

VINICIUS DA SILVA SANTOS

**PERFIL FERMENTATIVO E ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE
CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS COM CEPAS AUTÓCTONES DE BACTÉRIAS
LÁTICAS HETEROFERMENTATIVAS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência do
Conhecimento, para obtenção do título
de Magister Scientiae.

Viçosa
Minas Gerais - Brasil
2019

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S237p
2019 Santos, Vinícius da Silva, 1994-
Perfil fermentativo e estabilidade aeróbia de silagens de
cana-de-açúcar inoculadas com cepas autóctones de bactérias
láticas heterofermentativas / Vinícius da Silva Santos. – Viçosa,
MG, 2019.

1 dissertação eletrônica (xi, 23 f.): il.

Orientador: Odilon Gomes Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Zootecnia, 2019.

Referências bibliográficas: f. 19-23.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.504>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cana-de açúcar - Silagem. 2. Fermentação. 3. Bactérias.
4. Ácido láctico. I. Pereira, Odilon Gomes, 1960-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 633.2

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

VINICIUS DA SILVA SANTOS

**PERFIL FERMENTATIVO E ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE
CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS COM CEPAS AUTÓCTONES DE BACTÉRIAS
LÁTICAS HETEROFERMENTATIVAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 27 de fevereiro de 2019.



Karina Guimarães Ribeiro
(Coorientadora)



Thiago Carvalho da Silva



Odilon Gomes Pereira
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Débora e Milton,

Por terem me dado à vida e por hoje serem

A minha vida. Por todo amor, carinho e dedicação...

Dedico

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.”

Roberto Shinyashiki

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, por cuidados dos meus passos, incentivo e força.

Aos meus pais pelo exemplo de força, coragem e pelo apoio e amor incondicional.

À minha irmã pelo apoio, amor incondicional e amizade.

À minha família por sempre acreditarem em mim, não me deixarem desistir e assistência em todos os momentos

Aos professores da Universidade Federal da Paraíba pelos conhecimentos ministrados e contribuições.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Zootecnia, e a todos os professores pelos conhecimentos ministrados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa e auxílio na execução do projeto.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao INCT-CA pelo financiamento parcial desta pesquisa.

Ao professor Odilon Gomes Pereira pela orientação, confiança e apoio para a realização deste trabalho.

Aos professores Karina Guimarães Ribeiro, Thiago Carvalho pelas colaborações.

Aos colegas do laboratório de forragicultura pela amizade auxílio na execução do trabalho, conselhos, apoio e acima de tudo pela amizade: Wagner, Felipe, Iana, Cássia, João Paulo, Tâmara, Carla, Renan, e em especial ao meu irmão científico e amigo Alberto pelas contribuições exemplo de amizade e companheirismo desde os tempos de graduação.

À mãe científica Néia, pelo conhecimento ministrado, paciência carinho e atenção.

Aos Funcionários do Departamento de Zootecnia,

Zezé, Chicão e Mário pela colaboração e auxílio sempre que necessário.

Aos meus amigos de graduação Thaian, Silas, Pedro pelo carinho apoio e amizade

BIOGRAFIA

Vinicius da Silva Santos, filho de Debora Melquiades Silva Oliveira e Nilton José dos Santos, nasceu em 08 de junho de 1994, em Bom Jesus da Lapa - BA.

Em dezembro de 2011 concluiu o ensino médio na escola Centro Integrado de Ensino Continuado. Em março de 2012 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal da Paraíba - Areia, concluindo em janeiro de 2017, na oportunidade recebeu prêmio de láurea acadêmica de aluno destaque de Zootecnia. Em março de 2017 ingressou na pós-graduação no nível mestrado em zootecnia, no curso de Pós-Graduação em Zootecnia, pela Universidade Federal de Viçosa-MG.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE TABELAS E FIGURAS | VI |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | VII |
| RESUMO | VIII |
| ABSTRACT | X |
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 5 |
| 2.1 Local e Delineamento Experimental..... | 5 |
| 2.2 Preparo dos inoculantes | 5 |
| 2.3 Ensilagem..... | 6 |
| 2.4 Amostragem do material..... | 6 |
| 2.5 Quantificação das populações microbianas | 7 |
| 2.6 Avaliação da silagem | 7 |
| 2.7 Perfil fermentativo | 8 |
| 2.8 Estabilidade aeróbia | 8 |
| 2.9 Análises estatísticas | 8 |
| RESULTADOS | 10 |
| 3.1 Caracterização dos isolados, composição química e população microbianas dos tratamentos antes da ensilagem..... | 10 |
| 3.2 Composição química e populações microbianas de silagens de cana de açúcar após 90 dias de ensilagem. | 11 |
| 3.3 Composição química, populações microbianas e estabilidade aeróbia de silagens de cana- de-açúcar, após 7 dias de exposição ao ar. | 12 |
| DISCUSSÃO..... | 14 |
| 4.1 Composição química das silagens de cana-de-açúcar após 90 dias de fermentação | 14 |
| 4.2 pH, N-NH ₃ e Populações Microbianas das silagens de cana-de-açúcar após 90 dias de fermentação..... | 14 |
| 4.3 Composição química, populações microbianas e estabilidade aeróbia de silagens de cana de açúcar após 7 dias de exposição ao ar..... | 16 |
| CONCLUSÃO..... | 18 |
| REFERÊNCIAS | 19 |

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Caracterização dos isolados de silagens de cana-de-açúcar quanto ao pH, produção de ácidos orgânicos e etanol (mmol/l)..... | 10 |
| Tabela 2 - Composição química (g kg ⁻¹) e população microbiana (log UFCg ⁻¹) da cana-de-açúcar..... | 10 |
| Tabela 3 - Composição química (gkg ⁻¹) de silagens de cana-de-açúcar tratadas com cepas selvagens de bactérias lácticas. | 11 |
| Tabela 4 – pH, N-NH ₃ e populações microbianas de silagens de cana-de-açúcar tratadas com cepas autóctones de bactérias lácticas UFCgsilagem ⁻¹ | 12 |
| Tabela 5 – Teores de matéria seca (gkg ⁻¹), carboidratos solúveis (gkg ⁻¹), pH e populações microbianas (UFC grama de silagem ⁻¹) na estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar. | 13 |
| Tabela 6 - Estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar após 7 dias de exposição ao ar. | 13 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- BAL, bactéria ácido láctica
- LEV, leveduras
- FUN, fungos filamentosos
- FDA, fibra insolúvel em detergente ácido
- FDNcp, fibra insolúvel e detergente neutro corrigida para cinzas e proteína
- MM, matéria mineral
- CHOs, carboidratos solúveis
- MS, matéria seca
- N-NH₃NT MS, nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total com base na matéria seca
- NIDA, nitrogênio insolúvel em detergente ácido
- PB, proteína bruta
- UFC, unidades formadoras de colônias

RESUMO

SANTOS, Vinicius da Silva, M.Sc, Universidade federal de Viçosa, fevereiro de 2019.

Perfil fermentativo e estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar inoculadas com cepas autóctones de bactérias lácticas heterofermentativas. Orientador: Odilon Gomes Pereira. Coorientador (a): Karina Guimarães Ribeiro

Objetivou-se avaliar os efeitos da aplicação de cepas selvagens de bactérias lácticas heterofermentativas sobre população microbiana, composição química, perfil fermentativo e estabilidade aeróbia após 90 dias fermentação. Foram avaliados os seguintes tratamentos: T1: Controle (sem inoculante), T2: Inoculante comercial LalSil Cana (*Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand); T3: *Lactobacillus buchneri* 50.4; T4: *Leuconostoc* 7.10; T5: *Leuconostoc* 7.19; T6: *Lactobacillus buchneri* 50.4 + *Leuconostoc* 7.10, T7: *Lactobacillus buchneri* 50.4 + *Leuconostoc* 7.19. As cepas utilizadas nos tratamentos T3 a T7, pertencem ao banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da Silagem do Departamento de Zootecnia UFV. A taxa de inoculação utilizada foi de 1×10^{-6} UFCg⁻¹ de matéria natural. Após aplicação dos inoculantes, o material foi ensilado em baldes de 12 litros de capacidade. A estabilidade aeróbia foi avaliada com o auxílio de data loggers inseridos no centro geométrico de uma massa de 2kg de silagem armazenada em baldes e expostas ao ar por sete dias em ambiente com temperatura controlada (25°C). As análises de perfil fermentativo e populações microbianas, foram realizadas em amostras colhidas após 90 dias de fermentação e após sete dias de exposição ao ar, sendo avaliadas a populações de bactérias lácticas, fungos, leveduras e enterobactérias, bem como o pH. Em todas as amostras foram realizadas avaliações dos teores de matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente neutro, carboidratos solúveis e amônia. Os dados foram analisados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com sete tratamentos e quatro repetições. Foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade na comparação das médias. Houve efeito (P<0,05) de inoculantes sobre os teores de MS, FDNcp e FDA das silagens. Por outro lado, não foi observado efeito (P>0,05) de inoculantes sobre os teores de PB, CHOs, NIDA e MM. Para a MS, foi observado maior valor na silagem Leuc 1 comparada a controle. Foi observado menor valor de FDNcp e FDA na silagem com Lb 50.4 + Leuc 1, em relação à controle. Foi observado menor pH (P<0,05) na silagem Leuc 2 em comparação às silagens controle, Lb 50.4, Lb 50.4 + Leuc 1. Foi observado menor (P<0,05) população de BAL na silagem Leuc 2 (5,86 UFC gsilagem⁻¹) comparada a silagem Leuc 1 e controle. Maiores contagens de fungos (4,46 UFC gsilagem⁻¹) e leveduras (4,37 UFC gsilagem⁻¹) foram observadas para as silagens controle comparada às silagens Lb 50.4 (exceto para fungos), Leuc

1 e os combos. Não houve efeito ($P>0,05$) de tratamentos sobre o teor de MS e o pH das silagens após 7 dias de exposição ao ar. No entanto, foi observado efeito ($P<0,05$) de tratamentos sobre as populações de leveduras e fungos. No entanto, foi observado efeito ($P<0,05$) de tratamentos sobre a estabilidade aeróbia e o tempo até atingir a temperatura máxima. Foi observada maior estabilidade aeróbia na silagem Lb 50.4 + Leuc 1 em relação às silagens controle e Leuc 1 e Leuc 2. A silagem tratada com o combo Lb 50.4 + Leuc 1 também foi a que demandou maior número de horas para atingir a temperatura máxima quando comparada Leuc 2. O Combo Lb 50.4 + Leuc 1, reduziu a população de fungos e leveduras e melhorou o processo fermentativo da silagem de cana de açúcar após 90 dias de fermentação, e proporcionou maior estabilidade, podendo ser considerado como potencial inoculante para ensilagem desta cultura.

Palavras chaves: ácido lático, carboidratos solúveis, isolados, leveduras, etanol

ABSTRACT

SANTOS, Vinicius da Silva, M.Sc, Universidade federal de Viçosa, february, 2019. **Profile fermentative and aerobic stability of sugarcane silages inoculated with wild strains of heterofermentative lactic acid bacteria** Adviser: Odilon Gomes Pereira. Co-Advisers: Karina Guimarães Ribeiro.

The objective was to evaluate the species of wild strains of heterofermentative lactic species such as microbial, chemical composition, fermentative profile and aerobic stability after 90 days of fermentation. The following treatments were considered: T1: Control (without inoculant), T2: Commercial inoculant LalSil Cana (*Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand), T3: *Lactobacillus buchneri* 50.4, T4: *Leuconostoc* 7.10, T5: *Leuconostoc* 7.19, T6: *Lactobacillus buchneri* 50.4 + *Leuconostoc* 7.10, T7: *Lactobacillus buchneri* 50.4 + *Leuconostoc* 7.19. As strains used in treatments T3 to T7, belonging to the microorganism bank of the Laboratory of Microbiology of Silage of the Department of Animal Science of the UFV. Inoculation rate used was 1×10^{-6} UFC / g forage. After application of the inoculants, the material was ensiled in buckets of 12 liters capacity. The aerobic stability was evaluated with the aid of data loggers inserted in the geometric center of a mass of 2 kg of silage stored in pails and exposed to air at room temperature (25°C). Fermentation and expansion microcatchers were evaluated in samples harvested after 90 days of fermentation and after seven days of exposure to air, being evaluated by a set of variable phases, fungi, yeasts and enterobacteria, as well as pH. The dry matter, crude protein, neutral detergent fiber, soluble carbohydrate and ammonia contents were evaluated in all samples. Data were excluded in a completely randomized design, with seven treatments and four replications. The Tukey test was used at 5% of one possibility in the media. There was an effect ($P < 0.05$) of inoculants on the contents of DM, NDF and ADF of the silages. On the other hand, no effect ($P > 0.05$) of inoculants was observed on the levels of CP, WSC, NIDA and MM. For DM, higher values were observed in Leuc 1 silage compared to control. It was observed lower value of NDF and ADF in the silage Lb 50.4 + Leuc 1, in relation to the control. Leuc 2 silage was observed lower in the Leuc 2 silage compared to the control silages, Lb 50.4, Lb 50.4 + Leuc 1. A lower ($P < 0.05$) BAL population was observed in Leuc 2 silage (5, 86 UFCg silage⁻¹) compared to Leuc 1 silage and control. Higher counts of fungi (moulds) (4.46 CFU silage⁻¹) and yeasts (4.37 CFU silage⁻¹) were observed for the control silages compared to silages Lb 50.4 (except for fungi), Leuc 1 and combos. There was no effect ($P > 0.05$) of treatments on the DM content and the pH of the silages after 7 days of

exposure to air. However, treatments ($P < 0.05$) on yeast and fungal populations were observed. However, treatments ($P < 0.05$) on aerobic stability and time to peak temperature were observed. Greater aerobic stability was observed in the silage Lb 50.4 + Leuc 1 in relation to the control and Leuc 1 and Leuc 2 silages. The silage treated with the combo Lb 50.4 + Leuc 1 was also the one that demanded the greatest number of hours to reach the maximum temperature when compared to Leuc 2, the Combo Lb 50.4 + Leuc 1 provided a reduction in the fungi and yeast populations and, after 90 days of fermentation, promoted better aerobic stability, presenting improvements in the fermentation process of sugarcane silage.

Keywords: ethanol, insolates, lactic acid, soluble carbohydrates, yeast

INTRODUÇÃO

Dentre as forrageiras mais utilizadas no processo de conservação na forma de silagem destacam-se gramíneas como o milho, sorgo e cana-de-açúcar. O interesse da ensilagem de cana-de-açúcar, pelos produtores deve-se principalmente à sua elevada produtividade, com produções de 80-120t de matéria verde por ano (Nussio et al., 2003)

A cana-de-açúcar é tradicionalmente utilizada na forma *in natura* desintegrada, sendo fornecida diariamente para os animais, no período de escassez de alimentos. Porém, em escala de alta produção, a logística operacional com colheita diária torna-se grande entrave para o setor, devido a necessidade de mão-de-obra diária para a realização de cortes, picagem e transporte. Assim, a possibilidade de conservação deste material na forma de silagem, permitiria uma melhor logística para a utilização, além de oferecer flexibilidade quanto ao período de utilização da mesma (Reis et al., 2013).

Além dos fatores supracitados que justifiquem a utilização da cana em variados sistemas de produção, outros fatores que são considerados importantes para produção de silagens de boa qualidade, podem ser observados na cana de açúcar, como por exemplo, o teor adequado de matéria seca (MS) (próximo a 30%), carboidratos solúveis (superior a 23%) e população de bactérias láticas ($> 1 \times 10^6$ UFC/g de forragem) que garantem o rápido declínio do pH a valores próximos de 4,0 até dois dias de fermentação (Pedroso et al 2005).

Entretanto, apesar da cana-de-açúcar apresentar algumas condições favoráveis a utilização como forragem, podendo também ser ensilada, o seu alto teor de carboidratos solúveis em água e a elevada população de leveduras epifíticas (em torno de 1×10^6 UFC/g de forragem), levam a fermentação alcoólica e perdas no seu valor nutritivo, com aumento nos teores de componentes fibrosos nas silagens, perdas essas que podem ser superiores a 60% no processo de ensilagem (Daniel, et al., 2015)

De acordo com Woolford (1990), quando a contagem de leveduras aumenta para mais de $5,00 \log \text{ UFCg}^{-1}$, a silagem torna-se propensa à deterioração aeróbia, principalmente quando as espécies de leveduras que usam lactato estão em maior número. Estas leveduras possuem a capacidade de metabolizar o ácido láctico, que é o principal ácido e de maior quantidade presente no meio além de outros substratos remanescentes da fermentação. Este fato está associado ao aumento do pH da silagem, pela redução da concentração de ácidos no meio (Borreani; Tabacco, 2010).

Devido as perdas decorrentes do processo fermentativo e após abertura da silagem, os inoculantes microbianos tornaram-se os principais aditivos utilizados na silagem, tendo a sua utilização sido difundida na maior parte do mundo. Os inoculantes contendo BAL segundo Reis et al. (2017) são classificados em três grupos de acordo com o metabolismo de carboidratos: homofermentativo obrigatório, heterofermentativo obrigatório e heterofermentativo facultativo. O primeiro grupo metaboliza hexoses pela via da glicólise, produzindo apenas ácido láctico. O segundo grupo metaboliza hexoses e pentoses pela via da fosfocetolase e forma lactato e etanol ou acetato. O terceiro grupo metaboliza hexoses via glicólise e pentoses através da via da fosfocetolase.

Com relação aos aditivos microbianos, são utilizadas cepas de bactérias lácticas objetivando favorecer a fermentação láctica no início ou pensando em otimizar a conservação desse material após abertura. Destas cepas podemos destacar dois grupos principais, as homofermentativas e as heterofermentativas. Este último, apesar de apresentar menor recuperação de MS quando comparado ao primeiro, devido produzir além do ácido láctico também o ácido acético, pode se constituir em potencial inibidor de fermentações indesejáveis na fase de exposição ao ar. (McDonald et al., 1991)

De acordo com Warth, (1977) ocorre uma perda na eficiência celular de leveduras na presença de ácidos inibidores como o acético e propiônico, devido a necessidade de excreção desses ácidos após serem assimilados para o interior da membrana plasmática. Este comportamento também foi observado por Moon et al., (1983) que estudando o efeito da concentração do ácido acético, láctico propiônico e suas misturas, sobre o crescimento de leveduras ácido tolerantes observou redução na taxa de crescimento em função da utilização do ácido acético. Além do ácido acético, outros ácidos e/ou metabólitos também podem atuar de forma similar inibindo atuação de leveduras, como o ácido propiônico considerado mais forte que o acético na inibição desses microrganismos (Freese et al., 1973)

A adição de diferentes cepas de microrganismos pode ter um foco específico na estabilidade aeróbia, como o caso do *Lactobacillus buchneri* que apresenta uma rota metabólica para degradar o ácido láctico em condições ácidas e anaeróbias, onde aproximadamente 1 mol de ácido láctico pode ser convertido à ácido acético, 1,2propanodiol e traços de etanol (Oude Elferink et al., 2001). Tal fato foi observado por Nishino et al., (2003) que avaliando a adição de *Lactobacillus buchneri* em silagens de milho, observaram presença de 1,2 propanodiol apenas nas silagens inoculadas, bem como maiores concentrações de ácido acético aos 60 e 120 dias de fermentação para as silagens inoculadas em relação à controle.

O processo de conservação na forma de silagem é um ambiente complexo onde diferentes grupos microbianos atuam, de forma simultânea ou não, e os diferentes produtos formados podem apresentar efeito inibitório ou benéfico para utilização de outros grupos microbianos. Muck, (2018) em sua revisão relata a importância da utilização de combos de inoculantes microbianos que atuam em diferentes etapas do processo fermentativo, proporcionando melhorias inclusive na estabilidade aeróbia.

De acordo com Adesogan et al. (2003) *Leuconostoc spp.* são microrganismos importantes na fase inicial de fermentação, sendo consideravelmente menos acidófilos que outros microrganismos como por exemplo o *L. buchneri* que atua principalmente na fase anaeróbia terminal do processo fermentativo, tolerando um pH mais ácido. Portanto, a interação entre microrganismos atuando em diferentes etapas do processo pode auxiliar no processo de conservação, inibindo possíveis fermentações indesejáveis.

Kang et al. (2009) avaliaram a combinação de inoculantes contendo *Lactobacillus buchneri* e *Lactobacillus casei* observaram melhoria na estabilidade aeróbia para uma das cultivares de milho avaliadas. Segundo Muck (2008) as falhas na utilização de combos de inoculantes à base de *Lactobacillus buchneri* podem ser atribuídas a aplicação de cepas de atividade similar à população natural existente na forragem ou falhas em dominar os estágios posteriores da fermentação. A aplicação de cepas isoladas da própria cultura pode ser uma forma de se obter sucesso, devido reduzir os efeitos restritivos da população de bactérias ao inoculante.

Desta forma, estudos têm sido realizados na busca por aditivos que inibam a fermentação alcoólica e reduzam as perdas durante o período de ensilagem, com destaque para os aditivos microbiológicos. Alguns estudos têm relatado resultados positivos com cepas isoladas em ambiente tropical, indicando especificidade entre ambiente e cultura (Carvalho et al., 2014; Ávila et al., 2014). Ávila et al., (2009) isolaram cepas de *Lactobacillus. buchneri* em cana-de-açúcar e verificaram que a adição da cepa *Lactobacillus buchneri* UFLA SIL 72 reduziu a população de fungos e a concentração de etanol nas silagens.

Silva et al, (2017), Daniel et al., (2015) e Pedroso et al. (2008) em estudos com silagens de cana-de-açúcar, observaram menor população de leveduras e redução em torno de 50% na produção de etanol para as silagens tratadas com *L. buchneri*.

Carvalho et al., (2014) avaliaram a estabilidade aeróbia da cana-de-açúcar inoculada com sete cepas de *L. plantarum* e duas cepas de *L. hilgardii* isoladas de silagem de cana-de-açúcar. As cepas de *L. hilgardii* UFLA SIL51 e UFLA SIL52 estavam mais relacionadas à

estabilidade aeróbia do que as outras cepas de *L. brevis* (heterofermentativas obrigatórias) e produziram maiores concentrações de 1,2-propanodiol e ácido acético. As silagens tratadas com as cepas de *L. plantarum* UFLA SIL41, *L. brevis* UFLA SIL33, UFLA SIL25 e UFLA SIL27, e *L. hilgardii* UFLA SIL51 e UFLA SIL52 apresentaram populações de leveduras inferiores a $5 \log \text{UFCg}^{-1}$ na abertura dos silos, e após a exposição aeróbia as silagens diferiram em relação à redução da população de leveduras e aumento da temperatura, sendo as cepas de *L. hilgardii* as que apresentaram as melhores estabilidades aeróbia, fato relacionado pelos autores aos maiores teores de ácido acético e 1,2-propanodiol.

A maior parte dos estudos realizados com combinações de inoculantes, envolvem cepas de inoculantes de outras culturas, a utilização de cepas heterofermentativas isoladas da própria cana-de-açúcar em combinação ao *Lactobacillus buchneri* pode além de auxiliar no aumento da concentração de potenciais ácidos inibidores, minimizar os efeitos de competição com a microbiota autóctone na silagem.

Com base nessas informações, a hipótese do presente trabalho é de que cepas de bactérias heterofermentativas isoladas de silagens produzidas em condições tropicais, favorecem a estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar. Portanto, objetivou-se avaliar o efeito da aplicação de cepas selvagens de bactérias lácticas heterofermentativas sobre as populações microbianas, composição química, perfil fermentativo, recuperação de matéria seca e estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e Delineamento Experimental

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no município de Viçosa-MG, situada a 20° e 45' de latitude sul, 42° e 52' de longitude oeste e 648 m de altitude.

A ensilagem foi realizada nas dependências da unidade de ensino pesquisa e extensão em gado de corte e as análises foram realizadas no laboratório de forragicultura e laboratório de nutrição animal da UFV.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos (inoculantes) e quatro repetições. Os inoculantes avaliados foram: *Leuconostoc mesenteroides* 7.10t1 e *Leuconostoc mesenteroides* 7.19t3, *Lactobacillus buchneri* (Lb) 50.4 e o inoculante comercial LalSil Cana (*Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand, Goiás). Os isolados 7.10t1 e 7.19t3 foram isolados de silagens de cana e o Lb 50.4 de silagem de sorgo em estudos prévios, e, todos pertencem ao banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da Silagem do DZO, UFV. Os tratamentos foram: Tratamento 1 - Controle (sem inoculante); Tratamento 2 - inoculante comercial LalSil Cana; Tratamento 3 - Lb 50.4 - (*Lactobacillus buchneri* 50.4); Tratamento 4 - Leuc 1 (*Leuconostoc mesenteroides* 7.10t1); Tratamento 5 - Leuc 2 - (*Leuconostoc mesenteroides* 7.19t3); Tratamento 6 - Combo 1 (Lb 50.4 + Leuc 1); Tratamento 7 - Combo 2 (Lb 50.4 + Leuc 2)

2.2 Preparo dos inoculantes

O preparo dos inoculantes a princípio foi composto pela realização de duas ativações prévias antes do cultivo final, os microrganismos utilizados foram provenientes do banco de dados do laboratório de microbiologia da silagem - UFV foram retirados do estoque do ultrafreezer (-80°C), cuidadosamente descongelados na presença de gelo, e ativados inicialmente em 3ml de caldo MRS broth esterilizado (121°C 15 minutos) por 24 horas e, posteriormente, foram cultivados em uma maior quantidade de caldo MRS a uma curva de crescimento de 16 horas, afim de se obter quantidade suficiente para extração de 1% do inóculo para cultivo final. A determinação da quantidade de caldo utilizada no cultivo final, foi baseada no plaqueamento prévio do inóculo após a segunda ativação, considerando dessa forma o número de células presente após a curva de crescimento de 16 horas. Após a ativação final, o total do inóculo foi acondicionado em tubos de falcon e centrifugados por 6000g x 10min, sendo

o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 70ml de água destilada. e calculados para atingir o número de células desejado de $1,0 \times 10^6$ UFCg⁻¹ de matéria natural.

2.3 Ensilagem

A cana-de-açúcar foi colhida manualmente com idade de 12 meses e picada em um tamanho médio de partícula de 2 cm usando uma máquina colhedora de forragem JF-92 Z10 (JF Maquinário da agricultura, SP, Brasil) devidamente regulada. Após a picagem foram formadas 28 pilhas de 10 kg do material para aplicação imediata dos inoculantes a uma taxa de $1,0 \times 10^6$ unidades formadores de colônias (UFC) por g de forragem fresca.

Os inoculantes foram diluídos em 70 ml de água destilada, utilizando-se um aspersor de 500 ml de capacidade para aplicação. Para o tratamento controle foi aplicado a mesma quantidade de água usada nos tratamentos com inoculante.

O material foi ensilado em 28 baldes com capacidade de 12 litros com uma densidade média de 650kg/dm³. Os pesos dos baldes foram registrados para ajuste da densidade.

Avaliações foram realizadas no período de abertura após 90 dias de ensilagem e após sete dias de exposição do material ao ar para avaliação da estabilidade aeróbia.

2.4 Amostragem do material

Foram retiradas amostras de cada pilha para caracterização do material antes da ensilagem e após 90 dias na abertura dos silos experimentais. Parte do material foi destinado à realização da pré-secagem, em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas. Após a secagem, as amostras foram moídas em moinho tipo Wiley com peneira de malha 1 mm para avaliação da composição química e determinação de MS segundo Detmann et al. (2012).

Para a preparação do extrato aquoso, foram pesadas 25g às quais foram adicionadas 225 ml de solução estéril (Ring Solution®, Oxoid, England, Hampshire), sendo processado e homogeneizado com auxílio de um liquidificador industrial, por 1 minuto, e, posteriormente, filtrado em gaze. Este extrato foi dividido em duas porções, a primeira, utilizada para as análises microbiológicas e para avaliações da concentração de ácidos orgânicos (lático, acético, propiônico, butírico, além da concentração de etanol e 1,2 propanodiol), pH e amônia.

Na abertura dos baldes após 90 dias de fermentação, foi efetuada a pesagem dos baldes, e a homogeneização material, em seguida foi retirada uma amostra de 0,25kg de cada balde para pré secagem, e uma subamostra de 25 gramas de diferentes locais foram retiradas para

preparo do extrato aquoso como descrito anteriormente. Outra amostra (0,25 kg) foi retirada para congelamento (-20°C) e foram coletadas amostras de cada balde (2,0 kg) para avaliação da estabilidade aeróbia durante o período de sete dias.

2.5 Quantificação das populações microbianas

A partir do extrato aquoso foram realizadas uma serie de diluições de 10^{-1} até 10^{-6} tubos de falcon estéril. As contagens de microrganismos foram desenvolvidas em unicata de cada repetição, constando assim 4 médias por tratamento, usando plaqueamento em Pour Plate em meio de cultura MRS ágar (De Man, Rogosa and Sharpe Oxoid CM361, Oxoid Ltd.) para bactéria ácido láctica (48h de incubação à 37° C), BDA (Batata Dextrose Ágar® com 1,5% de ácido tartárico 10% (pH 3,5%) para leveduras e fungos (120h de incubação a 24°C). As diluições foram ajustadas de acordo com as observações de aberturas anteriores e tendência de contagem para cada microrganismo. A contagem foi realizada nas placas considerando entre 25 e 250 unidades formadoras de colônia.

Após pesagem dos baldes, o material foi homogeneizado em sacos plásticos, em seguida uma amostra (0,25 kg) foi retirada de cada balde para pré secagem, e uma subamostra de 25 gramas de diferentes locais foram retiradas para análise microbiológica, como descrito anteriormente. Outra amostra (0,25 kg) foi retirada para congelamento (-20°C) e, apenas 2 kg do material homogeneizado voltou para o balde para determinação da estabilidade aeróbia do material.

2.6 Avaliação da silagem

Após a abertura dos silos, foram avaliados: composição química, perfil fermentativo, contagens de microrganismos (fungos, leveduras, bactérias lácticas e enterobactérias). Aos 90 dias de fermentação foi realizado avaliação de estabilidade aeróbia de modo que a silagem após aberta foi alocada em sacos plásticos, homogeneizadas e foi pesado 2 kg de material das repetições de cada tratamento e retornado ao balde para monitoramento da temperatura em ambiente controlado com temperatura fixa de 25°C. A temperatura dos silos foi monitorada utilizando data loggers com capacidade para verificação de mudanças de temperatura de até 0,5°C, a temperatura foi mensurada automaticamente a cada 10 minutos durante 7 dias de avaliação. Como parâmetro para perda de estabilidade aeróbia foi considerado o parâmetro mínimo de 2°C em cada silo superior a temperatura ambiente. Também foram utilizados dois

data loggers para medição da temperatura ambiente. Foram determinados os teores de matéria seca, ácidos orgânicos e carboidratos solúveis.

Os teores de matéria seca (MS) foram determinados pelo método 934,01 como descrito pela AOAC (1990). Enquanto que os teores de proteína bruta (PB), nitrogênio amoniacal N-NH₃) e fibra indigestível em detergente neutro corrigida para cinza e proteína (FDN_{cp}) foram realizados conforme método descrito por Detmann et al., (2012).

2.7 Perfil fermentativo

A partir do extrato aquoso, foram tomadas amostras de 20 ml e transferidas para tubos de vidro adicionadas de três gotas de ácido sulfúrico 1:1 e congeladas à -20°C para análises de ácidos orgânicos, nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e carboidratos solúveis.

Os ácidos orgânicos foram determinados utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC; SPD-10 AVP, Shimadzu, OR, USA) conforme Siegrifield et al., (1984), a concentração de nitrogênio amoniacal foi avaliada segundo a metodologia de Chaney e Marbach (1962) descrita por Detmann (2012) e a concentração de carboidratos solúveis foi determinada utilizando um espectrofotômetro de acordo com a metodologia descrita por Nelson (1944).

2.8 Estabilidade aeróbia

Amostras de 2 kg do material foram retiradas após homogeneização das silagens dos respectivos tratamentos e colocados no mesmo balde. As temperaturas dos silos foram obtidas com o auxílio de data loggers que foram colocados no interior, centro geométrico da massa de cada um dos baldes de seus respectivos tratamentos e dois baldes vazios para registro da temperatura ambiente, sendo mantidos por sete dias em sala de ambiente controlado (25°C). A estabilidade aeróbia foi definida como o período (h) em que a silagem permaneceu estável antes de atingir ou ultrapassar 2°C em relação a temperatura ambiente.

2.9 Análises estatísticas

Os dados referentes a pH, nitrogênio amoniacal, populações microbianas, estabilidade aeróbia e composição química das silagens após 90 dias de fermentação e estabilidade foram

analisados por intermédio do procedimento MIXED do SAS (versão 9.1). Os dados foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado com sete tratamentos e quatro repetições. Os resultados referentes a contagem dos microrganismos foram convertidos para a base logarítmica (\log_{10} UFC). Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey-Kramer pelo LSMEANS statement ($\alpha = 0,05$). Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos utilizando 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

RESULTADOS

3.1 Caracterização dos isolados, composição química e população microbianas dos tratamentos antes da ensilagem

A caracterização dos isolados de silagens de cana-de-açúcar utilizados no experimento podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização dos isolados de silagens de cana-de-açúcar quanto ao pH, produção de ácidos orgânicos e etanol (mmol/l).

| Estirpe | Itens ¹ | | | | |
|--|--------------------|-------|-------|--------|--------|
| | AA | AL | AP | Etanol | pH/48h |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 7.19t3 | 20,563 | 0,463 | 0,864 | 1,053 | 3,91 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>dextranicum</i> 7.10T1 | 20,132 | 0,229 | 0,276 | - | 3,88 |

¹AA = Ácido acético; AL = Ácido láctico; AP = Ácido Propiônico

A composição química da cana-de-açúcar nos diferentes tratamentos antes da ensilagem é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição química (g kg⁻¹) e população microbiana (log UFCg⁻¹) da cana-de-açúcar.

| Itens | Tratamentos ¹ | | | | | | |
|--------|--------------------------|-------------|---------|--------|--------|-----------------|------------------|
| | Controle | LalSil cana | Lb 50.4 | Leuc 1 | Leuc 2 | Lb 50.4 +Leuc 1 | Lb 50.4 + Leuc 2 |
| MS | 215,0 | 211,2 | 212,7 | 212,9 | 208,8 | 206,3 | 206,4 |
| PB | 32,9 | 25,59 | 26,03 | 24,42 | 34,64 | 33,35 | 27,58 |
| CHOs | 450,4 | 414,5 | 408,0 | 370,6 | 401,8 | 433,6 | 425,3 |
| FDNcp | 555,2 | 538,1 | 567,3 | 511,2 | 556,3 | 520,9 | 569,1 |
| FDA | 332,9 | 300,7 | 310,7 | 284,2 | 322,8 | 302,00 | 301,6 |
| NIDA%N | 216,14 | 225,99 | 252,55 | 210,70 | 182,26 | 159,35 | 273,44 |
| MM | 45,8 | 45,8 | 48,8 | 45,4 | 42,7 | 51,5 | 49,4 |
| pH | 5,75 | 5,75 | 5,91 | 5,9 | 5,88 | 5,9 | 5,84 |
| ENT | 6,12 | 6,13 | 6,22 | 5,32 | 5,26 | 5,33 | 5,52 |
| BAL | 5,40 | 6,15 | 7,22 | 7,00 | 7,27 | 7,07 | 7,09 |
| FUN | 4,60 | 4,66 | 4,63 | 4,96 | 4,88 | 5,06 | 5,03 |
| LEV | 5,53 | 5,75 | 5,63 | 5,35 | 5,46 | 5,63 | 5,59 |

¹MS = Matéria seca; PB = Proteína bruta; NIDA = Nitrogênio insolúvel em detergente ácido; FDNcp = Fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; FDA= Fibra insolúvel em detergente ácido; CHOs = carboidratos solúveis; MM = Matéria mineral; ENT = população de enterobactérias UFCg⁻¹ BAL = população de bactérias lácticas UFCg⁻¹; FUN = população de fungos UFCg⁻¹; LEV = população de leveduras UFCg⁻¹.

3.2 Composição química e populações microbianas de silagens de cana de açúcar após 90 dias de ensilagem.

Houve efeito ($P < 0,05$) de inoculantes sobre os teores de MS, FDNcp e FDA das silagens. Por outro lado, não foi observado efeito ($P > 0,05$) de inoculantes sobre os teores de PB, CHOs, NIDA e MM (Tabela 3). Para a MS, foi observado maior valor na silagem Leuc 1 em relação a controle. Foi observado menor valor de FDNcp e FDA na silagem Lb 50.4 + Leuc 1, comparada a controle.

Tabela 3 - Composição química (gkg^{-1}) de silagens de cana-de-açúcar tratadas com cepas selvagens de bactérias lácticas.

| Itens ¹ | Tratamentos | | | | | | | EPM | P-valor |
|--------------------|-------------|----------------|----------|---------|---------|-----------------------|-----------------------|-------|---------|
| | Controle | Lalsil Cana | Lb 50.4 | Leuc 1 | Leuc 2 | Lb 50.4+ Leuc 1 | Lb 50.4+ Leuc 2 | | |
| MS | 186,1b | 196,6ab | 211,6ab | 226,1a | 200,8ab | 217,3ab | 212ab | 0,809 | 0,0366 |
| PB | 39,2 | 34,5 | 35,5 | 38,2 | 37,9 | 37,2 | 38,3 | 0,2 | 0,6562 |
| CHOs | 33,1 | 26,97 | 26,17 | 23,92 | 10,65 | 22,35 | 24,72 | 0,479 | 0,8171 |
| FDNcp | 631,2a | 597,9ab | 607,2ab | 589,9ab | 585,8ab | 580,3b | 606,9ab | 1,044 | 0,0501 |
| FDA | 373,9a | 348,55ab | 358,35ab | 344,2ab | 346,6ab | 330,72b | 349,2ab | 0,744 | 0,0218 |
| NIDA%N | 10,75 | 11,28 | 15,93 | 10,55 | 10,22 | 11,55 | 12,76 | 1,534 | 0,1818 |
| MM | 57,3 | 51,95 | 50,75 | 50,2 | 48,22 | 50,2 | 50,95 | 0,318 | 0,5792 |

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pela Diferença de mínimos quadrados predita ao nível de 5% de probabilidade.

¹MS = Matéria seca; PB = Proteína bruta; NIDA = Nitrogênio insolúvel em detergente ácido; FDNcp = Fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; FDA= Fibra insolúvel em detergente ácido; CHOs = carboidratos solúveis; MM = Matéria mineral.

As características fermentativas e as populações microbianas das silagens são apresentadas na Tabela 4. Foi observado menor pH ($P < 0,05$) na silagem Leuc 2 em comparação às silagens controle, Lb 50.4, Lb 50.4 + Leuc 1. A maior concentração de $\text{N-NH}_3\% \text{N}_{\text{total}}$ foi observada na silagem LalSil Cana quando comparada às silagens Leuc 1 e Lb 50.4 + Leuc 1.

Tabela 4 – pH, N-NH₃ e populações microbianas de silagens de cana-de-açúcar tratadas com cepas autóctones de bactérias lácticas UFCgsilagem⁻¹.

| Itens ¹ | Tratamentos | | | | | | | EPM | P-valor |
|---------------------------|-------------|-------------|---------|--------|--------|---------------------|---------------------|-------|---------|
| | Controle | Lalsil Cana | Lb 50.4 | Leuc 1 | Leuc 2 | Lb 50.4 + Leuc 1 | Lb 50.4 + Leuc 1 | | |
| pH | 3,43a | 3,30bc | 3,46a | 3,4ab | 3,16d | 3,47a | 3,24cd | 0,023 | 0,0001 |
| N-NH ₃ %Ntotal | 2,45ab | 2,81a | 2,02ab | 1,83b | 2,19ab | 1,86b | 1,98ab | 0,189 | 0,0144 |
| BAL | 8,15a | 7,04ab | 8,13a | 6,51ab | 5,86b | 6,92ab | 6,58ab | 0,417 | 0,0068 |
| FUN | 4,46a | 3,35ab | 2,83b | 3,00b | 3,44ab | 2,78b | 2,98b | 0,257 | 0,0011 |
| LEV | 4,37d | 3,45ab | 3,33ab | 3,23b | 3,82ab | 2,98b | 3,21b | 0,235 | 0,0085 |

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pela Diferença de mínimos quadrados predita ao nível de 5% de probabilidade.

¹BAL = bactérias lácticas; FUN = Fungos filamentosos; LEV = Leveduras

Foi observado menor ($P < 0,05$) população de BAL na silagem Leuc 2 (5,86 UFC gsilagem⁻¹) comparada a silagem LB 50.4 e controle (Tabela 4). Maiores contagens de fungos (4,46 UFC gsilagem⁻¹) e leveduras (4,37 UFC gsilagem⁻¹) foram observadas para as silagens controle comparada às silagens Lb 50.4 (exceto para fungos), Leuc 1 e os combos.

3.3 Composição química, populações microbianas e estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar, após 7 dias de exposição ao ar.

Não houve efeito ($P > 0,05$) de tratamentos sobre o teor de MS das silagens após 7 dias de exposição ao ar. Foi observado maior teor de carboidratos solúveis em água na silagem Lb 50.4 + Leuc 1 em relação à maioria das silagens excetuando-se Lb 50.4 e Lb 50.4 + Leuc 2 (Tabela 5). O pH das silagens não variou ($P > 0,05$) após setes dias de exposição aeróbia, cujo valor médio foi 5,08. No entanto, foi observado efeito ($P < 0,05$) de tratamentos sobre as populações de leveduras e fungos.

Tabela 5 – Teores de matéria seca (gkg^{-1}), carboidratos solúveis (gkg^{-1}), pH e populações microbianas (UFC grama de silagem⁻¹) na estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar.

| Itens ¹ | Tratamentos | | | | | | | EPM | P-Valor |
|--------------------|-------------|-------------|---------|--------|--------|----------------|-----------------|--------|---------|
| | Controle | LalSil Cana | Lb 50.4 | Leuc 1 | Leuc 2 | Lb 50.4+Leuc 1 | Lb 50.4+ Leuc 2 | | |
| MS | 190,9 | 177,8 | 187,6 | 182,6 | 184,8 | 188,6 | 187,9 | 0,4594 | 0,4953 |
| CHOs | 14,92b | 19,2b | 43,9ab | 24,25b | 16,97b | 81,32a | 54,45ab | 0,6694 | 0,0003 |
| pH | 5,45 | 5,45 | 5,27 | 4,89 | 4,88 | 4,84 | 4,83 | 0,1850 | 0,0624 |
| LEV | 7,57ab | 7,61ab | 7,52ab | 7,57ab | 7,81a | 7,11b | 7,79a | 0,1410 | 0,0437 |
| FUN | 3,66ab | 5,10a | 5,04a | 2,93b | 2,53b | 4,10ab | 2,47b | 0,3798 | 0,0001 |

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pela Diferença de mínimos quadrados predita ao nível de 5% de probabilidade.

¹MS = Matéria seca; CHOs = Carboidratos solúveis. FUN = Fungos filamentosos; LEV = Leveduras

Não houve efeito ($P>0,05$) de tratamentos sobre a Temperatura Máxima $^{\circ}\text{C}$, cujos valores variaram de 39,4 a 44,8 $^{\circ}\text{C}$ (Tabela 6). No entanto, foi observado efeito ($P<0,05$) de tratamentos sobre a estabilidade aeróbia e o tempo até atingir a temperatura máxima. Foi observada maior estabilidade aeróbia na silagem Lb 50.4 + Leuc 1 em relação às silagens controle, Leuc 1 e Leuc 2. A silagem tratada com o combo Lb 50.4 + Leuc 1 também resultou em maior número de horas para atingir a temperatura máxima quando comparada Leuc 2.

Tabela 6 - Estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar após 7 dias de exposição ao ar.

| Itens ¹ | Tratamentos | | | | | | | EPM | P-valor |
|--|-------------|-------------|---------|---------|--------|------------------|------------------|-------|---------|
| | Controle | LalSil Cana | Lb 50.4 | Leuc 1 | Leuc 2 | Lb 50.4 + Leuc 1 | Lb 50.4 + Leuc 1 | | |
| Estabilidade aeróbia (h) | 46,2b | 38,8b | 53,2ab | 49,0b | 34,9b | 73,1a | 56,0ab | 0,023 | 0,0001 |
| Temperatura máxima $^{\circ}\text{C}$ | 39,4 | 41,4 | 40,5 | 39,1 | 44,8 | 40,3 | 1,98ab | 0,189 | 0,0144 |
| Tempo até atingir temperatura máxima (h) | 60,4bc | 62,6bc | 87,62ab | 68,83bc | 46,58c | 110,7a | 6,58ab | 0,417 | 0,0068 |

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pela Diferença de mínimos quadrados predita ao nível de 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

4.1 Composição química das silagens de cana-de-açúcar após 90 dias de fermentação

O teor médio de carboidratos solúveis da cana-de-açúcar de 414,89 gkg⁻¹ antes da ensilagem encontra-se dentro da faixa normalmente registrada para essa cultura (Silva et al., 2018; Daniel et al., 2015). O aumento nas frações fibrosas das silagens não inoculadas em comparação às silagens tratadas pode estar relacionado ao consumo de carboidratos solúveis por microrganismos indesejáveis no processo fermentativo, além da perda de constituintes não fibrosos. Tais fatores pode contribuir para o aumento dos valores de FDN_{cp} e FDA como observado por Daniel et al, (2015) e Santos et al, (2015).

O aumento no teor de FDN das silagens em relação ao material original se deve a um efeito de diluição em decorrência do consumo de carboidratos solúveis em água durante a fermentação. Segundo Ávilla et al., (2014) é comum ocorrer aumento na fração fibrosa em silagens de cana-de-açúcar devido a fermentação de açúcares e síntese de etanol pelas leveduras, podendo resultar em elevadas perdas de MS. A elevação do teor de FDN_{cp} de 555.2 gkg⁻¹ antes da ensilagem para 631,2 gkg⁻¹ após 90 dias de fermentação observada no tratamento controle demonstra que esta perda ocorreu.

4.2 pH, N-NH₃ e Populações Microbianas das silagens de cana-de-açúcar após 90 dias de fermentação

Baseado nos valores de pH das silagens após 90 dias de fermentação, que variaram de 3,16 (Leuc 1) a 3,47 (Lb 50.4 + Leuc 2) podemos considerar que as silagens foram bem fermentadas, tomando como referência a faixa ideal de pH de 3,8 a 4,2 sugerida por McDonald et al. (1991). Os valores encontrados no nosso estudo para todas as silagens são próximos aos observados por Silva et al. (2018), Moraes et al. (2017), Santos et al. (2015) e Ávilla et al. (2009). Silagens de cana-de-açúcar apresentam uma alta quantidade de carboidratos solúveis principalmente sacarose que pode ser hidrolisado prontamente a monômeros como glicose e frutose e apresentar um rápido declínio de pH através da produção de ácidos, com valor final próximo de 3,5 (Kung Jr. & Stanley, 1982).

A população de BAL de 6,74 log UFCg⁻¹ observada na cana-de-açúcar antes da ensilagem é elevada, tendo como base a população de 5 log UFCg⁻¹ considerada adequada para

assegurar boa fermentação segundo Muck (1991). Esse valor é superior aqueles registrados por Cardoso et al. (2018) e Cavali et al. (2010) e em cana-de-açúcar in natura. Nas silagens, após 90 dias de fermentação, a população média de BAL observada de 7,03 do nosso estudo assemelha-se aquelas reportadas por Ávilla et al. (2014) e Ávilla et al (2009) em estudos com silagens de cana-de-açúcar. Os elevados valores na população final de BAL nas silagens podem indicar uma extensão da fermentação, sendo que mesmo após 90 dias de ensilagem a população observada foi superior a 7,00 log UFCg⁻¹, o que pode indicar a presença de cepas de BAL mais tolerantes ao ambiente ácido. Algumas cepas de BAL heterofermentativas podem até mesmo produzir mais ácido acético que o principal produto da fermentação o ácido láctico como as cepas usadas no nosso estudo (Tabela 1).

Populações médias de 4,83 e 5,56 log UFCg⁻¹ registradas para fungos e leveduras, respectivamente, na cana-de-açúcar antes da ensilagem, tem sido normalmente registrado para essa cultura (Silva et al., 2018; Moraes et al., 2017; Santos et al., 2015). Menores populações desses grupos microbianos após 90 dias de fermentação nas silagens Lb 50.4 (exceto para leveduras), Leuc 1 e nos combos, comparadas às silagens controle e LalSil cana sugerem maior capacidade de controle desses microrganismos o que poderia resultar em maior estabilidade aeróbia das silagens após exposição ao ar. Contudo, essa hipótese parece não se aplicar ao nosso estudo, conforme será discutido depois.

As populações de leveduras registradas no nosso estudo são inferiores aquelas reportadas por Ávila et al. (2010) de 7,17 e 6,57 log UFCg⁻¹ para silagens controle e tratadas com a cepa de *L. plantarum* UFLA-1-SIL. Os autores reportaram que essas populações elevadas de leveduras se devem à baixa concentração de ácido acético dessas silagens quando comparado aos outros tratamentos.

Os ácidos acético e propiônico são reconhecidamente potentes inibidores de fungos e leveduras. Então, podemos inferir, que as silagens Lb 50.4 + Leuc 1 e Lb 50.4 + Leuc 2 e Leuc 2 resultaram em maiores quantidades desses ácidos, resultando assim na redução da taxa de crescimento desses grupos microbianos (Freese et al., 1973, (Moon et al., 1983).

Além das concentrações de ácido acético e propiônico, a síntese de 1,2 propanodiol é um parâmetro interessante para redução das perdas decorrentes de fermentações indesejáveis. Cepas de *L. buchneri* apresentam a rota metabólica de formação do 1,2 propanodiol através do lactato, sendo convertido a lactoaldeído pela ação da lactoaldeído desidrogenase, sendo o lactoaldeído posteriormente convertido a 1,2 propanodiol pela lactoaldeído redutase (Heinl et

al., 2012). Desta forma, a produção de 1,2 propanodiol, além de reduzir a concentração de ácido láctico presente, pode ser um importante precursor para síntese de ácido acético e propiônico.

Cepas de bactérias do gênero *Leuconostoc* são importantes nas fases iniciais da fermentação e são menos acidófilos que *Lactobacillus buchneri* (Adesogan et al., 2003). Portanto, a associação de diferentes cepas de bactérias que atuem em distintas fases do processo fermentativo pode ser uma forma de obter melhorias no processo fermentativo (Much et al., 2018). Os resultados observados no nosso estudo sugerem que a presença do *Leuconostoc mesenteroides* em associação ao *Lactobacillus buchneri* foi importante na inibição de fungos e leveduras logo nas primeiras fases do processo de fermentação, tendo em vista que podem atuar em diferentes fases do processo de fermentação (Hammes e Hertel, 2003).

Todos os valores de amônia se encontram abaixo nível crítico de 15%, proposto por (Mahanna, 1994) para silagens de boa qualidade, indicando mínima proteólise.

4.3 Composição química, populações microbianas e estabilidade aeróbia de silagens de cana de açúcar após 7 dias de exposição ao ar.

A maior estabilidade aeróbia na silagem Lb 50.4 + Leuc 1 em relação às silagens controle, Leuc 1 e Leuc 2 pode estar associada a um efeito sinérgico da cepa de *Lactobacillus buchneri* 50.4, na presença da cepa *Leuconostoc mesenteroides* 7,10t1, podendo ter resultado numa maior produção de ácido acético e, portanto, maior estabilidade aeróbia.

A ausência de efeito de inoculação apenas com *Lactobacillus buchneri* na estabilidade aeróbia da silagem de cana-de-açúcar não é surpreendente. Recentemente, Rabelo et al. (2019) fizeram uma meta-análise para avaliar os efeitos de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus buchneri* na fermentação e estabilidade aeróbia de silagem de cana-de-açúcar e não verificaram efeito de *Lactobacillus buchneri* sobre a estabilidade aeróbia das silagens. Os autores atribuíram essa ausência de efeito provavelmente à maior preservação de carboidratos solúveis em água nas silagens tratadas com *L. buchneri*.

A persistência de bactérias lácticas em condições de aerobiose pode ser dificultada em virtude da presença do oxigênio. Algumas cepas de bactérias lácticas como *Leuconostoc mesenteroides* podem apresentar a habilidade de acumular manganês dentro da célula e reduzir os efeitos de toxidez do oxigênio presente na silagem, produzindo H₂O₂ (Archibald & Fridovich., 1981). De acordo com Condon, (1987) o oxigênio e substratos exógenos como

piruvato ou acetaldeído componentes da rota metabólica do lactato e etanol, respectivamente, podem servir de ativação para crescimento de *Leuconostoc mesenteroides*, o que pode justificar a maior estabilidade aeróbia no combo Lb 50.4 + Leuc 1.

A alta população de microrganismos indesejáveis, principalmente leveduras como observado nas silagens após 7 dias de estabilidade aeróbia, é comum em silagens onde existe uma alta concentração de carboidratos solúveis residuais. Phalow et al. (2003) descreveram duas formas de deterioração aeróbia em silagens. Na primeira, as leveduras, que apresentam uma faixa de crescimento ampla na fase de exposição ao ar como no caso do presente estudo podem causar a perda de grandes quantidades de CHOs com conversão a etanol. A outra, através da assimilação do próprio ácido láctico da fermentação, resulta no aumento do pH e favorece aparecimento de fungos filamentosos na silagem, com conseqüente perdas de MS.

A ausência de efeito de tratamento sobre o pH das silagens após 7 dias de exposição aeróbia, cujo valor médio foi 5,08, pode estar associado a maior produção de ácido acético nas silagens. A silagem tratada com Lb 50.4 + Leuc 1 foi a que apresentou menor população de leveduras (7,11 log UFC⁻¹g) comparada com Leuc 2 e Lb 50.4 + Leuc 2. É importante destacar, que todas as silagens apresentaram populações de leveduras da magnitude de 7 log UFCg⁻¹, o que representa um incremento médio de aproximadamente 2 log de UFC na população desse grupo microbiano em relação à silagem antes da exposição aeróbia, o que pode acarretar em severas perdas na silagem.

CONCLUSÃO

O Combo Lb 50.4 + Leuc 1, reduziu a população de fungos e leveduras e melhorou o processo fermentativo da silagem de cana de açúcar após 90 dias de fermentação, e proporcionou maior estabilidade, podendo ser considerado como potencial inoculante para ensilagem desta cultura.

REFERÊNCIAS

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 a chemical additive on the fermentation, aerobic stability, and nutritive value of crimped wheat grains. **Journal of dairy science**, 86(5), 1789-1796. 2003.

Archibald, F. S., & Fridovich, I. R. W. I. N. Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. **Journal of Bacteriology**, 146(3), 928-936. 1981.

Ávila C.L.S., Carvalho B.F., Pinto J.C., Duarte W.F. and Schwan R.F. Use of *Lactobacillus hilgardii* strains for enhancing quality of sugarcane silage. **Journal of Dairy Science**, 97, 940–951. 2014.

Ávila, C.L.S; Pinto, J.C.; Figueiredo, H.C.P. et al. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugarcane silage. **Grass and Forage Science**, v.64, n.4, p.384-394. 2009.

Ávila, C. L. D. S., Valeriano, A. R., Pinto, J. C., Figueiredo, H. C. P., Rezende, A. V. D., & Schwan, R. F. Chemical and microbiological characteristics of sugar cane silages treated with microbial inoculants. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39(1), 25-32. 2010.

Bach, B., C. 2015. **Perdas fermentativas, microbiologia e composição químico-bromatológica de silagens de milho (*Zea mays*) ou capim mombaça (*Panicum maximum*) tratadas com aditivos microbianos**. 98 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Borreani, G.; Tabacco, E. The relation ship of silage temperature with the microbial status of the face of corn silage bunkers. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.2620-2629. 2010.

Cardoso, L.L.; Ribeiro, K.G.; Marcondes, M.I.; et al. Chemical composition and production of ethanol and other volatile organic compounds in sugarcane silage treated with chemical and microbial additives. **Animal Production Science**. 2018.

Carvalho, B. F., Avila, C. L. S., Miguel, M. G. C. P., Pinto, J. C., Santos, M. C., & Schwan, R. F. Aerobic stability of sugar-cane silage inoculated with tropical strains of lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, 70, 308–323. 2014.

Cândido, E. P.; Santos, E. M.; Ramos, J. P. F.; Economic response of feedlot sheep fed silages with different cultivars of sorghum. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.1, p.79-85. 2015.

Cavali, J., Pereira, O. G., Valadares Filho, S. D. C., Santos, E. M. Bromatological and microbiological characteristics of sugarcane silages treated with calcium oxide. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39(7), 1398-1408. 2010.

Chaney, A.L.; Marbach, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-132. 1962.

Condon, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. **FEMS Microbiology Letters**, 46(3), 269-280. 1987.

Daniel, J. L. P.; Checulli, M.; Zwielehner, J.; et al. The effects of *Lactobacillus kefir* and *L. brevis* on the fermentation and aerobic stability of sugarcane silage. **Animal Feed Science and Technology**, 205, 69-74. 2015.

Detmann, E., Souza, M.A., Valadares Filho, S.C. et al. **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco: Universidade Federal de Viçosa, 214 p. 2012.

Freese, E; SHEU, C.W.; Galliers, E. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. **Nature**, v. 241, n. 5388, p. 321. 1973.

Hammes, W.P. and Hertel, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H. and Stackebrandt E. (eds) **The Prokaryotes, an evolving electronic resource for the microbiological community**, pp. 320–403. New York, USA: Springer-Verlag. 2003.

Heinl, S., Wibberg, D., Eikmeyer, F., Szczepanowski, R., Blom, J., Linke, B., Goesmann, A., Grabherr, R., Schwab, H., Puhler, A., Schluter, A., Insights into the completely annotated genome of *Lactobacillus buchneri* CD034, a strain isolated from stable grass silage. **Journal of Biotechnology**. 161, 153–166. 2012.

Jobim, C. C., L. G. NUSSIO, R. A. REIS, P. SCHMIDT. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia** vol.36 supl.0 Viçosa. July. 2007.

Kang, T. W., Adesogan, A. T., Kim, S. C., & Lee, S. S.. Effects of an esterase-producing inoculant on fermentation, aerobic stability, and neutral detergent fiber digestibility of corn silage. **Journal of dairy science**, 92(2), 732-738. 2009.

Kung Junior L.; Stanley, R.W.,. Effect of stage of maturity on the nutritive value of whole-plant sugarcane preserved as silage. **Journal of Animal Science**, v.54, p.689-696. 1982

Kung, L. Jr, Stokes, M. R., & Lin, C. J. Silage additives. In D. R. Buxton, R. E. Muck & J. H. Harrison (Eds.), **Silage science and technology** (pp. 251–304). Madison, WI: American Society of Agronomy. 2003.

Mahanna, B. Proper management assures high-quality silage, grains. **Feedstuffs (USA)**, 1994.

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

Moon, N.J.. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied. Bacteriology** 55:454–460. 1983.

Moraes, R. L., Ribeiro, K. G., Pereira, O. G., Marcondes, M. I. & Cardoso, L. L. Silagem de cana-de-açúcar tratada com inoculantes microbianos e suas misturas. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, 7, 76-83 2017.

Muck, R. E. et al. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 5, p. 3980-4000, 2018.

Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**. 153:375–380. 1944.

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**, 94(5), 800-807. 2003.

Nussio, L. G.; Schmidt, Patrick; Pedroso, A. de F. Silagem de cana-de-açúcar. In: Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: SIMPÓSIO SOBRE PASTAGEM, 20., Piracicaba. Produção animal em pastagens: situação atual e perspectivas: anais. Editado por Aristeu M. Peixoto, José Carlos de Moura, Sila Carneiro da Silva e Vidal Pedroso de Faria., 2003.

Okuda, H., S. Fuji, and Y. Kawashima. **A direct colorimetric method for blood ammonia**. Tokushima J. Exp. Med. 12:11–23. 1965.

Oude Elferink, S.J.W.H., Krooneman, J., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F., Faber, F. and Driehuis, F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology** 67, 125–132. 2001.

Pahlow, G.; Muck,R. E.; Driehuis, F. et al. Microbiology of ensiling. In: **Silage Science And Technology**. 42., 2003. Madison, USA. Proceedings... Madison: ASCSSA-SSSA, p.31-93. 2003.

Pedroso, A. D. F., Nussio, L. G., Loures, D. R. S. Fermentation, losses, and aerobic stability of sugarcane silages treated with chemical or bacterial additives. **Scientia Agricola**, 65(6), 589-594. 2008.

Pedroso, A. D. F., Nussio, L. G., Paziani, S. D. F., et al. Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. **Scientia Agricola**, 62(5), 427-432. 2005.

Reis, C. B. et al. Wild *Lactobacillus hilgardii* (CCMA 0170) strain modifies the fermentation profile and aerobic stability of corn silage. **Journal of Applied Animal Research**, p.1-7, 2017.

Reis, R. A et al. Capineira: Cana-de-açúcar. In: Reis, R.A. et al., Eds. **Forragicultura: Ciência, Tecnologia e Gestão dos Recursos Forrageiros**. 1.ed. Jaboticabal, Gráfica Multipress,. p.617-627. 2013.

Siegrifield, V.R., H. Ruckemann and G. Stumpf. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. **Landwirtsch Forsch.** 37:298-304, 1984.

Silva, L. D., Pereira, O. G., Silva, T. C. Effects of *Lactobacillus buchneri* isolated from tropical maize silage on fermentation and aerobic stability of maize and sugarcane silages. **Grass and Forage Science**, 73(3), 660-670. 2018.

Warth, A. Mechanism of resistance of *Saccharomyces bailii* to benzoic, sorbic and other weak acids used as food preservatives. **Journal of Applied Bacteriology** 43, 21 5-230. 1977.

WOOLFORD, M. K. The detrimental effects of air on silage. **Journal of Applied Microbiology**, v.68, n.2, p.101-116, 1990.