

**ADITIVOS BACTERIANOS NA ENSILAGEM
DE CANA-DE-AÇÚCAR**

ALEXANDRE ROCHA VALERIANO

2007

ALEXANDRE ROCHA VALERIANO

ADITIVOS BACTERIANOS NA ENSILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Forragicultura e Pastagem, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. José Cardoso Pinto

**LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
2007**

ALEXANDRE ROCHA VALERIANO

ADITIVOS BACTERIANOS NA ENSILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Forragicultura e Pastagem, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 13 de Julho de 2007.

PROF^a. ROSANE FREITAS SCHWAN, PhD,

DBI/UFLA

PROF. ANTÔNIO RICARDO EVANGELISTA, DSc,

DZO/UFLA

PROF. ADAUTON VILELA DE REZENDE, DSc

UNIFENAS

**José Cardoso Pinto
(UFLA)
Orientador**

**LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
2007**

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

Valeriano, Alexandre Rocha

Aditivos bacterianos na ensilagem de cana-de-açúcar / Alexandre Rocha

Valeriano. -- Lavras : UFLA, 2007.

74 p. : il.

Orientador: José Cardoso Pinto.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Silagem. 2. Inoculante. 3. Estabilidade aeróbia. 4. Microrganismo. 5.
Fermentação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-636.08552

"Depois de ter se esforçado para conseguir o que quer,
conceda-se o tempo para desfrutá-lo."

S. Brown

A

Meus pais, **Tirézio Valeriano e Denize Diniz Rocha Valeriano;**

e a minhas irmãs, **Valéria e Vanessa;**

DEDICO

À minha avó Maria, que completa seu centésimo aniversário
no presente ano, e nos presenteia com sua magnífica
experiência de vida.

OFEREÇO

Agradecimentos

A Deus, por sempre iluminar minha vida e me indicar o caminho do bem.

À Universidade Federal de Lavras, notadamente a todos os professores do Departamento de Zootecnia (DZO), que de alguma forma me auxiliaram na confecção desta pesquisa.

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

Ao professor Dr. José Cardoso Pinto que, muito além de um orientador e incentivador, se tornou um grande amigo neste período de convivência.

À professora Rosane Freitas Schwan pelas orientações e por permitir que o trabalho fosse conduzido no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia, mas principalmente pelos ensinamentos e amizade.

Aos professores Antônio Ricardo Evangelista e Aداuton Vilela de Rezende pelas sugestões que contribuíram grandemente para o aprimoramento do trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Pesquisa Animal, Márcio, Suelba, José Virgílio e Eliana, pela ajuda na realização das análises laboratoriais.

Aos secretários da Pós-graduação Katia e Carlos Henrique.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Biologia, Ivani e Magda, pela amizade e colaboração sempre que foi preciso.

A todos os professores e alunos de Iniciação Científica, com os quais eu convivi durante todo o tempo de condução do experimento, em um ambiente em que a amizade e a solidariedade foram de fundamental importância para o sucesso do trabalho.

Àqueles amigos que já existiam antes de iniciar a caminhada, muito obrigado pela força e respeito às minhas escolhas; e aos amigos que conquistei ao longo do curso agradeço pelo estímulo nas horas difíceis, o acolhimento e a solidariedade nesse período de convivência.

A todos os colegas de Pós-graduação, principalmente Carla Luiza da Silva Ávila e Valdir Botega Tavares, pela importante ajuda no projeto e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos bolsistas de Iniciação Científica Myuki Sueli Sugawara e Dâmiany pela amizade e pela imprescindível ajuda durante a condução do experimento e das análises laboratoriais.

Aos amigos Gabriel, Lécio, Vitória, Waldete, Bárbara, Cleilton, Thaís, Giovana, Lucilene, Athayde, Roberto Minetto, Magela, Farah, Letícia, Rejane, Cândido e tantos outros que, virtual ou pessoalmente, dividiram comigo as alegrias e dificuldades ao longo dessa caminhada.

Aos colegas de faculdade pela troca de experiências, construindo, dessa forma, o conhecimento através das diferenças.

Aos colegas de Pós-graduação, aos quais manifesto minha gratidão pelo carinho, amizade e incentivo.

Não quero simplesmente agradecer. Quero trazer para dentro do meu texto aqueles que já o percorrem nas entrelinhas. E não só aos que me ajudaram efetivamente na construção desta dissertação, mas aos amigos e colegas que compartilharam idéias, plantaram discussões, que me trouxeram pérolas poéticas, que construíram frases espirituosas e fortuitas sobre os rascunhos. Àqueles que me ajudaram, de alguma forma, no meu percurso nesses quase dois anos e, principalmente, a seguir adiante com a escritura, sem perder o que pulsa, o que vibra, agradeço imensamente.

MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

ALEXANDRE ROCHA VALERIANO, filho de Tirézio Valeriano e Denise Diniz Rocha Valeriano, nasceu em 3 de novembro de 1981, no município de Itaúna, estado de Minas Gerais.

Em fevereiro de 1998, ingressou na Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal (CEDAF-UFV), onde, em dezembro de 2000, obteve o título de Técnico Agrícola.

Em janeiro de 2001, ingressou na Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS; em agosto de 2004 foi membro (coordenador) do Núcleo de Estudos em Pastagens e Forragicultura – NEPAR e, no período de 2003 a 2005, bolsista de Iniciação Científica; em dezembro de 2005 obteve o título de Engenheiro Agrônomo.

Em março de 2006 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Federal de Lavras, concentrando seus estudos na área de Forragicultura e Pastagem.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Cana de açúcar como opção forrageira	3
2.2 Silagem de cana-de-açúcar	3
2.3 Uso de inoculantes na ensilagem de cana-de-açúcar	7
2.4 Estabilidade aeróbia	13
2.4.1 Microrganismos envolvidos na deterioração aeróbia das silagens	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Localização e clima	19
3.2 Preparo da forragem para ensilagem	19
3.3 Preparo dos inoculantes e tratamentos	20
3.4 Ensilagem da cana-de-açúcar	21
3.5 Avaliação de parâmetros químicos do processo de fermentação	22
3.6 Avaliação de parâmetros microbiológicos da silagem	23
3.7 Avaliação da estabilidade aeróbia das silagens	24
3.8 Delineamento experimental e análise estatística	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Caracterização da cana-de-açúcar no momento da ensilagem	26
4.1.1 Parâmetros químicos	26
4.1.2 Parâmetros microbiológicos	29
4.2 Silagens no momento da abertura	30

4.2.1	Parâmetros químicos e bromatológicos	30
4.2.2	Parâmetros microbiológicos.....	40
4.2.3	Produções de ácidos graxos voláteis, ácido lático e etanol.....	44
4.2.4	Estabilidade aeróbia	50
5	CONCLUSÕES	55
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
	ANEXOS.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

AGV: Ácidos graxos voláteis.

BAL: Bactérias do ácido láctico.

CHOs: Carboidratos solúveis.

CV: Coeficiente de variação.

DIVMS: Digestibilidade *in vitro* da matéria seca.

EA: Estabilidade aeróbia.

FDA: Fibra em detergente ácido.

FDN: Fibra em detergente neutro.

FF: Fungo filamentoso.

FV: Fontes de variação.

GL: Graus de liberdade.

HEMI: Hemicelulose.

LEV: Levedura.

MS: Matéria seca.

MV: Matéria verde.

NH₃: Teor de nitrogênio amoniacal como porcentagem do nitrogênio total.

PB: Proteína bruta.

QM: Quadrado médio.

TMAX: Temperatura máxima.

TTMAX: Tempo para atingir a temperatura máxima.

ufc: Unidades formadoras de colônia.

RESUMO

VALERIANO, Alexandre Rocha. **Aditivos bacterianos na ensilagem de cana-de-açúcar**. 2007. 74p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras. *

Objetivou-se avaliar o efeito de aditivos microbianos com bactérias heterofermentativas ou homofermentativas sobre as características microbiológicas e bromatológicas de silagens de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). O Experimento foi conduzido nos Departamentos de Zootecnia e Biologia da Universidade Federal de Lavras. A cana-de-açúcar foi colhida com 12 meses de rebrota e armazenada em silos experimentais de “PVC” durante 90 dias. No momento da ensilagem a cana-de-açúcar foi inoculada com as seguintes bactérias: *Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei*, *L. brevis* e *L. buchneri*, isolados de silagens de cana-de-açúcar; três inoculantes comerciais, dois contendo *L. buchneri* e um, *L. plantarum*; e Controle (sem inoculação). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com oito tratamentos e três repetições. Os parâmetros avaliados foram: pH, matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose (HEMI), cinzas, carboidratos solúveis (CHOs), nitrogênio amoniacal (NH₃), leveduras (LEV), bactérias ácido lácticas (BAL), fungos filamentosos (FF), ácidos graxos voláteis, ácido láctico, etanol e estabilidade aeróbia. A inoculação com *L. brevis* foi a que melhor preservou a fração FDN após a conservação. A população de FF esteve abaixo da população detectável (2,0 log ufc/g) e a de BAL foi alta, mas a de LEV foi intensamente inibida pelos inoculantes *L. buchneri* (isolado) e *L. buchneri* (comercial) em função da mais alta concentração de ácido acético, resultando também em menor produção de etanol e maior estabilidade aeróbia dessas silagens. A utilização de inoculantes contendo *L. plantarum* e *L. paracasei* mostrou-se prejudicial ao processo de conservação da cana-de-açúcar, aumentando a produção de etanol e provocando perdas de nutrientes. Essas silagens apresentaram baixas estabilidades quando expostas ao ar. A ensilagem da cana-de-açúcar com *L. buchneri* resultou em silagens com melhores características bromatológicas, baixas populações de leveduras e maiores estabilidades aeróbias. Das bactérias isoladas da própria cana-de-açúcar, o *L. buchneri* apresentou resultados análogos aos inoculantes comerciais.

* **Comitê de Orientação:** José Cardoso Pinto – UFLA/DZO (Orientador); Rosane Freitas Schwan – UFLA/DBI; Antônio Ricardo Evangelista - DZO/UFLA.

ABSTRACT

VALERIANO, Alexandre Rocha. **Bacterial additives in sugar cane ensiling.** 2007. 74p. Dissertation (Master's degree in Animal Science) – Federal University of Lavras, Lavras. *

This research work aimed to evaluate the effect of microbial additives with hetero fermentative or homo fermentative bacteria on the microbiologic and bromatologic characteristics of silage of sugar cane (*Saccharum* spp.). The experiment was conducted in the departments of Animal Science and Biology of the Federal University of Lavras. The sugar cane was harvested at 12 months' growth, stored in experimental "PVC silos for 90 days. The sugar cane was inoculated at the moment of ensiling with the following bacteria: *Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. buchneri*, these being sugar cane silage isolates, three commercial inoculants, two of them containing *L. buchneri* and one *L. plantarum* and Control (without inoculation). The utilized design was completely randomized with eight treatments and three replications. The evaluated parameters were: pH, dry matter (DM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), hemicellulose (HEMI), ashes, soluble carbohydrates (CHOs), ammonium nitrogen (NH₃) yeasts (LEV), lactic acid bacteria (BAL), filamentous fungi (FF), volatile fatty acids, lactic acid, ethanol and aerobic stability. The inoculation with *L. brevis* was the one which best preserved the NDF fraction after conservation. The population of FF was below the detectable population (2.0 log cfu/g) and the one of BAL was high, but the one of LEV was markedly inhibited by the inoculants *L. buchneri* (isolate) and *L. buchneri* (commercial) as related to the highest concentration of acetic acid, resulting also in less production of ethanol and greater aerobic stability of those silages. The use of inoculants containing *L. plantarum* and *L. paracasei* proved harmful to the process of conservation of sugar cane, increasing ethanol production, nutrient losses. Those silages presented poor stabilities when exposed to air. The sugar cane ensiling with *L. buchneri* resulted into silages with best bromatologic characteristics, low yeast populations and higher aerobic stabilities. Out of the bacteria isolated from sugar cane itself, *L. buchneri* showed results analogous to the ones of commercial inoculants.

* **Guidance Committee:** José Cardoso Pinto – UFLA/DZO (Adviser); Rosane Freitas Schwan – UFLA/DBI; Antônio Ricardo Evangelista - DZO/UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Tradicionalmente a cana-de-açúcar é colhida diariamente, sendo, então, picada e fornecida aos animais. Entretanto, o uso da planta em sistemas de produção intensivos e de grande escala tem aumentado, acelerando uma crescente demanda por novas tecnologias. Além disso, o corte diário torna-se problemático em situações em que se deseja utilizar a cana-de-açúcar como forrageira durante todo o ano por causa da dificuldade de colheita em dias de chuva e da perda no seu valor nutritivo durante o verão. Canaviais que foram submetidos a queima ou que sofreram fortes geadas também devem ser utilizados rapidamente para não serem perdidos.

A possibilidade do uso da cana-de-açúcar na forma de silagem tem sido uma alternativa para resolver os problemas advindos do corte diário, além, é claro, da praticidade que o uso de silagens proporciona a todo o sistema de produção. Porém, por apresentar grande quantidade de carboidratos solúveis, a cana-de-açúcar é altamente susceptível ao ataque de leveduras. Dentro do ambiente anaeróbio do silo, as leveduras são capazes de gerar perdas significativas em função da fermentação alcoólica.

A maioria dos inoculantes bacterianos para silagem existentes no mercado contém uma ou mais espécies de bactérias ácido lácticas (BAL) homofermentativas, que são mais rápidas e eficientes produtoras de ácido láctico. Todavia, alguns estudos têm mostrado que o excesso de BAL pode piorar a estabilidade aeróbia das silagens em virtude da redução da concentração de ácido acético, que é mais eficiente em inibir o crescimento de leveduras. Recentes estudos têm mostrado que a adição de inoculantes contendo cepas da bactéria heterofermentativa *Lactobacillus buchneri* à silagem pode inibir o crescimento de leveduras e melhorar a sua estabilidade aeróbia em razão do aumento na concentração do ácido acético. Porém, no Brasil, são raros os

trabalhos estudando a influência da adição desse microrganismo sobre a microbiota das silagens e, portanto, sobre as suas características de fermentação e de deterioração aeróbia.

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito de aditivos microbianos com bactérias heterofermentativas ou homofermentativas, isolados em silagens de cana-de-açúcar e de produtos comerciais, sobre características microbiológicas e bromatológicas de silagens de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cana de açúcar como opção forrageira

O alto potencial forrageiro da cana-de-açúcar no Brasil é decorrente da sua grande capacidade de produção de matéria seca (MS) e do alto conteúdo de energia por unidade de MS. Schmidt et al. (2004) determinaram valores de produção da variedade IAC 87-3184 de 183,5 t/ha de matéria verde (MV), equivalendo a 59,3 t/ha de MS. Já Lima & Mattos (1993) obtiveram produções entre 15 e 20 t/ha de nutrientes digestíveis totais (NDT), maiores que as produções observadas com milho (*Zea mays* L.), sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] e mandioca (*Manihot sculenta* Crantz), que produzem cerca de 8 t/ha de NDT.

Nussio & Schmidt (2005) ressaltam o baixo custo por tonelada de MS como ponto atrativo no uso da cana-de-açúcar na produção animal. Atualmente, o custo por tonelada de MS é de aproximadamente R\$ 200, 00, considerando a planta colhida com teor de 30% de MS.

Ainda que apresente inúmeras vantagens, a cana-de-açúcar tem limitações do ponto de vista nutricional (Nussio & Schmidt, 2005) e quanto à operacionalização da colheita diária (Junqueira, 2006).

2.2 Silagem de cana-de-açúcar

Na época das secas, a cana-de-açúcar se encontra com alto valor nutritivo, podendo ser fornecida fresca e picada diariamente. No entanto, esse manejo tem a desvantagem de demandar mão-de-obra diária para corte, picagem e transporte, estabelecendo, assim, uma limitação operacional quando se pretende suplementar rebanhos de maior porte (Nussio et al., 2003).

Tendo em vista os problemas relacionados ao corte escalonado e à colheita fora de época, associados às possibilidades de queima do canavial e/ou excedentes de produção, a demanda por informação sobre a ensilagem da cana-de-açúcar torna-se cada vez mais premente e freqüente.

Outros fatores, como flutuações nos preços do açúcar e do álcool, podem exigir redução da oferta de cana para as indústrias, devendo-se dar um destino alternativo à cana-de-açúcar existente. Canaviais submetidos a incêndio voluntário ou acidental ou queimados pela geada devem ser usados rapidamente para evitar a conversão da sacarose e a respiração indesejável de carboidratos, gerando a necessidade da decisão pelo processo de ensilagem (Nussio et al., 2003).

Segundo Nussio et al. (2003), a ensilagem de cana-de-açúcar pode representar uma solução operacional, porém existem questionamentos sobre se a ensilagem constitui também solução técnica e econômica.

Diversos autores (Preston et al., 1976; González & McLeod, 1976; Alli et al., 1982; Kung Jr. & Stanley, 1982; Pedroso et al., 2005) observaram que a cana-de-açúcar, quando ensilada, apresenta fermentação tipicamente alcoólica e perda no valor nutritivo, com redução no conteúdo de açúcares decorrente da produção de etanol pelo desenvolvimento de leveduras na silagem.

Diversos tipos de aditivos têm sido avaliados em experimentos com o objetivo de controlar a fermentação por leveduras durante o processo de ensilagem da cana-de-açúcar, melhorando, assim, o padrão de fermentação e a sua conservação. Aditivos biológicos e químicos como amônia, uréia, hidróxido de sódio e óxido de cálcio melhoram a composição bromatológica da silagem de cana em alguns trabalhos, porém apresentam resultados inconsistentes.

Pesquisa conduzida por Bravo Martins et al. (2006) constatou redução na população de leveduras de 6,5 log ufc/g de silagem nas silagens sem aditivos para valores médios de 5,87 e 5,5 log ufc/g, respectivamente, para as silagens

adicionadas de 1% de sulfato de amônio e 1% de uréia, em silagens de cana-de-açúcar ensilada por um período de 30 dias

Um outro problema surge em relação à deterioração aeróbia da silagem de cana-de-açúcar. Weinberg et al. (1993) observaram que altos teores de carboidratos residuais, combinados com uma alta concentração de ácido láctico e concentração de ácidos graxos voláteis insuficiente nas silagens inoculadas com BAL homofermentadoras, estiveram associados com deterioração aeróbia. Isto ocorre porque tanto os carboidratos solúveis como o ácido láctico são substratos para fungos e os ácidos graxos voláteis, muitas vezes, inibem estes microrganismos.

Os microrganismos naturalmente presentes nas plantas forrageiras constituem a microflora epífita ou epifítica e são responsáveis pela fermentação das silagens, influenciando também a sua estabilidade aeróbia e a eficiência dos inoculantes aplicados contendo microrganismos exógenos. O número de cepas de microrganismos epífitas é variável, sendo afetado pelo tipo de forragem, pelo estágio de maturidade das plantas, pelo clima, por tratos agrônômicos dispensados na condução da cultura e pelo corte e condicionamento da forrageira (Lin et al., 1992), bem como pela ocorrência de incêndio prévio, no caso da cana-de-açúcar (Bernardes et al., 2002).

Geralmente, os microrganismos presentes em maior número nas plantas forrageiras são as enterobactérias, as leveduras e os fungos, que competem com os lactobacilos pelos açúcares solúveis durante a etapa fermentativa no silo (Bolsen et al., 1992). Embora bactérias indesejáveis, como enterobactérias e clostrídeos, possam representar importante fonte de perdas qualitativas e riscos toxicológicos em silagens de baixa fermentação, seu desenvolvimento é inibido em condições de pH reduzido (Jobim & Gonçalves, 2003; Bravo Martins, 2004), o que reduz a importância prática desses microrganismos na ensilagem da cana-

de-açúcar, que se caracteriza por apresentar teor adequado de MS e rápido abaixamento do pH a valores considerados adequados.

As leveduras não são inibidas pelo baixo pH encontrado nas silagens, sobrevivendo sob limites de pH variando entre 3,5 e 6,5, sendo que algumas espécies são capazes de sobreviver inclusive sob pH inferior a 2,0 (McDonald et al., 1991). Elevadas contagens de leveduras e fungos prejudicam a fase de pós-abertura das silagens, causando a deterioração aeróbia e perdas no seu valor nutritivo, além de promover a elevação do pH no painel do silo, o que aumenta o risco de desenvolvimento de microrganismos patogênicos (Rotz & Muck, 1994).

Na ensilagem da cana-de-açúcar ocorre extensa atividade de leveduras. Estas podem estar presentes na ordem de 10^6 ufc/g de forragem, convertendo os carboidratos solúveis da forragem a etanol, CO_2 e água, resultando em perdas excessivas de MS, baixos teores de ácidos láctico e acético e aumento no teor de fibra em detergente ácido (FDA) das silagens (Alli et al., 1983).

A dinâmica fermentativa da silagem de cana-de-açúcar sem aditivos, avaliada por Pedroso et al. (2005), apontou estabilização na concentração de etanol em 6,4% na MS, após 15 dias de armazenamento, com decorrente perda de MS de cerca de 30% referente ao desaparecimento de 68% dos carboidratos solúveis.

Embora o etanol possa ser potencialmente aproveitável como substrato energético para os bovinos, por meio da conversão a acetato no rúmen (Chalupa et al., 1964), grande parte do que é produzido nas silagens é perdida durante a estocagem nos silos (Alli et al., 1982) e durante o fornecimento no cocho para os animais (Schmidt, 2006).

A produção deste álcool acarreta, ainda, perda de aproximadamente 49% de MS dos substratos, sendo que a reação bioquímica da sua síntese, catalisada pela via fermentativa de leveduras, pode ser descrita da seguinte forma (McDonald et al., 1991):



Talvez a produção de etanol e a conseqüente redução no valor nutritivo da silagem de cana sejam as principais dificuldades apresentadas por essa tecnologia e o maior desafio da pesquisa na busca por processos específicos que controlem adequadamente a população e a atividade de leveduras, sem prejuízo da qualidade da silagem e do desempenho dos animais.

Vale ressaltar que são poucos os trabalhos, como os de González & McLeod (1976), Alli et al. (1983), Bernardes et al. (2002) e Ávila (2007), que determinaram o efeito de aditivos sobre a contagem de leveduras em silagens de cana-de-açúcar, e mais raros os que procuraram caracterizar a população epífita da cana, como López et al. (1988) e Bravo Martins (2004), dificultando seriamente o entendimento sobre a produção e metabolização de ácidos orgânicos e compostos voláteis durante a ensilagem dessa forrageira.

2.3Uso de inoculantes na ensilagem de cana-de-açúcar

Visando alterar a principal rota fermentativa e reduzir as perdas de valor nutritivo das silagens de cana-de-açúcar têm sido utilizados aditivos e/ou inoculantes que, possivelmente, inibam a população de leveduras e/ou bloqueiem a via fermentativa de produção de álcoois.

O controle da fermentação é considerado de grande importância no processo de ensilagem. Porém, no desenvolvimento de aditivos têm-se dado grande ênfase aos métodos que melhorem o valor nutricional e reduzam as perdas de MS da silagem.

Pode-se interferir no processo de fermentação por meio da utilização de substâncias que atuem seja como fonte de nutrientes, preservativos ou acidificantes, tendo por finalidade fornecer condições adequadas para a

produção de uma silagem de melhor qualidade, controlando os microorganismos indesejáveis (Andriguetto et al., 2002).

As vantagens de se utilizarem aditivos biológicos e/ou inoculantes bacterianos são a sua segurança e facilidade de uso, além de não serem corrosivos para o maquinário, não poluírem o meio ambiente e serem produtos naturais. Diante disso, existe um grande número de estudos relacionados ao uso de inoculantes em silagens; no entanto, muitas vezes os resultados são contraditórios em relação às melhorias no processo fermentativo, no valor nutritivo, na digestibilidade e no consumo de MS das silagens e no ganho de peso dos animais (Nussio et al., 2003).

Essas variações podem ser decorrentes de fatores relacionados à forragem, como concentração de carboidratos fermentescíveis, teor de umidade e microflora epifítica; ao tipo e viabilidade dos inóculos utilizados e, principalmente, às condições de ensilagem.

Estudos realizados no Brasil também confirmam esse fato. Em alguns trabalhos, a adição de inoculantes influenciou as características das silagens; porém, em outros não causou nenhum efeito (Henrique, 1990; Morais, 1995). Nos estudos de Henrique (1990) e Morais (1995) não foram realizadas análises microbiológicas, sendo as conclusões formuladas com base na composição química das silagens de capim elefante.

Muitas vezes, o insucesso da inoculação das silagens pode ser decorrente da seleção inadequada dos microrganismos para o tipo de forragem que se deseja ensilar. Segundo Morais (1995), muitos produtos comerciais são utilizados como aditivos sem serem devidamente testados, sendo usados, freqüentemente, de forma exagerada. Essa falta de informações técnicas confiáveis sobre o produto leva o produtor à substituição de boas técnicas de manejo do silo por aditivos, o que, certamente, resulta em uma diminuição da qualidade do produto ensilado. Assim, é muito importante que se realizem estudos com inoculantes para

silagens contendo cepas isoladas daquelas produzidas nas condições tropicais, uma vez que os existentes são, na sua maioria, obtidos de forrageiras de clima temperado. Segundo Catchpoole & Henzel (1971), existem diferenças entre as bactérias das silagens tropicais e as das de regiões temperadas.

Os inoculantes bacterianos para silagens usualmente contêm uma ou mais espécies de BAL homofermentativas, que são mais rápidas e eficientes produtoras de ácido láctico. *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus* e *Enterococcus faecium* são as mais freqüentemente usadas (Driehuis et al., 1999a). Além disso, cepas selecionadas de BAL homofermentadoras têm sido preferidas como aditivos para silagem porque as bactérias heterofermentativas produzem CO₂ e ácido acético, resultando em perdas de MS e maiores riscos de diminuição do consumo (Nishino et al., 2003). Todavia, alguns estudos têm mostrado que o excesso de BAL pode piorar a estabilidade aeróbia das silagens em razão da redução da concentração de ácido acético não dissociado (Driehuis et al., 1999b) e as leveduras, que geralmente são as iniciadoras da deterioração aeróbica, são mais eficientemente inibidas pelos ácidos acético e propiônico do que pelo ácido láctico.

Contudo, resultados recentes de pesquisas têm sido consistentes em demonstrar a ausência de efeito, ou efeito deletério, da inoculação de bactérias homoláticas em silagens de cana-de-açúcar, acarretando elevação das perdas de MS (Freitas et al., 2006; Pedroso et al., 2007; Siqueira et al., 2007) e da produção de etanol (Andrade et al., 2000; Castro Neto, 2003; Silva, 2003).

Bravo Martins (2004) avaliou qualitativamente a população de microrganismos em silagens de cana-de-açúcar e observou 12 diferentes espécies de leveduras, sendo que a grande maioria assimilou lactato em cultivo *in vitro*.

Inoculantes contendo bactérias heterofermentativas, produtoras de ácidos acético e propiônico, além do ácido láctico, como *Lactobacillus buchneri*,

Pediococcus cerevisiae, *Propionibacterium shermani* e *Propionibacterium acidipropionici*, têm sido avaliados buscando alterar o perfil dos ácidos e incrementar a estabilidade aeróbia das silagens (Ranjit & Kung Jr., 2000).

A elevação do teor de ácido acético das silagens inoculadas com bactérias heteroláticas parece ser o principal fator responsável pela inibição do crescimento de leveduras em silagens de cana-de-açúcar.

Segundo McDonald et al. (1991), o uso do ácido acético em silagens tem sido evitado por muitos pesquisadores porque a sua presença em altas concentrações na silagem esteve associada com um desempenho insatisfatório dos animais, resultante de baixo consumo voluntário de MS. No entanto, esses autores citam os estudos de Dewysen & Vanbelle (1978), mostrando que o acetato apenas induz a uma ligeira redução do consumo (para ovinos) e que os problemas devem advir, indiretamente, do processo de produção de acetato na silagem, e não do efeito direto do ácido acético propriamente dito.

Segundo Danner et al. (2003), o efeito antimicrobiano de um ácido orgânico depende de seu pKa e do pH do meio. O ácido láctico tem pKa menor que o ácido acético e, por isso, é um ácido mais forte; entretanto, na faixa de pH normalmente encontrada nas silagens, o ácido acético se encontra menos dissociado que o ácido láctico, o que permite àquele penetrar a membrana plasmática das leveduras.

Os ácidos acético, propiônico, butírico, valérico e isocapróico exercem ação inibidora sobre a fermentação da glicose por leveduras. O ácido acético, na forma ácida, penetra por difusão passiva na célula da levedura, podendo tanto afetar a absorção de fosfato, por interferência química com a membrana plasmática, como a atividade de enzimas glicolíticas, ou ainda reduzir o pH intracelular, resultando em maior consumo de ATP para retirar íons H^+ do interior das células, após sua dissociação. Esse mecanismo leva à exaustão energética da célula de levedura, inviabilizando-a (McDonald et al., 1991).

Segundo Danner et al. (2003), a atividade antimicrobiana do acetato ou lactato é causada por moléculas ácidas não dissociadas lipofílicas que penetram no plasma da membrana bacteriana. A dissociação dessas moléculas dentro da célula promove liberação de prótons, acidifica o citoplasma e prejudica o crescimento microbiano. Portanto, a proteção exercida pelo ácido acético ocorre não pela morte dos microrganismos, mas pela inibição do seu crescimento.

Bactérias heteroláticas têm mostrado grande potencial de aumento da estabilidade aeróbia das silagens. Ranjit & Kung Jr. (2000), avaliando inoculantes contendo a bactéria heterofermentativa *Lactobacillus buchneri* em silagens de milho, observaram uma elevação significativa na estabilidade aeróbia, relacionada aos aumentos marcantes na produção dos ácidos acético e propiônico, com redução no teor de etanol e na população de leveduras das silagens tratadas. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores avaliando a inoculação de *Lactobacillus buchneri* em silagens de milho (Driehuis et al., 1999a; Nishino et al., 2003; Danner et al., 2003), cevada (*Hordeum vulgare* L.) (Taylor et al., 2002) e azevém (*Lolium perenne* L.) (Driehuis et al., 2001).

Oude Elferink et al. (2001) demonstraram a habilidade do *L. buchneri* em transformar ácido láctico em 1,2-propanodiol e ácido acético. Segundo Siqueira et al. (2005), é importante lembrar que a redução de ácido láctico representa uma diminuição do substrato potencialmente fermentescível por determinadas cepas de leveduras.

Ranjit & Kung Jr. (2000), utilizando *L. buchneri* na dose de 10^6 ufc/g de forragem, observaram aumento no teor de ácido acético de 1,8% na silagem sem inoculante para 3,6% na silagem inoculada com *L. buchneri*. A população de leveduras foi de 10^6 e 10^2 ufc/g nas silagens não inoculada e inoculada, respectivamente. Conseqüentemente, a estabilidade aeróbia aumentou em relação às silagens não tratadas, passando de 26,5 horas para mais de 900 horas.

A elevação no teor de ácido acético das silagens inoculadas com bactérias heteroláticas parece ser o principal fator responsável pela inibição do crescimento de leveduras nessas silagens.

Antes de ter sido estudada como aditivo em silagens de cana-de-açúcar, inúmeros trabalhos comprovaram os bons resultados obtidos com *L. buchneri* em outras forrageiras (Driehuis et al., 1999b; Weinberg et al., 2002; Nishino et al., 2003; Adesogan et al., 2003; Pedroso et al., 2006).

Com a adequada interpretação desse conjunto de resultados, vislumbrou-se a possibilidade do uso da bactéria heterolática *L. buchneri* como potencial aditivo na ensilagem da cana-de-açúcar, objetivando reduções na população de leveduras e na produção de etanol.

Pedroso et al. (2007) testaram, em silos experimentais, cinco aditivos químicos e dois inoculantes bacterianos, diluídos em água, nas seguintes dosagens (massa verde): uréia (0,5; 1,0 e 1,5%); NaOH (1; 2 e 3%); propionato de cálcio (0,05; 0,1 e 0,2%); benzoato de sódio (0,05; 0,1 e 0,2%); sorbato de potássio (0,015; 0,03 e 0,45%); bactérias homoláticas *Lactobacillus plantarum* (LP) (1×10^6); *L. buchneri* (1×10^6) e a combinação de LP e uréia (0,5; 1,0%). A análise dos dados obtidos mostrou que as médias das perdas gasosas (8,9%) e de efluentes (20,8 kg/t) responderam por 62 e 38%, respectivamente, das perdas de MS da silagem, com média de 14,4%. A inoculação com LP triplicou a produção de etanol e conduziu à menor recuperação de MS (77,7%), como resultado de maiores perdas de gases e efluentes. A adição de uréia com LP também resultou em maiores perdas de gases e maior teor de etanol em relação ao controle. Já a inoculação com *L. buchneri* foi efetiva em reduzir a produção de etanol (de 3,8 para 1,9% na MS) e as perdas totais de MS (18,2 para 8,0%).

Por outro lado, a aplicação das bactérias homoláticas *L. plantarum* e *Enterococcus faecium* mostrou-se capaz de diminuir a produção de etanol (1,3% vs 6,3% na MS) e as perdas de MS (2,6% vs 7,4%) em experimento realizado

por Driehuis & Wikselaar (2000) com silagens de azevém perene (*Lolium perenne* L.) emurhecido (48% de MS), embora não tenham sido identificados os microrganismos responsáveis pela fermentação alcoólica nas silagens.

Siqueira (2005) avaliou as perdas fermentativas em silagens de cana-de-açúcar inoculadas com *L. buchneri* ou com um aditivo composto por *Propionibacterium* sp. e *L. plantarum* (BAL). O autor observou que a inoculação com *L. buchneri* foi efetiva em reduzir as perdas, em relação à silagem sem aditivos (controle), e que a inoculação com *Propionibacterium* sp. + LP não apresentou efeitos benéficos na ensilagem da cana-de-açúcar.

Patrizi et al. (2004), estudando o efeito de inoculantes contendo cepas de *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *Streptococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici* e as enzimas amilase e celulase purificadas em capim-napier (*Pennisetum purpureum* Schum.) ensilado por 60 dias, observaram efeitos na redução do teor de FDA e aumento do pH dessas silagens, quando comparadas com a silagem controle.

2.4 Estabilidade aeróbia

A perda de componentes nutritivos após a abertura dos silos também é um fator determinante do valor nutritivo das silagens. A sua exposição ao oxigênio no painel do silo e no cocho durante o fornecimento aos animais é inevitável, o que possibilita o crescimento de microrganismos aeróbios que causam a deterioração da silagem.

Os principais substratos utilizados pelos microrganismos são os carboidratos solúveis, os ácidos orgânicos e o etanol. Em geral, as silagens de cana-de-açúcar possuem altos teores residuais de carboidratos solúveis e de etanol, o que as torna sejam muito propensas à deterioração, principalmente após o contato da massa ensilada com o oxigênio.

O processo de deterioração aeróbia é iniciado pela ação de leveduras, causando elevação do pH, ao mesmo tempo em que ocorre o processo de oxidação dos produtos da fermentação da silagem, principalmente o ácido lático. Com a elevação do pH, outros microrganismos oportunistas começam a proliferar em um processo que resulta em perdas de componentes nutritivos da silagem e que pode, também, comprometer sua qualidade higiênica em função do desenvolvimento de microrganismos patogênicos (Driehuis et al., 1999b). Dessa forma, o efeito dos aditivos também deve ser avaliado em relação à estabilidade aeróbia no pós-abertura do silo.

A variável mais comumente utilizada para expressar a perda da estabilidade aeróbia de silagens é o tempo, em horas, necessário para que ocorra a elevação da temperatura da massa em 2°C (Keady & O'Kiely, 1996).

O oxigênio pode penetrar na silagem durante o armazenamento ou no momento em que o silo for aberto para o seu fornecimento aos animais, proporcionando o crescimento de microrganismos aeróbios facultativos que sobreviveram inativos na ausência do oxigênio. Esses microrganismos utilizam vários substratos derivados diretamente da forragem ou, indiretamente, da fermentação. Essa fase está associada com perdas de nutrientes, sendo definida como deterioração aeróbia, na qual, tipicamente, um ou dois picos de temperatura são registrados em função da atividade de leveduras e mofos (Nishino et al., 2003).

A menor estabilidade aeróbia das silagens nos cochos é esperada quando o inoculante utilizado contém exclusivamente BAL homofermentativas (Ribeiro et al., 2005). Kung Jr. & Ranjit (2001) salienta que silagens tratadas com bactérias homofermentativas podem ser estáveis quando a prática de alimentação e o manejo do silo forem adequados. Porém, o número de produtores que utilizam silagem e dominam essa tecnologia ainda é restrito, o

que impulsiona a busca de novos aditivos capazes de melhorar a estabilidade pós-abertura (Ribeiro et al., 2005).

O principal problema da deterioração aeróbia da silagem resulta da mineralização completa dos nutrientes facilmente oxidáveis a dióxido de carbono e água pela ação microbiana, em presença de oxigênio atmosférico. Quimicamente, esse processo pode ser expresso de modo equivalente à equação da respiração por hexoses ($C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \text{energia}$) (Guim, 1997).

A deterioração aeróbia pode não ser acompanhada por aquecimento, especialmente em silagens com alto teor de umidade, em que esta atuará como atenuante de calor. Todavia, esse problema é invariavelmente acompanhado por perda de ácidos de fermentação, proteínas e carboidratos (Woolford, 1984).

Silagens de cana-de-açúcar são bastante propensas à deterioração aeróbia por apresentarem teor elevado de carboidratos solúveis residuais após a fermentação no silo. Pedroso (2003) observou estabilidade de 65 horas para silagem de cana sem aditivos, reduzida para 24 horas em silagens aditivadas com *L. plantarum*. A adição de *L. buchneri* ou benzoato de sódio elevou a estabilidade das silagens para 72 e 79 horas, respectivamente.

Siqueira et al. (2007) constataram aumento na estabilidade das silagens inoculadas com *L. buchneri* ou com a mistura de *Propionibacterium* e *L. plantarum*, em relação à silagem controle. Contudo, o pH das silagens aditivadas com *Propionibacterium* + *L. plantarum* foi mais elevado no pós-abertura, indicando possível degradação preferencial do ácido láctico em relação ao ácido acético.

Ranjit & Kung Jr (2000) estudaram a deterioração aeróbica em silagem de milho e observaram, até o terceiro dia de exposição ao ar, perdas de 5,3% da MS e 60% dos carboidratos solúveis (3,4% vs 1,4% na MS) existentes no dia da abertura do silo. No mesmo período, o pH aumentou de 3,9 para 5,0 e os teores

de ácidos láctico e acético foram reduzidos de 7,52 para 1,35% e de 1,88 para 0,08% na MS, respectivamente. Esses pesquisadores notaram, ainda, que o número de leveduras aumentou de aproximadamente 10^6 para mais de 10^8 ufc/g de silagem dentro de um dia e meio de exposição ao ar.

Danner et al. (2003) observaram que as silagens de milho inoculadas com BAL homofermentativas (*Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus* e *L. plantarum*) apresentaram estabilidade aeróbia menor (26 a 31 horas) que silagens sem inoculantes (40 horas) e silagens inoculadas com BAL heterofermentativas (274 horas para *L. buchneri* e 72 horas para *L. brevis*). As silagens inoculadas com *L. buchneri* continham quantidades pequenas de ácido láctico; no entanto, foram observadas quantidades altas de ácido acético e, também, quantidades apreciáveis de 1,2-propanodiol. Esses dados indicam que a estabilidade aeróbia está mais relacionada com a concentração de ácido acético do que com a de ácido láctico e o pH final. Esses autores também avaliaram o efeito de três compostos isolados (ácido láctico, acético e propiônico) das silagens estudadas na inibição de duas espécies de leveduras e duas de fungos filamentosos, constatando que o ácido acético foi muito eficiente na inibição destes microrganismos.

2.4.1 Microrganismos envolvidos na deterioração aeróbia das silagens

Leveduras e alguns fungos filamentosos são os microrganismos mais importantes envolvidos na deterioração aeróbia da silagem, catabolizando os ácidos láctico e propiônico e açúcares. As leveduras envolvidas pertencem a gêneros que utilizam ácidos, como *Candida*, *Endomycopsis*, *Hansenula* e *Pichia*, enquanto os utilizadores de açúcar são, principalmente, espécies de *Torulopsis* (Woolford, 1984).

Algumas leveduras, ao contrário da maioria dos fungos, precisam de condições anaeróbicas (anaeróbias facultativas), podendo manter altas populações nessas condições pela fermentação alcoólica de açúcares (1 glicose → 2 etanol + 2 CO₂ + 2 H₂O) (Jobim & Gonçalves, 2003). A presença de fungos é prejudicial à silagem porque eles quebram o açúcar e o ácido láctico pela via normal da respiração e também hidrolizam e metabolizam a celulose e outros componentes da parede celular. Além disso, alguns bolores, principalmente as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, crescem em silagens onde há penetração de ar e produzem toxinas que são prejudiciais aos animais e ao homem (Gotlieb, 1997).

Anteriormente, pensava-se que as bactérias desempenhavam um papel secundário na deterioração aeróbia da silagem; porém, segundo McDonald (1991), estas bactérias exercem uma função muito importante na deterioração das silagens. Existem evidências de que a principal bactéria envolvida na deterioração aeróbia das silagens pertence ao gênero *Bacillus*, porém tem sido observado crescimento de algumas BAL. Isso pode ser explicado pelo fato de que os bacilos têm pequena oportunidade de crescer inicialmente em uma silagem convencionalmente fermentada, especialmente se o pH for menor que 5, pois esses microrganismos, assim como os clostrídeos, são intolerantes à acidez, comparados a outros microrganismos que fazem parte da microflora da silagem. Por outro lado, na silagem podem ocorrer micro ambientes onde o pH se encontra mais elevado para permitir o crescimento desses microrganismos (Woolford, 1984).

As enterobactérias e a listéria (*Listeria monocytogenes*) também estão envolvidas na deterioração aeróbica das silagens, existindo uma relação direta entre a contaminação e essas bactérias. A contaminação causa degradação da silagem e possíveis prejuízos sanitários aos animais e ao homem (Jobim & Gonçalves, 2003).

Os microrganismos envolvidos no processo de deterioração aparentemente são oriundos da silagem, e não da contaminação pelo ar (Woolford, 1984).

As medidas a serem tomadas para controlar a deterioração aeróbia das silagens devem prevenir ou reduzir o crescimento dos microrganismos responsáveis pela iniciação do processo, os quais, na maioria dos casos, são as leveduras (Driehuis et al., 1999a).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização e clima

O experimento foi conduzido nos Departamentos de Zootecnia e Biologia da Universidade Federal de Lavras – MG.

A Estação Climatológica Municipal de Lavras está situada no Campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, Estado de Minas Gerais, em convênio com o Instituto Nacional de Meteorologia (INMER), em latitude de 21°14' S, longitude de 45°00' W e altitude de 918,84 m (Brasil, 1992). Segundo a classificação internacional de Köppen, o clima da região é do tipo Cwa, subtropical com verão quente e chuvoso e inverno frio e seco, caracterizado por um total de 23,4 mm de chuvas no mês mais seco e 295,8 mm no mês mais chuvoso, precipitação total anual de 1.529,7 mm e temperaturas médias máxima mensal igual a 22,1°C em fevereiro e mínima mensal igual a 15,8°C em julho.

3.2 Preparo da forragem para ensilagem

A cana-de-açúcar utilizada no experimento foi colhida de um canavial estabelecido há quatro anos em área pertencente à UFLA, com idade de rebrota de cerca de 12 meses, na estação seca (mês de junho), quando apresenta teor de carboidratos solúveis de aproximadamente 18° Brix. A colheita foi manual e, em seguida, a cana foi picada em picadeira estacionária sem sofrer o despalhamento, proporcionando partículas de 10 a 30 mm para a produção da silagem.

3.3 Preparo dos inoculantes e tratamentos

Os inoculantes foram previamente preparados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da UFLA.

Os inoculantes que contêm bactérias homoláticas foram *Lactobacillus plantarum* (UFLA 1 SIL) e *L. paracasei* (UFLA 67 SIL), e os que contêm bactérias heteroláticas, *L. buchneri* (UFLA 72 SIL) e *L. brevis* (UFLA 65 SIL). Essas espécies de microrganismos foram obtidas de silagens de cana-de-açúcar isoladas por Ávila (2007).

O inoculante **LB1** foi o Pioneer 11A44TM (Pioneer Hi-Bred International, Inc., Des Moines, IA, USA), que contém a bactéria heterolática *L. buchneri* na população de 10^{11} ufc/g do produto. O inoculante **LB2** foi o comercial Biomax[®] (Biomax[®], Christian Hansen, Valinhos, SP), que contém a bactéria homolática *L. plantarum*. O inoculante **LB3** foi o comercial SiloMax Lalsil Cana[®] (Matsuda e Lallemand S.A.), que contém a cepa NCIMB 40788 da bactéria heterolática *L. buchneri*.

Nos quatro tratamentos, para que as bactérias isoladas da própria silagem de cana-de-açúcar fossem adicionadas com a mesma concentração de células viáveis, realizou-se uma contagem do número dessas bactérias no inoculante por meio de plaqueamento em meio MRS (Tabela 12A). Inicialmente, o microrganismo foi cultivado em tubos contendo 2 mL de meio MRS por 24 horas; em seguida foi transferido para tubos contendo 10 mL de caldo MRS por mais 24 horas e, finalmente, transferido para erlenmeyer com 250 mL de caldo MRS e cultivado por 24 horas. Após este tempo, foi feita a contagem do número de células, obtendo-se um resultado aproximado de 9 log ufc/mL do caldo. Para cada tratamento foi retirado 0,3 mL do caldo presente no erlenmeyer, o qual foi, posteriormente, misturado com 80 mL de água destilada estéril e borrifado sobre 3 kg de forragem no momento da ensilagem. Ao final,

os inoculantes foram aplicados em uma concentração de 8 log ufc/kg de forragem, que correspondem a 5 log ufc/g de forragem.

Os tratamentos foram constituídos de:

- 1) Controle;
- 2) *L. plantarum* (UFLA 1 SIL);
- 3) *L. paracasei* (UFLA 67 SIL);
- 4) *L. brevis* (UFLA 65 SIL);
- 5) *L. buchneri* (UFLA 72 SIL);
- 6) LB1 (Pioneer 11A44TM);
- 7) LB2 (Biomax 5[®]);
- 8) LB3 (SiloMax Lalsil Cana[®]).

No tratamento controle a forragem foi ensilada sem adição de qualquer inoculante bacteriano, apenas borrifando água estéril na mesma quantidade que os demais tratamentos (80 mL).

3.4 Ensilagem da cana-de-açúcar

A forragem picada foi ensilada em silos de PVC com diâmetro de 10 cm e altura de 60 cm, adaptados com válvula tipo Bunsen, com capacidade cerca de 2,5 a 3,0 kg de forragem, sendo utilizada uma densidade de compactação de aproximadamente 600 kg de forragem por m³.

Os inoculantes preparados anteriormente foram misturados à forragem, no momento da ensilagem, com auxílio de um borrifador (sendo um para cada tratamento). Houve o cuidado de adicionar ao tratamento controle somente a

água destilada estéril, na mesma quantidade de água que foi adicionada junto com os inoculantes (80 mL) (**item 3.3**).

A forragem foi compactada manualmente nos silos, com o auxílio de uma barra de ferro. Estes foram armazenados com a válvula voltada para baixo (para que o efluente produzido fosse eliminado), em temperatura ambiente e sob a proteção da luz solar e chuvas. Foram retiradas amostras da forragem fresca, sem e com inoculantes, das quais uma parte foi armazenada em freezer e a outra foi levada para a estufa de ventilação forçada a 65°C por 72 horas. Após secagem e pesagem, esta foi moída e armazenada para análises posteriores. Uma terceira amostra foi colhida para a leitura do pH no momento da abertura dos silos.

3.5 Avaliação de parâmetros químicos do processo de fermentação

Para a avaliação dos parâmetros químicos da fermentação das silagens, os silos foram abertos após 90 dias do fechamento e de cada um foram retiradas três amostras, tomando-se o cuidado de desprezar as extremidades da silagem no silo (aproximadamente 10 cm). Destas amostras, uma foi pesada e seca em estufa de ventilação forçada a 65°C e a outra foi colocada em sacos plásticos devidamente identificados e congelados. Uma terceira amostra foi retirada para a determinação do pH e a contagem da população de microrganismos.

As análises bromatológicas da forragem fresca e das silagens foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Animal do DZO-UFLA. As amostras secas foram moídas em moinho do tipo Willey, com peneira de 30 mesh, e armazenadas em potes plásticos devidamente identificados, os quais foram encaminhados ao laboratório para a determinação dos teores de matéria seca (MS) e proteína bruta (PB) conforme os métodos recomendados pela AOAC (1990); fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA),

segundo as técnicas descritas por Silva (1990). Os teores de hemicelulose foram obtidos pela diferença entre FDN e FDA.

Foi colhida uma amostra de 10 g de silagem de cada silo para se proceder à leitura do pH em um potenciômetro Beckman Expandomatic SS-2.

Os teores de carboidratos solúveis (CHOs) também foram determinados em amostras secas, conforme a técnica de Bailey (1977) modificada por Valadares Filho (1981).

As amostras que haviam sido congeladas foram descongeladas para extração do suco, com prensa hidráulica, para a determinação dos teores de nitrogênio amoniacal como porcentagem do nitrogênio total [N-NH₃ (% N total)], e dos ácidos graxos voláteis, ácido láctico e etanol por cromatografia gasosa (AOAC, 1980).

O poder tampão foi determinado no momento da ensilagem, utilizando-se amostras congeladas de acordo com a técnica descrita por Playne & McDonald (1966).

A matéria mineral (cinzas) foi obtida após incineração de amostras em mufla a 550°C durante 3 h (Harris, 1970).

3.6 Avaliação de parâmetros microbiológicos da silagem

As análises microbiológicas da forragem e das silagens foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do DBI-UFLA. Foram efetuadas as contagens de BAL, leveduras e fungos filamentosos no momento de abertura dos silos. Coletou-se uma amostra de 80 g de silagem de cada silo, a qual foi colocada assepticamente em frascos contendo 720 mL de água peptonada estéril (1% de peptona), esterilizada a 121°C/15 min. e agitada durante 20 minutos. A partir do extrato obtido, foram preparadas diluições decimais de 10⁻¹ a 10⁻⁶.

As contagens totais de BAL, leveduras e fungos filamentosos foram realizadas tomando-se 0,1 mL de cada diluição, em triplicata, espalhado com alça de Drigalsky no meio MRS (Tabela 12A) em placas de Petri, acrescido de nistatina (0,4%) para contagem de BAL. No meio DRBC (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol) (Tabela 12A) efetuou-se a contagem de fungos filamentosos, e no meio YEPG (Tabela 12A), a contagem de leveduras. As placas foram incubadas a 28°C e as contagens totais de BAL, fungos filamentosos e leveduras foram realizadas após 24-72 horas de incubação.

3.7 Avaliação da estabilidade aeróbia das silagens

Após o período de ensilagem de 90 dias, os silos foram abertos e, de cada um, foi retirada uma amostra de cerca de 2,5 kg, acondicionada em balde plástico com capacidade de 5,0 kg cada para avaliação da estabilidade aeróbia. Essas amostras foram acondicionadas em uma sala fechada e a temperatura da forragem foi monitorada diariamente. Para isto, um termômetro foi inserido no centro geométrico da massa ensilada e avaliado por 5 dias. A temperatura da massa ensilada foi tomada duas vezes ao dia, às 8:00 e às 17:00 horas, e a temperatura ambiente foi medida com o auxílio de um termômetro localizado próximo aos baldes. A estabilidade aeróbia foi calculada como sendo o tempo, em horas, observado para que o alimento volumoso, após a abertura do silo, apresentasse uma elevação da temperatura de 2°C em relação à temperatura ambiente (Kung Jr. et al., 2000), que apresentou média de 23,9°C e variação entre 22,5 e 25°C.

Foram determinados a temperatura máxima (TMAX) da silagem, expressa em °C, como sendo a máxima temperatura observada no tratamento durante os cinco dias de avaliação, e o tempo para atingir a temperatura máxima

(TTMAX), como sendo o tempo, em horas, transcorrido para que a massa de forragem atingisse a temperatura máxima.

3.8 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento para avaliação dos parâmetros químicos e microbiológicos das silagens foi conduzido obedecendo a um delineamento experimental inteiramente casualizado, com oito tratamentos e três repetições. Os dados foram analisados estatisticamente pelos procedimentos de análise de variância, de acordo com o software SISVAR (Ferreira, 2000). Para a comparação de médias entre os tratamentos foi utilizado o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O modelo estatístico adotado foi o seguinte:

$$Y_{ik} = \mu + a_i + e_{ik} , \text{ em que:}$$

Y_{ik} = valores observados na k-ésima repetição e do i-ésimo tratamento;

μ = constante inerente a todas as observações;

a_i = efeito do i-ésimo tratamento;

e_{ik} = erro associado à observação Y_{ik} .

Os erros são considerados independentes e normalmente distribuídos, com média igual a zero e variância constante.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da cana-de-açúcar no momento da ensilagem

4.1.1 Parâmetros químicos

Os resultados referentes à composição química da cana-de-açúcar fresca, utilizada antes da ensilagem, estão apresentados na Tabela 1, e as análises de variância encontram-se nas Tabelas 1A, 2A e 3A.

Os valores médios de pH determinados no momento da ensilagem da cana-de-açúcar (5,56) foram ligeiramente superiores aos encontrados por Schmidt (2006) (5,02).

Os teores médios de MS (31,23%) e PB (3,11%) foram superiores aos encontrados na literatura, como 27,4% e 2,0% (Coan et al., 2002); 28,3% e 2,3% (Molina et al., 2002); 28,6% e 2,6% (Freitas et al., 2006) e 30,4% e 2,42% (Schmidt, 2006), respectivamente. Muck (1988) afirma que, em silagens, o teor de MS no momento de ensilar deve estar em torno de 30 a 35% para que o alimento seja bem preservado.

Na análise dos teores de FDN (58,8%), observou-se que estes foram superiores aos encontrados por outros autores, variando de 36,2 a 49%, enquanto os de FDA (32%) foram semelhantes aos da literatura, variando de 23,6 a 32% FDA (Fernandes et al., 2003; Pedroso et al., 2005; Freitas et al., 2006; Santos, 2007).

Para hemicelulose e cinzas, as concentrações medidas no momento da ensilagem foram 27% e 4,49%, respectivamente. Estes resultados são superiores aos relatados por Santos (2007), cujos valores foram de 20,62% e 2,25% para hemicelulose e cinzas, respectivamente.

Os valores de PT foram baixos, apresentando média de 10,7 E.mg NaOH/100g MS. Segundo McDonald et al. (1991), o poder tampão das plantas é um fator importante para ensilagem. O poder de tamponamento é exercido por bases inorgânicas de potássio e cálcio, proteínas, aminoácidos livres e por sua capacidade de produção de amônia (Van Soest, 1994). Como a cana-de-açúcar apresenta baixos teores de PB (3,1% na MS), esses valores de PT também tendem a ser baixos.

Ainda, os valores de carboidratos solúveis (CHOs) estão dentro da faixa encontrada por alguns autores (20 a 40%), porém foram inferiores aos encontrados por Freitas et al. (2006) e superiores aos relatados por Pedroso et al. (2007). Essas diferenças podem estar relacionadas à cultivar, à sua maturidade e às diferentes técnicas empregadas para análise dessa variável.

TABELA 1 Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose (HEMI) e cinzas, valores de pH, carboidratos solúveis (CHOs) e poder tampão (PT) da cana-de-açúcar fresca usada na ensilagem

Tratamentos ¹	pH	MS	PB	FDN	FDA	HEMI	Cinzas	CHOs	PT
		(% MS)						g/kg	(E.mg NaOH/ 100 g MS)
Controle	5,59	30,48	3,42	59,3	31,8	25,9	4,63	299,7	10,8
<i>L. plantarum</i>	5,57	33,17	3,04	59,6	31,3	27,7	4,50	295,0	10,4
<i>L. paracasei</i>	5,54	30,72	3,03	59,0	33,6	28,1	4,44	290,0	10,7
<i>L. brevis</i>	5,55	31,34	2,74	59,0	31,9	27,1	4,54	293,6	10,6
<i>L. buchneri</i>	5,58	31,14	3,16	58,3	31,9	26,4	4,65	276,6	10,8
LB1	5,57	30,71	3,13	57,7	31,4	25,4	4,29	292,8	10,8
LB2	5,57	31,68	3,02	59,45	32,9	26,8	4,36	291,6	10,5
LB3	5,55	30,60	3,33	58,5	31,9	28,6	4,60	292,9	10,7
MÉDIA	5,56	31,23	3,11	58,88	32,00	27,00	4,49	291,56	10,7

¹Controle - sem inoculante; *L. plantarum* (10⁵ ufc/g MV); *L. paracasei* (10⁵ ufc/g MV); *L. brevis* (10⁵ ufc/g MV); *L. buchneri* (10⁵ ufc/g MV); LB1, LB2 e LB3 silagens acrescidas de inoculantes comerciais.

4.1.2 Parâmetros microbiológicos

A composição microbiológica da cana-de-açúcar após a aplicação dos inoculantes sofreu influência nas populações de bactérias ácido lácticas (BAL) ($P < 0,05$), ao passo que para as contagens de leveduras (LEV) e fungos filamentosos (FF) não se observou efeito ($p > 0,05$) (Tabela 4A) (Tabela 2).

TABELA 2. Valores médios das populações de bactérias ácido lácticas (BAL), leveduras (LEV) e fungos filamentosos (FF) da cana-de-açúcar fresca durante a ensilagem

Tratamentos ¹	BAL	LEV	FF
	log ufc/g		
Controle	3,63 b	5,85	5,40
<i>L. plantarum</i>	8,16 a	6,30	5,47
<i>L. paracasei</i>	8,15 a	6,12	5,45
<i>L. brevis</i>	7,63 a	6,16	5,40
<i>L. buchneri</i>	7,86 a	6,26	5,50
LB1	7,93 a	6,25	5,38
LB2	7,62 a	6,08	5,45
LB3	7,90 a	6,26	5,36
MÉDIA	7,36	6,16	5,42

¹Controle - sem inoculante; *L. plantarum* (10^5 ufc/g MV); *L. paracasei* (10^5 ufc/g MS); *L. brevis* (10^5 ufc/g MV); *L. buchneri* (10^5 ufc/g MV); LB1, LB2 e LB3 silagens acrescidas de inoculantes comerciais.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P > 0,05$).

A silagem controle apresentou populações mais baixas de BAL (3,63 log ufc/g de forragem) que as demais, o que era esperado, uma vez que nos demais tratamentos as silagens foram inoculadas com 10^5 ufc/g de forragem de *Lactobacillus* no momento da ensilagem, alcançando população de até 8,16 log ufc/g (Tabela 2). Jaster (1994) cita que as BAL são encontradas em números

relativamente pequenos nas culturas (<10 log ufc/g). No entanto, o corte e picagem da forragem com equipamento adequado provocam a liberação de sucos da planta, o que pode aumentar o número de BAL prévio à ensilagem.

A população média de leveduras encontrada na cana-de-açúcar fresca foi alta (6,16 log ufc/g) em comparação com outras pesquisas realizadas. Nesse estudo observou-se população inicial de leveduras de 7,78 log ufc/g. Freitas et al. (2006) encontraram contagem menor, 5,05 log ufc/g.

As médias das populações de fungos filamentosos e leveduras não sofreram nenhuma influência com a aplicação dos inoculantes, apresentando valores médios de 5,42 e 6,16 ufc/g de forragem, respectivamente (Tabela 2). Esses valores foram semelhantes aos observados por Ávila (2007) após a aplicação de inoculantes que continham a espécie *L. buchneri* em cana-de-açúcar

4.2 Silagens no momento da abertura

4.2.1 Parâmetros químicos e bromatológicos

Os valores de pH, MS, PB, NH₃, CHOs e FDN foram influenciados pela adição dos inoculantes (P<0,05) (Tabelas 5A 6A e 11A), porém os teores de FDA, HEMI e Cinzas não diferiram entre as silagens (p>0,05) (Tabelas 5A, 6A e 7A).

As silagens inoculadas com *L. plantarum*, *L. paracasei* e *L. buchneri* foram as que apresentaram os menores valores de pH (Tabela 3). Esses baixos valores de pH podem estar associados a uma maior produção de ácido lático nestas silagens, visto que *L. plantarum* e *L. paracasei* são bactérias homoláticas. Esse efeito não foi observado para o inoculante comercial que continha bactéria homolática (LB2). As silagens que foram inoculadas com a cepa isolada de *L.*

buchneri proporcionaram um valor de pH menor que as demais que receberam esta mesma espécie de bactéria heterolática (LB1 e LB3), corroborando afirmação dos pesquisadores Catchpoole & Henzel (1971), os quais confirmam que existem diferenças entre as bactérias isoladas das silagens tropicais e as de origem temperada. Em geral, silagens inoculadas com *L. buchneri* apresentam pH mais alto em face da maior produção de ácido acético (Driehuis et al., 1999b; Oude Elferink et al., 2001). Esse fato foi observado nas silagens LB1 e LB3, que continham essa mesma espécie de bactéria.

As silagens apresentaram valores de pH variando de 3,46 a 3,58, situando-se, dessa forma, dentro dos limites reportados na literatura para silagens de cana-de-açúcar (Pedroso et al., 2007; Siqueira et al., 2007; Santos, 2007; Junqueira, 2006). McDonald et al. (1991) comentam que valores de pH variando de 3,8 a 4,2 devem ser esperados em silagens bem conservadas. No entanto, em silagens de cana-de-açúcar esses valores são menores.

De acordo com Siqueira (2005), o pH final é fruto da extensão da fermentação, principalmente realizada por microrganismos homofermentativos. McDonald et al. (1991) citam que a elevação artificial do número inicial de bactérias produtoras de ácido lático, na forragem ensilada, pode reduzir o pH final, aumentar o conteúdo de ácido lático e reduzir a perda de MS no silo, melhorando o desempenho e a produção de leite dos animais alimentados com a silagem tratada. De acordo com Evangelista et al. (2004), somente o baixo pH final não garante que a atividade de microrganismos indesejáveis, em especial enterobactérias e clostrídeos, seja prevenida durante o processo de fermentação. Para que esse efeito ocorra, é necessário que a redução do pH seja processada rapidamente. Neste estudo, não foi detectada a presença de ácido butírico, o que leva à conclusão de que não houve crescimento de bactérias do gênero *Clostridium*. Segundo McDonald et al. (1991), quando se trabalha com forrageiras com altos teores de açúcares e baixos de proteínas, a estabilidade do

pH ocorre normalmente antes do décimo dia de ensilagem. Pedroso (2003), em estudo com silagem de cana-de-açúcar, observou que o pH apresentava valores abaixo de 4 no terceiro dia após a ensilagem.

O pH é um dos fatores de maior importância na inibição de microrganismos indesejáveis. As enterobactérias são prejudiciais, principalmente na fase inicial de fermentação. O pH ótimo para seu crescimento é de 6,0 a 7,0; assim, a maioria das cepas de *Enterobacteriaceae* não cresce em pH abaixo de 5,0 (Bolsen, 1995). As bactérias do gênero *Listeria* spp. podem tolerar valores de pH de 3,8 a 4,2 por longos períodos se o oxigênio está presente, mesmo que em baixos níveis; no entanto, sob condições estritamente anaeróbicas, aqueles microrganismos são rapidamente inativados se os valores de pH são baixos (Oude Elferink et al., 2000). Os clostrídeos também são inibidos por pH baixo no meio; no entanto, mais importante que o efeito do pH isoladamente é o efeito conjunto deste com teores de MS mais altos, acima de 30% (Woolford, 1984).

As silagens que receberam *L. plantarum* apresentaram os maiores teores de MS (32,63%) e as demais não diferiram entre si, apresentando valores médios de 28,42% (Tabela 3). Esse comportamento pode estar associado ao maior teor de MS dessas silagens no momento da ensilagem (Tabela 1). Os teores médios de MS reduziram de 31,23 para 28,96%, ocorrendo, portanto, uma redução aproximada de dois pontos percentuais.

De acordo com Woolford (1984), a redução de MS está relacionada à diminuição de conteúdo celular, principalmente de carboidratos solúveis, durante o processo fermentativo. Outras vias comuns de perdas de MS são a produção de efluentes e a perda de água resultante de reações metabólicas (McDonald et al., 1991). No caso específico de silagens de cana-de-açúcar, em virtude da elevada população de leveduras encontradas no material no início do processo da ensilagem, as perdas de MS provocadas pelo metabolismo desses

microrganismos podem tornar-se bastante significativas. De acordo com McDonald et al. (1991), a produção de etanol pelas leveduras é acompanhada pela perda acentuada de MS dos substratos na forma de CO₂ e H₂O.

TABELA 3. Valores de pH, matéria seca (MS), proteína bruta (PB), nitrogênio amoniacal (NH₃) e carboidratos solúveis (CHOs) das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias

Tratamentos ¹	pH	MS	PB	NH ₃	CHOs
		(%)	(% MS)	% N-Total	(g/kg)
Controle	3,57 a	28,62 b	3,59 c	11,0 a	12,63 c
<i>L. plantarum</i>	3,49 b	32,63 a	4,16 b	6,33 b	21,33 c
<i>L. paracasei</i>	3,47 b	28,43 b	4,24 b	10,65 a	41,00 a
<i>L. brevis</i>	3,58 a	28,55 b	4,05 b	7,33 b	31,60 b
<i>L. buchneri</i>	3,46 b	27,61 b	3,65 c	11,33 a	18,33 c
LB1	3,55 a	28,59 b	3,76 c	10,66 a	18,33 c
LB2	3,57 a	30,02 b	4,25 b	8,16 b	28,00 b
LB3	3,53 a	27,12 b	4,97 a	7,00 b	25,41 c
MÉDIA	3,53	28,96	4,08	8,99	24,62

¹Controle - sem inoculante; *L. plantarum* (10⁵ ufc/g MV); *L. paracasei* (10⁵ ufc/g MV); *L. brevis* (10⁵ ufc/g MV); *L. buchneri* (10⁵ ufc/g MV); LB1, LB2 e LB3 - silagens acrescidas de inoculantes comerciais.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

As reduções médias de MS neste estudo foram inferiores à encontrada por Molina et al. (2002), que observaram redução média de sete unidades percentuais (28,72 para 21,10%) aos 56 dias de ensilagem da cana-de-açúcar com 12 meses de crescimento, sob efeito de aditivos químicos e microbianos. Siqueira et al. (2007) observaram reduções médias de MS de 35,3 para 30,5% para cana-de-açúcar colhida aos 15 meses de desenvolvimento e armazenada por período de 60 dias. Esses mesmos autores fazem uma ressalva da importância de se avaliar a variação entre os teores de MS antes da ensilagem e após a abertura

do silo, pois essa variação constitui indicativo de perda de MS durante a fermentação.

Os valores médios de MS obtidos nesta pesquisa (28,96%) são superiores aos reportados por Pedroso et al. (2007) (26,4%) e Queiroz (2006) (23,12%), os quais observaram diferenças significativas entre aditivos microbianos e químicos para essa variável.

A concentração de PB (Tabela 3) foi significativamente maior para a silagem que recebeu o inoculante LB3 (4,97%), seguida das silagens inoculadas com *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. brevis* e LB2. De acordo com os valores encontrados na forragem fresca (Tabela 1), houve aumento desse componente ao longo do período de fermentação. Observou-se um aumento médio de 3,11 para 4,08% de PB quando se comparou a forragem antes e depois de ensilada. O aumento verificado durante a ensilagem ocorreu, principalmente, como consequência da perda de carboidratos solúveis por respiração no processo de fermentação da silagem. Segundo Rotz & Muck (1994), o teor de PB pode sofrer aumento de 1 a 2% na MS em função desse processo. Para as silagens, Controle, *L. buchneri* e LB1, as variações nos valores de PB foram menores. Aparentemente, o processo fermentativo da cana-de-açúcar apresenta pouco efeito na degradação da proteína, uma vez que houve pequena alteração dessa fração ao longo do tempo e os valores obtidos para as silagens no momento da abertura (Tabela 3) estão dentro da amplitude preconizada por Faria (1993).

Queiroz (2006) registrou valores médios de 5,48% de PB em silagens de cana-de-açúcar colhida aos 12 meses de crescimento e inoculadas com aditivos microbianos. No entanto, Siqueira et al. (2005) obtiveram valor médio de 4,1% de PB, coincidente com esse trabalho, no estudo de aditivos químicos e microbianos na ensilagem de cana-de-açúcar crua e queimada.

O comportamento dos teores médios de NH₃ estiveram associados aos teores de PB nas silagens. As silagens que foram inoculadas com bactérias

apresentaram média de 8,7% de NH₃ como porcentagem do nitrogênio total, evidenciando o efeito da inoculação na redução da quebra da proteína em amônia e, possivelmente, associado à rápida queda no pH após a ensilagem. De acordo com Silveira (1975), teores de NH₃ abaixo de 8% são caracterizam silagens de boa qualidade.

Os teores de NH₃ nesse estudo estão dentro do limite sugerido por Van Soest (1994) para silagens de boa qualidade. Segundo esse autor, valores acima de 10% indicam que o processo de fermentação resultou em quebra excessiva de proteína em amônia. Por outro lado, os valores de NH₃ aqui relatados e discutidos foram superiores aos encontrados em silagens de cana-de-açúcar por Lima et al. (2002) e Siqueira (2005). Entretanto, Lopes (2006) encontrou valores de NH₃ de apenas 2,06% para silagens de cana pura após 180 dias de fermentação.

Freitas et al. (2006) encontraram valores elevados de NH₃ em silagens de cana inoculadas com *L. buchneri*, com média de 13,4%, não detectando influência da inoculação com *L. plantarum* e *L. buchneri* sobre essa variável.

Em geral, existe uma correlação entre degradação protéica e produção de NH₃ em silagens. Essa degradação ocorre quando a queda do pH ocorre de forma lenta, causada por fermentação por enterobactérias, enzimas vegetais ou fermentação por bactérias do gênero *Clostridium*, reduzindo os teores de PB e aumentando as concentrações de NH₃ (Bolsen, 1995). No entanto, se for levado em consideração que em grande parte dos estudos sobre ensilagem de cana-de-açúcar a queda do pH é rápida, e que nesse estudo não foi observado nenhum indicativo de fermentação clostrídica, essa correlação foi observada na presente pesquisa.

Ao final do processo de fermentação, a silagem sem inoculante apresentou uma tendência de menor concentração de CHOs residuais (12,63 g/kg) do que as inoculadas, embora estatisticamente não diferiu das silagens

inoculadas com *L. plantarum*, *L. buchneri*, LB1 e LB3. Esse fato pode ser explicado pela maior conversão, pelas leveduras, dos CHOs a etanol, visto que a silagem controle foi a que apresentou as maiores populações de leveduras (Figura 2) e maiores teores de etanol (Tabela 5) após 90 dias de armazenamento. A silagem que recebeu a bactéria homolática *L. paracasei* foi a que apresentou o maior valor residual de CHOs (41,0 g/kg), seguido da que recebeu a bactéria heterolática *L. brevis* (31,6 g/kg). Uma provável explicação para esses altos teores de CHOs residuais foram as baixas populações de BAL nessas silagens (Figura 1). Possivelmente, essas populações de microrganismos não foram capazes de converter os açúcares presentes na cana-de-açúcar a ácidos.

Queiroz (2006) observou maior preservação de CHOs em silagens de cana adicionadas de *L. buchneri*, quando comparadas ao tratamento controle, cujos valores foram 36,6 e 17,9 g/kg, respectivamente.

Em média, os teores de CHOs na cana-de-açúcar antes do processo de ensilagem eram de 291,5 g/kg (Tabela 1); porém, com a aplicação dos inoculantes e 90 dias de fermentação esses teores foram reduzidos para 24,62 g/kg (Tabela 3). Freitas et al. (2006) verificaram redução de 92% no teor de CHOs após a ensilagem da cana-de-açúcar com *L. buchneri*, de 59,7 para 5,6% na MS. Os valores obtidos por esses autores diferem dos reportados por alguns autores, como Kung Jr. & Stanley (1982); Pedroso (2003) e Junqueira (2006), os quais obtiveram valores próximos aos desse trabalho, e semelhantes aos de Alli et al. (1983) e Castro Neto (2003). Possivelmente, diferenças metodológicas são a razão para tais discrepâncias.

Observações efetuadas por Ávila (2007) indicam que concentrações residuais altas de CHOs estão associadas a menores perdas de MS durante a fermentação, o que constitui vantagem. No entanto, há desvantagem quando essas silagens são expostas ao ar porque tendem, em geral, a deteriorar mais rápido, a menos que exista algum fator que aumente a sua estabilidade.

Os teores dos componentes estruturais e minerais foram aumentados após a ensilagem, provavelmente em decorrência do consumo de CHOs, o que altera a composição centesimal do volumoso (Tabelas 1 e 4). A silagem que apresentou o maior aumento nos teores de FDN após a ensilagem foi a que recebeu *L. paracasei* (7,8 unidades percentuais), e a menor, a que recebeu *L. brevis* (0,89 unidades percentuais%). Essas silagens estão associadas aos maiores (66,8%) e menores (59,89%) teores de FDN observados após a cana-de-açúcar ter sido ensilada por 90 dias. Esse aumento nos teores de FDN podem estar associados a reduções nos teores observados de CHOs (Tabela 3). Os valores médios obtidos não condizem com a variação verificada nos teores de FDN e FDA (Tabela 4), uma vez que a silagem que apresentou menor teor de fração fibrosa não foi a de maior valor numérico de CHOs.

Como pode ser observado, o aumento da fração fibrosa do material ensilado em relação ao material original pode ocorrer devido à formação de efluentes durante o processo fermentativo, quando os componentes solúveis em água são reduzidos proporcionalmente ao aumento da fração menos fermentável insolúvel em água, particularmente os constituintes da parede celular (Van Soest, 1994). Pode, também, ocorrer por causa da perda de CHOs, na forma de gases, ou por meio da formação da chamada “água de metabolismo”, formada durante a síntese de etanol ou do metabolismo de fermentação de açúcares por bactérias, sendo também responsável pela redução no teor de MS.

Nos trabalhos conduzidos com cana-de-açúcar essas modificações têm sido associadas mais com a perda de MS na forma de gases em razão da fermentação alcoólica por leveduras do que a perdas por efluentes. No trabalho de Freitas et al. (2006) não houve produção de efluente. Estes autores concluíram que as modificações ocorridas nos teores de MS, FDN e FDA decorreram das perdas de CHOs na forma de gases e da produção da “água de metabolismo”.

TABELA 4. Teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose (HEMI) e Cinzas das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias

Tratamentos ¹	FDN	FDA	HEMI	CINZAS
	(% MS)			
Controle	60,39 b	37,87	28,87	5,21
<i>L. plantarum</i>	66,66 a	37,33	29,27	5,53
<i>L. paracasei</i>	66,80 a	37,78	28,02	5,50
<i>L. brevis</i>	59,89 b	33,14	26,75	5,33
<i>L. buchneri</i>	60,24 b	38,77	21,49	5,14
LB1	63,32 a	37,32	24,41	4,84
LB2	61,89 b	38,29	23,60	5,68
LB3	64,68 a	35,43	29,25	5,69
MÉDIA	62,98	37,24	26,46	5,64

¹Controle - sem inoculante; *L. plantarum* (10⁵ ufc/g MV); *L. paracasei* (10⁵ ufc/g MV); *L. brevis* (10⁵ ufc/g MV); *L. buchneri* (10⁵ ufc/g MV); LB1, LB2 e LB3 - silagem acrescidas de inoculantes comerciais.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

Pedroso et al. (2006) detectaram aumentos relativos médios de FDN de 9,35% para silagens de cana-de-açúcar tratada com inoculantes à base de *L. buchneri* e aditivos químicos, aos 96 dias de ensilagem.

Em estudo de fermentação de silagens de cana-de-açúcar com diferentes inoculantes, Sousa (2006) constatou aumentos de 67 e 47% nos teores de FDN das silagens controle e inoculada com *L. buchneri*, respectivamente, não havendo diferença no padrão de fermentação ao longo do processo (interação não significativa) para essa variável.

Na cana-de-açúcar de 24 meses de idade, Santos (2004) encontrou teor de 70,36% de FDN na MS. Porém, Roth et al. (2005) observaram teor de FDN de 75% na MS da cana-de-açúcar ensilada aos 15 meses de crescimento. Evangelista et al. (2003), avaliando o perfil de fermentação na silagem da cana-

de-açúcar pura, observaram elevação do teor de FDN de 55,6% para 75,6%, decorridos 50 dias de fermentação.

Observou-se aumento da ordem de 14,07% na fração de FDA com a ensilagem da cana-de-açúcar. Este comportamento era esperado, conforme já discutido para a variável FDN. Aumentos ponderais de 27,13% nos teores de FDA foram relatados por Pedroso et al. (2005) em estudo do perfil de fermentação da silagem de cana-de-açúcar.

Os teores médios de FDA encontrados nesta pesquisa (37,24%) são inferiores aos de Lopes (2006) (41,86%), Pedroso et al. (2005) (44,6%), Bravo Martins et al. (2006) (39,04%) e Siqueira et al. (2007) (45,4%), e concordam com os de Pedroso et al. (2006) (36,85%), Schmidt (2006) (37,4%) e Freitas et al. (2006) (37,68%). De acordo com Mertens (1982), menores teores de FDA caracterizam silagens de melhor qualidade, pois este componente da parede celular é inversamente correlacionado com a digestibilidade da MS.

Os valores médios de HEMI nesse estudo (26,46%) foram superiores aos encontrados por Lopes (2006), Schmidt (2006) e Santos (2007) e semelhantes aos de Ávila (2007). A HEM é um parâmetro importante na avaliação da fermentação da silagem de cana-de-açúcar. McDonald (1991), avaliando diversas silagens, verificou que, ao se esgotarem os carboidratos solúveis, a HEM pode servir de substrato para as bactérias fermentadoras. Este fato não foi observado nesta pesquisa, visto que os valores de HEMI da cana-de-açúcar antes da ensilagem (Tabela 1) foram muito próximos aos encontrados nesta forragem após o período de 90 dias de fermentação (Tabela 4) e não ocorreu exaustão dos CHOs da silagem.

Para Cinzas ocorreu um aumento em relação ao material original em função das perdas de conteúdo celulares durante a fermentação, resultando em elevação proporcional dos valores, conforme já discutido. Os valores obtidos nesta pesquisa são considerados altos quando comparados com os Pedroso et al.

(2005), Schmidt (2006) e Queiroz (2006), porém existem pesquisas, como a de Pedroso et al. (2006), em que se obtiveram, com diferentes aditivos na ensilagem de cana-de-açúcar, valores médios de Cinzas de 6,09% na MS.

4.2.2 Parâmetros microbiológicos

A adição de inoculantes às silagens de cana-de-açúcar influenciou significativamente ($P < 0,05$) a população de BAL durante o processo fermentativo (Tabela 7A). Os valores obtidos das populações de BAL podem ser observados na Figura 1.

Os maiores incrementos das populações de BAL, quando comparados com os da cana-de-açúcar fresca (Tabela 2), após o período de 90 dias de ensilagem, foram observados nas silagens controle, seguidas das correspondentes a *L. buchneri* e LB1 (Figura 1). O aumento de BAL no tratamento controle pode estar associado às suas menores populações iniciais no momento da ensilagem (Tabela 2), visto que este não sofreu inoculação com nenhum tipo de bactéria e apresentou os menores teores de CHOs residuais (Tabela 3). Sousa (2006) também observou uma alta população de BAL ao final do processo da fermentação de cana-de-açúcar sem aditivo.

As silagens que receberam a bactéria homolática *L. paracasei* foram as que apresentaram as menores populações de BAL, porém não diferindo de *L. brevis* e *L. plantarum*, que também exibiram maiores concentrações de CHOs. Possivelmente, este microrganismo não desenvolveu populações de BAL suficientes para converter os CHOs presentes na forragem em ácidos.

As silagens que receberam *L. plantarum*, *L. brevis* e *L. paracasei* apresentaram uma ligeira redução nas populações de BAL após 90 dias de ensilagem. Esta observação também foi reportada por Bravo-Martins (2004), com médias respectivas de 8,5; 6,5; 8,5 e 6,8 log ufc/g de silagens cana-de-

açúcar com 10, 20, 30 e 40 dias de fermentação. Em alguns trabalhos revisados foi constatada redução na população de BAL no decorrer do processo fermentativo (Pedroso et al., 2007). Segundo Hammes et al. (1992), na silagem ocorre uma sucessão de BAL. No estágio inicial, as bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus* dominam o processo, sendo substituídas por *Leuconostoc*, depois por *Lactobacillus* e *Pediococcus*, que são mais resistentes às condições ácidas. No decorrer do processo, até as BAL pertencentes ao gênero *Lactobacillus* vão perdendo a viabilidade e alguns microrganismos especializados, tais como *Lactobacillus buchneri*, continuam ativos em uma baixa quantidade (Oude Elferink et al., 2000).

Os valores médios de BAL (8,19 log ufc/g) são semelhantes aos relatados por Bravo-Martins (2006) (8,8 log ufc/g) avaliando aditivos químicos em silagens de diferentes variedades de cana-de-açúcar.

Observou-se efeito das populações de leveduras encontradas nas silagens (Figura 2). As maiores populações foram observadas nas silagens controle e *L. plantarum*. As silagens inoculadas com *L. buchneri* e LB1 apresentaram populações abaixo dos níveis de detecção, ou seja, < 2 log ufc/g. O mais baixo valor registrado de pH nesta pesquisa foi para as silagens que receberam *L. plantarum*, contudo não sendo suficiente para reduzir a população de leveduras (McDonald et al., 1991). As baixas estabilidades dessas silagens foram associadas a altas contagens de leveduras, que podem promover aumento de pH e o risco de desenvolvimento de microrganismos patogênicos como *Listeria monocytogenes* (Rotz & Muck, 1994).

Esse comportamento pode ser explicado pela existência de muitas espécies de leveduras que são relativamente insensíveis ao pH encontrado nas silagens (3,7 a 6,5), podendo manter altas populações sob condições anaeróbias pela fermentação dos açúcares (Jobim & Gonçalves, 2003). Observou-se também que as silagens correspondentes à mesma bactéria, *L. buchneri*,

apresentaram comportamentos diferentes das populações de leveduras ao final do período de armazenagem, variando de $< 2 \log \text{ ufc/g}$ (*L. buchneri* e LB1) a $4,53 \log \text{ ufc/g}$ (LB3).

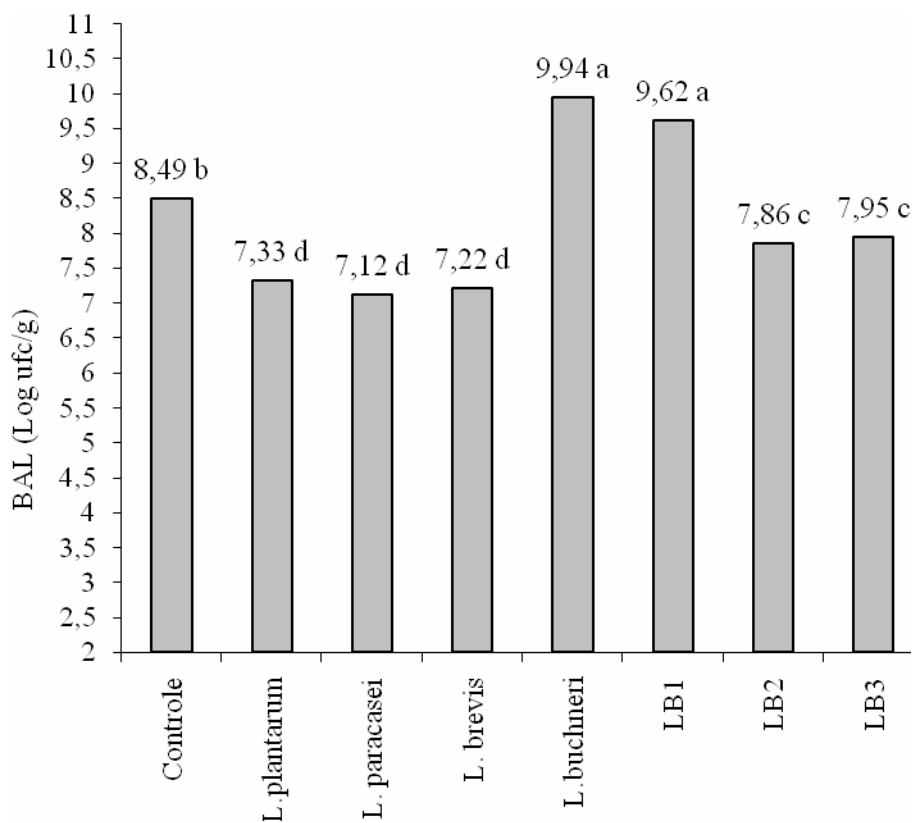


FIGURA 1. Contagem de bactérias ácido lácticas das silagens de cana-de-açúcar submetidas a diferentes tratamentos.

Letras diferentes indicam diferença significativa $P < 0,05$ pelo teste Scott-Knott

Existem relatos de que o ácido acético atua no controle da população de leveduras (Woolford, 1975); entretanto, concentrações de 1,7% na MS, como encontrado nesta pesquisa nas silagens controle e silagens inoculadas com *L.*

plantarum (Tabela 5), não foram eficientes no controle desse microrganismo. Concentração de 1,7% de ácido acético na MS equivale a 7,4 g do ácido por litro da fase úmida de uma forragem com 30% de MS, diferente dos valores preditos por Woolford (1975), segundo os quais populações de leveduras são controladas por concentrações de ácido acético superiores a 5,6 g/L do meio de cultura (94mmol/L).

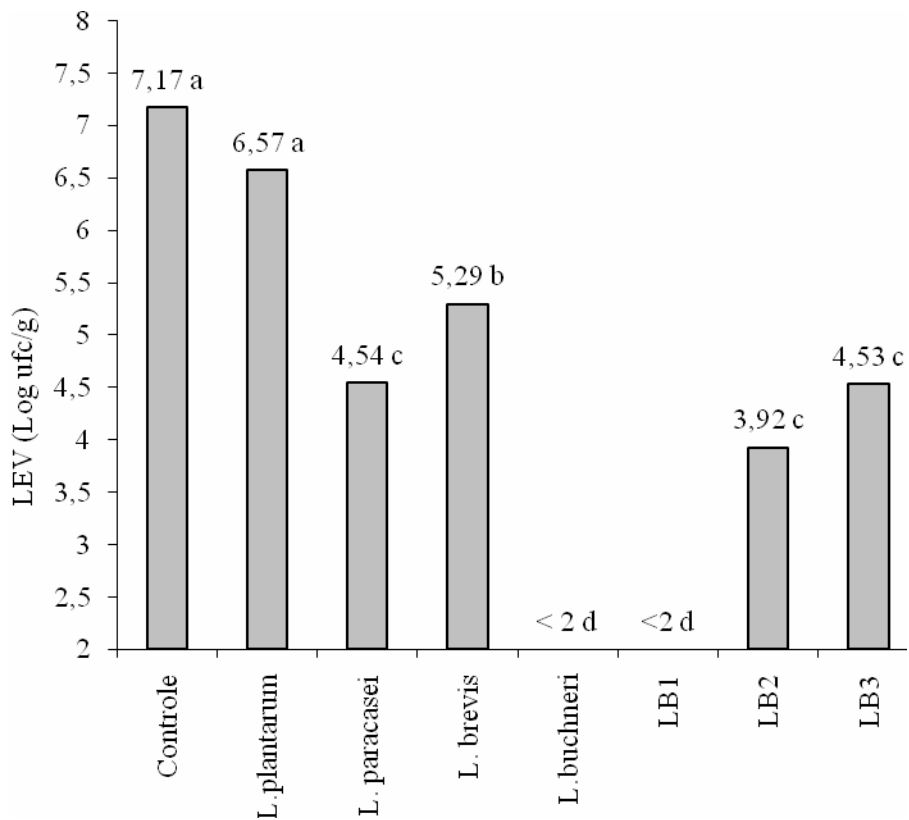


FIGURA 2. Contagem de leveduras das silagens de cana-de-açúcar submetidas a diferentes tratamentos.

Letras diferentes indicam diferença significativa $P < 0,05$ pelo teste Scott-Knott

Lopes (2006) pesquisou diferentes aditivos na ensilagem de cana-de-açúcar. Após um período de 180 dias de armazenamento, o autor determinou populações de 4,86 log ufc/g de leveduras. Porém, Bravo-Martins et al. (2006) obtiveram populações médias de leveduras, após 30 dias de ensilagem, de 5,97 log ufc/g, e Freitas et al. (2006), de 5,19 log ufc/g. Bernardes et al. (2002) obtiveram valores de 2,02 log ufc/g aos 55 dias de fermentação.

As populações de fungos filamentosos foram inferiores ao mínimo detectável nas análises ($< 2 \log \text{ ufc/g}$) em todas as silagens, por isso não foram representadas. Este fato possivelmente decorreu da baixa penetração de oxigênio nos silos no período de fermentação. Jobim & Gonçalves (2003) citam que espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicilium* crescem em silagens em que há penetração de ar.

Valores semelhantes foram relatados por Bravo-Martins et al. (2006) quando trataram cinco variedades de cana-de-açúcar com aditivos químicos.

4.2.3 Produções de ácidos graxos voláteis, ácido láctico e etanol

Foi observado efeito ($P > 0,05$) dos inoculantes sobre os teores médios de ácidos graxos voláteis, ácido láctico e etanol das silagens de cana-de-açúcar (Tabelas 8A e 9A).

Os teores médios de ácidos láctico e graxos voláteis e a relação ácido láctico:acético e etanol das silagens da cana-de-açúcar submetidas a diferentes inoculantes no momento da ensilagem são apresentados na Tabela 5.

Os dados referentes aos teores de ácido butírico foram encontrados em quantidades muito reduzidas (traços) em todas as silagens e não foram abordados nesta discussão.

Para a variável ácido láctico, foi determinada uma concentração média de 2,81% na MS, sendo o menor valor observado na silagem controle (1,73% na

MS). Não foram detectadas diferenças estatísticas entre as silagens que receberam inoculação no momento da ensilagem e a possível explicação para esse fato é o alto coeficiente de variação obtido para esta variável (Tabela 8A). Como já mencionado, análises de espectrofotometria geralmente proporcionam grande variação nos resultados obtidos, dando origem a altos coeficientes de variação.

O menor teor de ácido láctico na silagem controle pode estar associado à utilização deste como substrato pelos microrganismos, quando são baixas as reservas de CHOs (Krooneman et al., 2002).

As concentrações de ácido láctico em silagens de cana-de-açúcar apresentaram grandes variações nos trabalhos publicados. Alli et al. (1982) encontraram teores variando entre 1,66 e 1,93% na MS; Alcântara (1989) obteve 1,52% na MS, enquanto Andrade et al. (2001) e Freitas et al. (2006) registraram teores em torno de 4,3% na MS. Por outro lado, Kung Jr. & Stanley (1982), trabalhando com silagens de cana-de-açúcar colhida em diferentes períodos de desenvolvimento vegetativo, obtiveram teores de ácido láctico variando entre 2,82 e 5,65% na MS, sendo que o menor valor deste ácido foi acompanhado pelo maior de etanol, fato que também foi constatado nesse estudo (Tabela 5).

Essas disparidades são encontradas na literatura, bem como há concordância entre os teores dos ácidos orgânicos e suas relações e a influência na inibição da síntese de etanol. No entanto, observou-se que pouco se conhece dos reais mecanismos envolvidos no controle da produção de álcool. Devem ser conduzidos estudos que correlacionem e modelem os valores dos ácidos orgânicos com os teores de CHOs e de MS do material original, bem como a variedade forrageira envolvida. Além disso, devem ser padronizadas as técnicas de análise para a determinação de carboidratos a fim de que se diminuam os erros intrínsecos e melhores relações e compreensões do modelo possam ser extraídas. Assim, é possível obter melhor compreensão de quais variáveis estão

envolvidas e qual a real importância de um determinado parâmetro no controle das leveduras e na síntese de etanol das silagens de cana-de-açúcar (Sousa 2006).

Nas concentrações de ácido acético, foi observada uma variação de 1,74 (controle) a 4,97% na MS (*L. brevis*) (Tabela 5). Essa diferença entre as silagens era esperada, visto que as bactérias que compõem cada tratamento apresentaram perfis de produção de ácidos diferentes.

Os maiores teores de ácido acético foram obtidos nas silagens que continham as espécies *L. brevis* e *L. buchneri*. Ranjit & Kung Jr. (2000) afirmam que esses microrganismos produzem mais ácidos acético e propiônico, proporcionando aumento na estabilidade aeróbia das silagens. Oude Elferink et al. (2001) relataram a capacidade das bactérias *L. brevis* e *L. buchneri* em degradar ácido láctico utilizando a glicose como aceptor de elétrons e produzindo acetato, 1,3-propanodiol e CO₂. O ácido láctico, em pH inferior ao seu pK_a (4,73), mantém-se na forma não dissociada, de modo que a entrada do ácido pela membrana (permeável a esse ácido) dos microrganismos é realizada via transporte passivo. Dentro da célula, o ácido é dissociado (RCOO⁻ e H⁺) porque o pH interno do microrganismo é de 7,0 (superior ao pK_a), liberando íons de H⁺, o que implica gasto de energia por se tratar de um processo de transporte ativo, retardando o crescimento e podendo causar a morte celular (McDonald et al., 1991).

Nesse estudo, as concentrações de ácido acético foram semelhantes às observadas em silagens de cana-de-açúcar por Ranjit & Kung Jr. (2000), 6,6%, iguais às de Freitas et al. (2006), 2,6 a 4,5%, e superiores aos valores relatados por Andrade et al. (2001), em que todos os tratamentos provocaram variações de 0,9 a 2,2% nas silagens. Por outro lado, aqueles teores foram inferiores aos encontrados por Nishino et al. (2003), de 6,33%, utilizando silagens de milho adicionadas de *L. buchneri* na grandeza de 10⁶ log ufc/g MS.

As relações entre os ácidos lático e acético foram bastante dispersas, graças à grande variação dos teores destes ácidos. Os valores calculados para esta relação variaram de 0,43 a 2,07. Os valores mais elevados foram observados para as silagens inoculadas com *L. paracasei* (2,07) e *L. plantarum* (1,76) e os menores, para as silagens que foram inoculadas com bactérias heteroláticas, ou seja, bactérias que degradam o ácido lático a ácido acético.

TABELA 5. Teores dos ácidos lático e acético, relação ácido lático:ácido acético (AL:AC) e os teores de ácido propiônico e etanol das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias

Tratamentos ¹	Lático	Acético	AL:AC	Propiônico	Etanol
	(% na MS)			(% na MS)	
Controle	1,73 b	1,74 c	1,00 b	0,58 c	6,14 a
<i>L. plantarum</i>	3,02 a	1,75 c	1,76 a	0,16 d	3,44 b
<i>L. paracasei</i>	3,80 a	1,83 c	2,07 a	0,17 d	3,67 b
<i>L. brevis</i>	2,10 a	4,97 a	0,43 b	0,12 d	1,15 e
<i>L. buchneri</i>	3,06 a	4,07 a	0,75 b	1,34 a	2,10 d
LB1	3,17 a	4,30 a	0,73 b	0,71 b	2,85 c
LB2	2,58 a	3,17 b	0,79 b	0,16 d	2,05 d
LB3	3,03 a	4,55 a	0,66 b	0,16 d	2,15 d
MÉDIA	2,81	3,30	1,03	0,44	2,94

¹Controle - sem inoculante; *L. plantarum* (10^5 ufc/g MV); *L. paracasei* (10^5 ufc/g MV); *L. brevis* (10^5 ufc/g MV); *L. buchneri* (10^5 ufc/g MV); LB1, LB2 e LB3 - silagens acrescidas de inoculantes comerciais.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

Poucos são os trabalhos encontrados na literatura que apresentam teores de ácidos orgânicos em silagens de cana-de-açúcar. Não foram encontrados trabalhos em que esses teores estão associados aos inoculantes utilizados na ensilagem.

Kung Jr. & Shaver (2001) afirmam que, em plantas de milho, a relação entre os ácidos láctico e acético deveria variar entre 2,3 a 4,0:1; em silagens de alfafa, essa relação varia entre 2,7 a 3,5:1; enquanto em silagens de gramíneas temperadas, varia entre 3,3 a 6,0:1, sendo que os maiores teores de ácido láctico (6,2 a 8,9% na MS) são verificados nas silagens de Alfafa (*Medicago sativa* L.) em função do elevado poder de tamponamento dessa leguminosa. Resultados de trabalhos avaliando a adição de uréia em silagens de milho (Gonçalves et al., 1998) e sorgo (Vieira et al., 2004) mostram a elevação do teor de ácido acético e a redução na relação ácido láctico:ácido acético em decorrência da inclusão daquele aditivo.

No estudo dos teores de ácido propiônico, observou-se uma média, nas silagens, de 0,44% na MS. Os maiores teores foram obtidos nas silagens inoculadas com *L. buchneri* (1,34%), valores considerados alto conforme relatado na literatura (Schmidt, 2006; Sousa, 2006; Kleinschmit et al., 2005 e Taylor et al., 2002). Para as demais silagens, os valores encontrados estão de acordo com os relatados na literatura (Freitas et al., 2006 e Schmidt, 2006).

As concentrações de ácido propiônico nas silagens estão dentro da faixa de 0 a 1%, exceto as inoculadas com *L. buchneri*, classificadas como silagens de boa qualidade, conforme citado por Mahanna (1993). Entretanto, foram inferiores aos valores observados por Freitas et al. (2006), de 0,7 a 1,9% na MS. O ácido propiônico é um dos ácidos de cadeia curta de maior efeito sobre os microrganismos, reduzindo o crescimento de leveduras em pequenas concentrações. Essa característica ocorre pela ação na membrana citoplasmática, pelo abaixamento do pH celular, impedindo o transporte de aminoácidos entre as membranas celulares (Freese et al., 1973).

Para os teores médios de etanol, as silagens que foram submetidas à inoculação com bactérias homoláticas apresentaram comportamentos semelhantes, com média de 3,55% na MS, e superiores às demais que foram

inoculadas. Este comportamento foi relatado por diversos autores (Andrade et al., 2000; Castro Neto, 2003; Silva, 2003), quando demonstraram ausência de efeito ou efeito deletério da inoculação de bactérias homoláticas em silagens de cana-de-açúcar, acarretando elevação na produção de etanol.

Nos tratamentos que continham bactérias heteroláticas, a bactéria *L. brevis* foi a que proporcionou os menores teores de etanol após o período de 90 dias de armazenamento das silagens. Estes resultados podem ser explicados pela inibição do crescimento de leveduras ocasionado pelo ácido acético (McDonald et al., 1991).

Os maiores teores de etanol observados neste estudo foram para as silagens controle (6,14% na MS), sendo inferiores aos relatados na literatura (Kung Jr. & Stanley 1982; Pedroso et al., 2005). Esses autores encontraram teores de etanol de 8 a 17% na MS em silagens de cana-de-açúcar sem a aplicação de nenhum tratamento, resultando em perdas aproximadas de 30% da MS durante o processo de armazenagem.

Alli & Backer (1982) e Pedroso et al. (2005), estudando a dinâmica da fermentação de silagens de cana-de-açúcar, observaram aumentos na concentração de etanol durante a ensilagem, atingindo valores máximos em apenas 15 dias de ensilagem. No caso das silagens produzidas por Alli & Backer (1982), a exaustão dos teores de CHOs (apenas 1% na MS) foram responsáveis pela paralisação no incremento de etanol nas silagens. No caso de Pedroso et al. (2005), como os teores de CHOs e etanol continuaram variando dos 15 ao 45 dias, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas, pode ter ocorrido a continuidade da fermentação alcoólica, assemelhando-se à situação desta pesquisa.

Segundo McDonald et al. (1991), a fermentação etanólica é um processo ineficiente, com formação de duas moléculas de etanol e duas de CO₂ para cada molécula de glicose consumida, resultando em elevada perda de MS.

4.2.4 Estabilidade aeróbia

Para os dados de estabilidade aeróbia, temperatura máxima e tempo para atingir a temperatura máxima, foram observados efeitos dos inoculantes ($P < 0,05$) (Tabela 10A). Os dados referentes ao ensaio de estabilidade aeróbia estão apresentados nas Figuras 3, 4 e 5.

Na avaliação das silagens em aerobiose foi observada estabilidade aeróbia média de 56,4 h, sendo que os menores valores foram observados para as silagens controle (31,3h) e os maiores, para LB3 (86 h).

As silagens que foram inoculadas com as espécies *L. buchneri* apresentaram as maiores estabilidades, exibindo uma média de 69,5 h. Estas silagens também estiveram associadas com as menores temperaturas da massa de forragem e o maior tempo para se atingir esta temperatura máxima durante o período avaliado (Figuras 4 e 5). Esta maior estabilidade possivelmente está associada à maior produção de ácido acético (Ranjit & Kung Jr., 2000) em face do poder fungicida deste, que é o dobro daquele do ácido láctico, e vai atuar no controle de microrganismos deterioradores na fase aeróbia da silagem (Moon, 1983).

Na análise das silagens que receberam a inoculação de *L. brevis*, a estabilidade aeróbia obtida de 49,3 horas, sob o ponto de vista da produção de ácidos, principalmente do ácido acético (4,97% na MS), foi baixa, visto que esse ácido atua no controle de microrganismos na fase aeróbia, conforme já discutido. Essa estabilidade condiz com os teores de CHOs residuais e a contagem de microrganismos, pois essas silagens apresentaram altos teores de CHOs residuais (31,6 g/kg de forragem) e populações de leveduras da ordem de 5,29 log ufc/g de forragem, resultando em substrato e populações de microrganismos para uma rápida deterioração dessas silagens quando expostas ao O_2 (Woolford, 1984).

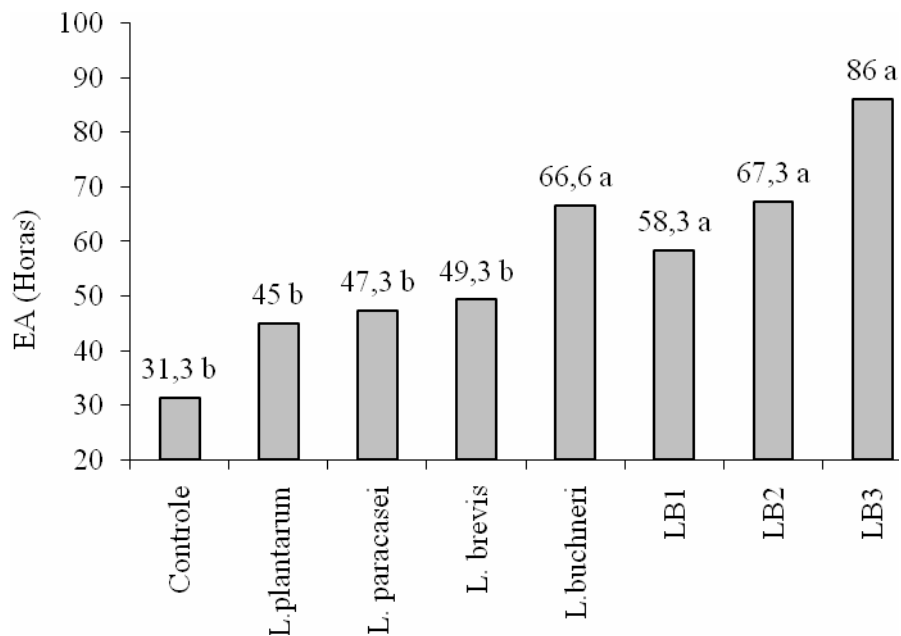


FIGURA 3. Estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar submetidas a diferentes tratamentos.

Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott

Danner et al. (2003) verificaram, em silagens de milho inoculadas com *L. buchneri*, *L. brevis* e *L. plantarum*, valores de 274, 72 e 26 horas de estabilidade, respectivamente, e que esta esteve relacionada com a produção de ácido acético nas concentrações de 5,53, 2,86 e 0,81 %MS, respectivamente.

Os valores de estabilidade aeróbia determinados nesta pesquisa foram inferiores aos do trabalho de Pedroso (2003), situando-se entre 65 e 75 horas para as silagens controle e inoculada com *L. buchneri* (5 log ufc/g), respectivamente; ou seja, houve um aumento de 11% no valor da estabilidade com a inoculação. Por outro lado, os valores foram superiores aos relatados por

Domingues et al. (2006), que determinaram, para a silagem de cana-de-açúcar, uma estabilidade aeróbia de apenas 16 horas e temperatura máxima alcançada pelas silagens de 45°C após 32 horas de exposição ao ar. Por sua vez, Queiroz (2006) e Santos (2007) não detectaram influência da adição de *L. buchneri* sobre a estabilidade aeróbia e TMAX de silagens de cana-de-açúcar, cujos valores médios foram de 37,7 e 35 h; 41,5 e 42,5°C, respectivamente. Considerando o alto valor de CHOs residuais nas silagens de cana-de-açúcar, os valores de estabilidade para esta pesquisa estão dentro da faixa esperada.

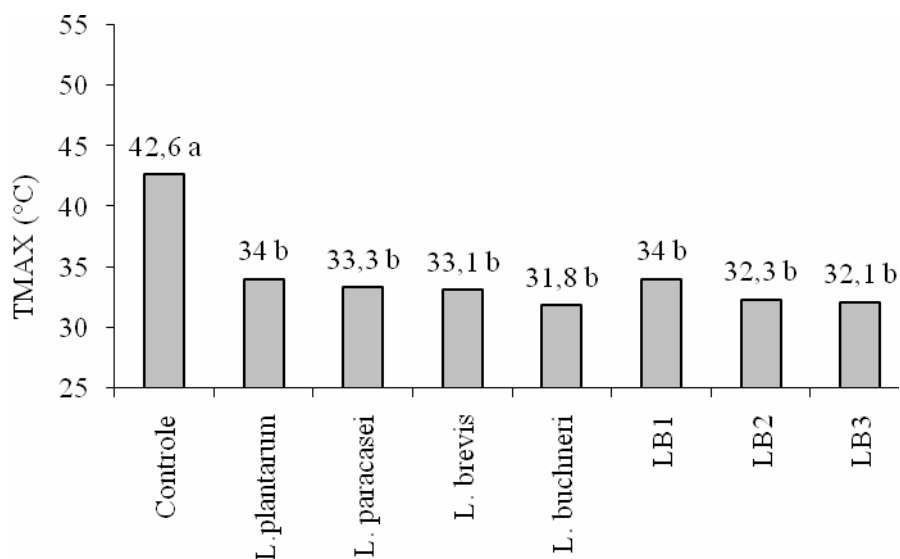


FIGURA 4. Temperatura máxima (TMAX) observada das silagens de cana-de-açúcar no ensaio de estabilidade aeróbia
Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott

A prática da inoculação com bactérias no momento da ensilagem propiciou menores temperaturas máximas das silagens para as que foram

inoculadas e maiores para controle, que atingiu cerca de 42°C, em 48 horas, enquanto as silagens inoculadas gastaram, em média, 88,5 horas para aquecer até 33°C (Figuras 4 e 5).

As leveduras são os microrganismos que iniciam o ataque ao lactato, sendo os maiores responsáveis pela deterioração aeróbia da silagem (Lindgren et al., 1985; Pahlow et al., 2003). No período compreendido entre a colheita da forragem e poucas horas após o fechamento do silo, as leveduras são capazes de se multiplicar até 10.000 ufc/g (Pahlow et al., 2003). Entretanto, quando a massa entra em contato com o ar, a população pode ultrapassar 100.000 ufc/g, sendo capaz de atingir elevada temperatura na presença de O₂ (Borreani et al., 2002; Muck, 2004), como pode ser observado na Figura 4.

Os valores obtidos de TMAX foram superiores aos de Balieiro Neto et al. (2005) em silagem controle de cana-de-açúcar, na qual após três dias a temperatura medida foi de 32,1°C. Junqueira (2006) não obteve diferença quanto aos valores de TMAX nos diferentes tratamentos químicos e bacterianos impostos às silagens de cana-de-açúcar, sendo que a temperatura média foi de 40,5°C.

Na análise do TTMAX, as silagens diferiram estatisticamente ($P < 0,05$) (Tabela 10A) e exibiram comportamentos semelhantes aos valores observados de estabilidade aeróbia (EA) (Figuras 3 e 5). Queiroz (2006) também observou esse comportamento similar para essas variáveis ao avaliá-lo em silagens de cana-de-açúcar expostas ao O₂.

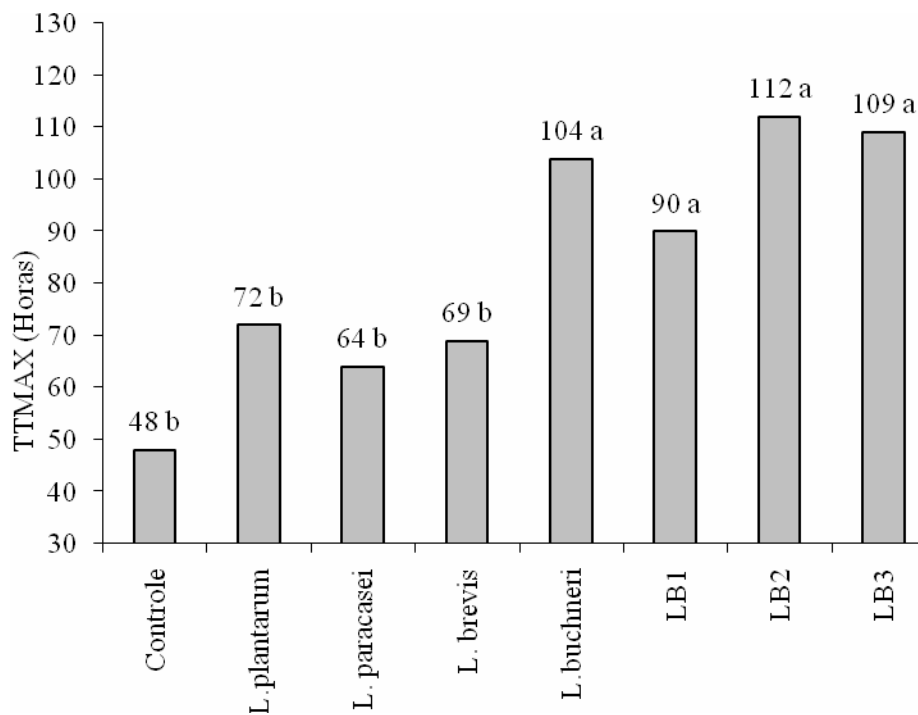


FIGURA 5. Tempo gasto para a silagem atingir a temperatura máxima (TTMAX) no ensaio de estabilidade aeróbia.

Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Toledo Filho et al. (2005) não encontraram diferenças quanto ao tempo para atingir a temperatura máxima em silagens de cana-de-açúcar sem aditivos (48,6h) e com inoculante contendo *L.buchneri* (53,08h).

5 CONCLUSÕES

A inoculação de bactérias no momento da ensilagem mostrou-se capaz de reduzir a produção de etanol e populações de microrganismos e diminuir as perdas de componentes nutritivos da silagem, apesar de os resultados terem sido variáveis.

A ensilagem da cana-de-açúcar com *L. buchneri*, tanto isolado como comercial, resultou em silagens de melhores características bromatológicas, baixas populações de leveduras e maiores estabilidades aeróbias.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESOGAN, A. T.; SALAWU, M. B.; ROSS, A. B.; DAVIES, D. R.; BROOKS, A. E. Effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* inoculants, or chemical additive on the fermentation, aerobic stability, and nutritive value of crimped wheat grains. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 86, p.1789-1796, 2003.

ALCÁNTARA, E.; AGUILERA, A.; ELLIOT, R.; SHIMADA, A. Fermentation and utilization by lambs of sugarcane harvested fresh and ensiled with and without NaOH. 4. Ruminal kinetics. **Animal Feed Science and Technology**, v. 23, p. 323-331, 1989.

ALLI, I.; BAKER, B. E.; GARCIA, G. Studies on the fermentation of chopped sugarcane. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 7, n. 4, p. 411-417, 1982.

ALLI, I.; FAIRBAIRN, R.; BAKER, B. E.; GARCIA, G. The effects of ammonia on the fermentation of chopped sugarcane. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 9, p. 291-299, 1983.

ANDRADE, J. B.; FERRARI JUNIOR, E.; BRAUN, G. Valor nutritivo da silagem de cana-de-açúcar tratada com uréia e acrescida de rolão de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.36, n.9, p.1169-1174, 2001.

ANDRADE, J.B.; FERRARI JÚNIOR, E.; POSSENTI, R.A.; LEINZ, F.F.; BIANCHINI, D.; RODRIGUES, C.F.C. Aditivo biológico na ensilagem de cana-de-açúcar tratada com uréia. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 57, n. 2, p. 139-149, 2000.

ANDRIGUETTO, J. M. et al. **Nutrição animal**. São Paulo: Nobel, 2002. v. 1, 395p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analyses**. 13.ed. Washington, 1980. 1015 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analyses**. 15.ed. Virginia, 1990. v. 1, 648 p.

ÁVILA, C. L. S. **Isolamento e uso de *Lactobacillus buchneri* na ensilagem de capim-mombaça e cana-de-açúcar**. 2007. 175p. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BALIEIRO NETO, G.B.; SIQUEIRA, G.R.; NOGUEIRA, J.R.; REIS, R.R.; SILVA, D.N.; ROTH, A.P.T.P.; ROTH, M.T.P. Pós-abertura de silagem de cana-de-açúcar cv. IAC86-2480 (*Saccharum officinarum* L.) com doses de óxido de cálcio. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: UFG/SBZ, 2005. 1 CD ROM.

BERNARDES, T. F. **Controle da deterioração aeróbia de silagens**. 2006. 103p. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Jaboticabal.

BERNARDES, T. F.; SILVEIRA, R. N.; COAN, R. M.; REIS, R. A.; MOREIRA, A. L.; SCHOCKEN ITURRINO, R. P. Características fermentativas e presença de levedura na cana-de-açúcar crua ou queimada ensilada com aditivo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. 1 CD ROM.

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.

BOLSEN, K. K.; LIN, C.; BRENT, B. E.; FEYERHERM, A. M.; AIMUTIS, W. R.; URBAN, J. E. Effects of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfafa and corn silages. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 75, p. 3066-3083, 1992.

BORREANI, G.; TABACCO, E.; COLOMBARI, G. Influenza del deterioramento aerobico degli insilati sulla qualità dei prodotti caseari. **L'Informatore Agrario**, v. 11, p. 58-61, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Normas climatológicas (1961-1990)**. Brasília: MA/SNI/DNMET, 1992. 84 p.

BRAVO-MARTINS, C. E. C.; CARNEIRO, L.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.; FIGUEIREDO, H. C. P.; SCHWAN, R. F. Chemical and microbiological evaluation of ensiled sugar cane with different additives. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 499-504, 2006.

BRAVO-MARTINS, C. E. C. **Identificação de leveduras envolvidas no processo de ensilagem de cana-de-açúcar e utilização de extratos vegetais como seus inibidores**. 2004. 148p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CASTRO NETO, A. G. **Avaliação de silagens de cana-de-açúcar submetidas a diferentes tratamentos**. 2003. 101p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CATHPOOLE, V. R.; HENZEL, E. F. Silage and silage-making from tropical herbage species. **Herbage Abstracts**, Farnham Royal, v. 41, n. 3, p. 213-221, 1971.

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

COAN, R. M.; SILVEIRA, R. N.; BERNARDES, T. F.; REIS, R. A.; MORENO, T. T. B.; MOREIRA, A.L. Composição química da cana-de-açúcar crua ou queimada ensilada com aditivo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. 1 CD ROM.

DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.69, n.1, p.562-567, 2003.

DEWYSEN, A. G.; VANBELLE, H. How chopping improves grass silage intake by sheep and heifers . In: GENERAL MEETING OF THE EUROPEAN GRASSLAND FEDERATION, 7., 1978, Merelbeke Belgium. **Proceedings...** Merelbeke Belgium, 1978.

DOMINGUES, F. N.; OLIVEIRA, M. S.; SIQUEIRA, G.R.; ROTH, A. P. T. P.; SANTOS, J.; ANDRADE, A. T.; MONTEIRO, R. R.; ROTH, M. T. P.; MAGARIO, F. B. Efeitos das doses de cal (CaO) microprocessada e do tempo após o tratamento sobre a estabilidade aeróbia e dinâmica de microrganismos na cana-de-açúca *in natura*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 2006. 1 CD-ROM.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; VAN WIKSELAAR, P. G. *Lactobacillus buchneri* improves aerobic stability of laboratory and farm scale whole crop maize silage but does not affect feed intake and milk production of dairy cows. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 12., 1999, Uppsala. **Proceedings...** Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 1999a. p. 264-265.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; SPOELSTRA, S. F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 583–594,1999b.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; VAN WIKSELAAR, P. G. 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, p.330-343, 2001.

DRIEHUIS, F.; WIKSELAAR, P. G. The occurrence and prevention of ethanol fermentation in high-dry-matter grass silage. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.80, p. 711-718, 2000.

EVANGELISTA, A. R.; LIMA, J. A.; SIQUEIRA, G. R.; SANTOS, R. V.; SANTANA, R. A. V.; LOPES, J. Perfil de fermentação da silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003. CD-ROM.

EVANGELISTA, A. R.; ABREU, J.G.; PEREIRA, R. C. Perdas na conservação de forragens. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 2., 2004, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO, 2004. p.75-112.

FARIA, V. P. Rações completas para vacas em lactação. In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. (Ed.). **Confinamento de bovinos leiteiros**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1993. p.229-244.

FERNANDES, A. M.; QUEIROZ, A. C.; PEREIRA, J. C.; LANA, R. P.; BARBOSA, M. H. P.; FONSECA, D. M. Fracionamento e cinética da degradação in vitro dos carboidratos constituintes da cana-de-açúcar com diferentes ciclos de produção em três idades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v.32, n.6, p.1778-1785, 2003. (Supl.1)

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 225-258.

FRESE, E.; SHEW, C.; GALLIERS, E. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. **Nature**, London, v.24, p.321-325, 1973.

FREITAS, A. W. P.; PEREIRA, J. C.; ROCHA, F. C.; COSTA, M. G.; LEONEL, F. P.; RIBEIRO, M.D. Avaliação da qualidade nutricional da silagem de cana-de-açúcar com aditivos microbianos e enriquecida com resíduo da colheita de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 38-47, 2006.

GONÇALVES, L. C.; BORGES, A. L. C. C.; RODRIGUEZ, N. M.; PIZARRO, E. A. Valor nutritivo da silagem de milho adicionada de uréia e carbonato de cálcio e do rolão de milho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, n. 3, p. 309-315, 1998.

GONZÁLEZ, E.; MCLEOD, N. A. Spontaneous fermentation of sugarcane. **Tropical Animal Production**, Santo Domingo, v.1, p.80-84, 1976.

GOTLIEB, A. Causes of mycotoxins in silages. In: THE SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK, NORTH AMERICAN CONFERENCE, 1997, Hershey. **Proceedings...** Hershey, PA: Northeast Regional Agricultural Engineering Service, 1997. p. 213–221.

GUIM, A. **Estabilidade aeróbica de silagens de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) emurcheado e tratado com inoculante microbiano.** 1997. 86p. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

HAMMES, W. P.; WEISS, N.; HOLZAPFEL, W. H. The genus *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALLOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (Ed). **The prokaryotes**. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 719-767.

HARRIS, L.E. **Os métodos químicos e biológicos empregados na análise de alimentos.** Gainesville: University of Florida, 1970. 150p.

HENRIQUE, W. **Efeito do uso de aditivos enzimo-bacterianos sobre a qualidade da silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) emurcheado e tratado com inoculante microbiano.** 1990. 100p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Ciência Animal e Pastagens)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

JASTER, E. Fermentation principles of legume, grass forage examined. **Feedstuffs**, Minneapolis, v.64, n. 12, p.14-16, Mar. 1994.

JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D. Microbiologia de forragens conservadas. In: _____. **Volumosos para produção de ruminantes: valor alimentício de forragens.** Jaboticabal: FUNEP, 2003. p. 1-26.

JUNQUEIRA, M. C. **Aditivos químicos e inoculantes microbianos em silagens de cana-de-açúcar: perdas na conservação, estabilidade aeróbia e o desempenho de animais.** 2006. 98p. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba.

KEADY, J. W. T.; O'KIELY, T. An evolution of effects of rates of the nitrogen fertilization of the grassland on silage fermentation, in silo losses, effluent production and stability. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 51, p. 350-362, 1996.

KLEINSCHMIT, D. H.; SCHMIDT, R. J.; KUNG JUNIOR, L. The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 88, n. 6, p. 2130-2139, 2005.

KROONEMAN, J; FABER, F.; ALDERKAMP, A. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, New York, v. 52, p. 639-646, 2002.

KUNG Jr., L.; RANJIT, N. K. The effects of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and stability of barley silage. **Journal of Dairy Science**, v.84, p. 1149-1115, 2001.

KUNG Jr., L; ROBINSON, J. R.; RANJIT, N. K.; CHEN, J. H.; GOLD, C. M.; PESEK, J. D. Microbial populations, fermentation end-products, and aerobic stability of corn silage treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1479-1486, 2000.

KUNG Jr, L.; STANLEY, R. W. Effects 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, Jr., L.; SHAVER, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. **Focus on Forage**, Winsconsin, v. 3, n. 13, p. 1-5, 2001.

LIMA, J. A.; EVANGELISTA, A. R.; ABREU, J. G.; SIQUEIRA, G. R.; SANTANA, R. A. V. Silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) enriquecida com uréia ou farelo de soja. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. 1CD-ROM.

LIMA, M. L. M.; MATTOS, W. R. S. Cana-de-açúcar na alimentação de bovinos leiteiros. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 5., Piracicaba, 1993. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1993. p.77-105.

LIN, C.; BOLSEN, K. K.; HART, R. A.; DICKERSON, J. T.; FEYERHERM, A. M.; AIMUTIS, W. R. Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2484-2493, 1992.

LINDGREN, S.; PETTERSSON, K.; KASPERSON, A. et al. Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 36, p. 765-774, 1985.

LOPES, J. **Qualidade da silagem de cana-de-açúcar elaborada com diferentes aditivos**. 2006. 85p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LÓPEZ, Z. A.; MOREÑO, I. E.; FOGLIATA, F. A.; AYALA, H. G. Microbial population of sugar juice that is neither affected nor deteriorated by frost. **Sugar y Azúcar**, Guadalajara, v. 83, p. 21-34, 1988.

MAHANNA, B. Troubleshooting silage problems. In: STATE APPLIED NUTRITION CONFERENCE, 4., 1993, Wisconsin. **Proceedings...** Wisconsin, 1993. p.1-21.

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

MERTENS, D. R. Using neutral detergent fiber to formulate dairy rations. In: GAINUT CONFERENCE FOR THE FEED INDUSTRY, 1982, Athens. **Proceeding...** Athens: University of Georgia, 1982. p. 116-126.

MOLINA, L. R.; FERREIRA, D. A.; GONÇALVES, L. C.; NETO, A. G. C.; RODRIGUEZ, N. M. Padrão de fermentação da silagem de cana-de-açúcar submetida a diferentes tratamentos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. CD-ROM.

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

MORAIS, J. P. G. **Avaliação do efeito do uso de inoculante bacteriano sobre a qualidade da silagem e desempenho animal**. 1995. 77p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Ciência Animal e Pastagens)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

MUCK, R. E. Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. **Transactions of the ASAE**, v. 47, p. 1011-1016, 2004.

MUCK, R. E. Factors influencing silage quality and their implications for management. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 11, p. 2992-3002, 1988.

NISHINO, N.; YOSHIDA, M.; SHIOTA, H.; SAKAGUCHI, E. Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole crop maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Applied Microbiology**, Okayama, v. 94, p. 800-807, 2003.

NUSSIO, L. G.; RIBEIRO, J. L.; PAZIANI, S. F. et al. Fatores que interferem no consumo de forragens conservadas. In: VOLOMOSO NA PRODUÇÃO DE RUMINANTES: VALOR ALIMENTÍCIO DE FORRAGENS, 2003, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Funep, 2003. p. 27-50.

NUSSIO, L. G.; SCHMIDT, P. Silagens de cana-de-açúcar para bovinos leiteiros: aspectos agronômicos e nutricionais. In: VISÃO TÉCNICA E ECONÔMICA DA PRODUÇÃO LEITEIRA, 2005, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 193-218.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; DRIEHUIS, F.; GOTTSCHAL, J. C. Silage fermentation processes and their manipulation. In: FAO ELETRONIC CONFERENCE ON TROPICAL SILAGE: silage making in the tropics with emphasis on smallholders, 1999, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 2000. p. 17-30.

OUDE ELFERINK, S. J. 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.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F. et al. 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.

PATRIZI, W. L.; MADRUGA JÚNIOR, C. R. F.; MINETTO, T. P.; NOGUEIRA, E.; MORAIS, M. G. Efeito de aditivos biológicos comerciais na silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 56, n. 3, p. 392-397, 2004.

PEDROSO, A. F. **Aditivos químicos e microbiano no controle de perdas e na qualidade de silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2003. 120f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

PEDROSO, A. F.; NUSSIO, L. G.; BARIONI JÚNIOR, W.; RODRIGUES, A. A.; LOURES, D. R. S.; CAMPOS, F.; RIBEIRO, J. L.; MARI, L.; ZOPOLLATTO, M.; JUNQUEIRA, M.; SCHMIDT, P.; PAZIANI, S. F.; HORII, J. Performance of holstein heifers fed sugarcane silages treated with urea, sodium benzoate or *Lactobacillus buchneri*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 4, p. 649-654, 2006.

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**, Brasília, v.36, n.3, p. 558-564, 2007.

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, 2005.

PLAYNE, M. J.; McDONALD, P. The buffering constituents of herbage. **Journal of Food Science and Agriculture**, Barking, v. 17, n. 6, p. 264-268, June 1966.

PRESTON, T. R.; HINOJOSA, C.; MARTINEZ, L. Ensiling of sugar cane with ammonia molasses and mineral acids. **Tropical Animal Production**, Edinburgh, v. 1, p. 120-126, 1976.

QUEIROZ, O. C. M. **Associação de aditivos microbianos na ensilagem e o desempenho de vacas em lactação recebendo silagem de cana-de-açúcar comparada a um volumoso tradicional**. 2006. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

RANJIT, N. K.; KUNG Jr., L. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage, **Journal of Dairy Science**, v.83, p.526-535, 2000.

RIBEIRO, J. L.; QUEIROZ, O. C.; NUSSIO, L. G. Desenvolvimento de aditivos microbianos para ensilagem: realidade e perspectivas. In: **VOLUMOSOS NA PRODUÇÃO DE RUMINANTES**, 2005, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Funep, 2005. p. 1-23.

ROTH, M.T. P.; SIQUEIRA, G. R.; REIS, R. A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. B.; BERNARDES, T. F.; PIRES, A. J. V.; ROTH, A. P. T. P.; AMARAL, R. C. Ensilagem da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tratada com doses de uréia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: UFG/SBZ, 2005. 1 CD ROM.

ROTZ, C. A.; MUCK, R. E. Changes in forage quality during harvester and storage. In: FAHEY, D. C.; COLLINS, M.; MERTENS, D. R.; MOSER, L. E. (Ed.). **Forage quality, evaluation, and utilization**. Madison: American Society of Agronomy/Crop Science Society/Soil Science Society, 1994. p. 828-868.

SANTOS, M. C. **Aditivos químicos para o tratamento da cana-de-açúcar in natura e ensilada (*Saccharum officinarum* L.)**. 2007. 112P. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SANTOS, R. V. **Silagem de cana-de-açúcar em duas idades de corte com diferentes aditivos**. 2004. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SCHMIDT, P. **Perdas fermentativas na ensilagem, parâmetros digestivos e desempenho de bovinos de corte alimentados com rações contendo silagens de cana-de-açúcar**. 2006. 228p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SCHMIDT, P.; NUSSIO, C. M. B.; RODRIGUES, A. A.; NUSSIO, L. G.; SANTOS, P. M.; SILVA, C. E. Produtividade, composição morfológica, digestibilidade e perdas no processo de ensilagem de duas variedades de cana-de-açúcar, com e sem adição de uréia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004. 1 CD ROM.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa, MG: UFV, 1990. 166p.

SILVA, S. A. R. **Avaliação da eficiência fermentativa da cana-de-açúcar ensilada com diferentes aditivos**. 2003. 44p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SILVEIRA, A. C. Técnicas para a produção de silagens. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 2., 1975, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 1975. p.156-186.

SIQUEIRA, G. R. **Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) ensilada com aditivos químicos e microbianos**. 2005. 92 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

SIQUEIRA, G. R.; BERNARDES, T. F.; REIS, R. A. Instabilidade aeróbia de silagens: Efeitos e possibilidades de prevenção. In: REIS, R. A.; SIQUEIRA, G. R.; BERTIPAGLIA, L. M. A. (Ed.). **Volumosos na produção de ruminantes**. 2.ed. Jaboticabal, SP: FUNEP, 2005. p. 25-60.

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 de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4, p. 789-798, 2007.

SOUSA, D. P. **Avaliação de aditivos químicos e microbianos como inibidores da síntese de etanol em silagens de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2006. 142 p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

TAYLOR, C. C.; RANJIT, N. J.; MILLS, J. A.; NEYLON, J. M.; KUNG JUNIOR, L. The effect of treating whole-plant barley with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 85, n. 7, p. 1793-1800, 2002.

TOLEDO FILHO, S. G.; SOUSA, D. P.; QUEIROZ, O. C. M.; RIBEIRO, J. L.; MARI, L. J. Perdas durante a ensilagem de cana-de-açúcar inoculada com aditivos microbianos. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 13., 2005, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba, SP: USP, 2005. 1 CD-ROM.

VALADARES FILHO, S. C. **Digestibilidade aparente e locais de digestão da matéria seca, energia e carboidratos de feno de soja perene**. 1981. 88p. (Dissertação mestrado) Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

VIEIRA, F. A. P.; BORGES, I.; STEHLING, C. A. V.; GONÇALVES, L. C.; COELHO, S. G. Qualidade de silagens de sorgo com aditivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 6, p. 819-829, 2004.

WEINBERG, Z. G. et al. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 512–518, 1993.

WEINBERG, Z. G. et al. Ensiling whole-crop wheat and corn in large containers with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 28, n.1, p. 7-11, 2002.

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

WOOLFORD, M. K. Microbial screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. **Journal of Science of Food and Agriculture**, New York, v. 26, p. 229-237, 1975.

ANEXOS

Tabela 1A	Resumo da análise de variância dos valores de pH e teores de MS e PB da cana-de-açúcar no momento da ensilagem.....	70
Tabela 2A	Resumo da análise de variância dos teores de FDN, FDA e HEMI da cana-de-açúcar no momento da ensilagem.....	70
Tabela 3A	Resumo da análise de variância dos valores de Cinzas, CHOs e PT da cana-de-açúcar no momento da ensilagem.....	70
Tabela 4A	Resumo da análise de variância dos valores de BAL, LEV e FF da cana-de-açúcar no momento da ensilagem.....	71
Tabela 5A	Resumo da análise de variância dos valores de pH e teores de MS e PB das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias.....	71
Tabela 6A	Resumo da análise de variância dos teores de CHOs, FDN e FDA das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias.....	71
Tabela 7A	Resumo da análise de variância dos valores de HEMI, Cinzas e BAL das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias.....	72
Tabela 8A	Resumo da análise de variância dos valores de LEV e ácidos láctico e acético das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias.....	72
Tabela 9A	Resumo da análise de variância da relação AL:AC e dos teores de ácido propiônico e etanol das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias.....	72
Tabela 10A	Resumo da análise de variância da estabilidade aeróbia, TMAX e TTMAX das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias.....	73

Tabela 11A	Resumo da análise de variância dos teores de NH ₃ das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias.....	73
Tabela 12A	Composição química dos meios MRS, DRBC e YEPG utilizados para contagens de microrganismos.....	74

TABELA 1A. Resumo da análise de variância dos valores de pH e teores de MS e PB da cana-de-açúcar no momento da ensilagem

Fonte de Variação	GL	pH		MS		PB	
		QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc
Tratamento	7	0,0009	0,9864	2,34	0,1685	0,13	0,3867
Resíduo	16	0,0051		1,34		0,11	
Média Geral		5,56		31,23		3,11	
CV (%)		1,3		3,71		10,85	

TABELA 2A. Resumo da análise de variância dos teores de FDN, FDA e HEMI da cana-de-açúcar no momento da ensilagem

Fonte de Variação	GL	FDN		FDA		HEMI	
		QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc
Tratamento	7	1,2444	0,2975	2,4266	0,3142	3,5452	0,0937
Resíduo	16	0,9328		1,8750		1,6290	
Média Geral		58,88		32,00		27,00	
CV (%)		1,64		4,28		4,73	

TABELA 3A. Resumo da análise de variância dos valores de Cinzas, CHOs e PT da cana-de-açúcar no momento da ensilagem

Fonte de Variação	GL	CINZAS		CHOs		PT	
		QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc
Tratamento	7	0,0445	0,9264	133,30	0,9994	0,0927	0,9648
Resíduo	16	0,1332		2061,1		0,3712	
Média Geral		4,49		291,56		10,70	
CV (%)		8,12		15,57		5,69	

TABELA 4A. Resumo da análise de variância dos valores de BAL, LEV e FF da cana-de-açúcar no momento da ensilagem

Fonte de Variação	GL	BAL		LEV		FF	
		QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc
Tratamento	7	6,9205	0,0000	0,0665	0,1114	0,0065	0,9230
Resíduo	16	0,0405		0,0322		0,0191	
Média Geral		7,36		6,16		5,42	
CV (%)		2,73		2,92		2,55	

TABELA 5A. Resumo da análise de variância dos valores de pH e teores de MS e PB das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias

Fonte de Variação	GL	pH		MS		PB	
		QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc
Tratamento	7	0,0069	0,0001	8,6417	0,0010	0,5927	0,0015
Resíduo	16	0,0006		1,3397		0,0993	
Média Geral		3,53		28,96		4,08	
CV (%)		0,74		4,00		7,71	

TABELA 6A. Resumo da análise de variância dos teores de CHOs, FDN e FDA das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias

Fonte de Variação	GL	CHOs		FDN		FDA	
		QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc
Tratamento	7	237,50	0,0002	23,875	0,02	11,7441	0,6723
Resíduo	16	26,772		7,0018		16,7795	
Média Geral		24,62		62,98		37,24	
CV (%)		21,01		4,20		11,00	

TABELA 7A. Resumo da análise de variância dos valores de HEMI, Cinzas e BAL das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias

Fonte de Variação	GL	HEMI		Cinzas		BAL	
		QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc
Tratamento	7	26,168	0,423	0,2575	0,0416	3,517	0,0000
Resíduo	16	24,359		0,0918		0,0945	
Média Geral		26,46		5,37		8,19	
CV (%)		18,65		5,64		3,75	

TABELA 8A. Resumo da análise de variância dos valores de LEV e ácidos, láctico e acético das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias

Fonte de Variação	GL	LEV		Lático		Acético	
		QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc
Tratamento	7	21,841	0,0000	1,2813	0,0061	5,5675	0,0000
Resíduo	16	0,1639		0,2852		0,1729	
Média Geral		4,00		2,81		3,30	
CV (%)		10,11		18,98		12,59	

TABELA 9A. Resumo da análise de variância da relação AL:AC e dos teores de ácido propiônico e etanol das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias

Fonte de Variação	GL	AL:AC		Propiônico		Etanol	
		QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc
Tratamento	7	0,9910	0,0000	0,5903	0,0000	7,0062	0,0000
Resíduo	16	0,0472		0,0051		0,1037	
Média Geral		1,03		0,44		2,946	
CV (%)		20,93		16,26		10,93	

TABELA 10A. Resumo da análise de variância da estabilidade aeróbia, TMAX e TTMAX das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias

Fonte de Variação	GL	Estabilidade		TMAX		TTMAX	
		QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc	QM	Pr>Fc
Tratamento	7	855,11	0,0016	37,200	0,0333	1681,9	0,0046
Resíduo	16	144,12		12,468		352,00	
Média Geral		56,41		34,18		83,66	
CV (%)		21,28		10,33		22,42	

TABELA 11A. Resumo da análise de variância dos teores de NH₃ das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias

Fonte de Variação	GL	NH ₃	
		QM	Pr>Fc
Tratamento	7	13,5953	0,0000
Resíduo	16	0,8057	
Média Geral			8,99
CV (%)			9,98

TABELA 12A. Composição química dos meios MRS, DRBC e YEPG utilizados para contagens de microrganismos

Ingredientes	Quantidade (g/L de meio)		
	MRS	DRBC	YEPG
Peptona bacteriológica	10	5,0	-
Peptona de soja	-	-	20
Extrato de carne	10	-	-
Extrato de levedura	5	-	10
Glicose	20	10	20
Sorbetano monooleato (Tween 80)	1,0	-	-
Fosfato de K dibásico	2,0	1,0	-
Acetato de sódio-3H ₂ O	5,0	-	-
Citrato de amônio	2,0	-	-
Sulfato de Mg-7 H ₂ O	0,05	0,5	-
Sulfato de Mn	0,05	-	-
Rosa bengala	-	0,025	-
Dicloran (0,2%)	-	0,2	-
Ágar	16	15	16
pH	6,5		3,5