade de silagens na Itália quantificando e identificando os microrganismos que influenciaram a sua preservação e segurança higiênica. Os autores obtiveram maior frequência e maior contagem de células viáveis de clostrídios nas silagens de milho (3×10^5 ufc/g silagem), seguida pela silagem de alfafa (*Medicago sativa* L.) (1×10^5 ufc/g silagem). Nas amostras de silagem de azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.), a população de clostrídios ficou abaixo do número detectável. As espécies de clostrídios isoladas foram identificadas por PCR RAPD e entre *C. beijerinckii*, *C. baratii*, *C. saccharolyticum*, *C. tyrobutyricum* e *C. butyricum*, a espécie *C. perfringens* foi identificada somente em silagem de alfafa.

Em forrageiras tropicais perenes, o número de células viáveis de BAB encontrado é, em geral, mais baixo que o número encontrado em silagens de milho e sorgo. Coan et al. (2007) observaram, com um dia de fermentação, pico populacional de, aproximadamente, 5 log ufc/g silagem de capim-tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia 1). Nas silagens de capim-marandu [*Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf cv. Marandu] foi observado pico populacional de, aproximadamente, 2,4 log ufc/g silagem, com sete dias de

fermentação. Transcorridos 56 dias do fechamento dos silos, a contagem de clostrídios foi em torno de 1 log ufc/g⁻ silagem de capim-tanzânia; nas silagens de capim-marandu, o número ficou abaixo do mínimo detectável. Os valores encontrados por Bernardes et al. (2005) ficaram entre 0,2 e 0,8 log ufc de clostrídios/g de silagem de capim marandu.

Geralmente, altas concentrações de esporos de BAB em silagens têm sido associadas com instabilidade anaeróbia em decorrência de um declínio insuficiente do pH na fase primária da fermentação. No entanto, os resultados de Vissers et al. (2007 a) mostram que um aumento na concentração de esporos de BAB, em silagens de milho e de outras gramíneas, está relacionado, também, com problemas de instabilidade aeróbia. O oxigênio penetra na silagem e inicia o crescimento de microrganismos aeróbios ácido tolerantes, como leveduras e bactérias do ácido acético. Esses microrganismos oxidam açúcares residuais e ácidos orgânicos, conduzindo a um aumento do pH. À medida que o número de microrganismos, que consomem oxigênio aumenta, algumas partes da silagem retornam à condição de anaerobiose. Essas porções da silagem que estão em condições anaeróbias e com o pH elevado são propícias ao crescimento de BAB (Vissers et al., 2007a).

Bactérias do gênero *Bacillus* são aeróbias ou anaeróbias facultativas. As principais espécies isoladas de silagem incluem *B. cereus*, *B. lentus*, *B. firmus*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis* e *B. polymyxa* (Giffel et al., 2002). O crescimento de *Bacillus* spp. ocorre durante estádios finais da deterioração aeróbia.

Em silagens de gramíneas perenes e milho, a presença de *Bacillus* pode variar de 10³ a 10⁹ esporos/g silagem. Altos níveis de esporos, frequentemente, são observados nas camadas superficiais do silo (Slaghuis et al., 1997; Driehuis & Elferink 2000; Giffel et al., 2002). A presença dessas bactérias no solo e a utilização de esterco como fertilizante estão relacionados com os números de esporos encontrados na planta forrageira e na silagem. Forrageiras fertilizadas

com esterco têm, aproximadamente, cem vezes mais esporos de *Bacillus* ssp. que forrageiras fertilizadas com adubo inorgânico (Rammer et al., 1994). O tipo de fertilizante orgânico utilizado tem influência na presença de esporos de bacilos. Rammer et al. (1997) mostraram que a aplicação de chorume não teve efeito nos números de esporos de bacilos, presentes na camada superficial do solo, na forrageira e na silagem, diferente do observado quando foi utilizado esterco sólido. Vissers et al. (2007c) encontraram correlações significativas entre as concentrações de esporos no leite e nas fezes e as concentrações de esporos nas fezes e na silagem. Os autores concluíram que esporos de *B. cereus* são, predominantemente, transmitidos de alimentos para o leite via fezes.

Os bacilos são capazes de fermentar uma grande variedade de carboidratos a ácidos orgânicos, etanol, 2,3-butanodiol e glicerol. Além desses compostos não terem efeito na preservação da silagem, essas bactérias competem com as BAL por substrato. Assim como clostrídios, os esporos de bacilos sobrevivem à passagem pelo trato intestinal. Sua ocorrência no leite cru tem sido associada com alto número de esporos nas fezes (Pahlow et al., 2003). A espécie *B. cereus* é considerada o principal deteriorador de leite pasteurizado. Os esporos psicotróficos dessa espécie podem germinar e crescer mesmo após a pasteurização e resfriamento. Esporos de *B. sporothermodurans* têm alta resistência ao calor e causam problemas em leite UHT (Giffel et al., 2002).

Verifica-se que bacilos podem produzir antibióticos durante a formação de seus endósporos. Em razão dessa capacidade, algumas cepas específicas de *B. subtilis* ou *B. licheniformis* têm sido usadas para inibir o crescimento de fungos filamentosos na silagem e reduzir a deterioração aeróbia de silagem de grão úmido de milho (Pahlow et al., 2003).

2.2.2.2 Leveduras e Fungos filamentosos

Leveduras são microrganismos eucarióticos unicelulares. Sua importância 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 anaeróbicas, as leveduras competem com as BAL por carboidratos (Woolford, 1984). As leveduras promovem a fermentação alcoólica de açúcares, convertendo carboidratos simples em etanol, gás carbônico e água. O etanol produzido não somente reduz a quantidade de CNF disponível, como também exerce influência negativa sobre o sabor do leite (Gordon & Morgan, 1972; Randby et al., 1999) e aumenta as perdas de MS. 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). Segundo Woolford (1984), leveduras são capazes de utilizar ácidos orgânicos quando substratos, facilmente assimiláveis, estão escassos.

Woolford (1984) se refere à existência de dois grupos fisiológicos de leveduras envolvidos no processo de deterioração aeróbia. O autor classifica um grupo como de “crescimento lento”, que são leveduras que fermentam açúcares, mas não decompõem ácido láctico, como as do gênero *Torulopsis*, e um outro grupo como de “crescimento rápido”, que é composto por leveduras que possuem uma baixa ação fermentativa sobre açúcares, mas decompõem ácido láctico, como as dos gêneros *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* e *Saccharomyces*.

Avaliando silagens de cana-de-açúcar, após cinco dias de fermentação, Pedroso et al. (2005) reportam população de leveduras de 5,05 log ufc/g silagem, seguido por um decréscimo para 4,5 log ufc/g após quinze dias de fermentação. Esse decréscimo na população de leveduras coincidiu com o período em que a concentração de etanol se estabilizou. De 45 a 120 dias a população permaneceu

constante em 2,0 log ufc/g. Com 180 dias de fermentação o número de leveduras estava abaixo do nível de detecção. A ocorrência de 6,6 log ufc leveduras/g de silagem de cana-de-açúcar, com 30 dias de fermentação, foi reportada por Bravo-Martins et al. (2006); os mesmos autores não observaram a presença de fungos filamentosos nessas silagens.

As condições de anaerobiose e baixo pH, encontradas no silo, são desfavoráveis à proliferação da maioria das espécies de fungos filamentosos. Geralmente esse grupo de microrganismos está associado às camadas superficiais, em que, ocasionalmente, ocorre penetração de ar, apesar de que alguns gêneros são capazes de crescer em anaerobiose (McDonald et al., 1991).

Os principais gêneros de fungos filamentosos que têm sido isolados de silagens são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Absidea*, *Monoascus*, *Scopulariopsis* e *Trichoderma* (El-Shanawany et al., 2005). Os fungos filamentosos utilizam carboidratos e ácido lático e hidrolizam e metabolizam celulose e outros componentes da parede celular (McDonald et al., 1991). Além disso, alguns gêneros como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* produzem toxinas. As micotoxinas são produtos secundários do metabolismo dos fungos.

Strom et al. (2006) ressaltaram que a inibição do crescimento de fungos pode ser ocasionada pela baixa concentração de oxigênio, altas concentrações dos ácidos produzidos durante a fermentação ou por bacteriocinas produzidas por BAL. As populações de fungos filamentosos foram inferiores ao mínimo detectável (<2 log ufc/g), em silagens de cana-de-açúcar, aditivadas com inoculantes microbianos (Ávila et al., 2009). Resultados semelhantes foram relatados por Bravo-Martins et al. (2006).

2.2.2.3 Listéria

Bactérias do gênero *Listeria* são aeróbias ou anaeróbias facultativas. A ocorrência de *Listeria* em silagens tem sido associada com deterioração aeróbia

(Driehuis & Elferink, 2000). A espécie *Listeria monocytogenes* tem maior importância por causa da patogenicidade e da capacidade de sobrevivência. Há evidências de que silagens de baixa qualidade são fontes primárias de contaminação de leite cru por bactérias desse gênero (Sanna et al., 1993; Vilar et al., 2007).

O crescimento e a sobrevivência de listéria na silagem depende do grau de anaerobiose e do pH. Bactérias do gênero *Listeria* desaparecem, rapidamente, em ambientes estritamente anaeróbios e em pH abaixo de 4,4 (Driehuis & Elferink, 2000). Avaliando a presença de listéria, no ambiente de produção de uma granja leiteira, Vilar et al. (2007) detectaram *Listeria* spp em 33,7% das amostras de silagem; a espécie *L. monocytogenes* estava presente em 6% dessas amostras.

2.2.2.4 Enterobactérias

As espécies de enterobactérias que ocorrem na silagem são anaeróbias facultativas e a maioria não é patogênica, porém, como elas apresentam endotoxinas no exterior de sua membrana, algumas espécies têm sido associadas com problemas alimentares e casos de mastite (Lindgren, 1991 citado por Pahlow et al., 2003).

Os poucos trabalhos que envolvem taxonomia mostram que ocorre uma sucessão de espécies ao longo do processo fermentativo (Heron et al., 1993; Östling & Lindgren, 1995). Na microflora epífita de gramíneas perenes, há dominância de *Erwinia herbicola* e *Rhanella aquatilis* que, após a ensilagem, são substituídas por *Hafnia alvei*, *Escherichia coli* e *Serratia fonticola* (Heron et al., 1993). Essas bactérias competem com as BAL pelos açúcares, no início do processo fermentativo, são de fraca atividade proteolítica, entretanto, são capazes de degradar aminoácidos. Esse fato contribui para a formação de amônia e aminas biogênicas na silagem.

A presença dessas bactérias pode ser minimizada por fermentações aceleradas em que há uma queda rápida no pH. A maioria das enterobactérias não prolifera e perde sua viabilidade em valores de pH abaixo de 4,5. No entanto, a presença de oxigênio prolonga sua sobrevivência na silagem (Driehuis & Elferink, 2000).

2.3 Silagem de cana na alimentação animal

Como alimento, a cana-de-açúcar é vista como fonte de carboidratos para a dieta animal. A alta capacidade de produção de MS por hectare e o alto conteúdo de carboidratos de alta digestibilidade são as características da cana-de-açúcar mais desejáveis em sistemas de produção animal.

Os CNF, presentes nessa forrageira, têm alta digestibilidade e são representados, majoritariamente, por sacarose. De acordo com Corrêa et al. (2003), a digestibilidade da MS não-FDN foi de 79,8% em dieta com cana-de-açúcar e foi observada no mesmo experimento uma digestibilidade de 74,5 e 75% da MS não-FDN, em dietas com silagem de milho dentado e milho flint, respectivamente. Com relação à fração fibrosa da cana-de-açúcar, ressalta-se que, apesar de possuir baixo conteúdo fibroso, a digestibilidade da sua FDN é a metade da de outras gramíneas, em torno de 20% para cana e em torno de 40% para o milho. O baixo índice de digestibilidade leva à redução no consumo e prejudica o desempenho animal (Andrade & Pereira, 1999; Corrêa et al., 2003).

O uso da cana-de-açúcar *in natura* ou ensilada, em dietas de bovinos leiteiros de alta produção, é visto com cautela pelos nutricionistas. Corrêa et al. (2003) concluíram que a cana-de-açúcar é uma opção para alimentar grupos de vacas Holandesas, durante a lactação, nas fases em que a demanda nutricional não é máxima. Nesse trabalho os autores ressaltaram que, em dietas para vacas em lactação, a cana-de-açúcar deprimiu o consumo de MS e a produção de leite quando comparada com a silagem de milho.

O potencial de produção animal, suportado pela silagem de cana-de-açúcar, deve ser precisamente definido para permitir recomendações específicas do seu emprego em dietas balanceadas. O número de pesquisas com alimentação animal, baseada em silagens de cana-de-açúcar, vem aumentando, mas o número de trabalhos publicados, ainda, é reduzido.

É um consenso, em trabalhos analisando silagem de cana-de-açúcar, a redução na digestibilidade *in vitro* da MS ao longo da fermentação (Freitas et al., 2006; Pedroso et al., 2007; Balieiro Neto et al., 2007; Siqueira et al., 2007; Pedroso et al., 2008; Santos et al., 2009). Essa redução pode ser explicada pela redução nos CNF que são utilizados, durante o processo fermentativo, com consequente aumento na fração fibrosa de baixa digestibilidade.

Por outro lado, em um trabalho conduzido com ovinos, Mendes et al. (2008) verificaram diferenças ($P<0,05$) entre os coeficientes de digestibilidade da FDN, das silagens e da cana *in natura* picada. Esta última apresentou digestibilidade de 49,8 da FDN, enquanto nas silagens foi observado um valor médio de 61,2%. Comparando os percentuais médios obtidos, observa-se que a ensilagem melhorou a digestibilidade dos compostos fibrosos em 23,0; 31,0 e 67,6% para FDN, FDA e hemicelulose, respectivamente.

Com relação ao desempenho de vacas leiteiras, a variação na produção de 24,4 a 25,5 litros diários não foram, estatisticamente, diferentes nas quatro dietas avaliadas: silagem de cana (acrescida com *L. buchneri*), silagem de milho, cana *in natura* ou silagem de milho mais cana *in natura*. Nesse mesmo trabalho foi observado um maior consumo (23,5 kg MS/dia) nas dietas à base de silagem de cana e silagem de milho mais cana *in natura* ($P<0,05$); o consumo nas dietas à base de silagem de milho foi de 21,3 kg MS/dia e na dieta com cana-de-açúcar *in natura* o consumo foi de 22,3 Kg MS/dia. Com isso, a maior eficiência alimentar foi obtida com a dieta a base de silagem de milho ($P<0,05$) (Queiroz et al., 2008).

O desempenho reprodutivo e o ganho de peso diário de novilhas Holandesas avaliadas, a partir do desmame até o primeiro acasalamento, foram satisfatórios em um sistema de alimentação baseado em silagem de cana-de-açúcar. Os ganhos de peso diário foram de 0,666 e 0,743 kg/dia nos tratamentos com silagem de cana e silagem de milho, respectivamente. Os números de acasalamentos por concepção foram de 1,1 e 1,3 com 92,8 e 78,5% de taxa de fertilidade para dietas de silagem de cana-de-açúcar e dietas de silagem de milho, respectivamente (Reyes-Gutierrez et al., 2007).

2.4 Presença de etanol na silagem de cana-de-açúcar

Diversos estudos, usando técnicas de cultivo ruminal, têm demonstrado que o metabolismo microbiano ruminal do etanol resulta, primariamente, em acetato e metano (Chalupa et al., 1964; Durix et al., 1991). O metabolismo de álcoois relacionado com nutrição de ruminantes pode ser subdividido em pelo menos quatro compartimentos metabólicos: silagem, rúmen, epitélio ruminal e fígado.

Parte dos álcoois presentes na silagem são metabolizados no rúmen, em ésteres de baixo peso molecular, e mesmo níveis normais de álcool induzem a variações nas concentrações de ésteres que estão correlacionadas com mudanças na fermentação de AGV no rúmen (Kristensen et al., 2007). Os mesmos autores concluem que vacas leiteiras, sob condições de baixo estresse metabólico, são capazes de metabolizar álcoois presentes em silagens sem efeitos aparentes no metabolismo esplânico; no entanto, o consumo de álcool afeta sua concentração sistêmica no sangue, por até 5 horas após ingestão. Os efeitos da ingestão de álcoois por ruminantes, ainda, não está bem elucidado.

Apesar de o etanol ser, potencialmente, aproveitável como fonte de energia para ruminantes, por meio da conversão a acetato no rúmen (Chalupa et al., 1964), a presença de etanol na silagem faz com que ocorram perdas por

volatilização durante a estocagem e descarregamento do silo. Segundo Queiroz et al. (2008), o acúmulo de etanol pode não somente representar perdas do material ensilado, mas também perdas decorrentes da recusa dos animais.

Silagens com alta concentração de etanol tendem a induzir um declínio lento, porém, mais efetivo nos valores de pH. Silagem de cana-de-açúcar apresenta altos níveis de etanol e o pH cai rapidamente, atingindo valores próximos a 3,5 (Pedroso et al., 2008; Ávila et al., 2009).

Os teores de etanol, encontrados na silagem de cana-de-açúcar, apresentam grande variação entre os trabalhos. Essa variação pode estar relacionada com a microbiota epífita, com o tipo de silo utilizado, com o tempo de fermentação, com as práticas de ensilagem e, principalmente, com o uso de aditivos.

Ávila et al. (2010) reportaram concentrações de 6,14; 2,85 e 2,10% de etanol na MS de silagem de cana-de-açúcar sem aditivo, inoculada com *L. buchneri* (cepa comercial 6337068) e inoculada com *L. buchneri* (cepa experimental UFLA SIL72), respectivamente.

O uso de 1% de óxido de cálcio reduziu o teor de etanol (0,38% na MS), de silagem de cana quando comparado com o tratamento controle (4,78% na MS) ($P < 0,05$) (Santos et al., 2008). O uso da bactéria homofermentativa *L. plantarum*, durante a fermentação da cana-de-açúcar, resultou em silagem com maior teor de etanol (12,5% MS) quando comparada com silagem controle (3,82% MS) e com a silagem fermentada com a adição de *L. buchneri* (1,95%MS) ($P < 0,05$) (Pedroso et al., 2007). Os autores atribuem essa maior concentração de etanol na silagem inoculada com *L. plantarum* a um maior desenvolvimento de leveduras, confirmando a informação da literatura de que apenas a redução do pH não é suficiente para impedir o desenvolvimento desses microrganismos e que o ácido láctico tem baixo poder fungicida.

2.5 Uso de aditivos em silagens de cana-de-açúcar

Para a obtenção de silagem de boa qualidade, a planta forrageira deve atender alguns requisitos no momento da colheita, como teor de MS entre 30 e 35%, alta concentração de carboidratos solúveis e baixo poder tampão. Quando essas condições não são atendidas, há necessidade de alguma interferência para que o processo ocorra de forma satisfatória. A cana-de-açúcar apresenta características desejáveis, entretanto, a alta concentração de carboidratos solúveis na forma de sacarose faz com que ocorra intenso crescimento de leveduras, ocasionando altas taxas de perda de MS.

2.5.1 Aditivos microbianos

Os aditivos microbianos são classificados como estimulantes da fermentação e são empregados por meio da adição de culturas bacterianas e constituem o grupo de aditivo mais utilizado em todo o mundo (McDonald et al., 1991). Os aditivos microbianos recomendados para silagens contêm, principalmente, bactérias do gênero *Lactobacillus*. Os produtos comercializados, atualmente, incluem bactérias homofermentativas, heterofermentativas ou a sua associação. Entre os fatores que determinam o sucesso da aplicação de microrganismos nas silagens, citam-se a compatibilidade entre a planta forrageira e o microrganismo (Muck, 2008), a habilidade de crescimento da bactéria na massa de forragem e a inoculação de uma população suficiente em relação à epífita da forragem (Zopollatto et al., 2009).

2.5.1.1 Inoculação com bactérias homofermentativas

As bactérias do ácido lático têm sido extensivamente avaliadas como inoculantes de silagens, com o intuito de aumentar o número e a competitividade desses microrganismos na massa ensilada, elevando a produção de ácidos orgânicos e inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis (Muck,

2008). As espécies de bactérias homofermentativas caracterizam-se por proporcionar às silagens taxa de fermentação mais rápida, menor proteólise, maior concentração de ácido lático, menores teores de ácidos acético e butírico, menor teor de etanol e maiores recuperações de nutrientes e MS (Kung Junior et al., 2003). O uso de BAL homofermentativas é recomendado, principalmente, para forrageiras com alto poder tampão, como a alfafa e com baixa concentração de MS.

Além de perdas de MS e maior produção de etanol, Pedroso et al. (2008) observaram que silagens de cana-de-açúcar, tratadas com *L. plantarum*, apresentaram altas perdas de carboidratos solúveis (66%) e menor pH. Os autores sugerem uma alta conversão de açúcares em ácido lático. No mesmo trabalho, esse aditivo não foi capaz de reduzir a população de leveduras e proporcionou silagens com alto teor de FDN e menor DIVMS ($P<0,05$) quando comparadas com a silagem controle. O único efeito positivo desse aditivo foi uma redução na produção de efluente.

2.5.1.2 Inoculação com bactérias heterofermentativas

A inabilidade de BAL homofermentativas, em promover a estabilidade aeróbia de silagens, despertou o interesse da pesquisa pelo uso de bactérias heteroláticas, capazes de produzir ácidos com efeito antifúngico e, ao mesmo tempo, estáveis em meio aeróbio. Bactérias heterofermentativas, sob baixo pH, utilizam ácido lático e glicose, para a produção dos ácido acético e propiônico, que possuem características de efeito antifúngico; no entanto, esse tipo de fermentação leva a um aumento nas perdas de MS (Kung Junior et al., 2003). Além das perdas de MS, o uso de BAL heterofermentativas tem sido associado a uma maior proteólise, provocando um aumento dos níveis de $\text{NH}_3\text{-N}$ das silagens (Schmidt et al., 2009). Esse fato foi verificado em silagem de cana-de-açúcar (Valeriano et al., 2009), silagem de alfafa (Kung Junior et al., 2003; Schmidt et

al., 2009), silagem de gramíneas perenes (Driehuis et al., 2001) e silagens de milho e sorgo (Filya, 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. A falta desta enzima constitui um fato extremamente favorável, visto que a maioria das bactérias heteroláticas produz álcool quando fermenta glicose e frutose até gliceraldeído-3-fosfato (Madingan et al., 1997).

A espécie *L. buchneri* reduz o ácido láctico e forma ácido acético e 1,2-propanodiol. É importante ressaltar que a redução do ácido láctico representa uma diminuição do substrato, potencialmente fermentescível, por algumas espécies de leveduras. O 1,2-propanodiol pode ser metabolizado pela bactéria *L. diolivorans* (Krooneman et al., 2002), resultando na produção de ácido propiônico e 1-propanol que, também, têm efeito antifúngico nas silagens.

Em uma meta-análise sobre os efeitos da inoculação de *L. buchneri*, Kleinschmit & Kung Junior (2006) concluíram que as respostas são específicas em relação à planta utilizada. Mas, em consenso, informaram que ocorrem reduções na concentração de ácido láctico e no número de leveduras e aumentos na concentração de ácido acético, na estabilidade aeróbia e nos valores de pH. Embora as perdas de MS, decorrentes da inoculação, tenham sido significativas, foram numericamente pequenas nessa meta-análise.

Schmidt et al. (2009) registraram altos níveis de ácido acético e 1,2-propanodiol em silagem de alfafa inoculada com *L. buchneri*. Através de PCR quantitativa, os autores observaram que o desenvolvimento dessa espécie de BAL na silagem é lento. Esse fato explica, em parte, porque seus efeitos na fermentação são observados tardiamente (após 45 dias) no processo de ensilagem.

Estudos recentes têm mostrado que a adição de inoculantes, contendo cepas da bactéria heterofermentativa *L. buchneri*, pode inibir o crescimento de leveduras e melhorar a estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar em decorrência do aumento na concentração do ácido acético. Para avaliar os efeitos da inoculação de *L. buchneri* à silagem de cana-de-açúcar, Ávila et al. (2009) utilizaram uma cepa comercial e uma cepa isolada da própria silagem de cana-de-açúcar. Os resultados mostraram silagens com maior concentração de carboidratos solúveis residuais e de ácido láctico e menor de etanol. A cepa isolada da própria silagem apresentou, ainda, uma produção de elevada concentração de ácido propiônico (1,44%MS), quando comparada com o tratamento controle (0,47%MS) ou com o inoculante comercial (0%).

Observa-se, portanto, que o uso de inoculantes bacterianos na ensilagem de cana-de-açúcar tem promovido resultados variáveis, sugerindo, com isso, que a recomendação de inoculantes deva ser feita com cautela. Espécies de bactérias, utilizadas com sucesso em milho e sorgo, não apresentam os mesmos resultados quando empregadas em cana. Essa especificidade, muitas vezes, deixa de ser apenas ao nível de espécie e passa a ser controlada por adaptações metabólicas ao nível de cepa utilizada (Ávila et al., 2009). Um exemplo é a espécie *L. plantarum* que tem apresentado resultados controversos quando utilizada na fermentação da silagem de cana-de-açúcar. A inoculação com essa espécie de BAL homolática em silagem de cana ocasionou elevação nas perdas de MS e na produção de etanol (Freitas et al., 2006; Pedroso et al., 2007; Pedroso et al., 2008).

Avaliando a aplicação de BAL homo e heterofermentativas em silagens de cana-de-açúcar, Ávila et al. (2010) observaram redução ($P < 0,05$) na população de leveduras nas silagens tratadas com *L. paracasei* (cepa UFLA-67-SIL) e *L. plantarum* (inoculante Biomax 5[®]). No mesmo trabalho foi observada redução no teor de etanol nas silagens tratadas com *L. paracasei* (cepa UFLA-67-SIL) e *L. plantarum* (inoculante Biomax 5[®]) e *L. plantarum* (cepa UFLA-1-SIL).

2.5.1.3 Efeitos do uso de inoculantes microbianos no desempenho animal

Em um sumário de resultados sobre o uso de inoculantes, Kung Junior & Muck (1997) relataram respostas positivas para inoculação microbiana de silagens no consumo, ganho de peso e produção de leite. No entanto, as causas da melhoria no desempenho animal, ainda, não são completamente claras. A melhoria na digestibilidade da MS, provavelmente, é uma das explicações para o aumento do desempenho animal (Kung Junior et al., 2003). Outra possibilidade seria um efeito probiótico das BAL do inoculante. Essas bactérias poderiam atuar inibindo o crescimento de microrganismos prejudiciais na silagem e no rúmen ou produzir substâncias benéficas que favoreceriam populações microbianas específicas no rúmen, que poderiam levar a um aumento no desempenho dos animais (Weinberg & Muck, 1996).

Estudos comprovaram a passagem de BAL da silagem para o rúmen e sua sobrevivência no ambiente ruminal (Weinberg et al., 2004), porém, não avaliam as interações desses microrganismos com os microrganismos ruminais e não explicam como BAL, usadas como inoculantes de silagem, promovem efeito probiótico em ruminantes. Alguns inoculantes, contendo BAL, têm potencial para aumentar a digestibilidade da MS e da FDN, quando utilizados na silagem ou adicionados diretamente no rúmen (Weinberg et al., 2007). Os mesmos autores, também, observaram que esses inoculantes podem minimizar o efeito inibitório do amido na digestibilidade da porção fibrosa; tal fato é explicado por uma possível competição com microrganismos ruminais produtores de lactato.

A utilização de silagem de milho aditivada com inoculantes microbianos, contendo espécies homo e heterofermentativas (*L. plantarum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. rhamnosus* e *Pediococcus pentosaceus*), exibiu aumentos das digestibilidades da FDN e da MS em dietas consumidas por ovinos (Aksu et al., 2004). Avaliando o consumo e a digestibilidade de rações, contendo 65% de

silagens de cana-de-açúcar aditivadas com inoculantes químicos ou microbianos na alimentação de bovinos, Schmidt et al. (2007) verificaram que os aditivos utilizados (ureia, *L. plantarum*, benzoato de sódio e *L. buchneri*) não foram efetivos em melhorar o consumo e a digestibilidade da MS de silagens de cana-de-açúcar em relação à silagem sem aditivo.

2.6 Óxido de Cálcio

O hidróxido de sódio (NaOH), o hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂], a amônia anidra (NH₃) e, mais recentemente, o óxido de cálcio (CaO) são utilizados para melhorar os coeficientes de digestibilidade de forrageiras, palhas e resíduos agrícolas (Andrade et al., 2001; Balieiro Neto et al., 2007; Santos et al., 2008; Amaral et al., 2009). A justificativa para a utilização de bases está no fato de a lignina de gramíneas ser susceptível à hidrólise provocada por álcalis em ligações covalentes do tipo éster entre a lignina e a parede celular (Soest, 1994).

Esses agentes atuam solubilizando parcialmente a hemicelulose. Além disso, promovem o fenômeno conhecido como “entumescimento alcalino da celulose”, que consiste na expansão das suas moléculas, causando a ruptura das ligações das pontes de hidrogênio, as quais, segundo Jackson (1977), conferem a cristalinidade da celulose, aumentando a digestão desta e da hemicelulose. De acordo com Klopfenstein (1980), o teor de lignina, normalmente, não é alterado pelo tratamento químico, mas a sua ação resulta em aumento da taxa de digestão da fibra.

A queda no teor de FDN em silagens, induzida pelo tratamento com óxido de cálcio, pode ser interessante nutricionalmente. O teor de fibra, um nutriente de baixa digestibilidade na cana (Andrade & Pereira, 1999; Corrêa et al., 2003) é o maior determinante químico da digestibilidade nesse alimento (Teixeira, 2004).

Balieiro Neto et al. (2007), avaliando doses crescentes de hidróxido de cálcio [0,5; 1,0 e 2,0% em base da matéria verde (MV)] obtiveram coeficientes de digestibilidade de 62,11% para o tratamento controle e 65,6; 70,7 e 79,2% para os tratamentos com 0,5; 1,0 e 2,0% de cal, respectivamente. Santos et al. (2009) obtiveram 48,7; 70,4 e 74,2 % de coeficientes de digestibilidade para os tratamentos controle, 1,0 e 1,5% de óxido de cálcio, com base na massa verde.

A cal virgem ou óxido de cálcio é originária do processo de calcinação de rochas compostas por carbonatos de cálcio (CaCO_3) e de magnésio (MgCO_3). A cal microprocessada tem sido utilizada na tentativa de controlar a fermentação alcoólica em silagens de cana-de-açúcar. A adição desse produto, durante o processo de ensilagem, provoca elevação do pH e aumento na pressão osmótica, alterando a população de microrganismos e, portanto, modificando o perfil fermentativo dessas silagens (Nussio et al., 2008).

Santos (2008), ao trabalhar com duas doses de cal virgem (1,0 e 1,5% na MV), em silagem de cana-de-açúcar, observou redução significativa na produção de etanol e, conseqüentemente, maiores recuperações de MS e de carboidratos solúveis. Silagens tratadas com cal virgem e calcário (1% na MV) apresentaram menores perdas gasosas, maior teor de carboidratos solúveis residuais, reduzida fermentação alcoólica (4,3; 1,2 e 1,2 % na MS de etanol para os tratamentos controle, cal virgem e calcário, respectivamente) e menor concentração de componentes fibrosos. A adição de cal virgem proporcionou silagens com alto teor de ácido butírico (3,1 %MS) (Amaral et al., 2009). Os trabalhos revisados, também, evidenciam um aumento no pH final da silagem; esse aumento é crescente conforme se aumenta a dose de álcali (Pedroso et al., 2007; Santos et al., 2008; Santos et al., 2009).

Santos et al. (2009), avaliando as adições de óxido, carbonato ou sulfato de cálcio em silagens de cana, observaram que silagens com menor pH apresentaram menores concentrações de ácido láctico. Os autores associam essa

correlação positiva ($r=0,52$) ao poder tampão. O tamponamento dos ácidos produzidos pela fermentação serve de estímulo para a maior intensidade de conversão dos açúcares solúveis em ácido lático, aumentando a concentração desse produto final. Outros autores relataram essa propriedade dos aditivos alcalinos. Klosterman et al. (1960) ressaltaram que o carbonato de cálcio é um aditivo eficiente em aumentar o teor de ácidos orgânicos em silagens. No entanto, avaliando a adição de hidróxido de cálcio, Miranda et al. (2007) obtiveram correlação positiva ($P<0,01$) entre o uso de aditivo químico e o dia de abertura dos silos. Os autores associaram silagens com alto pH a 56% de silagens com sintomas de fermentação clostrídica. A associação entre cal e outros aditivos capazes de induzir queda mais acentuada no pH inicial da silagem de cana pode ser interessante como estratégia para reduzir o teor de fibra no alimento sem o risco de fermentação indesejável.

2.7 Ácido Propiônico

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 (Kung Junior et al., 2003). Esses ácidos, na sua forma não dissociada, têm a capacidade de se difundir pela membrana plasmática, diminuindo o pH do citoplasma e afetando negativamente a glicólise e o sistema de transporte ativo das células, em um processo dependente do pH e da concentração de açúcares no meio (McDonald et al., 1991; Lambert & Stratford, 1999).

O ácido propiônico, utilizado como inibidor do crescimento de leveduras e mofo, aumenta a estabilidade aeróbia das silagens. Esse ácido é considerado um fungicida ou um fungistático (Kung Junior et al., 2003). Em estudos realizados por Moon (1983), foi verificado que os ácidos acético e propiônico são melhores inibidores do crescimento das leveduras que o ácido lático e que as

misturas de ácidos láctico, propiônico ou acético desempenham um efeito inibitório sinérgico.

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 leveduras evitando seu crescimento, sendo esse grupo de microrganismo o principal responsável pelas perdas de MS durante o processo fermentativo dessa forrageira. Carvalho et al. (2009) avaliaram os efeitos de doses crescentes de ácido acético e propiônico no controle do crescimento de leveduras isoladas de silagem de cana-de-açúcar, utilizando como substrato o caldo de cana. Esses autores observaram maior efeito deletério do ácido propiônico sobre a viabilidade celular. Apesar de não haver relatos do efeito desses ácidos na ensilagem da cana-de-açúcar, seu uso mostrou-se eficiente no controle do desenvolvimento de fungos e na melhoria da estabilidade aeróbica de silagens de aveia e milho (Ohyama et al., 1975; Britt et al., 1975; Selwet, 2008).

A taxa de dissociação ($\text{COOH} \rightarrow \text{COO}^-$) do ácido propiônico é dependente do pH (Lambert & Stratford, 1999). A um valor de pH de 6,5, apenas 1% desse ácido está na sua forma não dissociada, enquanto a um pH de 4,8, aproximadamente, 50% desse ácido está na forma não dissociada e é altamente antifúngico. A atuação do ácido propiônico é na superfície dos microrganismos competindo com aminoácidos por sítios ativos de enzimas ou por alterar a permeabilidade celular (Kung Junior et al., 2003). O efeito da aplicação de ácido propiônico em cada nível de pH foi demonstrado por Woolford (1975) (Tabela 1).

De acordo com Mills & Kung Junior (2002), uma mistura de agentes antifúngicos, composta, principalmente, por ácido propiônico tamponado, adicionado a uma taxa de 1g/kg de forragem fresca, foi incapaz de prevenir a produção de ácido butírico em cevada (*Hordeum vulgare* L.) que foi exposta ao ar por 24 h antes da ensilagem; isso talvez decorresse da baixa taxa de aplicação.

No entanto, preveniu decréscimo na digestibilidade aparente *in vitro* da MS associada com a exposição ao ar.

TABELA 1 Inibição de microrganismos pelo ácido propiônico.

pH	Concentração do ácido necessária para inibição	Classe de Microrganismo
6	> 250 mmol L ⁻¹	BAL, clostrídeos, mofos e leveduras
5	> 250 mmol L ⁻¹	BAL
5	< 8 mmol L ⁻¹	Clostrídeos
5	125 mmol L ⁻¹	Leveduras
4	< 70 mmol L ⁻¹	BAL, mofos, leveduras e clostrídeos

A taxa ótima de aplicação do aditivo varia dependendo da concentração de umidade, tempo de armazenamento, uso desejado e formulação com outros preservativos (Kung Junior et al., 2003). Altos níveis de ácido propiônico têm sido, prosperamente, usados para aumentar a estabilidade aeróbia de silagens de milho de grãos úmidos (Sebastian et al., 1996; Raeker et al., 1992; Voelker et al., 1989). O ácido propiônico é utilizado, principalmente, para melhorar a fermentação de gramíneas e reduzir a formação de N-NH₃ em silagem de alfafa (Broderick et al., 1991).

Especificamente na América do Norte, o uso de ácido propiônico não tamponado em altos níveis (10g/kg) é quase inexistente. No entanto, existem muitos produtos à base de ácido propiônico tamponado, que sugerem taxas de aplicação que são relativamente menores (0,5 a 2,0 g/kg peso fresco). Esse ácido tamponado é, frequentemente, combinado com outros agentes antimicóticos (ex.: sorbato, benzoato, ácidos cítrico e acético) (Kung Junior et al., 2003).

Goering & Gordon (1973) mostraram que 1,5 a 6,0 g/L de ácido propiônico podem prevenir o crescimento de leveduras em culturas puras. A maioria dos fungos filamentosos comuns pode ter seu crescimento restringido por esse ácido aplicado a uma taxa de 2,5 g/kg de forragem.

Segundo Kung Junior et al. (2003), são limitadas as informações disponíveis sobre os efeitos da silagem tratada com ácido propiônico no desempenho animal. Huber & Soejono (1977) verificaram aumento na ingestão de MS por vacas alimentadas com silagens de grãos úmidos de milho tratadas com ácido propiônico.

Kung Junior et al. (2004) observaram redução significativa no número de leveduras (log ufc/g) em silagens de grãos úmidos de milho, tratadas com 0,1% (MV) de ácido propiônico tamponado (ingredientes ativos contendo propionatos de sódio e de amônio e ácidos acético, benzoico e sórbico). Houve melhoria na estabilidade aeróbia das silagens de grãos úmidos de milho no tratamento com 0,2% do mesmo aditivo. No mesmo experimento esses autores observaram que o uso de aditivos, contendo BAL (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, e *Lactobacillus bulgaricus*), exclusivamente ou combinado com outro aditivo comercial a base de ácido propiônico tamponado, preveniu a produção de ácido butírico.

O uso de ácidos propiônico ou fórmico reduziu o número de leveduras e mofos em relação ao controle ($P < 0,05$) em silagem de milho. O efeito desses ácidos aplicados conjuntamente foi mais pronunciado (Selwet, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Como muitas análises da forragem, na pré-ensilagem, teriam de ser efetuadas no mesmo dia do enchimento dos silos, houve a necessidade de blocagem por dia de ensilagem, sendo formados 4 blocos (1 por dia). Com isso, o experimento foi conduzido, obedecendo a um delineamento de blocos ao acaso (DBC), com quatro repetições, sendo os blocos, os dias de confecção das silagens. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial do tipo 2 x 2 x 2 x 2 (com cal/sem cal, com ácido/sem ácido, com a cepa bacteriana/sem a cepa bacteriana, avaliação com 60 ou com 170 dias), totalizando dezesseis combinações. Para cada uma das oito possíveis combinações dos três fatores avaliados (cal, ácido propiônico e inoculante microbiano), duas amostras foram ensiladas em cada bloco para abertura, após 60 e 170 dias de ensilagem, formando 64 parcelas experimentais.

Utilizou-se a variedade de cana-de-açúcar CB 47355, colhida em setembro de 2008 com, aproximadamente, 12 meses de crescimento. A colheita dos colmos foi manual e o processamento realizado em picadeira estacionária. A cana-de-açúcar utilizada foi colhida e processada no mesmo dia. A forragem picada foi levada para um galpão em que foram aplicados os aditivos e confeccionadas as silagens. Como silos experimentais, foram utilizados 64 baldes plásticos com volume de 15 L cada. A forragem foi compactada, sendo feita uma padronização da densidade da silagem nos silos experimentais para 700 kg de forragem por m³. Para isso, foi marcado em cada balde, um volume de 14,3 L e 10 kg da forragem foi compactada até essa marca.

Os aditivos avaliados foram: cal virgem micronizada (óxido de cálcio), ácido propiônico PS (VETEC Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ), ambos na dosagem de 1%, com base na massa de forragem verde (FV), uma cepa

não comercial de *Lactobacillus buchneri*, (UFLA SIL 72), anteriormente, isolada de silagem de cana-de-açúcar (Ávila et al., 2009) e suas combinações.

A cepa bacteriana estava armazenada em criotubos a -80°C . Para sua utilização, a mesma foi reativada conforme Ávila et al. (2009). Após o período total de reativação, foi feita a contagem do número total de células viáveis no caldo, por meio de plaqueamento (em duplicata) em meio MRS (Difco), obtendo-se um resultado médio 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. Para cada silo, foram retirados 10 mL do caldo, misturados com 200 mL de água, borrifados e homogeneizados sobre a forragem no momento da ensilagem, resultando em uma dosagem média do inóculo de $1,6 \times 10^8$ ufc/kg de forragem ($8,2 \log$ ufc/kg forragem).

Nos tratamentos, contendo apenas ácido propiônico, o mesmo foi aplicado à forragem, diluído em água para atingir a concentração de 1% com base na massa verde, resultando no uso de 100 mL de ácido propiônico e 100 mL de água. Nos tratamentos em que foram utilizados, simultaneamente, ácido propiônico e inoculante experimental, cada aditivo foi diluído, separadamente, em 100 mL de água. A cal micronizada foi aplicada em forma de pó e homogeneizada manualmente e foram aplicados 100 g em cada mini-silo. Para prevenir a contaminação entre os tratamentos, foram utilizados uma lona plástica e um pulverizador para cada tratamento. Os silos foram cobertos por uma lona plástica que recebeu uma camada de areia sobre si mesma, esta foi vedada com fita adesiva de forma que fosse impedida qualquer troca gasosa com o ambiente. Após a vedação, os silos foram mantidos em temperatura ambiente e sob a proteção da luz solar e chuvas.

Os 64 baldes de silagens experimentais foram abertos em dois períodos, sendo 32 baldes abertos com 60 dias de fermentação e o restante após 170 dias. Foram retiradas amostras da forragem fresca, logo após a mistura dos aditivos e

antes da ensilagem (tempo 0) e após 60 e 170 dias de fermentação e coletadas três amostras de cada tratamento em cada período de amostragem.

Antes da retirada das amostras das silagens (60 e 170 dias), todo o conteúdo do mini-silo foi homogeneizado sobre lona plástica e nenhuma parte da silagem foi desprezada. Das três amostras coletadas, uma foi colocada em saco plástico, identificada e congelada a -20°C ; outra foi pesada e seca em estufa de ventilação forçada e a terceira amostra foi, imediatamente, utilizada para mensuração de pH e análises microbiológicas.

As amostras de cana-de-açúcar in natura e silagens que seriam utilizadas para realização de análises bromatológicas, foram pesadas e pré secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas (Silva et al., 2002). Decorrido o tempo de secagem, as amostras foram novamente pesadas e moídas em moinho tipo Willey com peneira de malha de 1,0 mm. Após o processamento, as amostras foram acondicionadas em potes plásticos. Nas amostras secas foi feita a determinação dos teores de MS laboratorial, mantendo-se a amostra em estufa a 105°C por 24 horas (Association of Official Agricultural Chemists - AOAC, 1990). A porção fibrosa foi analisada quanto ao teor de fibra em detergente neutro (FDN) com auxílio do aparelho Tecnal®, seguindo metodologia de Holden (1999). A porção mineral foi obtida com a incineração das amostras em mufla, a 550°C por 6 horas (AOAC, 1990).

Para as determinações dos teores de etanol, ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico foram utilizadas técnicas de cromatografia líquida de alta precisão (HPLC). Os extratos aquosos das amostras de silagens foram obtidos adicionando 270 mL de água destilada em 30 g da amostra congelada; em seguida, esse material foi homogeneizado em Lab-Blender Stomacher® durante 4 minutos e as amostras foram, previamente, filtradas em gaze. Do volume final obtido para cada amostra, foram retiradas duas porções que foram armazenadas em microtubos do tipo Eppendorff. Uma porção foi

utilizada para leitura de etanol. A outra porção, utilizada para mensuração de ácidos graxos voláteis e lactato, foi acidificada com 10 µL de ácido sulfúrico na concentração de 50% (v/v) para assegurar um pH final entre 2 e 3 (Canale et al., 1984). Uma segunda filtragem foi efetuada em membrana de nitrato-celulose (poro de 0,20 µm) antes da injeção no cromatógrafo. Os ácidos e o etanol foram identificados e suas concentrações foram determinadas pela comparação com os tempos de retenção e quantias definidas de padrões conhecidos. O aparelho (Shimadzu modelo LC-10Ai; Shimadzu Corp., Tokyo, Japão) estava equipado com um sistema duplo de detecção, consistindo de um detector ultra violeta (UV) e um detector de índice de refração (RID – 10A SPD-10Ai). Uma coluna de exclusão de íons Shimadzu (Shim-pack SCR-101H, 7,9 mm X 30 cm), operada na temperatura de 50°C, foi usada para obter a separação cromatográfica. A fase móvel consistia de solução de ácido perclórico a 100 mM com taxa de fluxo de 0,6 mL/min. Os ácidos foram detectados via absorbância de UV (210 nm) e índice de refração, enquanto o etanol foi identificado somente com detector de índice de refração.

Para mensuração do pH, 100 mL de água destilada foram adicionados a 15 g da amostra; a solução foi mantida em agitação com agitador orbital Tecnal – TE 140 a 120 rpm por 10 minutos, quando se procedeu à leitura do pH por meio de um potenciômetro Beckman Expandomatic SS-2.

Para as análises microbiológicas, o preparo das amostras seguiu o mesmo procedimento para todos os períodos avaliados. Para tanto, 70g da amostra foram colocadas, assepticamente, 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, em agitador orbital Tecnal – TE 140 a 120 rpm. A partir desta amostra foram preparadas diluições seriadas para se proceder ao plaqueamento.

Para posterior contagem de clostrídios, as amostras foram congeladas. As amostras utilizadas para congelamento foram preparadas adicionando-se 30 mL da amostra da primeira diluição (10^{-1}), que foi preparada, como citado anteriormente, em 10 mL de glicerol a 80% (v/v) (esterilizado a 121°C por 20 min.), obtendo-se uma concentração final do glicerol de 20% (v/v). As amostras foram congeladas a -20°C.

As contagens totais de BAL, leveduras e clostrídios foram efetuadas tomando-se 0,1 mL de cada diluição, em duplicata, espalhando com alça de Drigalsky no meio de cultivo.

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 total foi 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 saches AnaeroGenTM (Oxoid).

3.1 Delineamento experimental

Os dados foram analisados pelo procedimento PROC GLM do SAS Institute (1985), de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + B_i + I_j + C_k + A_l + D_m + IC_{jk} + IA_{jl} + CA_{kl} + ID_{jm} + AD_{lm} + CD_{km} + ICD_{jkm} + IAD_{jlm} + CAD_{klm} + e_{ijklm}, \text{ onde:}$$

μ = constante inerente a todas as observações;

B_i = efeito de bloco ($i = 1, 2, 3, 4$);

I_j = efeito do inoculante microbiano ($j = \text{com inoculante, sem inoculante}$);

C_k = efeito da cal ($k = \text{com cal, sem cal}$);

A_l = efeito do ácido propiônico ($l = \text{com ácido, sem ácido}$);

D_m = efeito do dia de abertura ($m = 60, 120$);

IC_{jk} = interação entre inoculante microbiano e cal;
 IA_{jl} = interação entre inoculante microbiano e ácido propiônico;
 CA_{kl} = interação entre cal e ácido propiônico;
 ID_{jm} = interação entre inoculante microbiano e dia de abertura;
 AD_{lm} = interação entre ácido propiônico e dia de abertura;
 CD_{km} = interação entre cal e dia de abertura;
 ICD_{jkm} = interação entre inoculante microbiano, cal e dia de abertura;
 IAD_{jlm} = interação entre inoculante microbiano, ácido propiônico e dia de abertura;
 CAD_{klm} = interação entre cal, ácido propiônico e dia de abertura;
 e_{ijklm} = erro associado à observação. Os erros são considerados independentes e normalmente distribuídos, com média igual a zero e variância constante.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de MS da cana-de-açúcar, antes da ensilagem e antes da aplicação dos tratamentos, foi de 24,9% (média de quatro repetições), já o teor de FDN e cinzas foram 52,9 e 5,2 (% da MS), respectivamente. A população de leveduras e BAL presentes na forragem foi de 4,7 e 5,8 log ufc/g forragem e o valor médio de pH ficou em torno de 5,8.

As variáveis avaliadas na cana fresca foram analisadas entre si, não sendo comparadas, estatisticamente, com as variáveis mensuradas na silagem (Tabela 2). A aplicação de alguns aditivos provocou efeitos imediatos sobre as variáveis avaliadas, na cana, antes da ensilagem. O tratamento com cal reduziu a população epifítica de BAL e leveduras (Tabela 2), provavelmente, em razão de um grande aumento no valor de pH nessas silagens. O tratamento com cal aumentou o teor de cinzas (de 4,9 para 10,9) e, também, o teor MS (de 26,1 para 26,9) imediatamente à aplicação. A aplicação de cal resultou em redução no teor de FDN na forragem ($P < 0,01$) (Tabela 2). Amaral et al. (2009), também, observaram redução no teor de FDN na cana tratada com cal virgem (1% MV) antes da ensilagem. No entanto, essa redução imediata à aplicação desse álcali é questionada por causa do período de atuação do tratamento com cal durante a secagem em estufa e o armazenamento da amostra.

Foi observada maior contagem de BAL na cana antes da ensilagem no tratamento com o inoculante (Tabela 2). Como esperado, a cana tratada com ácido propiônico apresentou maior concentração desse ácido e menor valor de pH. Houve aumento no teor de MS e FDN e redução na porcentagem de cinzas, no tratamento com ácido propiônico. A maior população de leveduras nesse tratamento é, provavelmente, decorrente da correção no valor do pH das silagens tratadas com cal pela adição de ácido propiônico.

Os teores de MS observados na silagem estão dentro dos valores relatados por outros autores. Em uma revisão das características das silagens produzidas no Brasil, Zopollatto et al. (2009) apontaram variação de 19,3 a 34,1% de MS após o processo fermentativo.

Houve efeito significativo da adição de ácido propiônico ($P<0,01$) e, também, do inoculante ($P<0,01$) sobre o teor de MS das silagens. Ambos os aditivos causaram redução nos teores médios de MS (22,3 para 21,3% para o ácido propiônico e de 22,1 para 21,5% para o inoculante) (Tabela 6). Em geral, a aplicação de cepas bacterianas heteroláticas na silagem provoca redução no teor de MS. Nessa avaliação, embora a redução tenha sido numericamente pequena, para silagens com e sem inoculante respectivamente, foi estatisticamente significativa ($P<0,01$). Essa maior perda de MS, decorrente da adição da cepa heterolática, é associada a perdas decorrentes do seu metabolismo, que utiliza vias fermentativas menos eficientes (Pahlow et al., 2003). Em uma meta análise, Kleinschmit & Kung Junior (2006) observaram que a inoculação de milho ou outras gramíneas com *L. buchneri* provocou redução na recuperação de MS.

Foi observado efeito significativo ($P<0,01$) entre os fatores cal e dia sobre os teores de MS das silagens de cana-de-açúcar. As silagens tratadas com cal apresentaram maior teor de MS (Tabela 4). Esse aumento provocado pela adição de cal, provavelmente, resultou do acréscimo de MS não fermentável. O aumento do teor de MS em resposta ao emprego de aditivos ricos em minerais foi observado anteriormente em outros trabalhos (Santos et al., 2008; Amaral et al., 2009; Santos et al., 2009). Apesar da maior redução no teor de MS, entre 60 e 170 dias, ter ocorrido na silagem tratada com cal, durante a ensilagem, o teor de MS dessas silagens sofreu redução de 4,2 pontos percentuais, enquanto as silagens não tratadas com cal sofreram redução de 6,6 pontos percentuais.

TABELA 2 Variáveis químicas e microbiológicas da cana-de-açúcar antes da ensilagem.

Variáveis	Com inoculante	Sem inoculante	<i>P</i>	Com ácido	Sem ácido	<i>P</i>	Com cal	Sem cal	<i>P</i>	EPM ⁵
Leveduras (log ¹ ufc/g cana)	4,26	4,12	0,19	4,30	4,08	0,04	3,69	4,69	<0,01	0,07
BAL ² (log ufc/g cana)	5,65	4,84	<0,01	5,27	5,22	0,75	4,67	5,82	<0,01	0,09
pH	8,28	8,28	0,98	7,83	8,72	<0,01	11,46	5,09	<0,01	0,03
MS ³ (%)	26,3	26,7	0,16	27,4	25,6	<0,01	26,9	26,1	<0,01	0,16
			% da MS							
FDN ⁴	50,3	49,2	0,28	48,8	50,7	0,06	47,9	51,5	<0,01	0,68
Cinzas	8,0	7,9	0,47	7,6	8,2	<0,01	10,9	4,9	<0,01	0,08
Ác. Lático	0,13	0,05	0,09	0,03	0,15	0,01	0,16	0,02	0,01	0,03
Ác. Acético	0,93	0,99	0,40	0,93	1,00	0,37	1,25	0,67	<0,01	0,05
Ác. Propiônico	1,23	1,49	0,21	1,98	0,74	<0,01	1,36	1,37	0,96	0,14
Ác. Butírico	0,15	0,20	0,21	0,17	0,19	0,62	0,17	0,19	0,55	0,03
Etanol	ND ⁶	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	-	-

¹ ufc - Unidades formadoras de colônia, ² BAL – Bactérias do ácido lático, ³ MS – Matéria Seca, ⁴FDN – Fibra em detergente neutro, ⁵EPM – Erro padrão das médias, ⁶ND - Não detectado

A redução nos teores de MS, durante a fermentação de silagens, é consensual na literatura (Pedroso et al., 2005; Miranda et al., 2007; Ávila et al., 2008) e é decorrente da atividade metabólica de microrganismos durante o processo fermentativo. Essa redução no teor de MS é indesejável e indica redução na disponibilidade de nutrientes disponíveis para o animal.

Como esperado, o teor de FDN aumentou ($P<0,01$) durante a ensilagem (Tabela 4). O consumo de CNF pela respiração celular, na primeira fase do processo de ensilagem, e por microrganismos, durante a fase de fermentação, faz com que ocorra concentração dos componentes fibrosos em relação à MS total, levando a esse aumento numérico no teor de fibras presentes nas silagens.

Houve efeito significativo entre o aditivo ácido propiônico com o aditivo inoculante ($P=0,05$) e com o aditivo cal virgem ($P<0,01$) (Tabela 3). A adição de cal nas silagens de cana-de-açúcar promoveu grande redução ($P<0,01$) no seu teor de FDN com e sem a adição de ácido propiônico. Entretanto, a adição de ácido propiônico causou aumento no teor de FDN das silagens com e sem cal e esse aumento foi maior na silagem sem cal (Tabela 4). A redução dos teores de fibra da silagem de cana é interessante do ponto de vista nutricional, visto que a fibra presente na cana-de-açúcar tem baixa digestibilidade (Andrade & Pereira, 1999; Corrêa et al., 2003), portanto, o teor de FDN da silagem de cana-de-açúcar é o maior determinante da sua digestibilidade (Teixeira, 2004). O decréscimo no teor de FDN é um dos pontos favoráveis à utilização de óxido de cálcio como aditivo em silagens e ocorre em função da hidrólise alcalina dos componentes da parede celular vegetal.

A redução no teor de fibra, promovida pela aplicação de aditivos alcalinizantes, já foi demonstrada na literatura. Balieiro Neto et al. (2007) observaram redução no teor de FDN de silagens tratadas com 0,5; 1,0 e 2,0 (% na MV) de óxido de cálcio. Os autores observaram que a diferença entre os teores de FDN, antes e após a ensilagem, na silagem com 2% de aditivo, foram de praticamente metade dos ocorridos nas outras silagens. A elevação

nos teores de FDN, após o período fermentativo (Tabela 4), provavelmente, está relacionada ao consumo de carboidratos solúveis. Santos et al. (2008) observaram menor teor de FDN e maior valor de DIVMS em silagens de cana-de-açúcar, tratadas com óxido de cálcio, os teores de FDN foram iguais a 67,10; 52,56 e 54,83% e DIVMS de 48,74; 70,45 e 74,21% para os tratamentos controle, 1 e 1,5% de cal virgem, respectivamente. A solubilização de alguns carboidratos fibrosos, ocasionada pelo tratamento com óxido de cálcio, pode atuar no teor de FDN mensurado. Os carboidratos mensurados, logo, deixam de ser contabilizados na fração fibrosa (FDN) e passam a fazer parte dos carboidratos não fibrosos.

As adições de ácido propiônico e de inoculante microbiano aumentaram os teores de FDN das silagens quando comparados com o tratamento controle (Tabela 6). Isso ocorreu tanto nas silagens com e sem inoculante, com maior efeito na silagem sem inoculante. A alteração nos teores de FDN, causada pelo tratamento com ácido e com inoculante, possivelmente, resultou da concentração dos componentes fibrosos, ou seja, decorrente do maior metabolismo fermentativo, resultando em maior consumo de componentes orgânicos.

A adição de cal virgem aumentou os teores de minerais das silagens de cana-de-açúcar (Tabela 4). Esse acréscimo ocorreu, imediatamente, após o tratamento da forragem com o aditivo e as silagens não tratadas apresentaram seus valores de matéria mineral dentro da amplitude relatada na literatura (Tabela 2). Esse aumento era esperado, em função dos teores de minerais presentes na cal e foi observado, em outros trabalhos, em que foram utilizados aditivos ricos em minerais (Amaral et al., 2009; Santos et al., 2009).

A adição de ácido propiônico, também, aumentou ($P<0,01$) o teor médio de cinzas das silagens de 9,13 para 8,77 (Tabela 4). A variação na fração mineral da silagem é indicativa de variação na fração orgânica. A concentração da fração mineral é sugestiva de maior consumo de matéria orgânica, durante o processo fermentativo e não era esperada no tratamento

TABELA 3 Valores de *P* para os tratamentos estudados.

	I	C	A	Dia	Interações ¹								
					I*C	I*A	C*A	I*Dia	A*Dia	C*Dia	I*C*Dia	I*A*Dia	C*A*Dia
%MS ²	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,57	0,34	0,7	0,48	0,96	<0,01	0,07	0,5	0,26
%FDN ³	0,27	<0,01	<0,01	<0,01	0,89	0,05	<0,01	0,73	0,37	0,1	0,68	0,24	0,18
%Cinzas	0,25	<0,01	<0,01	0,66	0,88	0,46	0,73	0,46	0,06	0,03	0,39	0,87	0,79
Leveduras	0,09	<0,01	<0,01	<0,01	0,22	0,38	<0,01	0,26	0,89	0,34	0,29	0,91	<0,01
BAL ⁴	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,08	0,06	<0,01	0,01	<0,01	<0,01	0,13	0,04	<0,01
<i>Clostridium</i> spp.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
pH	0,44	<0,01	<0,01	0,74	0,06	0,21	0,80	0,71	0,42	0,01	0,31	0,84	0,33
Ác. Lático	0,87	<0,01	0,51	0,05	0,77	0,02	0,17	0,20	0,96	0,37	0,19	0,22	0,22
Ác. Acético	<0,01	0,11	0,11	<0,01	0,47	0,08	1,00	0,14	<0,01	<0,01	0,22	0,32	0,44
Ác. Propiônico	0,07	0,01	<0,01	0,21	0,05	0,24	0,71	0,87	0,4	0,34	0,48	0,54	0,67
Ác. Butírico	0,31	<0,01	0,01	0,31	0,17	0,78	<0,01	0,03	0,25	0,15	0,02	0,32	0,03
Etanol	0,03	<0,01	<0,01	0,06	0,03	0,1	<0,01	0,64	0,76	0,08	0,52	0,75	0,69

¹ Interações: I - inoculante microbiano; C - cal virgem; A - ácido propiônico; Dia - dia de abertura dos silos; ²MS - Matéria Seca;

³FDN - Fibra em Detergente Neutro; ⁴BAL - Bactérias do Ácido Lático.

TABELA 4 Composição química e microbiológica de silagem de cana-de-açúcar tratada com cal, propionato ou inoculante microbiano, em dois tempos de ensilagem.

Variável	TE ¹ (dias)	Média	Com Cal		Sem Cal		Com Cal		Sem Cal		⁶ EPM
			CA ²	SA ³	CA	SA	⁴ CI	⁵ SI	CI	SI	
%MS ⁷	60	22,4	24,2	25,4	19,6	20,5	24,3	25,3	20,0	20,1	
	170	21,1	22,3	23,0	18,9	20,1	22,4	23,0	19,0	20,0	
	Média		23,3	24,2	19,3	20,3	23,4	24,2	19,5	20,1	0,27
%FDN ⁸	60	56,8	49,8	51,2	66,7	59,3	51,6	49,5	63,5	62,5	
	170	61,1	54,8	51,4	72,3	65,9	53,3	52,8	69,6	68,5	
	Média		52,3	51,3	69,5	62,6	52,5	51,2	66,6	65,5	1,50
%Cinzas	60	9,0	12,0	11,5	6,4	5,9	11,8	11,7	6,3	6,1	
	170	8,9	12,0	11,8	6,1	5,8	11,9	11,8	6,0	6,0	
	Média		12,0	11,7	6,3	5,9	11,9	11,8	6,2	6,05	0,11
Leveduras (log ufc ⁹ /g silagem)	60	5,40	5,97*	6,6*	3,45*	5,59*	6,25	6,32	4,45	4,59	
	170	4,78	5,75*	5,22*	2,37*	5,76*	5,44	5,54	3,60	4,54	
	Média		5,86	5,91	2,91	5,68	5,85	5,93	4,03	4,57	0,26
BAL ¹⁰ (log ufc/g silagem)	60	8,57	8,71*	8,71*	8,22*	8,65*	8,71	8,71	8,41	8,46	
	170	7,85	8,39*	8,39*	6,32*	8,30*	8,29	8,49	6,90	7,72	
	Média		8,55	8,55	7,27	8,48	8,50	8,60	7,66	8,09	0,13
<i>Clostridium</i> (log ufc/g silagem)	60	8,31	8,54*	8,56*	7,68*	8,44*	8,52*	8,58*	8,09*	8,03*	
	170	7,75	8,41*	8,39*	5,85*	8,36*	8,31*	8,49*	6,43*	7,79*	
	Média		8,48	8,48	6,77	8,40	8,42	8,54	7,26	7,91	0,11

¹TF – tempo de ensilagem; ²CA – com ácido, ³SA – sem ácido, ⁴CI – com inoculante, ⁵SI – sem inoculante; ⁶EPM – erro padrão das médias; ⁷MS – Matéria seca; ⁸FDN – Fibra em detergente neutro; ⁹ufc – unidade formadora de colônia; ¹⁰BAL – bactérias do ácido láctico.

* $P < 0,01$ – para interação entre três fatores.

com ácido propiônico visto que esse tratamento apresentou a menor população microbiana (Tabela 4).

A ocorrência de microrganismos em silagens é influenciada por diversos fatores, tais como tipo de forrageira, época de corte e até mesmo dos tratamentos culturais aplicados na lavoura (Bolsen, 1995). Durante a confecção da silagem, a altura de corte da planta e os cuidados para evitar contaminação com solo, também, podem influenciar a população microbiana inicial presente na forragem que irá se desenvolver ao longo da fermentação. A vedação eficiente do silo, também, influencia a fermentação e a massa de forragem deve ser mantida em anaerobiose até sua utilização. A mudança da condição anaeróbia leva a uma alteração indesejável dos microrganismos presentes na silagem.

A população inicial de leveduras presentes na cana-de-açúcar antes da ensilagem situou-se entre 3,2 e 4,9 log ufc/g de forragem (Tabela 2), elevando-se até 60 dias (Tabela 4). O número de trabalhos em que foi avaliada a população microbiana de silagens de cana-de-açúcar ainda é pequeno. Pedroso et al. (2005) observaram que a população epifítica de leveduras na cana-de-açúcar estava abaixo do detectável, já Ávila et al. (2009) observaram população de 5,8 log ufc/g forragem. Algumas diferenças observadas, na quantificação de microrganismos, em diferentes trabalhos, também, podem ser resultantes do tipo de meio utilizado para o cultivo do microrganismo.

Bravo-Martins et al. (2006) observaram que a população de leveduras em silagens de diferentes variedades de cana-de-açúcar, após 30 dias de fermentação, oscilou de 6,43 a 6,66 log ufc/g de silagem. Variações de 4,0 a 7,7 log ufc/g de silagem foram relatadas em oito trabalhos revisados por Zopollatto et al. (2009). De acordo com esses autores, as populações de leveduras observadas nas silagens avaliadas neste trabalho estão dentro do esperado.

Houve interação tripla significativa ($P < 0,01$) entre os aditivos cal virgem, ácido propiônico e período de ensilagem sobre a população de leveduras

na silagem (Tabela 3). O tratamento com ácido propiônico foi o que mais inibiu o crescimento de leveduras, durante a fermentação da cana-de-açúcar, nos dois tempos de abertura dos silos. A aplicação de ácido propiônico nas silagens com cal foi capaz de reduzir a população de leveduras de 5,91 para 5,86 log ufc/g silagem (Tabela 4). Não há estudos publicados avaliando a adição de ácidos em silagem de cana-de-açúcar, entretanto, é consensual na literatura que ácidos orgânicos fracos atuam sobre a viabilidade celular de microrganismos (Kung Junior et al., 2003; Selwet, 2008). O uso de ácido propiônico em silagem de milho foi capaz de reduzir ($P<0,05$) o número de leveduras em uma avaliação conduzida por Selwet (2008). O número de células viáveis de leveduras, observada por esse autor, foi de 7,9 e 7,6 log ufc/g silagem nos tratamentos controle e com ácido propiônico, respectivamente.

A adição exclusiva de cal e mesmo a adição de cal combinada com ácido resultou em silagens com maiores populações de leveduras (Tabela 4). Evidenciou-se para este parâmetro que a adição de cal não foi adequada, pois, os valores foram próximos ou superiores aos da silagem sem esses aditivos. O favorecimento desse grupo de microrganismo pode ser decorrente do aumento no pH ocasionado pela adição de cal. Arroyo-López et al. (2009) observaram que algumas espécies de leveduras têm maior crescimento em pH superior a 4,2.

O uso do inoculante mostrou tendência ($P=0,09$) em reduzir a população média de leveduras das silagens de 5,25 para 4,94 log ufc/g silagem (Tabela 4). Apesar de ter ocorrido redução na viabilidade de leveduras, nos tratamentos com cal, com ácido e na combinação de cal e ácido, a população de leveduras na silagem, sem a presença desses aditivos, aumentou de 5,59 para 5,76 log ufc/g silagem no intervalo de 60 para 170 dias (Tabela 4). Uma redução, mesmo na silagem sem aditivos, era esperada em virtude do decréscimo na disponibilidade de substratos e/ou presença de metabólitos tóxicos às leveduras produzidos durante a fermentação (Duarte et al., 2009). Um decréscimo na população de

leveduras, ao longo do processo fermentativo da silagem de cana-de-açúcar, foi relatado por Ávila et al. (2008), quando foi observada uma população de 6,34 log ufc/g silagem, aos 10 dias e 5,36 log ufc/g silagem, após 75 dias de fermentação.

As modificações quantitativas na microbiota das silagens tratadas com ácido propiônico e com cal virgem, também, podem ser explicadas por uma seleção de espécies. Essa constatação pode ser feita em função dos resultados da produção de etanol e de ácidos orgânicos. No tratamento com cal virgem, foi observada a maior população de leveduras (Tabela 4), foi o que apresentou menor teor de etanol e o maior teor de ácido láctico (Tabela 5). Pode-se inferir, portanto, que a grande população de leveduras, nesse tratamento, foi composta por espécies menos eficientes ou não produtoras de etanol. A redução na população de leveduras, observada ao longo da fermentação nas silagens aditivadas com ácido propiônico é, justamente, resultante do seu efeito deletério sobre células de microrganismos. Nesse tratamento, apesar da menor população de leveduras, observa-se maior teor de etanol (Tabela 5).

As bactérias do ácido láctico (BAL) constituem o principal grupo de microrganismos responsável pela conservação da forragem na forma de silagem. Sua presença na forrageira antes da ensilagem, normalmente, é baixa, no entanto, após a vedação do silo, essas bactérias se multiplicam e dominam o processo fermentativo até sua estabilização (Bolsen, 1995).

O número de células viáveis de BAL, observadas na cana-de-açúcar no presente trabalho, situou-se entre 4,0 e 6,2 log ufc/g de forragem (Tabela 2). Pedroso et al. (2005) relataram a contagem inicial de BAL na cana-de-açúcar como sendo igual a 4,58 log ufc/g de forragem, já Ávila et al. (2009) observaram 3,6 log ufc/g de forragem.

Todos os fatores testados influenciaram, significativamente, as contagens de BAL nas silagens, com interação significativa entre cal x ácido x

dia ($P < 0,01$) e inoculante x ácido x dia ($P = 0,04$) (Tabela 3). Houve redução na contagem de BAL, após 60 dias de fermentação (Tabela 4), assim como ocorrido com leveduras, em alguns tratamentos essa redução foi mais pronunciada. A perda de viabilidade é esperada e ocorre pela redução de substrato utilizado como fonte de energia e, também, pelo acúmulo de metabólitos tóxicos produzidos pelos próprios microrganismos envolvidos na fermentação (Duarte et al., 2009). Embora tenha ocorrido redução na população de BAL, o número de células viáveis maior que 8,5 log ufc/g silagem, encontrado após 170 dias de fermentação, é considerado alto (Tabela 4). Logo, pode-se inferir que houve uma falta de estabilização da fermentação, característica de silagem de cana-de-açúcar.

Ávila et al. (2009) registraram contagem de BAL de 8,9 log ufc/g silagem (sem aditivo) aos 90 dias de fermentação. Por meio de testes de identificação, os autores concluíram que todos os isolados pertenciam ao gênero *Lactobacillus*. Pedroso et al. (2005) observaram população de BAL de, aproximadamente, 3,6 log ufc /g silagem após 180 dias de fermentação.

No desdobramento da interação entre os aditivos cal e ácido com os tempos de abertura, observou-se menor população de BAL na silagem sem cal e com adição de ácido propiônico (Tabela 4). Esse ácido tem efeito deletério sobre microrganismos (Kung Junior et al., 2003); por isso, nesse tratamento, foi observada a menor população.

Com 170 dias, verificou-se redução na contagem de BAL de todas as silagens (Tabela 4). Para a silagem sem cal e com ácido, esses valores que, já eram mais baixos, com 60 dias tornaram-se, ainda, menores em relação às silagens com cal e a silagem sem tratamento.

No desdobramento da interação entre inoculante, ácido propiônico e os tempos de abertura dos silos, também, observou-se alta contagem de BAL aos 60 dias, para todas as associações de aditivos e da testemunha, havendo pequena

diferença entre os tratamentos (Tabela 6). Com 170 dias de fermentação, a menor população de BAL foi observada no tratamento com inoculante e ácido (6,91 log ufc/g silagem). Nos demais tratamentos e na silagem sem adição de inoculante ou ácido, as contagens de BAL, ainda, foram muito altas. 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 6).

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 (Figura 5A). 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.

A adição da cepa de *L. buchneri* aumentou ($P<0,01$) a contagem de BAL na forragem, imediatamente, após a inoculação (Tabela 2). No entanto, ao contrário do esperado, a aplicação do inoculante microbiano não aumentou o número de BAL na silagem após o processo fermentativo. Essa mesma cepa, anteriormente testada por Ávila et al. (2009), apresentou comportamento diferente quando inoculada na silagem. Esses autores observaram uma maior população de BAL, imediatamente, após a inoculação e essa população se manteve superior à da silagem não tratada após o período de fermentação.

Todas as interações entre os fatores estudados foram significativas quanto ao número de células viáveis de clostrídios (Tabela 3). A presença desse microrganismo foi considerada alta nas silagens avaliadas. A contagem média de clostrídios na cana-de-açúcar, antes da ensilagem, foi de 5,3 log ufc/g forragem. Até aos 60 dias, foi observado um aumento nessa população; no entanto, dos 60 aos 170 dias de ensilagem a população decresceu de 8,31 para 7,75 log ufc/g silagem (Tabela 4).

A adição de cal aumentou a população de clostrídios na silagem. A adição de ácido propiônico ou inoculante microbiano reduziu a presença desse microrganismo na silagem. A aplicação de inoculante microbiano nas silagens tratadas com cal foi capaz de reduzir o número de clostrídios, já a aplicação de ácido propiônico não teve o mesmo efeito (Tabela 4).

Não existem dados de quantificação da população de clostrídios em silagens de cana-de-açúcar, no entanto, pesquisas que avaliaram outras silagens indicam um número, expressivamente, menor que os encontrados no presente trabalho. Em alguns tratamentos o número de células viáveis ficou em torno de 8,5 log ufc/g silagem. Em silagens de milho e sorgo, as populações estimadas foram de 1,7 e 1,22; 1,74 e 1,37; 1,84 e 1,26 log NMP/g silagem respectivamente, nas silagens de milho e sorgo controle, inoculadas com *L. plantarum* e inoculadas com *L. buchneri* (Tabacco et al., 2009).

Em contraste com os resultados de Tabacco et al. (2009), a adição dessa cepa local de *L. buchneri* teve efeito em reduzir a população de clostrídios nas silagens avaliadas. Uma possível explicação seria a produção de bacteriocinas por essa espécie de BAL que foi inoculada. A capacidade de BAL produzir substâncias antimicrobianas, tais como as bacteriocinas, foi constatada por Gollop et al. (2005).

Ao longo do período fermentativo, nas interações entre o inoculante microbiano com cal ou com ácido (Tabela 4), observou-se um maior efeito do inoculante após 60 dias de fermentação. Esse efeito tardio da inoculação de silagens com cepas de *L. buchneri* foi demonstrado por Schmidt et al. (2009) que, avaliando a população e os metabólitos desse microrganismo em silagem de alfafa, observaram o pico populacional aos 45 dias após a ensilagem.

A utilização de ácido propiônico, associado com inoculante bacteriano, resultou em silagens de cana-de-açúcar com maior teor de ácido láctico (7,32%) (Tabela 6), semelhante ao da silagem sem tratamento (7,20%). Já nos

tratamentos apenas com inoculante e apenas com ácido, foram observadas menores produções de ácido láctico, quando comparados com a silagem sem tratamento e os valores foram iguais a 6,61; 6,80 e 7,20%, respectivamente (Tabela 6).

A adição de cal elevou a concentração de ácido láctico ($P<0,01$) das silagens, sendo 4,44 (%MS) no tratamento sem cal e 9,53 (%MS) no tratamento com cal. A concentração de ácido láctico na silagem tratada com cal virgem está acima dos valores relatados na literatura (Tabela 5). O valor máximo observado em uma revisão de 12 experimentos com silagens de cana-de-açúcar foi de 6,3% (Zopollatto et al., 2009).

Mesmo apresentando maiores concentrações de ácido láctico, os valores de pH das silagens com CaO são maiores. Tal fato, também, foi observado por Santos et al. (2008), cujas silagens tratadas com CaO (1,0% em base de MV) apresentaram valores de ácido láctico e de pH de 3,66% e 4,09, respectivamente, sendo os valores de ácido láctico e pH do tratamento controle iguais a 2,0% e 3,46, respectivamente. O caráter básico do óxido de cálcio eleva o pH da forragem instantaneamente à aplicação (Tabela 2). Esse fato está relacionado a um maior pH final das silagens.

As concentrações de ácidos orgânicos em silagens estão relacionadas com o teor de umidade da forrageira e com o tamponamento dos ácidos produzidos durante a fermentação (Klosterman et al., 1960). O tamponamento dos ácidos produzidos, durante o processo fermentativo, em razão da aplicação de óxido de cálcio, pode ter estimulado a produção desses ácidos nas silagens.

A concentração de ácido láctico aumentou ao longo do processo de fermentação (Tabela 5). O aumento na concentração de ácidos orgânicos, durante um processo fermentativo, ocorre até que o mesmo se estabilize por algum motivo intrínseco de cada material a ser fermentado. Nas silagens do presente trabalho, os resultados sugerem uma não estabilização do processo

fermentativo, pois, registrou-se o aumento do ácido láctico até aos 170 dias após o fechamento dos silos.

Os resultados da quantificação da população de BAL indicam um menor número de células viáveis no tratamento com ácido propiônico (Tabela 6). Mesmo nas silagens em que o inoculante microbiano foi aplicado juntamente com o propionato, não houve aumento dessa população. A maior produção de ácido láctico, nestas silagens, pode ser explicada por uma dominância da cepa local de *L. buchneri* inoculada sobre outras espécies menos eficientes em produzir ácido láctico. Essa espécie de BAL tem um crescimento tardio, durante o processo fermentativo da silagem, indicando, assim, uma maior tolerância às condições ácidas (Schmidt et al., 2009).

A menor concentração de lactato na silagem com inoculante e sem ácido propiônico (Tabela 5) pode ser decorrente da menor capacidade competitiva da cepa inoculada. Em condições normais de ensilagem (sem ácido propiônico), outras espécies menos eficientes na produção de ácido láctico são bem sucedidas na competição com a cepa inoculada, refletindo uma menor produção de ácido láctico. Kleinschmit & Kung Junior (2006) relataram menor concentração de ácido láctico em silagens inoculadas com *L. buchneri*. Já a redução de lactato na silagem tratada com ácido pode ser resultado da menor população bacteriana nesse tratamento (Tabela 5). O teor de ácido láctico, observado na silagem sem inoculante e sem ácido propiônico, apresentou valor próximo ao da silagem com ambos os aditivos (Figura 7). Neste caso, a população microbiana novamente explicaria a maior produção de lactato. O fato da não inoculação com o *L. buchneri* pode ter feito com que as outras bactérias produtoras de ácido láctico e, naturalmente, presentes na cana se desenvolvessem.

A concentração de ácido acético aumentou com o tempo de fermentação de 60 para 170 dias em todos os tratamentos (Tabela 5). Esse aumento, ao final

TABELA 5 Composição química da silagem de cana-de-açúcar tratada com cal, propionato ou inoculante microbiano, em dois tempos de ensilagem.

Variável	TE ¹ (dias)	Média	Com Cal		Sem Cal		Com Cal		Sem Cal		EPM ⁶
			CA ²	SA ³	CA	SA	CI ⁴	SI ⁵	CI	SI	
pH	60	3,91	4,22	4,35	3,49	3,58	4,30	4,27	3,53	3,55	
	170	3,92	4,27	4,40	3,43	3,57	4,34	4,33	3,51	3,49	
	Média		4,25	4,38	3,46	3,58	4,32	4,30	3,52	3,52	0,02
Ác. Lático (% MS)	60	6,75	9,48	9,30	4,15	4,05	9,11	9,68	4,05	4,14	
	170	7,22	10,05	9,27	4,55	5,00	9,98	9,34	4,72	4,84	
	Média		9,77	9,29	4,35	4,53	9,55	9,51	4,39	4,49	0,32
Ác. Acético (%MS)	60	3,68	4,07	4,24	2,91	3,50	4,47	3,84	3,38	3,03	
	170	5,30	5,11	4,05	6,75	5,28	4,97	4,19	6,94	5,10	
	Média		4,59	4,15	4,83	4,39	4,72	4,02	5,16	4,07	0,38
Ác. Propiônico (% MS)	60	2,55	3,75	0,65	4,78	1,01	3,19	1,21	2,76	3,03	
	170	3,07	3,69	0,94	5,18	2,47	2,94	1,69	3,91	3,73	
	Média		3,72	0,80	4,98	1,74	3,07	1,45	3,34	3,38	0,58
Ác. Butírico (% MS)	60	0,32	0,00*	0,02*	1,07*	0,20*	0,00*	0,02*	0,50*	0,77*	
	170	0,65	0,11*	0,89*	1,36*	0,25*	0,47*	0,54*	1,21*	0,40*	
	Média		0,06	0,46	1,22	0,23	0,24	0,28	0,86	0,59	0,15
Etanol (% MS)	60	4,62	1,30	1,13	10,10	5,96	1,24	1,19	6,96	9,10	
	170	3,88	1,30	1,05	8,39	4,79	1,13	1,22	5,95	7,23	
	Média		1,30	1,09	9,25	5,38	1,19	1,21	6,46	8,17	0,54

¹TE – tempo de ensilagem; ²CA – com ácido, ³SA – sem ácido, ⁴CI – com inoculante, ⁵SI – sem inoculante; ⁶EPM – erro padrão das médias.

* $P < 0,01$ – para interação entre três fatores.

TABELA 6 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)	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
%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
%Cinzas	60	9,0	9,3	8,8	9,2	8,6
	170	8,9	9,0	8,9	9,0	8,8
	Média		9,2	8,9	9,1	8,7
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
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
<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
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
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
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
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
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
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

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.

do período de fermentação, pode ser decorrente da utilização do ácido láctico por bactérias heterofermentativas (como *L. buchneri* ou *L. brevis*) adicionadas ou presentes, naturalmente, na cana-de-açúcar. Com 60 dias de ensilagem, a adição de cal aumenta e a de ácido propiônico diminui o teor desse ácido. Com 170 dias de fermentação, a adição de cal reduz e a de ácido aumenta o teor de acetato (Tabela 5).

A adição de inoculante microbiano aumentou ($P<0,01$) a concentração de ácido acético na silagem de 4,04% na silagem sem inoculante para 4,94% na silagem com inoculante (Tabela 4). Outros autores, também, observaram maior produção de ácido acético quando se utilizou *L. buchneri* como cultura iniciadora em silagens (Kleinschmit & Kung Junior, 2006; Ávila et al., 2009). A maior produção desse ácido decorre de uma falha na enzima acetaldeído desidrogenase que impede que o acetaldeído seja transformado em etanol e, assim, o acetilfosfato é convertido a acetato (Elferink et al., 2001).

A presença de ácido acético na silagem resulta, principalmente, do metabolismo de BAL heterofermentativas, no entanto, algumas espécies de clostrídios podem produzir acetato (Hippe et al., 2003). A presença desse ácido na silagem exerce importante papel antifúngico, durante a fermentação e após a abertura dos silos (Danner et al., 2003) e pode ser utilizado pelo ruminante como fonte de energia. Os teores de ácido acético estão dentro dos valores observados por Zopollatto et al. (2009) cujo valor máximo foi de 9,3% e o mínimo de 1,6% relatados de 14 experimentos revisados de silagens de cana.

A ocorrência de ácido butírico em silagens de cana-de-açúcar, normalmente, é baixa e a sua presença, frequentemente, está associada com a fermentação clostrídica. Neste trabalho, as silagens tratadas com cal virgem apresentaram os menores valores de ácido butírico, mesmo apresentando a maior população de clostrídios (Tabela 5). Possivelmente essa ocorrência tenha sido por causa da seleção de espécies de clostrídios, visto que diversas espécies desse

microrganismo não produzem nenhum butirato e, sim, acetato, lactato, formato ou propionato como produtos principais da fermentação (Hippe et al., 2003).

A presença de ácido butírico aumentou ao longo da fermentação (Tabela 5). Até aos 60 dias o emprego de cal virgem inibiu a produção desse ácido e o tratamento com propionato foi o que apresentou a maior concentração de butirato (Tabela 5). A aplicação simultânea de cal e ácido propiônico reduziu a concentração de ácido butírico na silagem de cana, embora a utilização única de ácido propiônico tenha promovido aumento na concentração de butirato (Tabela 5). A alta produção de butirato, observada nas silagens tratadas com ácido propiônico não era esperada, uma vez que silagens tratadas com esse ácido apresentaram a menor população de clostrídios e os menores valores de pH (Tabela 5) e esse é um fator que reduz a população desses microrganismos.

Na maioria dos trabalhos revisados por Zopollatto et al. (2009), os valores de ácido butírico ficaram em torno de 0,1%. Ávila et al. (2009) não detectaram a presença desse ácido em silagens de cana-de-açúcar inoculadas ou não com *L. buchneri*. Já Amaral et al. (2009) observaram concentrações de 3,1% em silagens de cana aditivadas com 1% de cal virgem. Os autores atribuem tal fato ao maior pH das silagens tratadas com cal, possibilitando, assim, o crescimento de clostrídios.

Normalmente, silagens de cana-de-açúcar apresentam baixos teores de ácido propiônico. O valor médio observado em nove trabalhos revisados por Zopollatto et al. (2009) foi de 0,7%. Os valores médios, observados no presente trabalho, estão acima dos citados por esses autores. Como um dos aditivos testados foi o ácido propiônico, já era esperada maior concentração desse ácido nas silagens aditivadas. O esquema em fatorial de disposição dos tratamentos influencia, na análise estatística dos resultados dos outros fatores, fazendo com que a média geral da concentração de ácido propiônico na silagem seja maior em

resposta ao tratamento com o ácido propiônico. No entanto, a comparação entre os tratamentos não é influenciada.

As silagens tratadas com cal virgem apresentaram menores teores de ácido propiônico (Tabela 5). A associação do inoculante microbiano com cal aumentou a concentração de propionato na silagem. A resposta da adição do inoculante microbiano, como fator principal, também, tendeu ($P=0,07$) a aumentar os teores de ácido propiônico nas silagens de cana-de-açúcar (Tabela 3). Na utilização simultânea da cepa indígena de *L. buchneri* e cal o aumento na concentração de propionato foi resultado do metabolismo dessa bactéria. Diferente das outras cepas de *L. buchneri* já avaliadas, essa nova cepa apresenta maior produção de ácido propiônico já relatada em outros trabalhos em que foi avaliada (Ávila et al., 2009; Ávila et al., 2010). Essa maior ocorrência de ácido propiônico, quando *L. buchneri* é utilizado como cultura iniciadora, pode ser resultado do seu metabolismo, no entanto, é, frequentemente, associada à produção de 1,2-propanodiol que é um produto final resultante da conversão anaeróbia do ácido lático a ácido acético (Elferink et al., 2001). O 1,2-propanodiol pode ser convertido em ácido propiônico e 1-propanol por microrganismos que ocorrem naturalmente na silagem. O principal microrganismo associado a esse processo é a bactéria *L. diolivorans* (Krooneman et al., 2002).

Como já era esperado, a adição de ácido propiônico reduziu ($P<0,01$) os valores de pH das silagens de cana-de-açúcar (Tabela 5). A interação entre o tratamento com cal e os tempos de avaliação das silagens foi significativa ($P=0,01$) para os valores de pH. A adição de óxido de cálcio resultou em silagens com maior valor de pH, esse valor sofreu um pequeno aumento de 60 para 170 dias (Tabela 5). As silagens nas quais não foi adicionada a cal apresentaram um valor de pH menor o qual apresentou um pequeno decréscimo de 60 para 170 dias.

Os valores de pH, observados em silagens de cana-de-açúcar, geralmente, são mais baixos que os observados em silagens de outras forrageiras e caem, rapidamente, durante o processo fermentativo (Ávila et al., 2009). Valores mínimos de pH de até 2,7 foram relatados por Zopollatto et al. (2009). A concentração hidrogeniônica exerce grande influência na fermentação de silagens. Diferentes valores de pH alteram a microbiota presente durante a fermentação, alterando, assim, os produtos metabólicos importantes para uma boa preservação da forrageira.

A cal virgem foi o tratamento que exerceu o maior efeito de redução dos teores de etanol das silagens de cana-de-açúcar (Tabela 5), embora as silagens que foram tratadas com cal tenham apresentado as maiores contagens de leveduras. O tratamento com esse álcali pode ter selecionado determinados gêneros de menor capacidade em produzir etanol, como *Pichia* e *Candida*, em detrimento de gêneros com alta produção de etanol, como *Saccharomyces*.

Para as concentrações de etanol, houve interação significativa entre os aditivos cal x ácido ($P < 0,01$) e cal x inoculante ($P < 0,03$). A adição de cal virgem exclusiva ou combinada com ácido propiônico ou com inoculante microbiano causou acentuada redução na concentração de etanol das silagens (Tabela 5). A adição de ácido propiônico, ao contrário, causou aumento nos teores de etanol (Tabela 5). As silagens sem cal e aditivadas com ácido propiônico apresentaram alta concentração de etanol quando comparadas com as silagens sem nenhum tratamento. Ao contrário do que aconteceu com a adição de cal, a adição exclusiva de ácido pode ter selecionado leveduras mais tolerantes à acidez e mais eficientes em produzir etanol.

Além das leveduras, algumas espécies de bactérias têm capacidade para produzir etanol. Como as populações de BAL, tanto no tratamento com cal quanto no com ácido, foram maiores que as populações de leveduras, uma parte do etanol encontrado nessas silagens pode ter se originado do metabolismo

dessas bactérias. Clostrídios, também, têm capacidade de fermentar açúcares a etanol (Hippe et al., 2003), podendo, dessa forma, contribuir com parte da concentração de etanol observada nas silagens.

O inoculante, também, causou redução nos teores de etanol, porém, esse efeito não foi tão intenso quanto o da adição de cal e foi observado apenas nas silagens sem cal (Tabela 5). O efeito da adição de bactérias heterofermentativas da espécie *L. buchneri* na redução do etanol já foi observado em silagens de cana-de-açúcar (Ávila et al., 2009; Ávila et al., 2010) e de gramíneas de clima temperado (Kleinschmit & Kung Junior, 2006). A redução no teor de etanol ($P=0,03$), observada no tratamento com inoculante (Tabela 4), pode estar associada à redução na população de leveduras na silagem (Ávila et al., 2009).

Santos et al. (2008) observaram menor teor de etanol (0,38%) em silagens de cana tratadas com óxido de cálcio (1% em base de MV); as silagens inoculadas com *L. buchneri* apresentaram teores de etanol semelhantes ao da testemunha, com valor de 5,97%. Reduções nos teores de etanol em silagens de cana tratadas com cal (1% na base de MV), também, foram observadas por Amaral et al. (2009), apresentando 3,1 pontos percentuais menos etanol que a silagem controle.

Embora as silagens de cana tratadas com ácido propiônico tenham apresentado alta concentração de etanol (9,25%) (Tabela 5), os valores encontrados estão de acordo com os observados por Zopollatto et al. (2009), cujo maior valor foi de 21,8% e o menor igual a 7,8%, em 19 dados de silagens de cana-de-açúcar.

5 CONCLUSÕES

A cepa indígena de *L. buchneri* estudada melhorou a qualidade das silagens de cana-de-açúcar e os resultados dessa inoculação foram melhores após 170 dias de fermentação. A aplicação dessa cepa, associada ao tratamento com óxido de cálcio, é promissora na melhoria da qualidade microbiológica dessas silagens.

O uso de ácido propiônico promoveu uma redução na população de microrganismos, porém, não foi capaz de reduzir a fermentação alcoólica das silagens.

A utilização de óxido de cálcio melhorou as características químicas e nutricionais das silagens de cana-de-açúcar, no entanto, favoreceu o crescimento de microrganismos indesejáveis.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSU, T.; BAYTOK, E.; BOLAT, D. Effects of a bacterial silage inoculant on corn silage fermentation and nutrient digestibility. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 249-252, Jan./Mar. 2004.

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 7, p. 1598-1624, July 2000.

AMARAL, R. C.; PIRES, A. V.; SUSIN, I.; NUSSIO, L. G.; MENDES, C. Q.; GASTALDELLO JUNIOR, A. L. Cana-de-açúcar ensilada com ou sem aditivos químicos: fermentação e composição química. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 8, p. 1413-1421, ago. 2009.

ANDRADE, J. B.; FERRARI JÚNIOR, E.; BRAUN, G. Valor nutritivo da cana-de-açúcar tratada com hidróxido de sódio e acrescida de rolão de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 10, p. 1265-1268, out. 2001.

ANDRADE, M. A. F.; PEREIRA, M. N. Performance of holstein heifers on fresh sugarcane as the only dietary forage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 1, p. 91, Jan. 1999.

ARROYO-LÓPEZ, F. N.; ORLIC, S.; QUEROL, A.; BARRIO, E. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interpecific hybrid. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 131, n. 2/3, May 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. 15. ed. Arlington, 1990. v. 1, 1141 p.

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.

ÁVILA, C. L. S.; PINTO, J. C.; SUGAWARA, M. S.; SILVA, M. S.; SCHWAN, R. F. Qualidade da silagem de cana-de-açúcar inoculada com uma cepa de *Lactobacillus buchneri*. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 255-261, Mar. 2008.

ÁVILA, C. L. S.; VALERIANO, A. R.; PINTO, J. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. F.; REZENDE, A. V.; SCHWAN, R. F. Chemical and microbiological characteristics of sugar cane silages treated with microbial inoculants. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, n. 1, p. 25-32, jan. 2010.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. (Ed.). **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 1-72.

BALIEIRO NETO, G.; SIQUEIRA, G. R.; REIS, R. A.; NOGUEIRA, J. R.; ROTH, M. T. P.; ROTH, A. P. T. P. Óxido de cálcio como aditivo na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 5, p. 1231-1239, set./out. 2007.

BERNARDES, T. F.; REIS, R. A.; MOREIRA, A. L. Fermentative and microbiological profile of marandugrass ensiled with citrus pulp pellets. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 2, p. 214-220, Mar./Apr. 2005.

BOLSEN, K. K. Silage: basic principles. In: BARNES, R. F.; MILLER, D. A.; NELSON, C. J. **Forages**. 5. ed. Ames: Iowa State University, 1995. p. 163-176.

BRAVO-MARTINS, C. E. C.; CARNEIRO, H.; CASTRO-GOMES, R. J.; FIGUEIREDO, H. C.; SCHWAN, R. F. Chemical and microbiological evaluation of ensiled sugarcane with different additives. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 499-504, Oct./Dec. 2006.

BRITT, D. G.; HUBER, J. T.; ROGERS, A. L. Fungal growth and acid production during fermentation and refermentation of organic acid treated corn silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 58, n. 3, p. 532-539, Mar. 1975.

BRODERICK, G. A.; RICKER, D. B.; VOLLEBREGT, N. Microbial inoculant or propionic acid treatment for preservation of alfalfa silage fed to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 1, p. 174, Jan. 1991.

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.

CARVALHO, B. F.; ÁVILA, C. L. S.; PINTO, J. C.; PEREIRA, M. N.; SCHWAN, R. Efeitos de ácidos orgânicos no crescimento de leveduras isoladas de silagem de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25., 2009, Porto de Galinhas. **Anais...** Porto de Galinhas: Prix, 2009. CD ROM.

CHALUPA, W.; EVANS, J. L.; STILLIONS, M. C. Influence of ethanol on rumen fermentation and nitrogen metabolism. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 23, n. 3, p. 802-807, Mar. 1964.

COAN, R. M.; REIS, R. A.; GARCIA, G. R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; FERREIRA, D. S.; RESENDE, F. D.; GURGEL, F. A. Dinâmica fermentativa e microbiológica de silagens dos capins tanzânia e marandu acrescidas de polpa cítrica peletizada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 5, p. 1502-1511, set./out. 2007.

CORREA, C. E. S.; PEREIRA, M. N.; OLIVEIRA, S. G.; RAMOS, M. H. Performance of holstein cows fed sugarcane or corn silage of different grain textures. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 621-629, Aug./Sept. 2003.

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.

DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S. J. W. H. O. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 22, n. 1, p. 212-217, Jan./Mar. 2000.

DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S. J. W. H. O.; WIKSELAAR, P. G. van. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 56, n. 4, p. 330-343, Dec. 2001.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; PEREIRA, G. V. M.; GERVÁSIO, I. M.; SCHAWN, R. F. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 36, n. 2, p. 557-569, Feb. 2009.

DURIX, A.; JEAN-BLAIN, C.; SALLMANN, H. P.; JOUANY, J. P. Use of semi-continuous culture system (Rusitec) to study the metabolism of ethanol in the rumen and its effects on ruminal digestion. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 71, n. 1, p. 115-123, Jan./Mar. 1991.

ELFERINK, S. J. O.; W. H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J. A.; SPOELSTRA, S. F.; FABER, F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 125-132, Jan. 2001.

EL-SHANAWANY, A. A.; MOSTAFA, M. E.; BARAKAT, A. Fungal populations and Mycotoxins in silage in Assuit and Sohag governorates in Egypt, with special reference to characteristic Asperigilli toxins. **Mycopathologia**, New York, v. 159, n. 2, p. 281-289, Feb. 2005.

FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 11, p. 3575-3581, Nov. 2003.

FREITAS, A. W. P.; PEREIRA, J. C.; ROCHA, F. C.; DETMANN, E.; RIBEIRO, M. D.; COSTA, M. G.; LEONEL, F. P. Características da silagem de cana-de-açúcar tratada com inoculante bacteriano e hidróxido de sódio e acrescida de resíduo da colheita de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 1, p. 48-59, jan./fev. 2006.

GIFFEL, M. C. T.; WAGENDORP, A.; HERREWEGH, A.; DRIEHUIS, F. Bacterial spores in silage and raw milk. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 81, n. 1/4, p. 625-630, Dec. 2002.

GOERING, H. K.; GORDON, C. H. Chemical aids to preservation of high moisture feeds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 56, n. 10, p. 1347-1351, Oct. 1973.

GOLLOP, N.; ZAKIN, V.; WEINBERG, Z. G. Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 3, p. 662-666, Mar. 2005.

GORDON, D. T.; MORGAN, M. E. Principal volatile compounds in feed-flavoured milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 55, n. 7, p. 905-912, July 1972.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The Prokaryotes, an evolving electronic resource for the microbiological community**. New York: Springer-Verlag, 2003. p. 320-403.

HERON, S. J. E.; WILKINSON, J. F.; DUFFUS, C. M. Enterobacteria associated with grass and silages. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, n. 1, p. 13-17, Jan. 1993.

HIPPE, H.; ANDREESEN, J. R.; GOTTSCHALK, G. The genus *clostridium*-nonmedical. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The prokaryotes, an evolving electronic resource for the microbiological community**. New York: Springer-Verlag, 2003. p. 1800-1866.

HOLDEN, L. A. Comparison of methods of *in vitro* dry matter digestibility for ten 565 feeds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 8, p. 1791-1794, Aug. 1999.

HUBER, J. T.; SOEJONO, M. Organic acid treatment of high dry matter corn silage fed lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 59, n. 12, p. 2063-2070, Dec. 1976.

JACKSON, M. G. Review article: the alkali treatments of straws. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 105-130, Feb. 1977.

JULIEN, M. C.; DION, P.; LAFRENIÈRE, C.; ANTOUN, H.; DROUIN, P. Sources of clostridia in raw milk on farms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 20, p. 6348-6357, Oct. 2008.

KLEINSCHMIT, D. H.; KUNG JUNIOR, L. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 10, p. 4005-4013, Oct. 2006.

KLOPFENSTEIN, T. Increasing the nutritive value of crop residues by chemical treatments. In: HUBER, J. T. **Upgrading residues and products for animals**. New York: CRC, 1980. p. 40-60.

KLOSTERMAN, E. W.; JOHNSON, R. R.; SCOTT, H. W.; MOXON, A. L.; STAVERN, J. V. Whole plant and ground ear corn silages, their acid content, feeding value and digestibility. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 19, n. 2, p. 522-532, Feb. 1960.

KRISTENSEN, N. B.; STORM, A.; RAUN, B. M. L.; ROJEN, B. A.; HARMON, D. L. Metabolism of silage alcohols in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 3, p. 1364-1377, Mar. 2007.

KROONEMAN, J.; FABER, F.; ALDERKAMP, A. C.; ELFERINK, S. J. H. O. W.; DRIEHUIS, F.; CLEENWECK, I.; SWINGS, J.; GOTTSCHAL, J. C.; VANCANNEYT, M. *Lactobacillus diolovorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, n. 2, p. 639-646, Mar. 2002.

KUNG JUNIOR, L.; MUCK, R. E. Animal response to silage additives. In: SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK-NORTH AMERICAN CONFERENCE, 1997, Hershey. **Proceedings...** New York: NRAES-99, 1997. p. 200-210.

KUNG JUNIOR, L.; MYERS, C. L.; NEYLON, J. M.; TAYLOR, C. C.; LAZARTIC, J.; MILLS, J. A.; WHITER, A. G. The effects of buffered propionic acid-based additives alone or combined with microbial inoculation on the fermentation of high moisture corn and whole-crop barley. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, n.5, p.1310-1316, May 2004.

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.

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.

LAMBERT, R. J.; STRATFORD, M. Weak-acid preservatives: modeling microbial inhibition and response. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 1, p. 157-164, Jan. 1999.

MADINGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 8. ed. New Jersey: Prentice, 1997. 986 p.

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

MENDES, C. Q.; SUSIN, I.; NUSSIO, L. G.; PIRES, A. V.; RODRIGUES, G. H.; URANO, F. S. Efeito do *Lactobacillus buchneri* na fermentação, estabilidade aeróbia e no valor nutritivo da silagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 37, n. 12, p. 2191-2198, dez. 2008.

MILLS, J. A.; KUNG JÚNIOR, L. The effect of delayed ensiling and application of a propionic acid-based additive on the fermentation of barley silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 8, p. 1969-1975, Aug. 2002.

MIRANDA, D. C. L.; DIAS JÚNIOR, G. S.; PEREIRA, M. N.; SPURI, R.; LOPES, F.; SANTOS, G. Change in dry matter content of sugarcane silage treated with chemical and microbiological additives. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 1, p. 289, Jan. 2007.

MOON, N. J. Inhibition of the growth of acid-tolerant yeasts by acetate, lactate, propionate, and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 453-460, Apr. 1983.

MUCK, R. E. Initial bacterial numbers on lucerne prior to ensiling. **Grass and Forrage Science**, British, v. 44, n. 1, p. 19-25, Mar. 1989.

MUCK, R. E. Advances in inoculants for silage. In: SYMPOSIUM ON STRATEGIC MANAGEMENT OF PASTURE AND, 2.; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL PRODUCTION UNDER GRAZING, 2., 2008, Viçosa, MG. **Proceedings...** Viçosa, MG: UFV, 2008. p. 221-232.

NUSSIO, L. G.; SANTOS, M. C.; QUEIROZ, O. C. M. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n. 57, p. 40-66, jun. 2008.

OHYAMA, Y.; MASAKI, S.; HARA, S. Factors influencing aerobic deterioration of silages and changes in chemical composition after opening silos. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 26, n. 6, p. 1137-1147, June 1975.

OSTLING, C. E.; LINDGREN, S. E. Influences of enterobacteria on the fermentation and aerobic stability of grass silages. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 50, n. 1, p. 41-47, Mar. 1995.

PAHLOW, G.; MUCK, R. E.; DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S. J. W. H. O.; SPOELSTRA, S. F. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 31-94.

PEDROSO, A. F.; NUSSIO, L. G.; LOURES, D. R. S.; PAZIANI, S. F.; IGARASI, M. S.; COELHO, R. M.; HORII, J.; RODRIGUES, A. A. Efeito do tratamento com aditivos químicos e inoculantes bacterianos nas perdas e na qualidade de silagens de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 3, p. 558-564, maio/jun. 2007.

PEDROSO, A. F.; NUSSIO, L. G.; LOURES, D. R. S.; PAZIANI, S. F.; RIBEIRO, J. L.; MARI, L. J.; ZOPOLLATTO, M.; SCHMIDT, P.; MATTOS, W. R. S.; HORII, J. Fermentation, losses, and aerobic stability of sugarcane silage treated with chemical or bacterial additives. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 6, p. 589-594, Nov./Dec. 2008.

PEDROSO, A. F.; NUSSIO, L. G.; PAZIANI, S. F.; LOURES, D. R. S.; IGARASI, M. S.; COELHO, R. M.; PACKER, I. H.; HORII, J.; GOMES, L. H. Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 5, p. 427-432, Sept./Oct. 2005.

QUEIROZ, O. C. M.; NUSSIO, L. G.; SCHMIDT, P.; RIBEIRO, J. L.; SANTOS, M. C.; ZOPOLLATTO, M. Silagem de cana-de-açúcar comparada s fontes tradicionais de volumosos suplementares no desempenho de vacas de alta produção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 37, n. 2, p. 358-365, Feb. 2008.

RAEKER, M. O.; BERN, C. J.; JOHNSON, L. A.; GLATZ, B. A. Preservation of high-moisture maize by various propionate treatments. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 69, n. 1, p. 66-69, Jan. 1992.

- RAMMER, C.; LINGVALL, P.; SALOMON, E. Ensiling of manured crops – Does repeated spreading of slurry increase the hygienic risk? **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 73, n. 2, p. 329-336, Dec. 1997.
- RAMMER, C.; OSTLING, C.; LINGVALL, P.; LINDGREN, S. Ensiling of manured crops: effects on fermentation. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 343-351, Sept. 1994.
- RANDBY, A.; SELMER-OLSEN, E. I.; BAEVRE, L. Effect of ethanol in feed on milk flavour and chemical composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 2, p. 420-428, Feb. 1999.
- REYES-GUTIERREZ, J. A.; PALMA-GARCIA, J. M.; TAPIA-GONZALEZ, J. M.; MORALES-ZAMBRANO, I. E.; ROCHA-CHAVEZ, G. The effect of feeding sugar cane (*Saccharum officinarum*) or corn silage to Holstein heifers on development and reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 1, p. 289, Jan. 2007.
- ROSSI, F.; DELLAGLIO, F. Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of microbial indicators. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 5, p. 1707-1715, Nov. 2007.
- SANAA, M.; POUTREL, B.; MENARD, J. L.; SERIEYS, F. Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 10, p. 2891-2898, Oct. 1993.
- SANTOS, M. C.; NUSSIO, L. G.; MOURÃO, G. B.; SCHMIDT, P.; MARI, L. J.; RIBEIRO, J. L. Influência da utilização de aditivos químicos no perfil da fermentação, no valor nutritivo e nas perdas de silagens da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 37, n. 9, p. 1555-1563, set. 2008.
- SANTOS, M. C.; NUSSIO, L. G.; MOURÃO, G. B.; SCHMIDT, P.; MARI, L. J.; RIBEIRO, J. L.; QUEIROZ, O. C. M.; ZOPOLLATTO, M.; SOUZA, D. P.; SARTURI, J. O.; TOLEDO FILHO, S. G. Nutritive value of sugarcane silage treated with chemical additives. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 2, p. 159-163, Mar./Apr. 2009.
- SAS INSTITUTE. SAS[®] user's guide: statistics. 5. ed. Cary, 1985. 1290 p.

SCHMIDT, P.; MARI, L. J.; NUSSIO, L. G.; PEDROSO, A. F.; PAZIANI, S. F.; WECHSLER, F. S. Aditivos químicos e biológicos na ensilagem de cana-de-açúcar. 1. Composição química das silagens, ingestão, digestibilidade e comportamento ingestivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 5, p. 1666-1675, set./out. 2007.

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.

SEBASTIAN, S.; PHILLIP, L. E.; FELLNER, V.; IDZIAK, E. S. Comparative assessment of bacterial inoculation and propionic acid treatment of aerobic stability and microbial populations of ensiled high-moisture ear corn. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 4, p. 447-456, Apr. 1996.

SELWET, M. Effect of organic acids on numbers of yeasts and mould fungi and aerobic stability in the silage of corn. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, Oczapowskiego, v. 11, n. 2, p. 119-123, Feb. 2008.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análises de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 235 p.

SIQUEIRA, G. R.; REIS, R. A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; BERNARDES, T. F.; PIRES, A. J. V.; ROTH, M. T. P.; ROTH, A. P. T. P. Associação entre aditivos químicos e bacterianos na ensilagem da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 4, p. 789-798, jul./ago. 2007.

SLAGHUIS, B. A.; TE GIFFEL, M. C.; BEUMER, R. R.; ANDRE, G. Effect of pasturing on the incidence of *Bacillus cereus* spores in raw milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 7, n. 4, p. 201-205, Apr. 1997.

SOEST, P. J. van. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476 p.

STROM, K.; SJOGREN, J.; BROBERG, A.; SCHNÜRER, J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4322-4327, Sept. 2002.

TABACCO, E.; PIANO, S.; CAVALLARIN, L.; BERNARDES, T. F.; BORREANI, G. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 271, p. 1-10, Mar. 2009.

TEIXEIRA, C. B. **Determinantes da degradabilidade entre clones de cana-de-açúcar no rúmen de bovinos**. 2004. 72 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VALERIANO, A. R.; PINTO, J. C.; ÁVILA, C. L. S.; EVANGELISTA, A. R.; TAVARES, V. B.; SCHWAN, R. F. Efeito da adição de *Lactobacillus sp.* na ensilagem da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 6, p. 1009-1017, jun. 2009.

VILAR, M. J.; YUS, E.; SANJUÁN, M. L.; DIÉGUEZ, F. J.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 11, p. 5083-5088, Nov. 2007.

VISSERS, M. M. M.; DRIEHUIS, F.; TE GIFFEL, M. C.; JONG, P. de; LANKVELD, J. M. G. Concentrations of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 2, p. 928-936, Feb. 2007 a.

VISSERS, M. M. M.; DRIEHUIS, F.; GIFFEL M.C.; JONG, P.; LANKVELD, J. M. G. Minimizing the level of butyric acid bacteria spores in farm tank milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 7, p. 3278-3285, July 2007 b.

VISSERS, M. M. M.; GIFFEL, M. C.; DRIEHUIS, F.; DE JONG, P.; LANKVELD, J. M. G. Minimizing the level of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 7, p. 3286-3293, July 2007c.

VOELKER, H. H.; CASPER, D. P.; LUDENS, F. C.; SCHINGOETHE, D. J. High moisture corn preserved with esters of propionic acid for lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, n. 1, p. 89-92, Jan. 1989.

WEINBERG, Z. G.; CHEN, Y.; GAMBURG, M. The passage of lactic acid bacteria from silage into rumen fluid, *in vitro* studies. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 10, p. 3386-3397, Oct. 2004.

WEINBERG, Z. G.; MUCK, R. E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 53-68, Jan. 1996.

WEINBERG, Z. G.; SHATZ, O.; CHEN, Y.; YOSEF, E.; NIKBAHAT, M.; BEN-GHEDALIA, D.; MIRON, J. Effect of lactic acid bacteria inoculants on *in vitro* digestibility of wheat and corn silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 10, p. 4754-4762, Oct. 2007.

WOOLFORD, M. K. Microbiological screening of straight chain fatty acids (C1-C12) as potential silage additives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 26, n. 3, p. 219-228, Apr. 1975.

WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation**. New York: Marcel Dekker, 1984. 350 p.

ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 1, p. 170-189, jan. 2009.