

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

Alterações microbiológicas e químicas na silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) *in natura* e queimada, inoculadas ou não, com *Lactobacillus buchneri*.

Juliano Vittori

Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

Alterações microbiológicas e químicas na silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) *in natura* e queimada, inoculadas ou não, com *Lactobacillus buchneri*.

Juliano Vittori

Orientador: Prof. Dr. Ruben Pablo Schocken-Iturrino

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, *Campus* de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANO VITTORI – Nascido em 26 de fevereiro de 1982, em Ribeirão Preto - SP, filho de Clovis Luiz Vittori e Maria de Lourdes Ferreira Vittori. Ingressou no curso de Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista – UNESP, *Campus* de Jaboticabal - SP em março de 2002, onde foi bolsista de IC-CNPq no período de 2004 a 2006, obtendo o título de Zootecnista em julho de 2006. Iniciou em março de 2007 o curso de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária pela mesma instituição, sob orientação do Prof. Dr. Ruben Pablo Schocken-Iturrino. No período de maio a novembro de 2008 realizou estágio de mestrando junto a University of Illinois-Champaign/Urbana – EUA, como bolsista da CAPES, sendo submetido à defesa de dissertação em junho de 2009.

Aos meus pais

Clóvis e Lourdes, pelos exemplos de coragem e determinação na busca dos ideais e
pela dedicação e amor durante toda uma vida

DEDICO

Aos meus irmãos

Luciano e Fabiano

pelo apoio, incentivo, amizade e amor que sempre demonstraram.

OFEREÇO

Agradecimento especial

Ao Professor Pablo, pela nossa grande amizade e pelos ensinamentos que o mesmo tem proporcionado desde a época de estagiário. Pessoa única e fundamental no meu crescimento acadêmico e pessoal. Foram anos de vivência e aprendizado, que levaram-me a respeitá-lo e admirá-lo como pessoa e profissional.

A você Professor Pablo fica minha eterna gratidão e o meu sincero MUITO OBRIGADO!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino pela grande amizade, ajuda, orientação e dedicação durante todos esses anos.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Jaboticabal, pela oportunidade e pela minha formação profissional.

A todos os professores de pós-graduação da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, pela contribuição na minha formação.

Ao professor Dan Faulkner da Universidade de Illinois – EUA, pelo apoio e ensinamentos proporcionados durante o período de estágio.

Ao professor Ricardo Reis, pela orientação na área de forragicultura e pelos ensinamentos que me proporcionou.

Ao Gustavo Rezende Siqueira pelas orientações e cooperação no andamento do experimento.

A Mariana Castelleti Beraldo pela grande amizade e ajuda na execução da parte laboratorial do experimento, a qual sem sua ajuda, a realização deste trabalho não seria possível.

Aos amigos e colegas de laboratório Silvina, César, Adriana, Gislaine, Tammy, Carol, Márcia, Marita, Natalie, Gisela e Katia, aos quais tenho imenso carinho e admiração.

A Rosane Oliveira, que através de seu apoio e dicas, tornou possível a realização do meu estágio no Exterior.

Aos funcionários e professores do Departamento de Microbiologia, em especial Edna e Rosangela.

Aos componentes da banca examinadora pelas sugestões e correções deste trabalho.

Aos amigos, companheiros e ex-moradores da República Abatedouro: Hamilton (Uruka), Gustavo (Lupus), Rodnei (Lampião), Ricardo (K-pão) Caio (Mandrúvá) e Fernando (Leitão) pelos momentos felizes e pelos dias e noites que compartilhamos juntos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior, pela concessão de bolsa de estudos.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para realização e conclusão do trabalho.

Muito obrigado !

SUMÁRIO

	Página
Lista de tabelas	ix
Lista de figuras	x
Resumo.....	xii
Summary.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Processo de ensilagem	3
2.2. Microrganismos deteriorantes após abertura dos silos	4
2.2.1. <i>Bacillus</i>	5
2.2.2. Enterobactérias.....	6
2.2.3. Fungos filamentosos.....	7
2.2.4. Leveduras	7
2.3. Ensilagem da cana-de-açúcar	9
2.4. <i>Lactobacillus buchneri</i>	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Localização e preparo das silagens	14
3.2. Amostragens e análises realizadas	14
3.3. Identificação dos fungos filamentosos	16
3.4. Análise estatística.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1. Contagem e dinâmica microbiana	18
4.2. Parâmetros químicos.....	22
4.3. Parâmetros microbiológicos e químicos nas diferentes alturas de coleta	27
4.4. Fungos filamentosos associados à ensilagem da cana-de-açúcar.....	29
5. CONCLUSÕES.....	33
6. REFERÊNCIAS	33

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Alterações microbiológicas nas silagens de cana-de-açúcar cruas ou queimadas, inoculadas ou não com <i>Lactobacillus buchneri</i> , analisadas após abertura dos silos (Média dos tratamentos no tempo), no segundo semestre de 2007 em Jaboticabal-SP.....	19
Tabela 2. Alterações químicas nas silagens de cana-de-açúcar cruas ou queimadas, inoculadas ou não com <i>Lactobacillus buchneri</i> , analisadas após abertura dos silos (Média dos tratamentos no tempo), no segundo semestre de 2007 em Jaboticabal-SP.....	23
Tabela 3. Efeito da profundidade nos parâmetros microbianos e químicos das silagens de cana-de-açúcar avaliadas após abertura dos silos.....	28

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Destino do ácido orgânico em ambiente de baixo pH e na presença de célula microbiana.	12
Figura 2. Dinâmica da população de leveduras nas diferentes silagens de cana-de-açúcar avaliadas em diferentes dias após abertura dos silos	19
Figura 3. Dinâmica da população de fungos filamentosos nas diferentes silagens de cana-de-açúcar avaliadas em diferentes dias após abertura dos silos	20
Figura 4. Dinâmica da população de <i>Bacillus</i> nas diferentes silagens de cana-de-açúcar avaliadas em diferentes dias após abertura dos silos.....	20
Figura 5. Variação temporal dos valores de pH nas diferentes silagens de cana-de-açúcar avaliadas em diferentes dias após abertura dos silos.....	24
Figura 6. Variação temporal dos valores de matéria seca nas diferentes silagens de cana-de-açúcar avaliadas em diferentes dias após abertura dos silos	25
Figura 7. Variação temporal dos teores de proteína bruta nas diferentes silagens de cana-de-açúcar avaliadas em diferentes dias após abertura dos silos	26

- Figura 8.** Variação temporal dos teores de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) nas diferentes silagens de cana-de-açúcar avaliadas em diferentes dias após abertura dos silos.....27
- Figura 9.** Frequência dos gêneros de fungos filamentosos identificados na silagem de cana-de-açúcar, avaliada em diferentes períodos de aeração29
- Figura 10.** Frequência dos gêneros de fungos filamentosos identificados na silagem de cana-de-açúcar inoculada, avaliada em diferentes períodos de aeração30
- Figura 11.** Frequência dos gêneros de fungos filamentosos identificados na silagem de cana-de-açúcar queimada, avaliada em diferentes períodos de aeração.30
- Figura 12.** Frequência dos gêneros de fungos filamentosos identificados na silagem de cana-de-açúcar queimada e inoculada, avaliada em diferentes períodos de aeração31

ALTERAÇÕES MICROBIOLÓGICAS E QUÍMICAS NA SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR (*SACCHARUM OFFICINARUM* L.) IN NATURA E QUEIMADA, INOCULADAS OU NÃO, COM *LACTOBACILLUS BUCHNERI*.

RESUMO – Visando suplementar ruminantes no período seco, a cana-de-açúcar nos últimos anos tem sido bastante pesquisada e empregada como volumoso alternativo, principalmente na forma de silagem. Na ensilagem desta forrageira, principalmente quando utilizada após queima do canavial, ocorre uma alta atividade de leveduras epífitas que convertem os carboidratos solúveis da forragem em etanol, gás carbônico e água, levando a elevadas perdas de matéria seca, aumento no teor de fibra em detergente neutro e diminuição de consumo. Buscando amenizar esses problemas tem-se pesquisado inoculantes bacterianos compostos por bactérias ácido-produtoras, tais como o *Lactobacillus buchneri*. Sendo assim, objetivando avaliar os efeitos antimicrobianos e químicos na silagem de cana-de-açúcar queimada e inoculada com *Lactobacillus buchneri*, quatro silos de superfície foram analisados por meio dos seguintes tratamentos: cana-de-açúcar crua sem aditivo; cana-de-açúcar crua inoculada com *L. buchneri*; cana-de-açúcar queimada sem aditivo e cana-de-açúcar queimada e inoculada com *L. buchneri*. As amostragens foram efetuadas após 0, 21, 49, 77 e 105 dias de utilização dos silos, sendo retiradas do centro e superfície do painel. Houve redução na população de leveduras e fungos filamentosos nas silagens inoculadas e aumento nas queimadas. Constatou-se maior população de microrganismos na camada superficial, além de maiores valores de pH e nitrogênio amoniacal. Ocorreram menores perdas de matéria seca na silagem de cana-de-açúcar queimada e inoculada em relação ao seu controle. As silagens apresentaram os fungos filamentosos *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhizopus* e *Neurospora* após abertura, verificando-se redução na frequência dos mesmos ao longo do período. O inoculante exerceu um efeito redutor na população de leveduras e na perda de MS sendo esse efeito potencializado pela queima da cana-de-açúcar. A deterioração das diferentes silagens no pós-abertura, independente do tratamento, foi dominada pela ação das leveduras.

PALAVRAS-CHAVE: deterioração, ensilagem, fogo, inoculante, microrganismos, pH.

**MICROBIOLOGICAL AND CHEMICAL CHANGES ON SUGARCANE SILAGE
(*SACCHARUM OFFICINARUM* L.) CRUDE AND BURNED, INOCULATED OR
NOT, WITH *LACTOBACILLUS BUCHNERI*.**

SUMMARY – In order to supplement ruminants's diets in dry period, sugarcane in the last years has been researched and processed as silage to used as an alternative food. In this ensilage process, mainly after sugar cane plantation have been set on fire, occurs a high activity of yeasts that convert the soluble carbohydrates of the forage in ethanol, carbon dioxide and water, leading to dry matter losses, increase in fiber content and decrease in the intake. In a way to solve those problems bacterial inoculants produced with acid-producers bacteria's, such as *Lactobacillus buchneri*, have been researched. Considering this the aim of the present study was to evaluate the microbiological and chemical effects on burned sugarcane silage when inoculated with *Lactobacillus buchneri*. Four silos type surface were analyzed using the following treatments: sugarcane without additives; sugarcane inoculated with *L. buchneri*; burned sugarcane without additives; and burned sugarcane inoculated with *L. buchneri*. The samples were taken after 0, 21, 49, 77 and 105 days after opening the silos and they were taken from the center and the surface of the panel. There was a reduction in the population of yeasts and filamentous fungi in inoculated silages and an increase of them in burned silages. There was a greater population of microorganisms in the superficial layer, in addition to higher pH values and ammoniacal nitrogen. The burned silage inoculated with *L. buchneri* showed the least amount of losses of dry matter in comparison to the control sample. The fungi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhizopus* and *Neospora* were found in the silages after opening the silos and the frequency of these microorganisms decreased with the passing of time. The inoculating had an reducing effect in the yeast's population and in the loss of DM, and this effect was enhanced by the burn of the sugarcane. The deterioration of the different silages in the post-opening period, regardless the treatment, was dominated by the action of yeasts.

KEYWORDS: deterioration, ensilage, fire, inoculant, microorganism, pH.

1. INTRODUÇÃO

A variação na disponibilidade de forragem durante o ano tem sido apontada como um dos fatores que contribuem para a baixa produtividade dos rebanhos brasileiros mantidos em pastagem. De modo a contornar esse problema, a cana-de-açúcar nos últimos anos tem sido bastante pesquisada e empregada como volumoso alternativo para ruminantes. Apesar de a mesma apresentar alta produção por hectare e capacidade de manutenção do potencial energético durante o período seco, quando produzida para ser oferecida *in natura*, apresenta alguns inconvenientes como a contratação de mão-de-obra diária para cortes, despalhamento, desintegração e transporte, além dos riscos que a cultura sofre a incêndio acidental ou criminoso (BERNARDES et al., 2007; PEDROSO et al. 2007).

Em razão disso, muitos produtores têm optado pela ensilagem como alternativa de utilização desta forrageira. Essa técnica proporciona uma boa economicidade, gerada pela redução da utilização de mão-de-obra, além da liberação da área para rebrota homogênea das plantas, que permite melhor cobertura do solo e maior índice de área foliar para o período das águas e, conseqüentemente, menores gastos com o controle de plantas invasoras (FREITAS et al., 2006).

Na ensilagem da cana-de-açúcar, ocorre uma alta atividade de leveduras epífitas que convertem os carboidratos solúveis (CS) da forragem em etanol, gás carbônico e água, levando a elevadas perdas de matéria seca, aumento no teor de fibra em detergente neutro (FDN) e diminuição de consumo. A presença de leveduras é considerada indesejável, em vista que esse grupo de microrganismos está associado com a deterioração aeróbia das silagens (DRIEHUIS et al., 1999).

Apesar da cana-de-açúcar ser considerada uma cultura de baixo risco agrônômico, o fogo e a queima por geada representam riscos para o canavial, sendo a ensilagem uma boa opção em situações em que a queima constitui um acidente. Porém neste processo ocorrem reações de reversão da sacarose e aumento na população de leveduras que acarretam a uma conseqüente perda do valor alimentício e capacidade de estocagem do material no canavial (SIQUEIRA, 2005; BERNARDES et al., 2007).

Aliado a esse fato, a presença de O₂, pela entrada de ar durante o período de estocagem, principalmente na abertura do silo, favorece o desenvolvimento de microrganismos aeróbios indesejáveis e/ou patogênicos tais como as leveduras, fungos filamentosos, *Bacillus*, *Listeria monocytogenes* e enterobactérias. Esses microrganismos além de produzirem toxinas que acarretam problemas aos animais, utilizam carboidratos solúveis, ácidos orgânicos e compostos nitrogenados solúveis, como substratos para o seu desenvolvimento, com consequente perda do valor nutritivo (WOOLFORD, 1990; McDONALD et al., 1991).

Buscando minimizar esses problemas intrínsecos a ensilagem de cana-de-açúcar, bem como de outras forrageiras, tem-se pesquisado de maneira intensiva o uso de aditivos, principalmente inoculantes bacterianos compostos por bactérias ácido-produtoras. Dentre esses destaca-se o *Lactobacillus buchneri* que já é utilizado na Europa e EUA com intuito de melhorar a qualidade das silagens de milho, sorgo e de grãos de cereais. Essa bactéria produz ácido acético e 1,2-propanediol, que inibem principalmente o desenvolvimento e a sobrevivência de leveduras e fungos filamentosos, quando a silagem é exposta ao ambiente (DRIEHUIS et al., 1999, WEINBERG et al., 1999). No Brasil trabalhos como o de SIQUEIRA (2005) e PEDROSO et al. (2008) obtiveram bons resultados utilizando esse microrganismo em silagens de cana-de-açúcar, porém de maneira geral estudos microbiológicos em relação à dinâmica dos microrganismos envolvidos nesse processo após abertura dos silos ainda são incipientes.

Considerando que, após abertura, a silagem é exposta à deterioração aeróbia, processo caracterizado por aumentos de temperatura, pH e oxidação dos produtos da fermentação, e que a cana-de-açúcar quando utilizada para produção de silagem após queima acidental, tem um aumento na população de leveduras, os inoculantes, tais como o *Lactobacillus buchneri* são alternativas promissoras para evitar perdas elevadas na ensilagem desta forrageira.

Em face do exposto, este trabalho teve o objetivo de verificar alterações microbiológicas e químicas na silagem de cana-de-açúcar *in natura* e queimada,

inoculadas ou não, com *Lactobacillus buchneri* durante diferentes períodos de exposição aeróbia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Processo de ensilagem

É chamada silagem a forragem verde, succulenta, conservada por meio de um processo de fermentação anaeróbica. As silagens são guardadas em silos após processo de corte, compactação e vedação para que haja a fermentação.

O processo de ensilagem baseia-se na redução do pH da massa ensilada através principalmente da produção de ácido de láctico por bactérias ácido-produtoras por meio da fermentação de carboidratos solúveis da planta. Essa produção de ácido é exigida em quantidades suficientes para inibir o desenvolvimento de microrganismo deteriorantes, de modo a preservar essa material até que o mesmo seja fornecido ao animal (McDONALD et al., 1991).

O processo de ensilagem inicia-se após o corte da forrageira, a qual ainda permanece viva e respirando ativamente. Quando este material é ensilado, as células vivas continuam respirando até esgotar o oxigênio retido no meio do material ensilado. Junto a este material existe uma variedade de microrganismos como leveduras, fungos filamentosos e bactérias aeróbias. A atuação desses microrganismos, somada a respiração das células do material ensilado, consomem, num período de 4 a 6 horas, todo o oxigênio disponível, produzindo em contrapartida, dióxido de carbono, água e calor. Nesta fase a temperatura ideal deve estar entre 27 e 38° C, a qual será um meio propício ao desenvolvimento dos microrganismos produtores de ácido láctico. Se a compactação e vedação do material não forem bem feitas haverá excesso de oxigênio, que induzirá maior respiração celular, isso causará temperaturas acima de 44° C, reduzindo as chances de uma fermentação desejável. Como consequência, haverá uma redução no valor nutritivo da forragem, devido, principalmente às perdas de

digestibilidade de proteína. Nesta fase as enterobactérias, produtoras de ácido acético multiplicam-se em função do pH e temperatura (TORRES, 1984; STEFANIE et al., 2000).

À medida em que há redução do pH, e há consumo do oxigênio, as enterobactérias são substituídas por bactérias ácido lácticas, na maioria anaeróbias, representados por bactérias do gênero, *Streptococcus* e *Leuconostoc*, as quais reduzem ainda mais o pH dando possibilidade a multiplicação dos *Lactobacillus* e *Pediococcus*, que crescem mais lentamente, mas apresentam uma alta taxa de produção de ácido láctico, estabelecendo um pH entre 3,8 a 4,2.

Há uma perda inevitável, de ordem de 3%, de energia devido à transformação dos carboidratos em ácido láctico. O objetivo da ensilagem é não permitir que ela ultrapasse 5%. Ocorrem ainda redução de nitratos, degradação das proteínas em aminoácidos, amônia e outros produtos nitrogenados não protéicos. Sob boas condições de fermentação a ensilagem estará preservada em 2 a 3 semanas (TORRES, 1984). Essa redução no pH é fundamental na proteção contra microrganismos indesejáveis como *Clostridium* spp, que são responsáveis pela produção de ácido butírico, que além de provocar odor desagradável, interfere na aceitabilidade da silagem pelo animal. (WOOLFORD, 1990).

2.2. Microrganismos deteriorantes após abertura dos silos

Durante o desabastecimento dos silos a silagem volta a ser exposta ao ambiente aeróbio. Esse fato é inevitável, porém o mesmo pode ocorrer antes mesmo da abertura da silagem, no caso em que exista algum furo na lona causado por agente físico ou mesmo roedores ou pássaros. Esse processo é dividido em dois estágios.

Inicialmente essa degradação é iniciada pelo consumo dos ácidos orgânicos por leveduras e ocasionalmente por bactérias ácido acéticas. Essa redução ocasiona um aumento no pH, dando início a segunda fase de deterioração, a qual está associada a uma elevação da temperatura, dando oportunidade aos *Bacillus* de multiplicarem-se.

Nesse último estágio, outros microrganismos aeróbios (facultativos) como fungos filamentosos e enterobactérias podem voltar a atuar (WOOLFORD, 1990; OSTLING & LINDGREN, 1995; STEFANIE et al., 2000).

2.2.1. *Bacillus*

As bactérias do gênero *Bacillus* caracterizam-se por serem microrganismos em forma de bastonetes, formadores de esporos, aeróbios ou aeróbios facultativos produtores de catalase e fermentadores de proteína (WOOLFORD, 1984).

Acreditava-se que esse microrganismo apresentava função secundária na deterioração das silagens quando comparado com as leveduras (WOOLFORD, 1990). Porém, extensos estudos revelaram que eles exercem uma função muito mais importante do que se acreditava para determinadas espécies forrageiras. Várias pesquisas realizadas na América do Norte e Europa têm demonstrado que as bactérias do gênero *Bacillus* estão presentes nas silagens nas fases finais de deterioração, quando houve consumo de ácido láctico pelas leveduras e então o alimento apresenta elevado valor de pH. Entretanto, no ambiente tropical, no qual as forrageiras são caracterizadas por um processo de fermentação onde os valores de pH se estabilizam acima de 4,5, tem-se condições favoráveis ao desenvolvimento deste tipo de bactéria (BERNARDES, 2003).

A maioria das espécies possuem enzimas sacarolíticas e proteolíticas sendo as espécies *B. cereus*, *B. lentus*, *B. firmus* e *B. sphaericus* as principais responsáveis na deterioração de silagens (McDONALD et al., 1991).

Algumas espécies tais como o *B. subtilis* e o *B. licheniformis* tem sido utilizadas para inibir o desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos dada sua atividade antifúngica, principalmente em silagens de grão úmido como verificado no trabalho PAHLOW et al. (2003).

As bactérias do gênero *Bacillus* podem passar da silagem para as fezes através do sistema digestório dos ruminantes, acarretando uma maior contaminação do leite,

sendo consideradas um agente patogênico pelos laticínios, dada sua resistência a pasteurização e aumento de sua população mesmo a baixas temperaturas (PAHLOW et al., 2003).

2.2.2. Enterobactérias

As enterobactérias são microrganismos gram-negativos não formadores de esporos e anaeróbios facultativos, normalmente não patogênicos em silagens, móveis e fermentadores de carboidrato, tendo como subproduto ácido acético (McDONALD et al., 1991). No processo de ensilagem estão relacionadas ao consumo inicial de oxigênio sendo rapidamente inibidas pelo desenvolvimento de bactérias ácido-láticas, com subsequente queda no pH.

As mesmas são inibidas com pH abaixo de 4,5, porém podem voltar a atuar no pós-abertura através do consumo de ácido lático e acético se as condições de anaerobiose não forem alcançadas adequadamente. OSTLING & LINDGREN (1995) afirmaram que a presença de enterobactérias, por outro lado, pode tornar a silagem mais estável na fase aeróbia através da produção de alguns compostos durante a fermentação, levando a inibição de leveduras durante a exposição aeróbica. Somado a esse fato as enterobactérias podem produzir nitrito e óxido nítrico que são compostos inibidores de *Clostridium* (ARCURI et al., 2003).

As principais espécies encontradas em gramíneas frescas são *Erwinia herbicola* e *Rahnella aquitilis* sendo que no processo de ensilagem é sucedida por *Hafnia alvei* e posteriormente por *Escherichia coli* e *Serratia fonticola* (OSTLING & LINDGREN, 1995). As mesmas podem deaminar e descarboxilar alguns aminoácidos, formando amônia durante a ensilagem, apesar de possuírem fraca atividade proteolítica (McDONALD et al., 1991; HENDERSON, 1993).

2.2.3. Fungos filamentosos

A deterioração aeróbia da silagem está associada, principalmente, com o desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras. Estes microrganismos apresentam alta resistência as variações do pH e sobrevivem em meio anaeróbio.

Aliado a esse problema o oferecimento de material com alta concentração de fungos filamentosos e a exposição a esporos fúngicos pode ser prejudicial à saúde dos animais, especialmente ruminantes jovens (MUCK et al., 1984; WITTENBERG et al, 1996) e equinos (CUNHA, 1991) bem como as pessoas que manuseiam a forragem, devido à presença de toxinas, especialmente aquelas relacionadas com fungos patogênicos, como o *Aspergillus glaucus* e *Aspergillus fumigatus* (MOSER, 1980; REIS & RODRIGUES, 1992).

Os fungos presentes na deterioração da silagem são representados por muitos gêneros, incluindo os tipos termofílicos. Em algumas silagens, o desenvolvimento dos fungos filamentosos segue os das leveduras e isso frequentemente é refletido no aparecimento de dois picos de elevação da temperatura durante a deterioração. O primeiro pico pode ocorrer dentro de dois a três dias de exposição ao ar, que é atribuído as leveduras e o segundo, ocorrendo de três a quatro dias após o primeiro, podendo ser atribuído aos fungos filamentosos. Um grande número de espécies tem sido isoladas de silagens deterioradas incluindo membros do gênero *Monascus*, *Geotrichum*, *Bissochlamys*, *Mucor*, *Monilia*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (McDONALD et al., 1991).

2.2.4. Leveduras

As leveduras são organismos eucariotas, anaeróbios facultativos e heterótrofos. Sob condições de anaerobiose fermentam açúcar em etanol e CO₂. Essa produção de etanol além de diminuir a quantidade de açúcar disponível para as bactérias ácido-produtoras, podem afetar o sabor do leite (RANDBY et al., 1998). Além disso, o etanol

residual na silagem provoca rejeição de consumo pelo animal, logo após seu fornecimento no cocho (SCHMIDT et al., 2004), contudo se ingerido apresenta significativa contribuição energética ao animal, por via direta.

Em condições de aerobiose, muitas leveduras podem degradar o ácido láctico a CO_2 e H_2O . Essa degradação provoca um aumento no pH do silagem, dando oportunidade de outros microrganismos deteriorantes voltarem a atuar (McDONALD et al., 1991).

Apesar de serem capazes de fermentar açúcares e produzir lactato e acetato, sua presença na silagem não é desejável, pois primeiramente estão associadas com deterioração, e em segundo lugar competem com as bactérias ácido-láticas por substrato, que fermentam principalmente a etanol, contribuindo pouco para a preservação da silagem (WOOLFORD, 1990).

Segundo McDONALD et al. (1991), esses microrganismos não são inibidos pelo pH das silagens, podendo ser encontradas com valores variando de 3,0 a 8,0. Em condições aeróbias são capazes de tolerar ácidos orgânicos melhor do que qualquer microrganismo, obtendo energia pela fermentação de açúcares. Sua sobrevivência na silagem depende de fatores como anaerobiose bem como a concentração de ácidos orgânicos, sendo que a presença de oxigênio aumenta a sobrevivência e a multiplicação desse microrganismo durante estocagem (JONSSON & PAHLOW, 1984).

Na silagem seu principal papel consiste em deteriorar esse alimento quando o mesmo é exposto ao ar. A maioria encontrada em forragem fresca é constituída de espécies não fermentativas como os gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Candida* e *Hansenula*. Após estabelecer um ambiente anaeróbio no silo, as espécies aeróbias são sucedidas pelas leveduras fermentativas, cujas principais espécies são: *Torulopsis* e *Saccharomyces*. Caso haja entrada de ar no silo durante a fermentação, as leveduras fermentadoras de lactato dominam, mas se prevalecerem às condições anaeróbias estas espécies serão reduzidas a 15% do total e permanecerão as *Saccharomyces*, que embora fermentativas não usam o lactato (WOOLFORD, 1990).

2.3. Ensilagem da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é amplamente utilizada como forragem suplementar de inverno no Brasil e em outros países de clima tropical, sendo utilizada também como principal volumoso em fazendas produtoras de leite e em confinamentos de gado de corte (PEDROSO et al., 2007). É uma forrageira com grande potencial de produção de MS e energia por área e permite bom desempenho dos animais quando corretamente suplementada com proteínas e minerais (BOIN & TEDESCHI, 1993). Seu valor nutritivo é mantido durante os meses de inverno, sendo tradicionalmente fornecida fresca aos animais. A ensilagem tem sido utilizada para evitar as operações diárias de corte e transporte da cana e pode colaborar ainda para o aumento da produtividade e da vida útil dos canaviais pela maior eficiência nos cuidados pós-colheita, como capina e fertilização. Serve ainda para evitar a perda total da forragem em casos de incêndio ou de geadas (BERNARDES et al., 2007; PEDROSO et al., 2007).

A cana-de-açúcar caracteriza-se por possuir um alto teor de carboidratos solúveis e uma grande população de leveduras epífitas. Quando essa forrageira é utilizada na forma de silagem, essas condições favorecem uma intensa fermentação alcoólica, através da conversão desses CS a etanol, CO₂ e água (McDONALD et al., 1991). Como resultado a silagem de cana-de-açúcar pode apresentar perdas excessivas de matéria seca (MS), redução nos teores de CS e em seu valor nutritivo, refletindo dessa forma uma diminuição no desempenho animal (ALLI et al., 1982).

Segundo KUNG Jr. & STANLEY (1982) e PEDROSO et al. (2005), teores de etanol de 8 a 17% da MS têm sido relatados para cana-de-açúcar ensilada sem o uso de aditivos, resultando em perdas aproximadas de 30% da MS durante o processo.

Outro problema vinculado à utilização dessa forrageira como volumoso está relacionado aos riscos que a mesma sofre a incêndio acidental ou criminoso. Essa queima inviabiliza a manutenção do canavial na forma de capineira para ser utilizado no período de escassez de forragem. Nesse caso a ensilagem da cana-de-açúcar apresenta-se como forma preventiva, ou mesmo, curativa no caso de incêndios acidentais, porém BERNARDES et al. (2007) verificaram que essa forrageira quando

utilizada para ensilagem após queima apresenta um aumento significativo na população de leveduras. Nesse estudo as silagens de cana-de-açúcar queimadas apresentaram maiores concentrações de etanol (7,3 *versus* 6,5 %) e maiores populações de leveduras (2,7 *versus* 2,2 log ufc/g de silagem), quando comparadas as silagens de cana-de-açúcar crua.

Altas contagens de leveduras causam a deterioração das silagens expostas ao ar durante a estocagem ou após a abertura dos silos, promovendo aumento do pH e do risco de desenvolvimento de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes, como *Listeria monocytogenes*, fungos filamentosos, *Bacillus* e enterobactérias (WOOLFORD, 1990; ROTZ & MUCK, 1994).

2.4. *Lactobacillus buchneri*

Visando controlar a fermentação alcoólica, bem como a degradação das silagens no pós-abertura tem-se preconizado a utilização de aditivos microbianos, compostos principalmente por bactérias ácido-produtoras.

Dentre os aditivos microbianos, encontramos inoculantes compostos por bactérias heterofermentativas ou homofermentativas. Inoculantes contendo bactérias homofermentativas promovem maior eficiência na produção de ácido lático, maior rapidez na acidificação e menor pH final, além de redução na taxa de degradação protéica destas silagens (WEINBERG & MUCK, 1996). Sabendo que as leveduras podem sobreviver em pH próximo ou inferior a 2 (McDONALD et al., 1991), SOUZA et al. (2008) citam que a maior produção de ácido lático nas silagens aditivadas não seria eficiente em controlar as leveduras em silagens de cana-de-açúcar como verificado nos trabalhos de PEDROSO, (2003) e FREITAS et al., (2006).

Desta forma tem-se estudado a utilização do *Lactobacillus buchneri*, tendo em vista a sua característica heterofermentativa, em que através de uma via metabólica de degradação anaeróbia do ácido lático, converte-se um mole de ácido lático em meio mol de ácido acético, meio mol de 1,2-propanodiol e traços de etanol (OUDE

ELFERINK et al., 2001). Esse microrganismo produz ácidos orgânicos considerados fracos, no que se refere à eficiência em reduzir o pH da massa ensilada. No entanto, a ação desses ácidos ocorre sobre o metabolismo de leveduras e fungos filamentosos. Segundo MOON (1993) o ácido acético teria efeito positivo na inibição de leveduras e consequente na fermentação alcoólica.

A capacidade do *L. buchneri* de degradar em condições anaeróbias, ácido láctico em ácido acético e 1,2-propanodiol, em quantidades equimolares foi demonstrada por OUDE ELFERINK et al. (2001). Vale ressaltar, que a redução de ácido láctico representa diminuição de substrato potencialmente fermentável por leveduras. Sendo assim, no caso da ensilagem da cana-de-açúcar, esse efeito apresenta grande interesse durante o processo fermentativo e no pós-abertura (SIQUEIRA, 2005).

Segundo McDONALD et al. (1991), bactérias heteroláticas fermentam glicose produzindo ácido láctico e etanol, já a frutose é fermentada a ácido láctico, acético e manitol; porém o *L. buchneri* não possui a enzima acetaldéido desidrogenase responsável pela redução de acetaldéido a etanol. Portanto esse microrganismo não produz etanol, consequentemente ocorre aumento na concentração de ácido acético como produto final de sua fermentação.

O ácido acético em solução com pH inferior ao pK_a encontra-se não dissociado, permitindo a sua entrada por difusão passiva nas células das leveduras. A dissociação desse ácido e liberação do íon H^+ é tóxica às leveduras, promovendo dessa forma um gasto de energia (ATP) para expulsar o H^+ , proporcionando assim decréscimo na multiplicação desses microrganismos e até mesmo sua morte (Figura 1) (McDONALD et al., 1991).

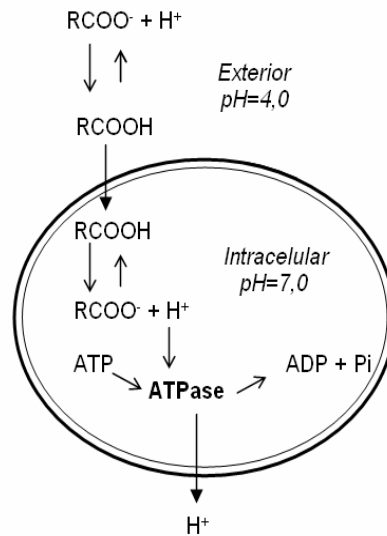


Figura 1- Destino do ácido orgânico em ambiente de baixo pH e na presença da célula microbiana (BERNARDES, 2006; adaptado de DAVIDSON, 1997).

Atualmente diversos pesquisadores brasileiros tem estudado a utilização do *Lactobacillus buchneri* na ensilagem de cana-de-açúcar.

PEDROSO et al. (2002) avaliaram a adição de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus buchneri* em silagens de cana-de-açúcar, após 90 dias de fermentação, verificando redução na produção de etanol (1,75%), menores perdas gasosas (8,4%) e maior recuperação da matéria seca nas silagens inoculadas com o *L. buchneri*.

O mesmo autor e colaboradores em 2007, avaliando a eficácia de aditivos químicos e inoculantes bacterianos na inibição da produção de etanol, diminuição das perdas de MS e na melhoria da digestibilidade *in vitro* de silagens de cana-de-açúcar, verificaram redução na perda total de MS nas silagens inoculadas com essa bactéria, porém observaram também que nenhum dos aditivos foi capaz de reduzir a concentração de etanol nas silagens, incluindo dentre eles o *Lactobacillus buchneri*.

Avaliando a fermentação, perdas e estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos ou bacterianos, PEDROSO et al. (2008), constataram redução de 50% no etanol da silagem inoculada com *Lactobacillus*

buchneri, em relação ao controle. Nessa mesma comparação, observaram também menores contagens de leveduras e aumento na estabilidade aeróbia.

SIQUEIRA et al. (2009) avaliaram o efeito da queima e do tratamento com aditivos químicos (uréia, benzoato de sódio e hidróxido de sódio) e inoculantes microbiológicos (*Propionibacterium acidipropionici* + *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus buchneri*) na ensilagem da cana-de-açúcar. Os autores verificaram que o *Lactobacillus buchneri*, juntamente com o hidróxido de sódio foram os mais eficientes em controlar as perdas qualitativas durante o processo fermentativo da ensilagem da cana-de-açúcar crua ou queimada.

SOUZA et al. (2008) estudando a eficácia de uréia e inoculantes microbianos nas alterações fermentativas de cana-de-açúcar, contraditoriamente verificaram que as silagens inoculadas com *L. buchneri* apresentaram maior produção de etanol, 11,53% versus 8,27%, da silagem controle, o que refletiu em perdas significativas e baixa recuperação de MS, além de baixa digestibilidade pela perda de CS e pelo acúmulo de FDN, que foram similares aos das silagens sem aditivo. Em relação à contagem de leveduras, o inoculante também não exerceu efeito significativo comparativamente ao controle.

De maneira geral os estudos em relação à ensilagem da cana-de-açúcar concluem que a silagem confeccionada sem aditivo controlador da população de leveduras apresenta grandes perdas de matéria seca e carboidratos solúveis devido à grande população de leveduras e conseqüentemente extensa produção de etanol (SIQUEIRA, 2005), porém estudos microbiológicos ainda são incipientes, principalmente em relação à dinâmica dos microrganismos envolvidos nesse processo após abertura dos silos, e de qual forma os mesmos interagem com o *Lactobacillus buchneri* e a queima dessa forrageira antes da ensilagem.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização e preparo das silagens

O experimento foi conduzido na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) - Alta Mogiana, Colina-SP, durante o 2º semestre de 2007. A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) ensilada foi o cultivar IAC86-2480. Foram realizadas queimadas no canavial, de modo a simular uma queima acidental. A colheita da forragem foi realizada após 18 meses do plantio, com ensiladeira Menta Mit 3000 produzindo partículas de 1 a 3 cm, sendo as canas-de-açúcar (queimada e crua) submetidas aos seguintes tratamentos: cana-de-açúcar crua sem aditivo (CC); cana-de-açúcar crua inoculada com *L. buchneri* (CI); cana-de-açúcar queimada sem aditivo (CQ) e cana-de-açúcar queimada e inoculada com *L. buchneri* (CQI). O microrganismo *L. buchneri* (Cepa NCIMB40788) é encontrado no inoculante comercial LalsilCana® (BUCH) e foi aplicado utilizando-se uma bomba costal, respeitando-se a dose de 5×10^4 ufc/g de massa ensilada, a qual equivale a 2 g de inoculante diluído em 2 L de água por t de massa ensilada.

Os materiais foram acondicionados em quatro silos do tipo superfície até completarem aproximadamente 100 t. A compactação foi feita através de tratores, sendo a massa posteriormente coberta por lona plástica dupla face de 200 micras. Sacos de areia foram colocados sobre a lona e ao redor do silo para vedação do processo. As dimensões de cada silo eram de 4 metros de largura, 1,5 m de altura na região central e 25 m de comprimento.

3.2. Amostragens e análises realizadas

As amostragens foram efetuadas após 0, 21, 49, 77 e 105 dias da abertura dos silos (60 dias de vedação). As amostras foram retiradas em pontos aleatórios de duas alturas do painel, sendo elas a 10 cm da superfície e no centro (1,00m do topo). As

mesmas foram coletadas manualmente atingindo 10 cm dentro do painel, sendo que os silos eram recobertos após esse manejo. A velocidade de retirada de silagem de cada silo era de aproximadamente 1,00 m/semana (15 cm de fatia/dia).

Cada amostra foi subdividida em três subamostras, tendo cada uma aproximadamente 300g: a primeira foi utilizada para as análises microbiológicas, sendo acondicionadas em sacos plásticos e enviadas sob refrigeração em caixas isotérmicas esterilizadas ao laboratório para análises; a segunda para análise de MS e proteína bruta (PB), como descrito por SILVA & QUEIROZ (2002), em que foi realizado uma pré-secagem em estufas de circulação forçada a 60°C, por 72 horas e moagem até atingirem pedaços menores que 6 mm, sendo posteriormente armazenados em potes plásticos; e a terceira que foi preparada segundo a metodologia descrita por KUNG Jr. et al. (1984) para determinação do pH com o uso do potenciômetro e teores de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), segundo SILVA & QUEIROZ (2002).

As análises da 2^o e 3^o subamostras foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (FCAV UNESP Jaboticabal – SP). As análises microbiológicas foram realizadas nos laboratórios de Bactérias Anaeróbias e de Defesa Fitossanitária da mesma universidade.

O preparo das amostras para análise microbiológica consistiu de uma diluição prévia, pesando-se 25 g de silagem (matéria verde) e adicionando a 225 ml de solução salina estéril (8,5 g de NaCl/litro de água destilada). Após agitação foram retirados 10 mL do extrato para as diluições posteriores, e a partir dos extratos diluídos (10⁻¹ a 10⁻⁵) foram realizadas as semeaduras nos meios específicos para cada microrganismo estudado. Foi realizada contagem do número de colônias de leveduras, fungos filamentosos, *Bacillus* e enterobactérias.

O desenvolvimento de *Bacillus* foi realizado conforme SPECK (1984) utilizando-se o meio ágar nutriente (Difco) sendo que, as culturas foram incubadas em aerobiose a 30°C por três dias. Para determinar o desenvolvimento de enterobactérias nas silagens foi utilizado como meio de cultura Violet Red Bile Agar (Oxoid), com incubação aeróbia por três dias em temperatura de 35°C segundo JONSSON (1991). Para

contagem total de leveduras utilizou-se o meio Agar dextrose batata (Difco) acidificado com ácido tartárico para obtenção de pH 4,0 sendo que, as amostras foram incubadas por 3 dias a 28°C (KURTMAN & FELL, 1998). Também para contagem de fungos foi utilizado o mesmo meio de cultura e temperatura, sendo que a incubação foi realizada por 5 dias.

A diferenciação entre leveduras e fungos filamentosos foi realizada de acordo com a morfologia das colônias sabendo-se que as leveduras são microrganismos que apresentam colônias de aspecto cremoso, enquanto que os fungos filamentosos apresentam aspecto aveludado.

Todas as contagens foram feitas em unidades formadoras de colônias (UFC/g), sendo estas posteriormente transformadas em Log_{10} .

3.3. Identificação dos fungos filamentosos

Além da contagem foi realizado um levantamento dos gêneros de fungos filamentosos associados ao material ensilado. Para realização do mesmo foi utilizado o método do papel de filtro usado em testes de sanidade de sementes, o qual foi adaptado ao material ensilado. Este método consistiu em se colocar três folhas de papel de filtro por placa de Petri, previamente umedecidos com água destilada e esterilizada. Posteriormente, foram colocadas em cada placa, 10 fragmentos de 0,3 a 0,5 cm da cana-de-açúcar ensilada (por amostra), de maneira a ficarem equidistantes uns dos outros (LUCCA FILHO, 1987).

Os fragmentos das silagens foram retirados de partes da amostra escolhidas ao acaso, sendo incubados sob regime de luz alternada (12 horas de luz e 12 horas de escuro) por 7 dias, a uma temperatura de 20° C. Após o período de incubação os fragmentos foram examinados, individualmente, através de microscópio estereoscópio. Paralelamente, sempre que necessário, foram feitas lâminas das estruturas dos fungos filamentosos (micélio e corpo de frutificação) e examinadas em microscópio ótico

comum e comparadas segundo a descrição de BARNETT & HUNTER (1972) e HANLIN (1990) para facilitar a identificação.

Foi detectada apenas a porcentagem de ocorrência de cada gênero de fungo filamentosos estudado nas amostras. A estimativa dos fungos filamentosos foi calculada através da fórmula usada por SENTHILKUMAR et al. (1993):

$$\% \text{ de frequência} = \frac{\text{Número de amostras nas quais apareceram fungos filamentosos}}{\text{Número total de amostras examinadas}} \times 100$$

3.4. Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado num esquema de parcelas sub-subdivididas, sendo a parcela principal os tratamentos (cana-de-açúcar crua sem inoculante; cana-de-açúcar crua com inoculante; cana-de-açúcar queimada sem inoculante e cana-de-açúcar queimada com inoculante), a sub-parcela as duas profundidades de coleta (superfície e centro do painel) e a sub-subparcela os tempos de coleta (0, 21, 49, 77 e 105 dias após abertura).

Os dados foram analisados estatisticamente pelos procedimentos da análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%, utilizando o programa de Análise Estatística ESTAT, desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Contagem e Dinâmica microbiana

Através da Tabela 1 e figuras 2, 3, e 4 observa-se os efeitos microbiológicos (contagem e dinâmica) da queima e inoculação com *Lactobacillus buchneri* nas diferentes silagens de cana-de-açúcar. Observou-se que a queima provocou aumento significativo ($P < 0,05$) na população de leveduras (5,53 %) e *Bacillus* (3,14 %) e não significativo ($P > 0,05$) nos fungos filamentosos na silagem queimada em relação à crua. Resultados semelhantes foram encontrados por BERNARDES et al. (2007) que ao analisarem a fermentação da cana-de-açúcar queimada, verificaram aumento (18,51%) na contagem de leveduras no tratamento que sofreu queima. Segundo os autores, esse aumento é atribuído às altas temperaturas geradas por esse processo, que destroem a camada de cera que envolve a parede celular desta espécie vegetal, provocando rachaduras no colmo e conseqüentemente exsudação de conteúdo celular, aumentando dessa forma a contaminação microbiana, principalmente por leveduras.

Segundo os mesmos autores, outro aspecto relacionado à maior contagem de leveduras nas canas queimadas pode estar relacionado à maior proporção de açúcares na forragem submetida à queima, como resultado da eliminação da palha. No preparo das silagens do presente experimento, quantidades semelhantes de forragem foram acomodadas no silo (cana crua ou queimada), de modo que, como o fogo carboniza a palha, maior proporção de material vegetal com presença de açúcares foi disponibilizada a esses microrganismos.

Somado a esses fatos o aumento da temperatura podem provocar o desdobramento da sacarose em glicose e frutose. A presença de açúcares redutores (glicose e frutose) pode facilitar a fermentação alcoólica pelas leveduras, pois, segundo WALKER (1998), algumas espécies possuem invertase, enzima capaz de degradar a sacarose, enquanto outras cepas, por não possuírem a enzima, ficariam limitadas à fermentação desse dissacarídeo. Assim, com a presença de elevados teores de glicose e frutose, duas fontes de carbono capazes de ser facilmente fermentadas, as silagens

produzidas com cana queimada podem apresentar maior população de leveduras (BERNARDES et al., 2007), como observado neste estudo.

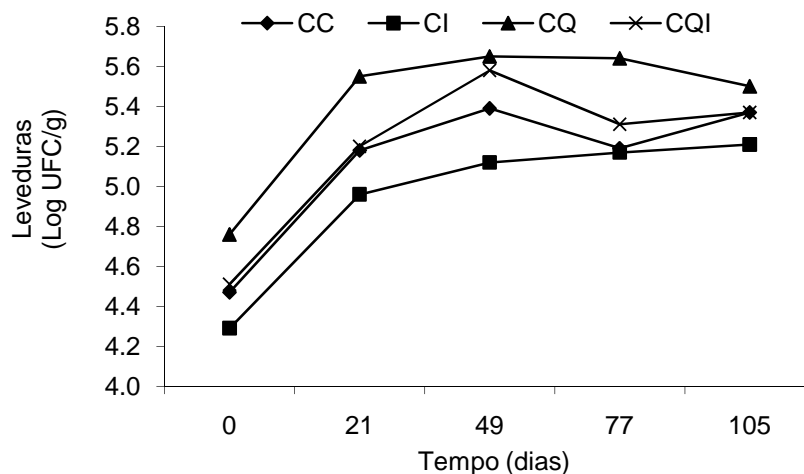
Tabela 1. Alterações microbiológicas nas silagens de cana-de-açúcar cruas ou queimadas, inoculadas ou não com *Lactobacillus buchneri*, analisadas após abertura dos silos (Média dos tratamentos no tempo), no segundo semestre de 2007 em Jaboticabal-SP.

Parâmetros avaliados	Tratamentos ¹				CV(%) ²
	CC	CI	CQ	CQI	
Leveduras (logUFC/g)	5,12 bc	4,95 c	5,42 a	5,19 b	5,06
Fungos filamentosos (logUFC/g)	2,57 ab	2,46 b	2,71 a	2,56 b	6,77
<i>Bacillus</i> (logUFC/g)	5,55 b	5,56 b	5,73 a	5,64 ab	3,18

¹ (CC) Cana-de-açúcar crua sem aditivo; (CI) Cana-de-açúcar crua inoculada com *L. buchneri*; (CQ) Cana-de-açúcar queimada sem aditivo; (CQI) Cana-de-açúcar queimada e inoculada com *L. buchneri*.

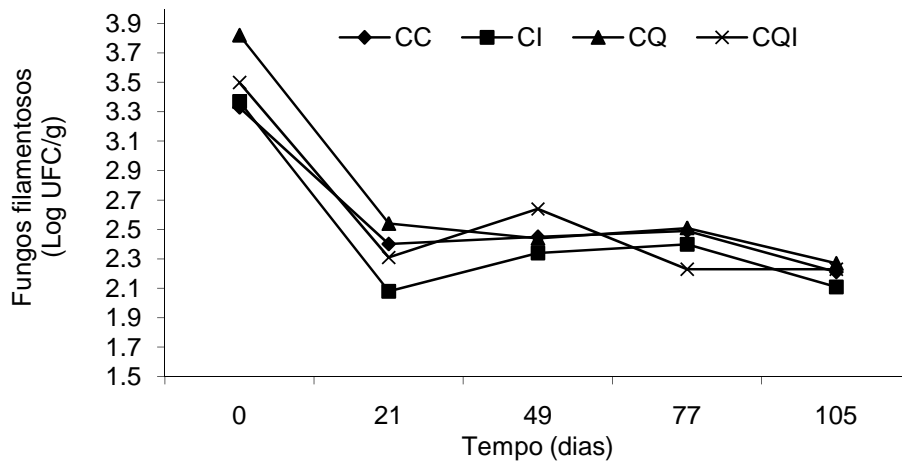
² CV= Coeficiente de variância

a, b, c Médias seguidas da mesma letra não diferem (P<0,05) pelo teste Tukey.



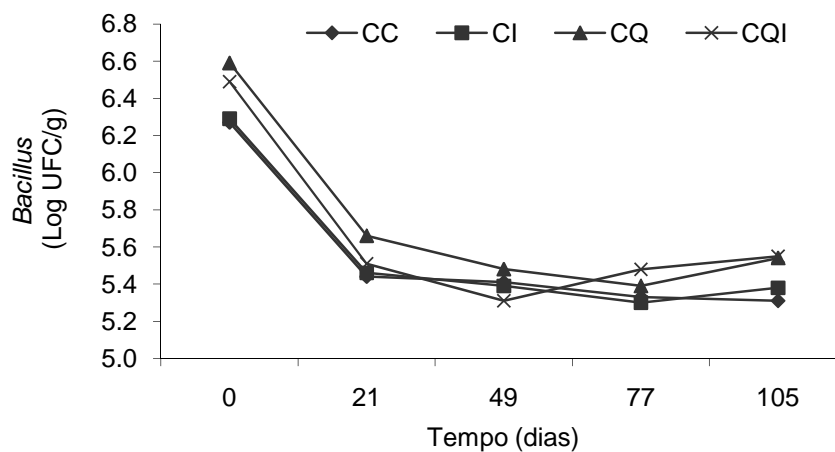
(CC) Cana-de-açúcar crua sem aditivo; (CI) Cana-de-açúcar crua inoculada com *L. buchneri*; (CQ) Cana-de-açúcar queimada sem aditivo; (CQI) Cana-de-açúcar queimada e inoculada com *L. buchneri*.

Figura 2. Dinâmica da população de leveduras nas diferentes silagens de cana-de-açúcar avaliadas em diferentes dias após abertura dos silos.



(CC) Cana-de-açúcar crua sem aditivo; (CI) Cana-de-açúcar crua inoculada com *L. buchneri*; (CQ) Cana-de-açúcar queimada sem aditivo; (CQI) Cana-de-açúcar queimada e inoculada com *L. buchneri*.

Figura 3. Dinâmica da população de fungos filamentosos nas diferentes silagens de cana-de-açúcar avaliadas em diferentes dias após abertura dos silos.



(CC) Cana-de-açúcar crua sem aditivo; (CI) Cana-de-açúcar crua inoculada com *L. buchneri*; (CQ) Cana-de-açúcar queimada sem aditivo; (CQI) Cana-de-açúcar queimada e inoculada com *L. buchneri*.

Figura 4. Dinâmica da população de *Bacillus* nas diferentes silagens de cana-de-açúcar avaliadas em diferentes dias após abertura dos silos.

A inoculação com *L. buchneri* provocou uma redução significativa na população de leveduras (4,24%) e fungos filamentosos (5,53%) na silagem de cana-de-açúcar queimada em relação à cana-de-açúcar queimada sem aditivo ($P < 0,05$) (Tabela 1 e Figuras 2 e 3). O mesmo efeito foi verificado nas silagens cruas, porém as diferenças não foram significativas ($P > 0,05$).

Segundo SIQUEIRA (2005) no processo de queima pode ocorrer transformação de sacarose em glicose e frutose, com conseqüente alteração no substrato disponível. O *L. buchneri* fermenta tanto sacarose quanto glicose e frutose, mas, no entanto, a eficiência fermentativa de monossacarídeos (glicose e frutose) é maior do que quando dissacarídeos (sacarose) são fermentados por esse microrganismo (McDONALD et al., 1991).

Baseados nos dados encontrados no presente estudo e nas descobertas de SIQUEIRA (2005) acredita-se que a possível disponibilização de monossacarídeos estimulou o desenvolvimento do *L. buchneri* devido ao aumento de substratos fermentescíveis com conseqüente incremento na produção de ácido acético, que segundo MOON (1983) tem efeito positivo na inibição de leveduras, conseqüentemente controle da fermentação alcoólica. Esse ácido em solução com pH inferior ao pK_a encontra-se não dissociado, permitindo a entrada do mesmo por difusão passiva nas células das leveduras. A dissociação desse ácido e liberação do íon H^+ é tóxica às leveduras, promovendo dessa forma um gasto de energia (ATP) para expulsar o H^+ , proporcionando assim decréscimo na multiplicação desses microrganismos e até mesmo sua morte (McDONALD et al., 1991). Trabalhos no exterior como os de RANJIT & KUNG Jr. (2000) e TAYLOR et al. (2002), também obtiveram sucesso na redução de leveduras em silagens de milho quando as mesmas foram inoculadas com *L. buchneri*.

Analisando a fermentação, perdas e estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e bacterianos, PEDROSO et al. (2008), verificaram uma redução significativa na população de leveduras nas silagens inoculadas com *L. buchneri* em relação ao seu controle. Os valores das contagens foram de 6,42 Log UFC/g para as silagens controle e 3,92 Log UFC/g para as

inoculadas. Paralelamente verificou-se que a inoculação reduziu em 50% o etanol na silagem em relação ao controle.

Na literatura ha relatos que o *L. buchneri* produz um composto denominado buchnericin LB, que tem efeito bacteriostático sobre *Bacillus* bem como *Listeria monocytogenes* (YILDIRIM & YILDIRIM, 2001), porém nesse trabalho o inoculante não influenciou significativamente a população desse microrganismo (Tabela 1) ($P>0,05$).

Houve um aumento na população de leveduras até o 21º dia, estabilizando-se após esse momento (Figura 2). As curvas de desenvolvimento dos fungos filamentosos e *Bacillus* foram inversas a curva de desenvolvimento das leveduras. Possivelmente, esse decréscimo pode estar associado à alta produção de etanol, encontrada normalmente em silagens de cana-de-açúcar, dada a multiplicação das leveduras. Aliado a esse fato as leveduras podem ter se sobressaído na competição por substratos com os outros microrganismo. Acredita-se que, o etanol produzido e a competição por substrato pelas mesmas possa ter exercido efeito antimicrobiano sobre os grupos supracitados (Figuras 2, 3 e 4). BERNARDES et al. (2007) citam que o etanol produzido funciona como inibidor microbiano na maioria das espécies de microrganismos em silagens de cana-de-açúcar.

Em todas as silagens não houve crescimento de enterobactérias. Segundo OSTLING & LINDGREN (1995), durante a deterioração aeróbia de silagens, enterobactérias podem voltar a desenvolver-se significativamente, porém neste caso, além da alta produção de etanol, os baixos pHs verificados (Tabela 1 e Figura 5), podem ter inibido o desenvolvimento desse grupo.

4.2. Parâmetros químicos

Na tabela 2 e figuras 5, 6, 7 e 8 observa-se os efeitos da queima e inoculação com *Lactobacillus buchneri* nos parâmetros químicos das silagens de cana-de-açúcar.

Tabela 2. Alterações químicas nas silagens de cana-de-açúcar cruas ou queimadas, inoculadas ou não com *Lactobacillus buchneri*, analisadas após abertura dos silos (Média dos tratamentos no tempo), no segundo semestre de 2007 em Jaboticabal-SP.

Parâmetros avaliados	Tratamentos ¹				CV(%) ²
	CC	CI	CQ	CQI	
pH	4,86 a	4,67 b	4,66 b	4,46 c	2,87
PB (%)	4,48 a	4,37 ab	4,27 ab	4,23 b	6,62
N-NH ₃ (%)	2,79 a	2,75 a	2,74 a	2,75 a	14,73
MS (%)	22,53 c	24,40 ab	22,75 bc	24,91 a	9,33

¹ (CC) Cana-de-açúcar crua sem aditivo; (CI) Cana-de-açúcar crua inoculada com *L. buchneri*; (CQ) Cana-de-açúcar queimada sem aditivo; (CQI) Cana-de-açúcar queimada e inoculada com *L. buchneri*.

² CV= Coeficiente de variância

^{a, b, c} Médias seguidas da mesma letra não diferem (P<0,05) pelo teste Tukey

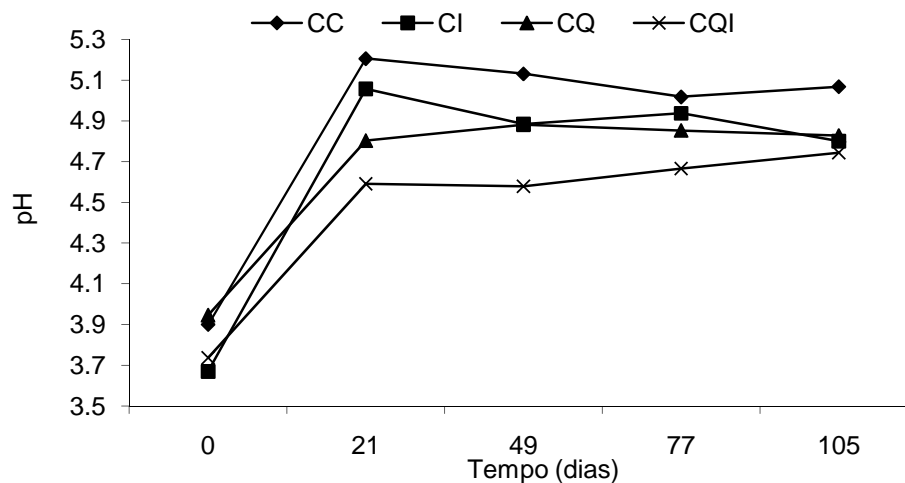
Os pHs das silagens inoculadas (crua e queimada) apresentaram menores valores em relação a seus controles. A queima também provocou uma redução significativa nos valores de pH em relação à silagem crua (P<0,05) (Tabela 2). Porém BERNARDES et al. (2007), verificaram que a queima antes da ensilagem promoveu pequeno acréscimo, de 3,5 para 3,7, nos valores de pH da silagem queimada em relação à crua.

Segundo SIQUEIRA (2009) o *L. buchneri* quando utilizado em estudos na ensilagem de cana-de-açúcar (SIQUEIRA et al., 2007; SCHMIDT et al., 2007) bem como de outras forrageiras como RANJIT et al. (2002) e FILYA (2003) que avaliaram silagem de milho e sorgo respectivamente, normalmente apresentam valores de pH superiores às silagens não tratadas.

De acordo com KLEINSCHMIT & KUNG Jr. (2006) umas das possíveis causas são os menores teores de ácido lático observados nas silagens inoculadas. Esse microrganismo além de possuir fermentação heterolática (McDONALD et al., 1991) com produção predominantemente de ácido acético (WEINBERG & MUCK, 1996), pode converter o ácido lático em ácido acético (OUDE ELFERINK et al., 2001). Como o ácido

lático possui um pK_a baixo o mesmo é o principal responsável pela redução dos valores de pH na ensilagem (SIQUEIRA, 2009).

Houve um aumento geral nos valores de pH de todas silagens, após abertura dos silos (Figura 5). Segundo McDONALD et al. (1991), a exposição da silagem ao ar, provoca uma retomada no desenvolvimento de microrganismos aeróbios que consomem o ácido lático, permitindo o aumento do pH e a diminuição da qualidade nutricional do material ensilado.



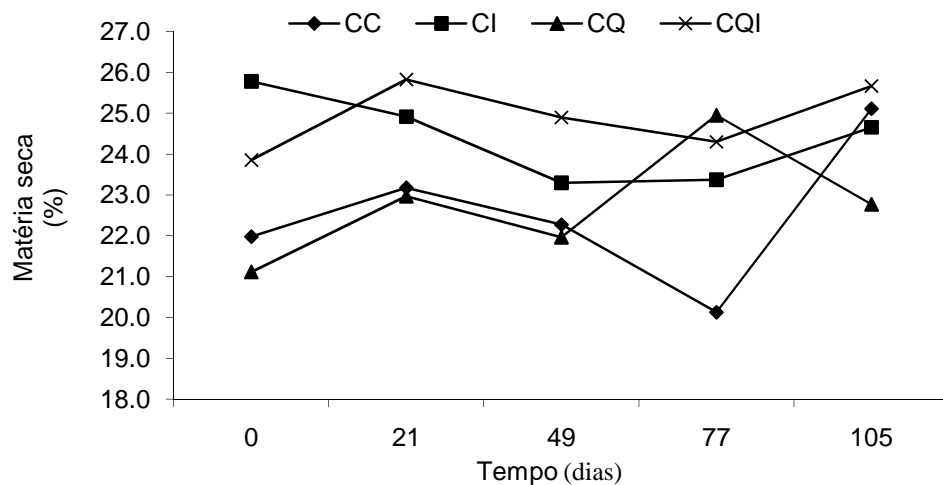
(CC) Cana-de-açúcar crua sem aditivo; (CI) Cana-de-açúcar crua inoculada com *L. buchneri*; (CQ) Cana-de-açúcar queimada sem aditivo; (CQI) Cana-de-açúcar queimada e inoculada com *L. buchneri*.

Figura 5. Variação temporal dos valores de pH nas diferentes silagens de cana-de-açúcar avaliadas em diferentes dias após abertura dos silos.

Na Tabela 2 e Figura 6 observa-se que as silagens inoculadas apresentaram maiores valores de MS (+7,66% na silagem crua e +8,77% na silagem queimada) em relação aos seus controles ($P < 0,05$). No caso da silagem queimada, da mesma forma que nas contagens das leveduras, a possível mudança no perfil de carboidratos solúveis provocado pela queima pode ter influenciado indiretamente o teor de MS, através da ação do *L. buchneri* sobre as leveduras.

Resultados similares foram encontrados por SIQUEIRA et al. (2009). Os autores analisaram o efeito da queima e do tratamento com aditivos químicos e

inoculantes microbiológicos, tais como o *Lactobacillus buchneri* na ensilagem da cana-de-açúcar, observando maiores valores de MS quando a cana-de-açúcar foi inoculada com *L. buchneri*. Os valores de MS foram de 27,4 e 31,9%, para as silagens de cana-de-açúcar cruas e queimadas respectivamente. Para as silagens de cana-de-açúcar queimada os valores foram de 29,2 % para a não inoculada e 33,4 % para a inoculada.



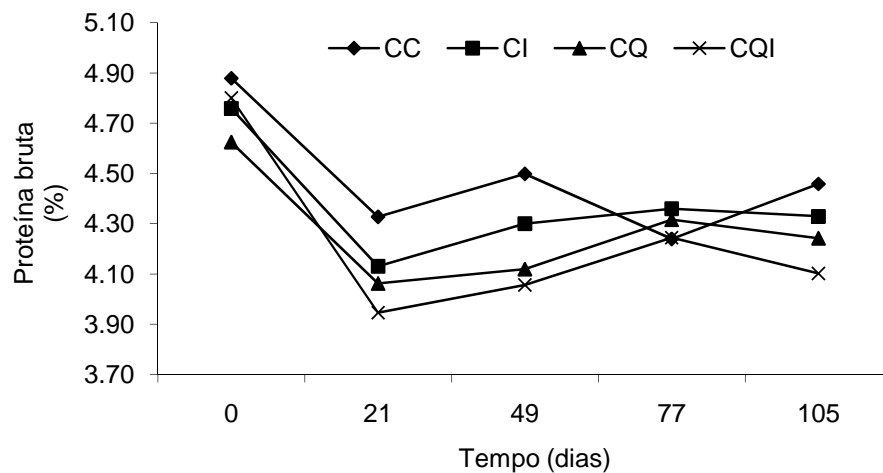
(CC) Cana-de-açúcar crua sem aditivo; (CI) Cana-de-açúcar crua inoculada com *L. buchneri*; (CQ) Cana-de-açúcar queimada sem aditivo; (CQI) Cana-de-açúcar queimada e inoculada com *L. buchneri*.

Figura 6. Variação temporal dos valores de matéria seca nas diferentes silagens de cana-de-açúcar avaliadas em diferentes dias após abertura dos silos.

Não houve diferença significativa entre as silagens crua e queimada, porém SIQUEIRA et al. (2009) observaram maiores teores de MS na silagem de cana-de-açúcar queimada, apesar de encontrar menores teores de MS na cana-de-açúcar queimada. Segundo o autor a queima provoca uma redução na quantidade de palha e folhas, que conseqüentemente aumenta a proporção de colmos, diminuindo dessa forma o teor de MS no material antes da ensilagem. Utilizando a mesma justificativa BERNARDES et al. (2007) verificaram declínio na concentração de MS (3,75 %), na silagem de cana-de-açúcar queimada em relação a silagem de cana-de-açúcar crua.

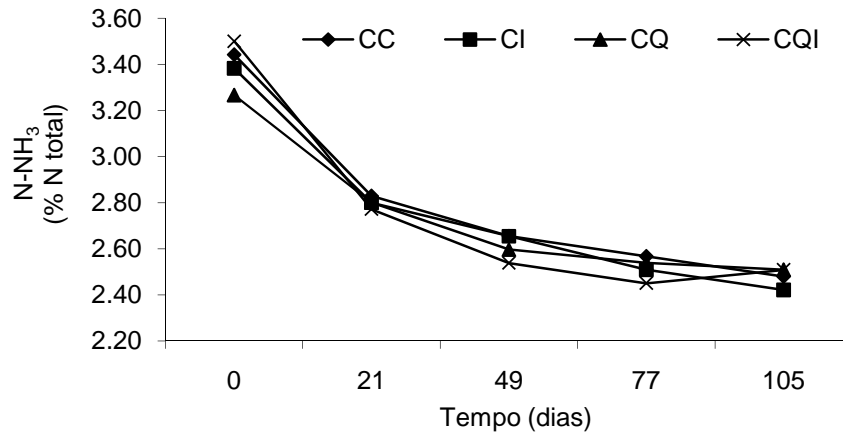
Não houve diferenças significativas entre os valores de PB ($P>0,05$) (Tabela 2), porém SIQUEIRA et al. (2008) constataram um aumento no teor desse parâmetro na cana-de-açúcar que sofreu queima (+15,38 %), atribuindo-se ao menor teor de PB encontrado nas palhas, a qual é eliminada durante a queima. BERNARDES et al. 2007 também verificaram que a queima da cana-de-açúcar antes da ensilagem promoveu discreto acréscimo no valor de PB.

Verificou-se uma diminuição no teor de PB em todas as silagens durante o período de exposição aeróbia ($P<0,05$) (Figura 7). Contraditoriamente houve um decréscimo no teor de $N-NH_3$ durante o desabastecimento dos silos ($P<0,05$) (Figura 8). Esperava-se um acréscimo no teor do mesmo em vista da redução nos teores de PB, já que o aumento do teor de $N-NH_3$ é um indício da ocorrência de proteólise. Nesse caso a análise das perdas por nitrogênio amoniacal é muito inconsistente, já que o mesmo pode-se ter perdido por volatilização (McDONALD et al. 1991).



(CC) Cana-de-açúcar crua sem aditivo; (CI) Cana-de-açúcar crua inoculada com *L. buchneri*; (CQ) Cana-de-açúcar queimada sem aditivo; (CQI) Cana-de-açúcar queimada e inoculada com *L. buchneri*.

Figura 7. Variação temporal dos teores de proteína bruta nas diferentes silagens de cana-de-açúcar avaliadas em diferentes dias após abertura dos silos.



(CC) Cana-de-açúcar crua sem aditivo; (CI) Cana-de-açúcar crua inoculada com *L. buchneri*; (CQ) Cana-de-açúcar queimada sem aditivo; (CQI) Cana-de-açúcar queimada e inoculada com *L. buchneri*.

Figura 8. Variação temporal dos teores de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) nas diferentes silagens de cana-de-açúcar avaliadas em diferentes dias após abertura dos silos.

4.3. Parâmetros microbiológicos e químicos nas diferentes alturas de coleta

Os valores dos diferentes parâmetros microbiológicos e químicos das silagens nas duas profundidades de coleta encontram-se na Tabela 3. Observou-se menores valores de pH (0,2 unidade), com conseqüente menor desenvolvimento microbiano e degradação protéica na camada inferior ($P < 0,05$). Acredita-se que a fermentação foi influenciada pelas condições de anaerobiose, principalmente na fase fermentativa, dado que as camadas mais superficiais do silo possuem uma menor condição de anaerobiose devido à maior dificuldade de compactação. Essa condição possivelmente gerou uma fermentação menos eficiente quando comparada ao centro do painel, com conseqüente redução na produção de ácidos, maior pH e menor efeito antimicrobiano. Houve um maior teor de MS na camada superficial ($P < 0,05$), atribuindo-se esse valor a maior perda de água encontrada normalmente nas camadas mais próximas a superfície.

Tabela 3. Efeito da profundidade nos parâmetros microbianos e químicos das silagens de cana-de-açúcar avaliadas após abertura dos silos.

Parâmetros avaliados	Profundidades		CV (%) *
	Superfície	Centro	
Leveduras (logUFC/g)	5,30 a	5,04 b	3,57
Fungos filamentosos (logUFC/g)	2,67 a	2,48 b	6,62
<i>Bacillus</i> (logUFC/g)	5,71 a	5,53 b	3,49
pH	4,79 a	4,59 b	4,33
PB (%)	4,35 a	4,33 a	10,10
N-NH ₃ (%)	3,05 a	2,47 b	11,56
MS (%)	24,33 a	22,96 b	5,71

* CV= Coeficiente de variância

^{a, b} Médias seguidas da mesma letra não diferem (P<0,05) pelo teste Tukey

Não há na literatura trabalhos relatando o efeito da profundidade nos diferentes parâmetros microbiológicos e químicos em silagens de cana-de-açúcar, porém encontramos alguns estudos relacionados, em outras espécies forrageiras.

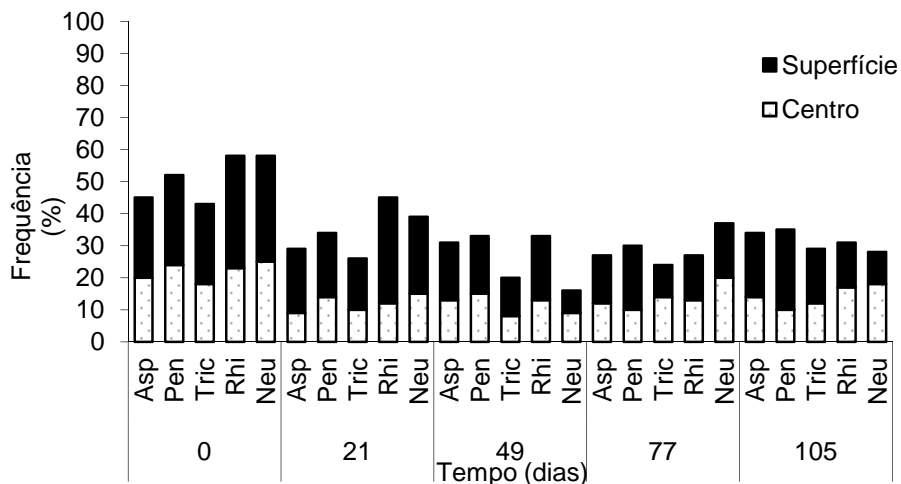
GUIM et al. (2002) avaliando o efeito de um inoculante microbiano sobre a estabilidade aeróbica de silagens de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) pré-seco em três diferentes profundidades, verificaram menores valores de N-NH₃ e maiores valores de pH e contagem de leveduras nas camadas mais superficiais em relação à camada mais profunda. Segundo os autores a camada superficial tem maior velocidade de deterioração durante a exposição ao ar, que aparece como reflexo do padrão de fermentação durante a anaerobiose.

Em estudo recente, VISSERS et al. (2007) constataram maiores valores de pH, contagens de fungos filamentosos, leveduras e bactérias ácido-butíricas nas camadas superiores em silagens de milho produzidas na Holanda. Os autores constataram que as altas concentrações de bactérias ácido-butíricas na superfície e nas áreas com baixa densidade resultam da deterioração aeróbia por leveduras e fungos filamentosos.

Segundo BORREANI et al. (2002) citado por BERNARDES (2006) as áreas mais próximas a atmosfera são naturalmente mais susceptíveis a infiltração de ar devido à maior porosidade da massa e aos materiais utilizados na cobertura.

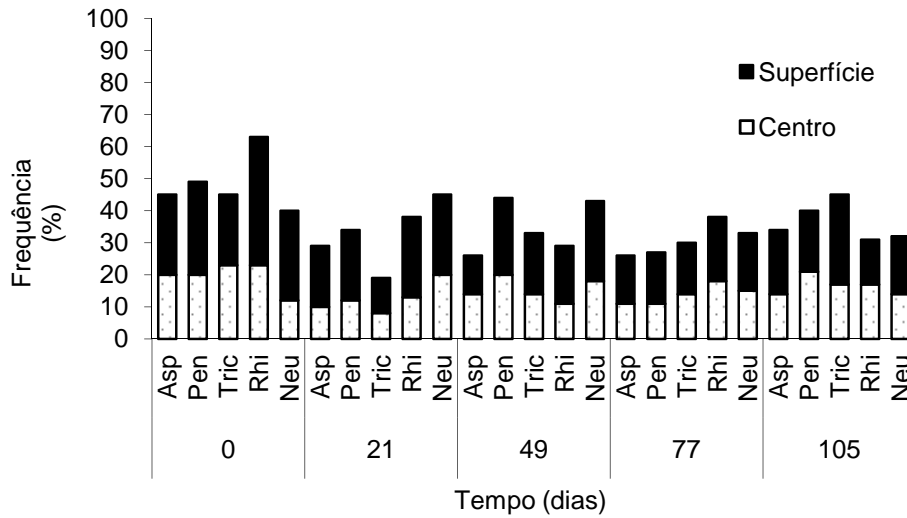
4.4. Fungos filamentosos associados à ensilagem de cana-de-açúcar

A frequência dos gêneros de fungos filamentosos identificados nas diferentes silagens de cana-de-açúcar, avaliadas em diferentes períodos de aeração, está apresentada nas Figuras 9, 10, 11 e 12. As silagens de cana-de-açúcar apresentaram após sua abertura os fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhizopus* e *Neurospora*.



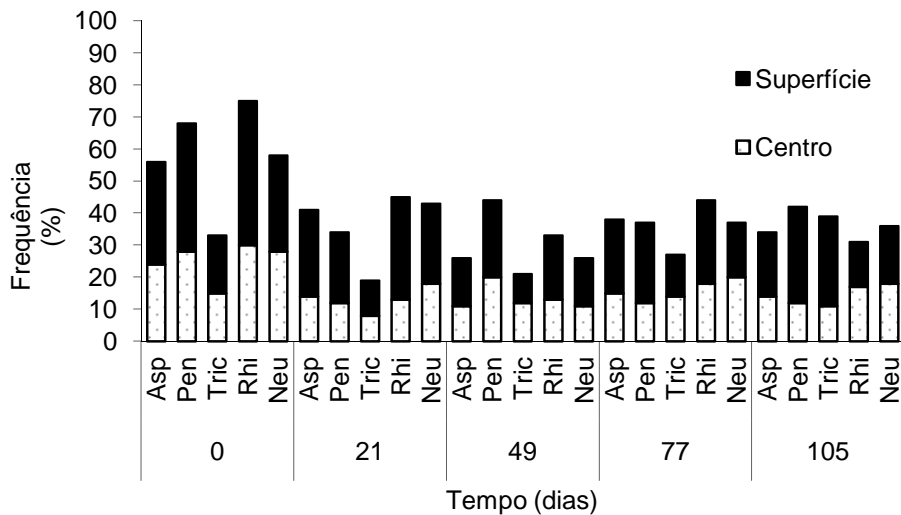
Asp = *Aspergillus*, Pen = *Penicillium*, Tri = *Trichoderma*, Rhi = *Rhizopus*, Neu = *Neurospora*

Figura 9 – Frequência dos gêneros de fungos filamentosos identificados na silagem de cana-de-açúcar, avaliada em diferentes períodos de aeração.



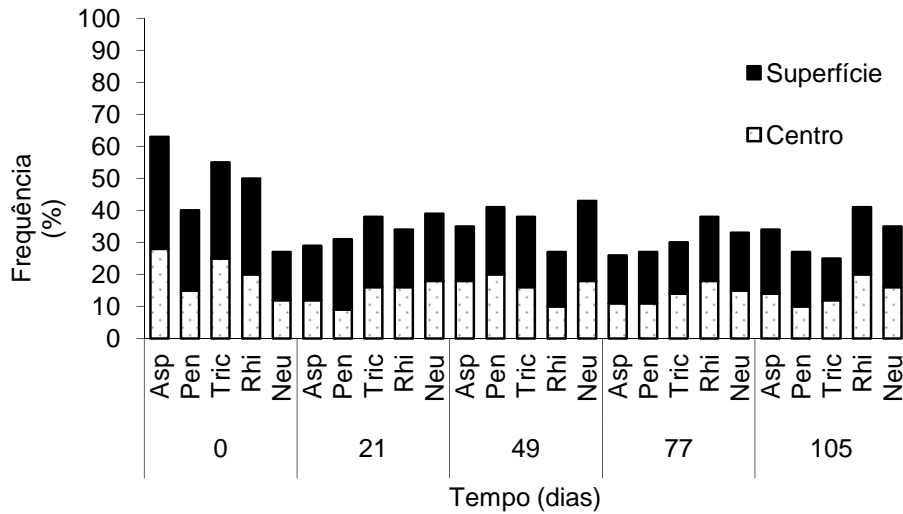
Asp = *Aspergillus*, Pen = *Penicillium*, Tri = *Trichoderma*, Rhi = *Rhizopus*, Neu = *Neurospora*

Figura 10 - Frequência dos gêneros de fungos filamentosos identificados na silagem de cana-de-açúcar inoculada, avaliada em diferentes períodos de aeração.



Asp = *Aspergillus*, Pen = *Penicillium*, Tri = *Trichoderma*, Rhi = *Rhizopus*, Neo = *Neurospora*

Figura 11 - Frequência dos gêneros de fungos filamentosos identificados na silagem de cana-de-açúcar queimada, avaliada em diferentes períodos de aeração.



Asp = *Aspergillus*, Pen = *Penicillium*, Tri = *Trichoderma*, Rhi = *Rhizopus*, Neu = *Neurospora*

Figura 12 - Frequência dos gêneros de fungos filamentosos identificados na silagem de cana-de-açúcar queimada e inoculada, avaliada em diferentes períodos de aeração.

Segundo MUCK & SHINNERS (2001) os fungos filamentosos mais encontrados em silagens são os dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* e os principais substratos utilizados pelos microrganismos são os ácidos orgânicos, o etanol e os açúcares solúveis residuais, resultando em aumento do pH, redução na digestibilidade e no conteúdo de energia da silagem. Paralelamente esses microrganismos podem produzir micotoxinas, principalmente em silagens onde há penetração de ar, que podem causar doenças aos animais, quando ingeridas (MAHANNA, 1994).

Diversas pesquisas conduzidas no exterior têm analisado a microbiota fúngica de silagens após abertura, porém poucos fazem referência à ensilagem de cana-de-açúcar. DALFRE et al. (2007) constataram a presença de fungos filamentosos dos gêneros *Oidium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizopus* em fragmentos de folhas e colmos de canas-de-açúcar colhidas diretamente em canaviais.

Nas figuras 9, 10, 11 e 12 observa-se um número pequeno de fungos filamentosos associados à ensilagem, apesar da cana-de-açúcar apresentar uma vasta

variedade de gêneros quando encontra-se no campo (DALFRE et al. 2007). Acredita-se, portanto, que o processo de fermentação determinou a seleção de fungos filamentosos adaptados a esse processo.

Observou-se uma tendência a diminuição na frequência dos fungos filamentosos durante o período de exposição. Diferentemente dos dados encontrados neste trabalho, SCHOCKEN-ITURRINO et al. (2005) registraram aumento na ocorrência dos fungos filamentosos *Penicillium*, *Fusarium* e *Pithomyces* com o prolongamento da exposição ao ar, em silagens de capim-Tifton 85. Segundo os autores a presença de oxigênio permitiu o desenvolvimento dos microrganismos tolerantes a pH ácido, como os fungos filamentosos, previamente inibidos pela anaerobiose. Estes ainda ressaltam que, durante o desenvolvimento dos fungos filamentosos, ocorre utilização do ácido láctico e consequente elevação do pH, fato observado em seu trabalho.

No presente estudo, apesar do aumento no pH após abertura das silagens (Figura 5), o mesmo não foi suficiente para promover um desenvolvimento progressivo dos fungos filamentosos. Possivelmente esses microrganismos podem ter sido inibidos pela competição por substratos com as leveduras e pela possível presença de etanol. Ressalta-se que no neste caso, a deterioração no pós-abertura foi dominada pela ação das leveduras (Figuras 2, 3 e 4).

Apesar de constatar-se a presença de *Penicillium* e *Aspergillus*, não foi possível a detecção de outros fungos filamentosos patogênicos produtores de micotoxinas tais como *Fusarium*, *Pithomyces*, *Alternaria*, *Claviceps* e *Stachybotrys* (BELÉM, 1994). Considerando apenas esse aspecto, as silagens apresentaram uma boa qualidade sanitária.

Ocorreu uma maior frequência de fungos filamentosos na superfície quando comparada ao centro do painel. Acredita-se que a fermentação bem como as condições de aerobiose exerceram efeito micostático. Observa-se que no 21º dia após abertura ocorreu uma diminuição geral nas frequências dos fungos filamentosos isolados, oscilando até o 105º dia. Semelhantemente ao verificado nas contagens, a provável alta concentração de etanol pode ter exercido um efeito supressor também sobre os fungos filamentosos.

Os bons resultados encontrados neste trabalho no tocante ao efeito do inoculante na população de leveduras e conseqüentemente na perda de MS, poderão dar suporte a maiores estudos para avaliar se o mesmo é suficiente para promover um melhor retorno financeiro, seja por meio da redução de perdas com ensilagem e/ou queima ou melhora no desempenho animal.

5. CONCLUSÕES

O inoculante exerceu um efeito redutor na população de leveduras e na perda de MS sendo esse efeito potencializado pela queima da cana-de-açúcar.

A deterioração das diferentes silagens no pós-abertura, independente do tratamento, foi dominada pela ação das leveduras.

6. REFERÊNCIAS

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

ARCURI, P.B.; CARNEIRO, J.C.; LOPES, F.C.F. Microrganismos indesejáveis em forragens conservadas: efeito sobre o metabolismo de ruminantes. In: Reis, R.A.; BERNARDES, T.F.; SIQUEIRA, G.R. et al.. (Org.). *Volumosos na produção de ruminantes: valor alimentício de forragens*. 1ª ed. Jaboticabal: , 2003, v. , p. 51-69.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3.ed. Burgess: Publishing Company, 1972. 241p.

BELÉM, P.A.D. **Introdução ao estudo das micotoxinas de interesse em medicina veterinária**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1994. 18p.

BERNARDES, T.F. **Características fermentativas, microbiológicas e químicas do capim-marandu (*Brachiaria brizantha* (hochst ex. a. rich) stapf cv. marandu) ensilado com polpa cítrica peletizada**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2003. 118p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2003.

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

BERNARDES, T.F.; REIS, R.A.; SIQUEIRA, G.R.; et al. Avaliação da queima e da adição de milho desintegrado com palha e sabugo na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 2, p. 269-275, 2007.

BOIN, C.; TEDESCHI, L.O. Cana-de-açúcar na alimentação de gado de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 5., 1993, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1993. p.107-126.

CUNHA, T.J. **Horse: feeding and nutrition**. 2ed. Califórnia: Academic Press, 1991. 445p.

DALFRÉ, J.T.; RODRIGUES, J.P.B.; DONATO, B.G., et al. Microbiota fúngica da conjuntiva, da cana-de-açúcar e de anemófilos da região canavieira de Monte Belo - Minas Gerais. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, p. 445-449, 2007.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. Anaerobic lactate degradation in maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 583-594, 1999.

FILYA, I. The Effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. **Journal of Dairy Science**, v.85, n. 11, p. 3575-3581, 2003.

FREITAS, A.W.P.F.; PEREIRA, J.C.; ROCHA, F.C., et al. 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.

GUIM, A.; ANDRADE, P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P., et al. Aerobic stability of wilted grass silages (*Pennisetum Purpureum*, Schum.) treated with microbial inoculant. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 2176-2185, 2002.

HANLIN, B.T. **Illustrated genera of Ascomycetes**. St Paul: APS Press, 1990. 263p.

HENDERSON, N. Additives silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 33, p. 35-56, 1993.

JONSSON, A.; PAHLOW, G. Systematic classification and biochemical characterization of yeast growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* culture. **Animal Research and Development**, v. 20, p. 7-22, 1984.

JONSSON, A. Growth of *Clostridium tyrobutiricum* during fermentation and aerobic deterioration of grass silage. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 54, p. 557-568, 1991.

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.

KRUSTEV, E., KHRISTOV, B. Microflora in corn silage. **Vet Med Nauki**, v. 18, n. 7, p. 88-91, 1981.

KUNG Jr., L.; GRIEVE, D.B.; THOMAS, J.W. et al. Added ammonia or microbial inoculant for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 2, p. 299-306, 1984.

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.

KURTMAN, C.P.; FELL, J.W. **The yeast**: a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier, 1998. 1055p.

LUCCA FILHO, O.A. Metodologia de testes de sanidade de sementes. In: **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 276-298.

MAHANNA, B. Proper management assures high-quality feeds. **Feedstuffs**, v.10, p.12-56, 1994.

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

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.

MOSER, L.C. Quality of forage as affected by post-harvest storage and processing. In: **Crop quality storage and utilization**. Madison: ASA/CSSA, 1980.p. 227-260.

MUCK, A.P., et al. Physiological functions of glicocorticoides in stress and their relation to pharmacological actions . **Endocrinological Review**, v. 5, n. 1, p. 25, 1984.

MUCK, R.E.; SHINNERS, K.J. Conserved forages (silage and hay): Progress and priorities. In: INTERNACIONAL GRASSLAND CONGRESS, 29., 2001, São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: Brazilian Society of Animal Husbandry. 2001. p.753-762.

MUCK, R.E.; SHINNERS, K.J. Conserved forages (silage and hay): Progress and priorities. In: INTERNACIONAL GRASSLAND CONGRESS, 29., 2001, São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: Brazilian Society of Animal Husbandry. 2001. p. 753-762.

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

OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J.C.; et al. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.1, p.125–132, 2001.

PAHLOW, G; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Eds.) **Silage science and technology**. 1.ed. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 31-94.

PEDROSO, A.F. **Aditivos químicos e microbianos como inibidores da produção de etanol em silagens de cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2003. 120p. Tese (Doutorado em agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2003.

PEDROSO, A.F., L.G. NUSSIO, D.R.S. LOURES, et al. Efeito de tratamento com aditivos químicos e inoculantes bacterianos nas perdas e a qualidade de silagens de cana-de açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 558-564, 2007.

PEDROSO, A.F.; NUSSIO, L.G.; LOURES, D.R.S., et al. Fermentation, losses, and aerobic stability of sugarcane silages treated with chemical or bacterial additives. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 6, p. 589-594, 2008.

PEDROSO, A.F.; NUSSIO, L.G.; PAZIANI, S.F. et al. Bacterial inoculants and chemical additives to improve fermentation in sugar cane silage. In: International Silage Conference, 13, 2002. Proceedings... 2002. Cd-rom.

PEDROSO, A.F.; NUSSIO, L.G.; PAZIANI, S.F. et al. Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. **Scientia Agricola**, v. 62, p. 427-432, 2005.

RANDBY, A. T., I. SELMER-OLSEN, AND L. BAEVRE.. Effect of ethanol in feed on milk flavor and chemical composition. **Journal of Dairy Science**. v. 82, p. 420–428, 1998.

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

RANJIT, N.K.; TAYLOR; C.C; KUNG, Jr, L. Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. **Grass and Forage Science**, v. 57, n.1, p.73–81, 2002.

REIS, R.A.; RODRIGUES, L.R. de A. Uso de conservantes em feno com alto teor de umidade. In: SEMANA DE ZOOTECNIA - A INTERAÇÃO SOLOS X PASTAGENS X NUTRIÇÃO ANIMAL, 14, 1992, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: Fundação Cargill, 1992. p.77-89.

ROTZ, C.A.; MUCK, E.M. Changes in forage quality during harvest and storage. In: FAREY JR., G.C. (Ed.) **Forage quality, evaluation, and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p. 828-868.

SCHMIDT, P.; NUSSIO, C.M.B.; RODRIGUES, A.A.; L.G., et al. Produtividade, composição morfológica, digestibilidade e perdas no processo de ensilagem de duas variedades de cana-de-açúcar, com e sem adição de uréia. In: Reunião da SBZ, 41, Campo grande, 2004. **Anais...** Campo Grande: SBZ, Cdrom 2004.

SCHMIDT, P.; MARI, L.J.; NUSSIO, L.G. et al. 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 (suplemento).

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; REIS, R.A.; COAN, R.M.; et al . Alterações químicas e microbiológicas nas silagens de capim-Tifton 85 após a abertura dos silos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 2, 2005.

SENTHILKUMAR, K.; UDAYAN, K.; MANIAN, S. Successional patern of mycoflora associated with litter degradation in a *Cymbopogon caesius* dominated tropical grassland. **Tropical Grass**, v. 27, n. 27, p. 121-127, 1993.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 235p.

SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P., et al. Influência da queima e aditivos químicos e bacterianos na composição química de silagens de cana-de-açúcar. **Archivos de Zootecnia** (Universidad de Córdoba), v. 58, p. 43-54, 2009.

SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P., et al. Perdas de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 6, 2007.

SIQUEIRA, G.R. **Aditivos na silagem de cana-de-açúcar in natura ou queimada**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2009. 107p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2009.

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

SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P., et al. Perdas de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 6, 2007.

SIQUEIRA, G.R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; REIS, R. A. et al. **Alterações químicas durante o armazenamento de silagens de cana-de-açúcar crua ou queimada e inoculadas ou não com *L. buchneri***. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45., 2008, Lavras. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2008. (CD-ROM).

SOUSA, D.P.; MATTOS, W.R.S.; NUSSIO, L. G., et al. 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.

SPECK, M.L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, American Public Health Association, 1984. 914p.

STEFANIE, J.W.H.; ELFEINK, O.; DRIEHUIS, F. et al. Silage fermentation process and their manipulation. In: FAO ELETRONIC CONFERENCE ON TROPICAL SILAGE, Rome, 1999, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 2000. p. 17-30.

TAYLOR, C.C.; RANJIT, N.J.; MILLS, J.A., et al. The effect of treating whole-plant barley with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p.1793–1800, 2002.

TORRES, R.A. Conservação de forragem. In: 3 CURSO DE PECUÁRIA LEITEIRA, 2 a 6 de julho de 1984. Companhia Industrial e Comercial Bras. De Produtos Alimentares/NESTLE.

VISSERS, M.M.M., DRIEHUIS, F., TE GIFFEL, M.C., et al. Concentrations of Butyric Acid Bacteria Spores in Silage and Relationships with Aerobic Deterioration. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 928-936, 2007.

WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. London: Wiley Editorial Offices, 1998. 350p.

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

WEINBERG, Z.G.; SZAKACS, G.; ASHBELL, G., et al. 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, n. 3, p. 218-222, 1999.

WITTENBERG, K.M., UNDI, M., BOSSUYT, C. Establishing a feed value for moulded hay. **Animal Feed Science and technology**, v. 60, n.3-4, p.301-310. 1996.

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

WOOLFORD, M.K. **The silage fermentation**. New York, Marcel Dekker, 1984. 305p.

YILDIRIM, Z.; YILDIRIM, M. Characterization of Buchnericin LB, produced by *Lactobacillus buchneri* LB. **Turkish Journal of Biology**, v. 25, p. 73-82, 2001.