

MARCELO BONSI CHECOLI

**SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADAS COM
Lactobacillus kefiri e *L. brevis*: EFEITOS NO PERFIL FERMENTATIVO
E NA ESTABILIDADE AERÓBIA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

C514s
2014 Checoli, Marcelo Bonsi, 1978-
Silagens de cana-de-açúcar tratadas com *Lactobacillus*
kefiri e *L. brevis* : efeitos no perfil fermentativo e na estabilidade
aeróbia / Marcelo Bonsi Checoli. – Viçosa, MG, 2014.
ix, 24f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Odilon Gomes Pereira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.19-24.

1. Cana-de-açúcar. 2. Silagem. 3. *Lactobacillus* -
Fermentação. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Zootecnia.
II. Título.

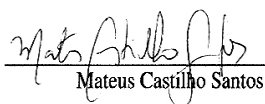
CDD 22. ed. 633.61

MARCELO BONSI CHECOLI

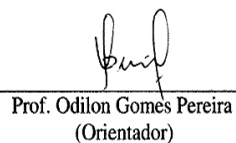
**SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADAS COM
Lactobacillus kefir e *L. brevis*: EFEITOS NO PERFIL FERMENTATIVO
E NA ESTABILIDADE AERÓBIA**

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

APROVADA: 28 de julho de 2014.


Mateus Castilho Santos


João Luiz Pratti Daniel


Prof. Odilon Gomes Pereira
(Orientador)

À minha família, em especial, à minha esposa Juliana, minha filha querida Beatriz e à nova integrante da família, minha filha querida Isabela, que está por vir. Ao meu pai Gilberto e à minha mãe Otilia, por me guiarem até aqui e darem todo o suporte necessário para mais esta conquista.

A Deus, essa força superior que nos permite continuar trilhando os mistérios da ciência e da vida, ofereço essa conquista.

Se quiser ir rápido, vá sozinho.
Se quiser ir longe, vá junto.
Provérbio Africano

Estudar, Saber, Agir, Vencer.
“Quatro pilares UFV”

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade do curso.

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, pela abertura dos seus portões e porão do saber.

Ao Professor Luiz Gustavo Nussio, pela oportunidade a mim dada de conduzir os trabalhos no Departamento de Zootecnia da ESALQ.

Aos funcionários do Laboratório do Departamento de Zootecnia da ESALQ, em especial ao Cesar, pela amizade e pelo empenho.

Aos colegas e integrantes do Grupo de Qualidade e Conservação de Forragens da ESALQ, que se dedicaram na condução do trabalho.

Ao Dr. João Luiz Pratti Daniel, pelo apoio na realização deste experimento, pelo companheirismo, pelo exemplo de pesquisador nato que é e pelas orientações úteis para a finalização deste trabalho.

À empresa Sanphar/Biomin, que possibilitou a realização deste Mestrado Profissionalizante – em especial, ao Marcelo Ziani.

Ao Professor Odilon Gomes Pereira, pela coordenação do Mestrado Profissionalizante e pela sua orientação e confiança.

À Fernanda Vieira, da Pós-Graduação, pelo auxílio nos trâmites administrativos e pela paciência.

À pesquisadora e gerente de produtos da Biomin, Jutta Zwielehner, que me ajudou no projeto inicial desta pesquisa.

Ao Professor Patrick Schmidt, pelas dicas ao longo da condução do experimento.

Ao amigo e colega de trabalho Lucas José Mari, pelos ensinamentos e pela competência no que realiza.

Aos amigos do Mestrado, Ronald, Marcos, Emanuela, Saulo, Napier, Diogo e Igor Julio, pelo convívio ao longo do curso.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1 Análises de pH e microbiológicas.....	10
2.2 Análises químico-bromatológicas.....	10
2.3 Análise estatística.....	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4 CONCLUSÃO	18
REFERÊNCIAS	19

RESUMO

CHECOLI, Marcelo Bonsi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014. **Silagens de cana-de-açúcar tratadas com *Lactobacillus kefir* e *L. brevis*: Efeitos no perfil fermentativo e na estabilidade aeróbia.** Orientador: Odilon Gomes Pereira.

Foi avaliado o efeito de inoculantes bacterianos contendo cepas heterofermentativas de *Lactobacillus kefir* e *Lactobacillus brevis* no perfil fermentativo e na estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar. Avaliaram-se quatro tratamentos: controle (C) – sem aditivo; aditivo 1 (LB) – cepas de bactérias heteroláticas *Lactobacillus brevis* aplicadas na dose de 2×10^5 unidades formadoras de colônia/g (UFC/g); aditivo 2 (LK) – cepas de bactérias heteroláticas *Lactobacillus kefir* aplicadas na dose de 2×10^5 ufc/g; e aditivo 3 (LBK) – mescla de cepas de bactérias heteroláticas *Lactobacillus brevis* (1×10^5 ufc/g) e *Lactobacillus kefir* (1×10^5 ufc/g) aplicadas na dose total de 2×10^5 ufc/g. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições, totalizando 20 silos experimentais. Após os tratamentos, o material foi ensilado em baldes plásticos de 20 L de capacidade, obtendo-se uma massa específica de 600 kg/m^3 de massa verde. Na silagem controle, foi observado menor ($P < 0,05$) teor de matéria seca e maiores ($P < 0,05$) teores de FDN e FDA, bem como menor ($P < 0,05$) digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca. Independentemente dos tratamentos utilizados, o pH não sofreu alteração. As contagens de bactérias lácticas e os teores de etanol e ácido láctico foram menores ($P < 0,05$) nas silagens inoculadas. O teor de ácido

acético foi maior na silagem tratada com *L. Kefiri* em relação à controle e àquela tratada com *Lactobacillus brevis*. O teor de 1,2-propanodiol foi maior na silagem tratada com *L. kefir*. Não houve efeito de tratamentos sobre a estabilidade aeróbia das silagens, porém, na temperatura acumulada em cinco dias, o *L. kefir* apresentou melhor resultado. As silagens inoculadas mostraram melhor perfil fermentativo, resultando em melhor recuperação da matéria seca e conseqüente diminuição da deterioração aeróbia.

ABSTRACT

CHECOLI, Marcelo Bonsi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **Sugar cane silages treated with *Lactobacillus kefir* and *L. brevis*: Effects on fermentation profile and aerobic stability.** Adviser: Odilon Gomes Pereira.

The aim of this study was to evaluate the effect of bacterial inoculants containing heterofermentative strains of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus kefir* on the fermentation profile and aerobic stability of sugar cane silages. Four treatments were evaluated: control (C) - without additives; Additive 1 (LB) - strain of heterolactic bacteria *Lactobacillus brevis* applied at a rate of 2×10^5 colony forming units/g (CFU/g), Additive 2 (LK) - strains of heterolactic bacteria *Lactobacillus kefir* applied at a rate of 2×10^5 cfu/g; Additive 3 (LBK) – a blend of *Lactobacillus brevis* (1×10^5 cfu / g) and *Lactobacillus kefir* (1×10^5 cfu / g) was applied at a total rate of 2×10^5 cfu/g. The experimental design was completely randomized with five replicates for each treatment, resulting in 20 silos. After the treatments had been applied, the material was ensiled in 20 L plastic buckets, resulting in bulk density of 600 kg/m^3 of fresh weight. In the control silage, there was lower dry matter content ($P < 0.05$), and higher NDF and ADF contents ($P < 0.05$), as well as lower *in vitro* true digestibility of dry matter ($P < 0.05$). Regardless of treatments, pH did not change. The counts of lactic acid bacteria, and the contents of ethanol and lactic acid were lower ($P < 0.05$) in the inoculated silages. Acetic acid content was higher in the silage treated with *L. Kefiri*, compared with the control and the silage treated with *Lactobacillus brevis*, while the

1,2-propanediol content was higher for the treatment with *L. kefir*. There was no effect of treatments on aerobic stability of the silages; however, *L. kefir* obtained the best result for temperature accumulated for 5 days. The inoculated silages had better fermentation profile, resulting in a better recovery of dry matter and consequent reduction of aerobic deterioration.

1 INTRODUÇÃO

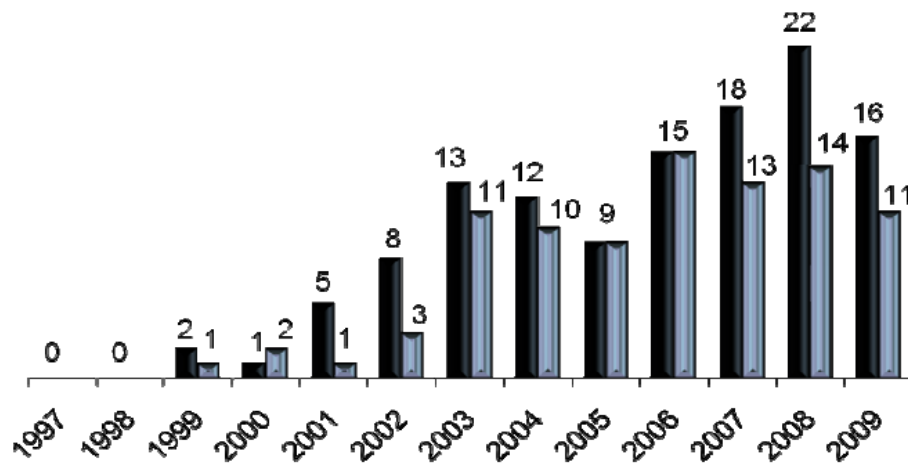
A utilização de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) nas dietas de bovinos como fonte de volumoso tem aumentado constantemente. Essa não é uma prática recente, uma vez que existem relatos de 1916 mencionando seu uso como forragem suplementar aos animais. Isso pode ser explicado por alguns fatores que favorecem a produção desse volumoso, como: sua maior produção durante o período com escassez de pasto na região centro-sul do Brasil; alta produção de massa verde (75 a 120 t/ha); opção em casos de incêndio acidental; facilidade durante a ensilagem, em razão de a época de colheita se concentrar nos meses de seca; benefício logístico dentro da propriedade; baixo risco de perda da cultura; e baixo custo.

Sua utilização só não é maior devido à dificuldade de manejo dessa forrageira, pois o corte diário exige mão de obra extra e o processo de ensilagem sem aplicação de aditivos se torna ainda menos eficiente. A cana-de-açúcar, quando ensilada sem aditivo, apresenta de forma predominante fermentação alcoólica, com alta produção de etanol, o que resulta em perdas elevadas de matéria seca e de energia líquida (DANIEL; NUSSIO, 2011).

Pedroso et al. (2005) também concluíram que a ensilagem da cana sem a adoção de aditivos eficazes promove redução do valor nutritivo, devido à fermentação alcoólica típica de leveduras. Esse fato é justificável, tendo em vista o alto teor de carboidratos solúveis (CS) e a grande população de leveduras epifíticas da planta, as quais convertem os CS em etanol, CO₂ e água (MCDONALD et al., 1991). Assim, o

uso de aditivos químicos e, ou, biológicos se faz necessário para minimizar os impactos de uma fermentação inadequada, porém espontânea.

Os estudos relacionados à ensilagem de cana-de-açúcar no Brasil datam da década de 1990 (Figura 1). A maioria deles envolveu a avaliação de algum tipo de aditivo, químico ou biológico, no processo de ensilagem. No entanto, teores de etanol em silagens de cana-de-açúcar não inoculada podem variar de 7,8% a 21,8% na matéria seca (MS) (KUNG JR.; STANLEY, 1982; ANDRADE et al., 2001; PEDROSO, 2003; FREITAS et al., 2006; ZOPOLLATTO et al., 2009). Com essa variação, é necessário maior esforço científico no sentido de buscar novas alternativas para tornar o processo de fermentação mais eficiente, reduzindo perdas.



Fonte: SCHMIDT (2009).

Figura 1 - Número de resumos e grupos de pesquisas trabalhando com silagem de cana-de-açúcar, publicados nos anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1997-2009.

Portanto, a ensilagem da cana-de-açúcar associada à utilização de aditivos químicos ou microbianos pode ser alternativa interessante para o sistema de produção de leite e carne. No entanto, na metanálise realizada por Schmidt (2009), ficou evidente que as bactérias do ácido lático são ineficientes em alterar o padrão fermentativo da cana-de-açúcar. Os resultados negativos obtidos, provavelmente, devem-se ao fato de as leveduras não serem inibidas pelo ácido lático (MOON, 1983; DANNER et al., 2003) e de ainda se usar esse ácido como substrato para produção de etanol (MCDONALD et al., 1991).

Devido à sua grande quantidade de CS, a silagem de cana-de-açúcar torna-se altamente suscetível à ação de leveduras, encontradas em altas populações na própria planta. No ambiente anaeróbio do silo, as leveduras são capazes de gerar perdas significativas de matéria seca, em razão da fermentação alcoólica.

Embora a queda de pH seja extremamente importante do ponto de vista de conservação e diminuição da ação de microrganismos indesejáveis no ambiente do silo, isoladamente, o pH baixo não é suficiente para impedir o desenvolvimento de leveduras, pois o ácido lático tem baixo poder fungicida (MOON, 1983). Em condições aeróbias, muitas espécies de levedura utilizam o ácido lático como substrato (MCDONALD et al., 1991). Como diversas espécies de leveduras podem sobreviver em pH próximo a 2, a maior produção de ácido lático nas silagens aditivadas com bactérias homoláticas não tem sido eficiente para controlar as leveduras em silagens de cana (PEDROSO, 2003; FREITAS et al., 2006).

Aditivos químicos, como a ureia e o ácido benzoico, podem melhorar a qualidade de silagens de cana-de-açúcar, diminuir a população de leveduras e mofo, além de reduzir a produção de etanol e as perdas de MS e CS (LIMA et al., 2002).

A adição de ureia na ensilagem baseia-se na transformação desta em NH_3 , que tem ação antifúngica (KUNG JR. et al., 2003). A utilização de ureia na ensilagem de cana-de-açúcar foi estudada por Alvarez e Preston (1976), que avaliaram a atuação dela no controle das perdas de açúcares representados pelo grau Brix (sacarose, açúcares redutores e não açúcares, em % do caldo). A dose de 1,02% de ureia propiciou menor redução no teor de açúcares (9%), enquanto, na silagem controle, a perda foi de 40% de açúcares.

O hidróxido de sódio é um aditivo muito usado para aumentar a digestibilidade de palhadas (MCDONALD et al., 1991). Nieblas et al. (1982) recomendaram a utilização do NaOH na ensilagem da cana-de-açúcar, pois, segundo esses autores, esse álcali foi capaz de alterar a fermentação basicamente alcoólica para fermentação predominantemente láctica.

O uso de aditivos microbiológicos em silagens tem como principais objetivos inibir o crescimento de microrganismos aeróbios indesejáveis ao processo, como as leveduras e *Listeria*; inibir o crescimento de organismos anaeróbios indesejáveis, como enterobactérias e clostrídeos; inibir a atividade de proteases e deaminases da planta e de microrganismos; adicionar microrganismos benéficos para dominar a fermentação (culturas *starters*); formar produtos finais benéficos para estimular a produção do

animal; e melhorar a recuperação de matéria seca da forragem conservada (KUNG JR. et al., 2003).

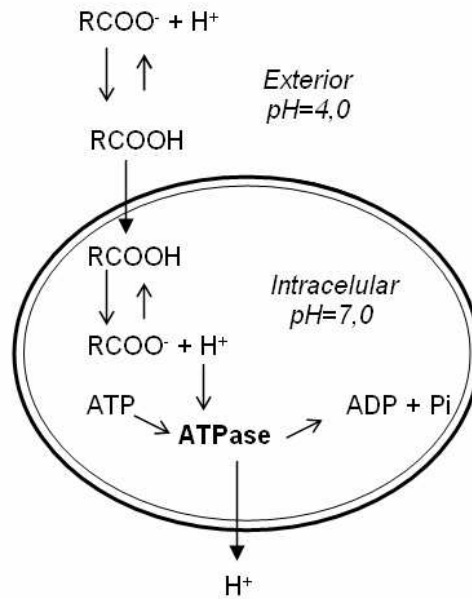
A fermentação que ocorre durante a ensilagem é fundamental para a conservação da forragem ensilada, minimização das perdas e preservação do seu valor nutricional. Assim, a ensilagem geralmente controla a atividade microbiana pela combinação de um ambiente anaeróbio com a fermentação natural dos açúcares por bactérias do ácido lático presentes na cultura, sendo a compactação um detalhe primordial para o sucesso da ensilagem. Essa fermentação e a consequente redução no pH suprimem o crescimento de outros microrganismos anaeróbios indesejáveis.

Os aditivos microbiológicos ou inoculantes microbianos são muito utilizados em todo o mundo, pois são de fácil manuseio, seguros, não corrosivos, não poluem o ambiente e são atóxicos para os animais e o homem (ÁVILA et al., 2009).

Inoculantes microbianos usados como aditivos incluem bactérias homofermentativas, heterofermentativas ou a combinação delas. Os microrganismos homofermentativos caracterizam-se pela taxa de fermentação mais rápida, menor proteólise, maior concentração de ácido lático, menores teores de ácidos acético e butírico e maior recuperação de energia e matéria seca. Bactérias heterofermentativas utilizam ácido lático e glicose como substrato para produção de ácido acético e propiônico, os quais são efetivos no controle de fungos, especialmente sob pH baixo.

O ácido acético em pH inferior ao seu pKa (4,75) fica na forma não dissociada, sendo a membrana de leveduras e fungos permeável a ele; conseqüentemente, a entrada do ácido é realizada via transporte passivo (DANNER et al., 2003). Dentro da levedura, ele é dissociado (RCOO^- e H^+) devido ao fato de o pH interno do microrganismo ser por volta de 7,0 (superior ao pKa), liberando íons H^+ ; por conseguinte, ocorre rápida redução do pH intracelular (Figura 2). Para elevar novamente o pH, o microrganismo tem de expulsar os íons 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).

Zopollatto et al. (2009) concluíram, em revisão envolvendo 43 trabalhos publicados na década de 1999-2009, referentes às culturas de milho (8), sorgo (6), cana-de-açúcar (14) e capins tropicais (15), que no caso das silagens de cana-de-açúcar a utilização de bactérias homofermentativas estimulou a perda por efluentes e a produção de etanol.



Fonte: Adaptado de DAVIDSON, 1997; BERNARDES, 2003.

Figura 2 - Transformações do ácido orgânico em ambiente de baixo pH e na presença da célula microbiana.

De acordo com o metabolismo, espécies de *Lactobacillus* e outras bactérias produtoras de ácido láctico (BAL) podem ser divididas em três grupos (HOLZER et al., 2003):

- Homofermentativa Obrigatória (grupo 1):
 - *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. salivarius*, *Pediococcus* spp., *Paralactobacillus* spp. e *Enterococcus faecium*.
- Heterofermentativa Facultativa (grupo 2):
 - *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum* e *L. sakei*.
- Heterofermentativa Obrigatória (grupo 3):
 - *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. reuteri* (*Leuconostocaceae*) e *L. kefir*

Esses grupos são divididos de acordo com os produtos oriundos do resultado final da fermentação de suas vias metabólicas.

Vias Metabólicas:

(Grupo 1) BAL Homofermentativas são capazes de converter o carbono das hexoses (glucose e frutose) em ácido láctico.



(Grupo 2) Heterofermentativas Facultativas têm uma indução à fosfoquelatase (quando a glucose e a frutose estão em níveis baixos e a pentose é abundante, elas também podem fermentar pentoses) que produz a mesma quantidade de ácido acético e láctico como produto final da fermentação. Em alguns casos, esse grupo de bactérias pode transformar pentoses em hexoses, seguidas de uma glicólise, ocasionando a via heterofermentativa da pentose, produzindo somente ácido láctico.



(Grupo 3) BAL Heterofermentativas Obrigatórias produzem 1 mol CO₂, 1 mol etanol (ou ácido acético) e 1 mol de ácido láctico por mol de hexose (glucose e frutose).



Essa via metabólica produz, além dos ácidos, CO₂. Dessa forma, ocorre perda de matéria seca (MS) durante a fermentação da silagem na forma de CO₂. Em silagens inoculadas somente com *L. buchneri*, a recuperação da MS é menor (KLEINSCHMIT et al., 2006). Ainda, segundo esses autores, Muck (1996) foi o primeiro a sugerir que silagens inoculadas com *L. buchneri* poderiam melhorar a estabilidade aeróbia. Desde então, um considerável número de pesquisas vêm sendo desenvolvidas com esse microrganismo, o qual aparentemente melhora a estabilidade aeróbia das silagens pela via de conversão anaeróbia do ácido láctico em ácido acético (OUDE ELFERINK et al., 2001).

Em estudo apresentado à Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), foi demonstrado, em silos experimentais, que a cepa *L. buchneri* (DSM 22501) obteve resultado significativo para melhorar a produção de silagem através da redução do pH e do nitrogênio amoniacal e aumento na preservação da matéria seca. As cepas de *L. buchneri* (NCIMB 40788-CNCM I-4323), *L. buchneri* (ATCC PTA-6138) e *L. buchneri* (ATCC PTA-2494) apresentaram potencial para melhorar a estabilidade aeróbia de silagens. Nesse estudo, as doses aplicadas às forragens foram de 1x10⁵ UFC/g de forragem (EFSA JOURNAL, 2013).

A cepa de *L. kefir* DSM 19455, isolada de chucrute (conserva de repolho fermentado), melhorou a estabilidade aeróbia pelo aumento na produção de ácido acético durante a fermentação (EFSA JOURNAL, 2013). Nesse estudo, a dose utilizada da referida cepa foi de 5x10⁷ UFC/kg de forragem ou, ainda, 5x10⁴ UFC/g de forragem.

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de inoculantes bacterianos contendo cepas heterofermentativas obrigatórias de *Lactobacillus kefir* (DSM 19455) e

Lactobacillus brevis (DSM 19456) no perfil fermentativo e na estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Universidade de São Paulo – ESALQ, Piracicaba/SP. A variedade de cana-de-açúcar utilizada foi a IAC 93-3046, colhida com teor médio de sólidos no caldo de 22,33° Brix.

Foram avaliados quatro tratamentos: controle (C) – sem aditivo; aditivo 1 (LB) – contendo cepas de bactérias heteroláticas *Lactobacillus brevis* com níveis de garantia de 5×10^{10} unidade formadora de colônia/g (UFC/g) do produto; aditivo 2 (LK) – contendo cepas de bactérias heteroláticas de *Lactobacillus keferi* com níveis de garantia de 5×10^{10} UFC/g do produto; e aditivo 3 (LBK) – contendo uma mescla de cepas de bactérias heteroláticas *L. brevis* e *L. keferi* com níveis de garantia de 5×10^{10} UFC/g do produto final. Antes do início do experimento, a contagem microbiana dos inoculantes foi estabelecida por plaqueamento, para que a dose real aplicada atingisse 200.000 UFC/g de forragem fresca. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições, resultando em 20 silos experimentais. Os aditivos usados foram diluídos em 4 mL/kg de forragem fresca e aplicados com pulverizador manual de 1 litro. No material controle foi aplicada a mesma quantidade de água destilada usada para diluir os inoculantes nas silagens aditivadas. Foram utilizados baldes plásticos de 20 L como silos experimentais. A forragem foi compactada nos silos por meio de pisoteio humano. Os silos pesaram aproximadamente 15 kg, obtendo-se uma massa específica (ME) de 600 kg/m³ de massa verde.

Antes do enchimento dos silos, foi realizada a pesagem destes e, em seguida, após o fechamento, foi efetuada uma nova pesagem. Os silos foram mantidos em local

coberto, em temperatura ambiente, até a sua abertura, que ocorreu setenta dias após a ensilagem.

No momento da ensilagem, foi coletada uma amostra da forragem para determinação do teor de MS, proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (DVIVMS) e pH. Foram quantificados também na forragem as populações de levedura (LEV) e bactérias lácticas (BAL) e o teor de grau Brix.

No momento da abertura dos silos foi feita uma pesagem destes, para avaliação das perdas quantitativas por gases e perda total de MS, pela diferença gravimétrica, conforme descrito por Jobim et al. (2007). Após a abertura dos silos, a camada superficial de aproximadamente 5 cm foi descartada; abaixo dessa camada, toda a silagem foi recolhida, colocada em sacos plásticos e homogeneizada. Na sequência, uma amostra de 350 g foi coletada em sacos de papel para secagem em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas. Após secagem, o material foi processado em moinho de facas tipo Wiley, com peneira de malha de 1,0 mm, e armazenado em potes plásticos devidamente vedados, para análise da composição químico-bromatológica. Outra amostra foi utilizada para preparo de extrato aquoso (1:9) em liquidificador e subsequente determinação de pH, produtos de fermentação e contagem microbiana.

A estabilidade aeróbia (EA) das silagens foi avaliada por meio do controle de temperatura das silagens expostas ao ar, de acordo com o método descrito por Kung et al. (2000). Foram coletados 3 kg de cada unidade experimental, que foram colocados em baldes plásticos sem tampa e mantidos em câmaras climáticas a 25±1 °C durante 10 dias. As temperaturas foram mensuradas a cada 30 minutos com o uso de *data loggers* (EL-USB-1 – Lascar Electronics/U.K.), inseridos no centro da massa em cada balde. Amostras das silagens foram colhidas no início e no término do período de avaliação, para determinação do teor de MS em estufa de circulação forçada de ar a 55 °C.

A estabilidade aeróbia (EA) foi definida como o tempo em horas para elevação da temperatura em 2 °C em relação ao ambiente. Foram medidos também a temperatura máxima (Tmax) alcançada pela massa; o tempo para atingir a temperatura máxima (HTmax); o acúmulo de temperatura em 5 e 10 dias; e a perda de matéria seca em 10 dias de exposição aeróbia (O'KIELY et al., 2001).

2.1 Análises de pH e microbiológicas

A partir de uma subamostra fresca de silagem, foi preparado extrato aquoso por meio da adição de 225 mL de água destilada estéril em 25 g de amostra fresca, homogeneizada por quatro minutos em Lab-Blender Stomacher[®], e realizada a leitura de pH em potenciômetro digital. Após, foram realizadas diluições decimais sequenciais (10^{-1} a 10^{-6}) para quantificação de microrganismos, através de plaqueamentos *pour plate*, em triplicata. O cultivo foi realizado em placas de Petri estéreis, em meio MRS ágar (7543A, Acumedia[®], Michigan, USA) suplementado com natamicina (0,25 g/L) para bactérias do ácido lático (BAL) a 32 °C por 48 horas. A contagem de leveduras e fungos filamentosos deu-se a partir do plaqueamento em ágar Malte (M137, Himedia[®] Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India) acrescido de ácido lático na concentração de 0,5%, com incubação das placas a 28 °C por 48 horas, para contagem de leveduras, e de quatro a cinco dias, para fungos filamentosos.

2.2 Análises químico-bromatológicas

A determinação do teor de matéria seca definitiva foi feita por secagem em estufa a 105 °C durante 16 horas (AOAC, 2000). A análise de PB foi realizada pelo método de combustão de Dumas (Leco 2000, Leco Instruments Inc). Os teores de FDN e FDA foram determinados conforme o método de Van Soest et al. (1991), utilizando-se sulfito de sódio e α -amilase, com base no método sequencial proposto pela ANKON[®] Fiber Analyser. A análise de carboidratos solúveis (CS) foi feita conforme metodologia descrita por Hall (2000).

Os produtos de fermentação também foram determinados no extrato aquoso obtido para determinação de pH. O ácido lático foi analisado por espectrometria com leitura em 565 nm, de acordo com metodologia adaptada de Pryce (1969). As concentrações de acetona, acetato de etila, álcool isopropílico, etanol, acetato de propila, 2-butanol, 1-propanol, lactato de etila, ác. acético, ác. propiônico, 2,3-butanodiol, 1,2-propanodiol, ác. butírico, ác. isovalérico e ác. valérico foram determinadas em cromatógrafo a gás (Gas Chromatograph Mass Spectrometer - GCMS-QP 2010, ULTRA, Shimadzu[®], Japan.). O teor de MS corrigida para voláteis foi calculado como: **MS_{corr} (%MV) = MS estufa (%MV) + 0,08 x ácido lático (%MV) + 0,77 x 1,2-propanodiol (%MV) + 0,87 x 2,3-butanodiol (%MV) + 0,95 x ácidos graxos voláteis (%MV) +**

lactato de etila (%MV) + 1-propanol (%MV) + etanol (%MV) + acetato de etila (%MV) + acetona (%MV), em que ácidos graxos voláteis = ácido acético + ácido propiônico + ácido butírico + ácido isovalérico + ácido valérico.

2.3 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância, e as comparações das médias, realizadas pelo teste de Tukey, considerando-se o nível de 5% de probabilidade de erro tipo I, com auxílio do software estatístico SAS (Statistical Analysis System).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 é mostrada a composição químico-bromatológica e a população de BAL e LEV na cana-de-açúcar antes da ensilagem.

Na Tabela 2 são apresentadas a composição químico-bromatológica e as perdas de matéria seca das silagens, em função dos tratamentos. Foi verificado efeito de aditivo ($P < 0,05$) sobre o teor de matéria seca das silagens, sendo registrado menor valor na silagem controle. O teor de MS das silagens foi inferior àquele da cana-de-açúcar antes da ensilagem, em decorrência da perda de MS característica do processo. A redução no teor de MS da cana-de-açúcar após ensilagem também foi constatada por Kung Jr. e Stanley(1982) e Pedroso et al. (2005).

Foram registrados maiores teores de FDN e FDA nas silagens controle, em comparação com aquelas tratadas com aditivos. Isso provavelmente se deve ao menor teor de carboidratos solúveis em água dessa silagem em relação às demais, refletindo em maiores perdas de matéria seca, conforme constatado no presente trabalho. Em todas as silagens avaliadas, os teores de FDN e FDA foram maiores que aqueles registrados na cana-de-açúcar antes da ensilagem, em decorrência do açúcar utilizado durante o processo de fermentação. Vários trabalhos, como os de Pedroso et al. (2005), Siqueira et al.(2007c), Schmidt et al. (2007) e Souza et al. (2008), também constataram aumento nos constituintes da parede celular com o processo de ensilagem da cana-de-açúcar.

A menor DIVVMS observada na silagem controle em relação àquelas tratadas reflete o maior conteúdo dos constituintes fibrosos dessa silagem. Schmidt et al. (2009),

avaliando aditivos químicos e microbiológicos em silagens de cana-de-açúcar, verificaram que as silagens tratadas com aditivos químicos apresentaram menores teores de FDN e FDA e maiores coeficientes de digestibilidade que silagens controle ou inoculadas com aditivos microbiológicos, provavelmente em decorrência do menor teor de carboidratos estruturais.

Tabela 1 - Composição da cana-de-açúcar antes da ensilagem

MS	36,00
PB, % MS	2,97
FDN, % MS	62,40
FDA, % MS	38,80
CHO solúveis, % MS	27,60
DVIVMS, % MS	57,80
Bactérias lácticas, log UFC/g	5,53
Leveduras, log UFC/g	5,29
Fungos filamentosos, log UFC/g	4,20
Grau Brix	22,33

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; CHO: carboidratos solúveis; DVIVMS: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca.

Tabela 2 - Efeito dos tratamentos na composição química e no controle de perdas em silagens de cana-de-açúcar

Item	Tratamento				EPM	P
	C	LB	LK	LBK		
MS	28,3c	31,1a	30,3b	30,8ab	0,19	<0,01
MScorr	32,48a	33,71b	33,27b	33,47b	0,19	<0,01
PB, % MS	4,34a	3,93c	4,01b	3,97bc	0,02	<0,01
FDN, % MS	79,3a	71,7b	72,5b	71,8b	0,26	<0,01
FDA, % MS	54,4a	47,9b	48,6b	48,5b	0,29	<0,01
CHO solúveis, % MS	12,1b	19,8a	18,9a	19,6a	0,25	<0,01
DVIVMS, % MS	51,8b	54,3a	55,7a	55,0a	0,41	<0,01
Perdas gasosas, %	13,1a	8,52c	9,49b	9,08bc	0,22	<0,01
Perdas de MS, %	25,0a	17,2b	18,3b	17,4b	0,51	<0,01
Perdas de MScorr, %	13,74a	10,20b	10,12b	10,12b	0,51	<0,01

MS: matéria seca; MScorr: matéria seca corrigida; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; CHO: carboidratos solúveis; DVIVMS: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca; C: tratamento controle; LB: tratamento com *L. brevis*; LK: tratamento com *L. kefir*; LBK: tratamento combo *L. brevis* + *L. kefir*.

Médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P>0,05).

Foi observada maior ($P < 0,05$) população de bactérias do ácido láctico na silagem controle. Já a população de leveduras foi menor ($P < 0,05$) na silagem controle e naquela tratada com LK, que por sua vez não diferiram entre si ($P > 0,05$). Silagens tratadas com inoculantes contendo cepas de bactérias heterofermentativas via de regra controlam leveduras no processo de ensilagem, conforme observado nos trabalhos de Nishino et al. (2003), Weinberg et al. (1999), Ranjit e Kung (2000) e Kung e Ranjit (2001), porém esse efeito não foi observado neste trabalho.

Não foi observado efeito ($P > 0,05$) de tratamentos sobre o pH das silagens avaliadas (Tabela 3), embora o pH em silagens de cana-de-açúcar não seja um ponto crítico e tampouco indicador de qualidade fermentativa, uma vez que a produção de etanol por leveduras ocorre mesmo sob pH inferior a 3,5 (MCDONALD et al., 1991). Oude Elferink (2001) avaliaram o comportamento do *Lactobacillus buchneri* em nove diferentes condições de pH, concluindo que em valores de pH de 3,8 o *L. buchneri* é mais eficiente em consumir ácido láctico do que em pH igual a 5,8. Foi observado também que houve significativa redução na população de bactérias produtoras de ácido láctico. Isso pode ser um fator decisivo para a qualidade do material ensilado, visto que leveduras utilizam o ácido láctico no seu metabolismo, o que pode acarretar maior produção de etanol (Tabela 3).

Ainda na Tabela 3, pode ser observada forte relação entre as bactérias lácticas e a produção de ácido láctico, leveduras e etanol, e o fator limitante parece serem as bactérias lácticas fornecendo ácido láctico como substrato para as leveduras, para maior produção de etanol. Segundo Bravo-Martins (2004), a maioria das espécies de leveduras utiliza o ácido láctico como substrato, fato esse observado no tratamento controle do presente trabalho.

Foi observada maior ($P < 0,05$) produção de etanol na silagem controle. A princípio, isso poderia ser atribuído a uma maior população de leveduras nessa silagem. No entanto, é importante destacar que essa silagem, juntamente com aquela tratada com LK, apresentou menores populações desse grupo microbiano. Isso de certa forma parece antagônico. Essa perda elevada de etanol pode ser um problema em termos de perdas qualitativas do material ensilado, podendo ocasionar menor ingestão pelos animais. Mari et al. (2006) avaliaram o comportamento ingestivo de bovinos alimentados com silagens de cana pura e aditivada com LB (5×10^4 UFC/g MV) e verificaram consumo de MS 12,3% superior para a silagem com inoculante. De acordo com McDonald et al. (1991), a fermentação por leveduras gera perda de matéria seca de 48,9%, devido à

produção de etanol e CO₂. Essas perdas podem ser aumentadas, em razão da volatilização do etanol, sobretudo em silos de grande escala. Em vários estudos, observaram-se baixos teores de etanol nas silagens de cana-de-açúcar. Segundo esses autores, o etanol deve ter sido perdido por volatilização durante o processo de retirada da forragem dos silos (PEDROSO et al., 2006; QUEIROZ et al., 2008; SCHMIDT et al., 2007).

Em virtude da sua capacidade de produção de ácido acético, no caso de *L. kefir* e também de 1,2-propanodiol, as bactérias heterofermentativas se diferenciaram, com resultados positivos em relação ao controle no que diz respeito à produção de etanol, em que o ácido acético produzido em níveis mais elevados, em combinação com menor produção de ácido láctico, pode ter minimizado a produção de etanol.

Tabela 3 - Perfil fermentativo e populações microbianas de silagens de cana-de-açúcar tratadas com inoculantes bacterianos

Item	Tratamento				EPM	P
	C	LB	LK	LBK		
Bactérias lácticas, log UFC/g	6,93a	5,31b	5,66b	5,56b	0,16	<0,01
Leveduras, log UFC/g	3,41b	4,75a	2,72b	4,97a	0,21	<0,01
Fungos filamentosos, log UFC/g	1,74	1,62	1,48	1,48	0,28	0,90
pH	3,84	3,85	3,86	3,83	0,01	0,32
Etanol, %MS	13,35a	6,60b	7,32b	6,73b	0,27	<0,01
Ácido láctico, %MS	3,42a	3,01b	2,58c	2,86bc	0,09	<0,01
Ácido acético, %MS	2,02b	2,18b	2,56a	2,32ab	0,08	<0,01
Acetona, mg/kg MS	41b	61b	84ab	140a	18,1	<0,01
Acetato de etila, mg/kg MS	573a	416b	583a	411b	26,3	<0,01
1-propanol, mg/kg MS	330a	<0,1b	2b	<0,1b	3,6	<0,01
Lactato de etila, mg/kg MS	710a	438b	438b	476b	14,4	<0,01
2,3-butanodiol, mg/kg MS	1770a	607c	929b	731bc	67,1	<0,01
Ácido propiônico, mg/kg MS	161a	44b	30b	39b	13,5	<0,01
1,2-propanodiol, mg/kg MS	2484b	203d	7707a	923c	121	<0,01
Ácido butírico, mg/kg MS	25a	12b	6b	5b	3,0	<0,01
Ácido isovalérico, mg/kgMS	51a	17b	6b	9b	4,3	<0,01
Ácido valérico, mg/kg MS	34a	14b	1c	0,5c	3,2	<0,01

pH: potencial hidrogênio iônico; C: tratamento controle; LB: tratamento com *L. brevis*; LK: tratamento com *L. kefir*; LBK: tratamento combo *L. brevis* + *L. kefir*.

Médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P>0,05).

Outro fator interessante a ser observado nesse experimento é a produção de 1,2-propanodiol do tratamento LK, diferenciando-se significativamente em relação aos demais produtos resultantes da fermentação; alguns pesquisadores reportaram benefícios desses produtos no desempenho produtivo dos animais. Nishino et al. (2003), observando os trabalhos de Clapperton e Czerkawski (1972) e de Czerkawski e Breckenridge (1973), sugerem que o alto consumo de silagens inoculadas pode alterar o desempenho e a eficiência energética dos ruminantes. Daniel e Nussio (2011) afirmam que, em geral, o processo fermentativo de uma silagem acarreta perdas, mas os produtos finais dessa fermentação são essenciais para preservação do material, e que, além disso, esses compostos têm altos níveis de energia e são fontes de nutrientes significativas para o animal.

Foi observado maior ($P < 0,05$) teor de ácido butírico na silagem controle. Altos níveis de ácido butírico são caracterizados por uma fermentação majoritariamente realizada por clostrídeos. A presença de *Clostridium* spp. tem efeito negativo sobre a qualidade da silagem se o pH não for suficientemente baixo para inibir o seu crescimento, pois esses microrganismos fermentam açúcares, ácido lático e aminoácidos, produzindo ácido butírico e aminas, as quais podem prejudicar a ingestão de forragem (STEFANIE et al., 2000). A fermentação clostrídica resulta em perdas significativas de matéria seca, e os produtos da fermentação reduzem a palatabilidade, além de diminuir a estabilidade da silagem (MAHANNA, 1994; ROTZ; MUCK, 1994). O efeito mais prejudicial das bactérias produtoras de ácido butírico é o desdobramento de proteínas, resultando em material menos palatável e de odor desagradável (MCDONALD et al., 1991).

A estabilidade aeróbia, definida como o tempo, em horas, para elevação da temperatura em 2 °C, foi numericamente maior nas silagens inoculadas. No entanto, houve diferença significativa na temperatura acumulada em cinco dias (Tabela 4), sendo inferior para o tratamento LK, indicando minimização da deterioração aeróbia da silagem ($P < 0,02$). Leveduras são consideradas microrganismos *starters* de uma deterioração aeróbia (O'KIELY, 2009). Esse fato confirma o potencial da referida cepa em reduzir o impacto de uma deterioração aeróbia ou de melhorar a estabilidade aeróbia de uma silagem. Isso fica ainda mais evidente se for comparado o tratamento LK com o LBK. Além do fator UFC/g de forragem aplicado nesse tratamento, a eficiência de *L. kefir* foi superior em controlar o aumento da população de leveduras. Embora não tenha sido detectado nesse experimento, o que ainda poderia ter auxiliado a diminuir a

deterioração aeróbia é a transformação do 1,2-propanodiol em ácido propiônico, um conhecido agente antifúngico.

Tabela 4 - Efeito dos tratamentos na estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar

Item	Tratamento				EPM	P
	C	LB	LK	LBK		
Estabilidade aeróbia, h	42,2	40,2	52,7	38,9	5,90	0,37
Temperatura acumulada 5d, °C	25,1xy	27,7xy	21,9y	38,5x	4,52	0,09
pH 5d exposição aeróbia	3,76b	4,37ab	3,84b	4,83a	0,24	0,02
Perdas de MS 5d, %	2,73b	2,66b	2,26b	5,96a	0,69	<0,01
Temperatura acumulada 10d, °C	61,2	74,6	65,6	76,0	4,78	0,13
pH 10d exposição aeróbia	5,27b	5,46ab	5,30b	5,98a	0,17	0,03
Perdas de MS 10d, %	6,65	8,06	7,49	8,48	0,71	0,33

C: tratamento controle; LB: tratamento com *L. brevis*; LK: tratamento com *L. kefir*; LBK, tratamento combo *L. brevis* + *L. kefir*.

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P>0,05).

4 CONCLUSÃO

Os inoculantes, quando usados isoladamente, promoveram melhor perfil fermentativo, o que resultou em menor produção de etanol, maior teor de ácido acético, maior recuperação da matéria seca e diminuição da deterioração aeróbia.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ, F. J.; PRESTON, T. R. Ammonia/molasses and urea/molasses as additives for ensiled sugar cane. **Tropical Animal Production**, v. 1, p. 98-104, 1976.

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

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International** 16th ed. Washington, USA, 1997.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International** 17th. Gaithersburg, USA, 2000.

AVILA, C. L. S.; PINTO, J. C.; FIGUEIREDO, H. C. P.; MORAIS, A. R.; PEREIRA, O. G.; SCHWAN, R. F. Estabilidade aeróbia de silagens de capim-mombaça tratadas com *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 5, p. 779-787, 2009.

BERNARDES, T. F. **Características fermentativas, microbiológicas e químicas do capim-Marandu (*Brachiaria brizantha* (Hoschst ex. A. Rich) Stapf cv. Marandu) ensilado com polpa cítrica peletizada**. 118 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2003.

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. 148 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2004.

CLAPPERTON, J. L.; CZERKAWSKI, J. W. Metabolism of propane-1: 2-diol infused into the rumen of sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 27, p. 553-560, 1972.

CZERKAWSKI, J. W.; BRECKENRIDGE, G. Dissimilation of 1,2-propanediol by rumen micro-organisms. **British Journal of Nutrition**, v. 29, p. 317-330, 1973.

DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G. Contribution of silage volatile compounds for the animal nutrition. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2, São Pedro. **Proceedings...** São Pedro, FEALQ, p. 279-306, 2011.

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

DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTEVILLE, T. J. (Ed.). **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997, p. 520-556.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); Scientific Opinion on the safety and efficacy of *Lactobacillus brevis* (DSM 23231), *Lactobacillus buchneri* (DSM 22501), *Lactobacillus buchneri* (NCIMB 40788—CNCM I-4323), *Lactobacillus buchneri* (ATCC PTA-6138) and *Lactobacillus buchneri* (ATCC PTA-2494) as silage additives for all species. **EFSA Journal**, v. 11, n. 4, p. 3168, 2013.

doi:10.2903/j.efsa.2013.3168. Pesquisa online:

<www.efsa.europa.eu/efsajournal>. Acessado em: 12 de ago. de 2014.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); Scientific Opinion on the safety and efficacy of *Lactobacillus kefir* (DSM 19455) as a silage additive for all animal species. **EFSA Journal**, v. 11, n. 4, p. 3177, 2013. doi:10.2903/j.efsa.2013.3177.

Pesquisa online: <www.efsa.europa.eu/efsajournal>. Acessado em: 12 de ago. de 2014.

FILYA, I.; SUCU, E; KARABULUT, A. The effect of Propionibacterium acidipropionici, with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 444-451.

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 resíduos da colheita da soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 38-47, 2006.

HALL, M. B. **Neutral detergent-soluble carbohydrates, Nutritional relevance and analysis: a laboratory manual**. Gainesville: University of Florida, 2000. 42 p. (Bulletin, 339).

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

HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; DANNER, H.; BRAUN, R. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. **TRENDS in Biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 282-287, 2003.

JOBIM, C. C.; NUSSIO, L. G.; REIS, R. A.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 101-120, 2007. (Suplemento Especial)

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

KUNG JR., L.; STOKES, M. R.; LIN, C. J. Silage additives. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Eds.). **Silage science and technology**. Wisconsin: ASA; CSSA; SSSA, 2003. p. 305-360.

KUNG JR., L.; RANJIT, N. K. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1149-1155, 2001.

KUNG JR., L. Microbial and chemical additives for silage: effect on fermentation and animal response. In: Workshop sobre milho para silagem, 2., Piracicaba, 2000. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2000, p. 1-53.

KUNG Jr., L.; ROBINSON, J. R.; RANJIT, N. K.; CHEN, J. H. ; GOLT, 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. 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.

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: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2002. (CD-ROM).

MAHANNA, B. Proper management assures high-quality silage, grains, **Feedstuffs**, Minneapolis, v. 66, n. 10, p. 12-56, 1994.

MARI, L. **Desempenho de bovinos de corte alimentados com rações contendo cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) fresca ou ensilada e o padrão de fermentação e a estabilidade aeróbica das silagens aditivadas**. 2008. 315 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2008.

McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow: Chalcomb Publication, 1991. 340 p.

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

- MUCK, R. E. A lactic acid bacteria strain to improve aerobic stability of silages. In: **Research Summaries**. Madison: U.S. Dairy Forage Research Center, 1996. p. 42-43.
- NSEREKO, V. L.; SMILEY, B. K.; RUTHERFORD, W. M.; SPIELBAUER, A.; FORRESTER, K. J.; HETTINGER, G. H.; HARMAN, E. K.; HARMAN, B. R. Influence of inoculating forage with lactic acid bacterial strains that produce ferulate esterase on ensilage and ruminal degradation of fiber. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 122-135, 2008.
- NIEBLAS, T. D.; SHIMADA, A. S.; PALACIOS, J. T. Manipulación de la fermentación en ensilaje de caña de azúcar y valor alimenticio para borregos. 3. Digestibilidad aparente. **Veterinaria México**, v. 13, p. 23-26, 1982.
- 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, SP, 2005, p. 193-218.
- NUSSIO, L. G.; SCHMIDT, P.; PEDROSO, A. F. Silagem de cana-de-açúcar. In: FORRAGICULTURA E PASTAGENS, TEMAS EM EVIDÊNCIA, SUSTENTABILIDADE, 4., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 49-74.
- O'KIELY, P. O.; CLANCY, M.; DOYLE, E. M. Aerobic stability of grass silage mixed with a range of concentrate feedstuffs at feed-out. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., 2001. São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba, SP, FEALQ, 2001. p. 794-795.
- O'KIELY, P. Chemical additives and the aerobic stability of silages. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2009. São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba, SP. FEALQ, 2009. p. 155-174.
- OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J. C.; SPOELSTRA, S. G.; FABER, F.; DRIEHUIS, F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2 propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 125-132, 2001.
- PEDROSO, A. F. **Aditivos químicos e microbianos como inibidores da produção de etanol em silagens de cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2003. 120 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo, SP, 2003.
- 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.
- PRYCE, J. D. A modification of Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **Analyst**, Cambridge, v. 94, p. 1151-1152, 1969.

RANJIT, N. K.; KUNG, 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.

ROCHA, K. D.; PEREIRA, O. G.; VALADARES FILHO, S. C.; OLIVEIRA, A. P.; PACHECO, L. B. B.; CHIZZOTTI, F. H. M. Valor nutritivo de silagens de milho (*Zea mays* L.) produzidas com inoculantes enzimo-bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 389-395, 2006.

RODRIGUES, P. H. M.; ANDRADE, S. J. T.; RUZANTE, J. M.; LIMA, F. R.; MELOTTI, L. Valor nutritivo da silagem de milho sob o efeito da inoculação de bactérias ácido-láticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 6, p. 2380-2385, 2002.

RODRIGUES, P. H. M.; RUZANTE, J. M.; SENATORE, A. L.; LIMA, F. R.; MELOTTI, L.; MEYER, P. M. Avaliação do uso de inoculantes microbianos sobre a qualidade fermentativa e nutricional da silagem de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 3, p. 538-545, 2004.

ROTZ, C. A.; MUCK, R. E. Changes in forage quality during harvest and storage. In: **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison: ASA; CSSA; SSSA, 1994. p. 828-868.

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

SCHMIDT, P. Improved efficiency of sugarcane ensiling for ruminants supplementation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 1., 2009, Piracicaba. **Proceedings...** Piracicaba, SP, FEALQ, 2009. p. 47-72.

SILVA, A. V.; PEREIRA, O. G.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S. C.; CECON, P. R.; FERREIRA, C. L. L. F. Composição bromatológica e digestibilidade *in vitro* da matéria seca de silagens de milho e sorgo tratadas com inoculantes microbianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 1881-1890, 2005.

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, 2007c.

SOUSA, D. P.; MATTOS, W. R. S.; NUSSIO, L. G. Efeito de aditivo químico e inoculantes microbianos na fermentação e no controle da produção de álcool em silagens de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 9, p. 1564-1572, 2008.

STEFANIE J. W. H.; ELFERINK, O.; DRIEHUIS, F.; GOTTSCHAL, J. C.; SPOELSTRA, S. F. Silage fermentation processes and their manipulation. In: ELETRONIC CONFERENCE ON TROPICAL SILAGE, 2000, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 2000. p. 17-30.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

WEINBERG, Z. G.; SZAKACS, G.; ASHBELL, G.; HEN, Y. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *L. plantarum*, applied at ensiling, on the ensiling fermentation and aerobic stability of wheat and sorghum silages. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 218-222, 1999.

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

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