Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura ‘‘Luiz de Queiroz’’

Avaliação da dinâmica da população de microrganismos em plantas de cana-de-açúcar IAC (93-3046)

Sérgio Gil de Toledo Filho

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’ para a obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagem

Piracicaba - 2010

Sérgio Gil de Toledo Filho
Biólogo

Avaliação da dinâmica da população de microrganismos em plantas de cana-de-açúcar IAC (93-3046)

Orientador:
Prof. Dr. **Luiz Gustavo Nussio**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' para a obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagem

Piracicaba - 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Toledo Filho, Sérgio Gil de
Avaliação da dinâmica da população de microrganismos em plantas de cana-de-açúcar IAC (93-3046) / Sérgio Gil de Toledo Filho. - - Piracicaba, 2010.
95 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Bactérias 2. Cana-de-açúcar - Microbiologia 3. Ensilagem 4. Fermentação 5. Forragem Leveduras 7. Silagem I. Título

CDD 636.08552
T649a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À minha amiga

Gisele Bonato Muraro (in memoriam),

Dedico.

À minha família,

que ao longo desses anos me apoiaram, ensinaram e confortaram, em especial ao meu pai, ***Sérgio Gil de Toledo****, pelo nome, pela vida, amizade, exemplo e ensino,*

Ofereço.

'Brincar é condição fundamental para ser sério.'

(Arquimedes)

AGRADECIMENTOS

À minha Amada e Gloriosa Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' (ESALQ/USP), que se tornou meu lar por 8 anos, e sempre o será, e que moldou parte do meu ser.

Ao meu querido Orientador, Prof. Dr. Luiz Gustavo Nussio, pelo exemplo de profissionalismo, pelas lições de vida, pelo convívio e pela oportunidade única de fazer parte não só do seu time, mas da sua vida.

Ao prezado Prof. Dr. Wilson Roberto Soares Mattos, pela amizade, pelo carinho e incentivo num dos momentos mais difíceis, que me fez permanecer aqui: *'Sim Mestre, valeu a pena!'*.

Ao Prof. Dr. Gérson Barreto Mourão, pelo convívio, amizade, paciência e dedicação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Ítalo Delalibera Jr. e ao querido amigo MSc. Giuliano Pauli pela colaboração e por cederem as dependências do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos (USP/ESALQ).

Ao meu amigo e professor Antônio Augusto Bianchi, pelos ensinamentos, pela alegria contagiante e pelo apoio emocional.

Aos funcionários do Depto. de Zootecnia, em especial Carlos César, Tâninha, Sr. Laureano, Jucelino e Emerson, pela amizade e prestatividade que sempre tiveram.

Aos membros do QFC (Equipe de 'Qualidade e Conservação de Forragens') que se dedicaram ao máximo na condução dos trabalhos e sem os quais seria impossível sua conclusão.

Aos queridos amigos, novos e de longa data: Maldito, Mohandas, Gi, Ataq, Ana, Puki, Zélão, Pulha, Jhones, Bambú, Van, Dani, Mariele, Soli, Martão, Denner, Daniel, Kbça, Juninho, Bolo, César, Véia, Mindy, K-lha, Pimpão, Ed, Suruka's, Adirso, Jchão, Girdo e Girda, Ga, Guilla, Bianchi, Naty, Robson Tico-Tico, Júnio Kbção, Vitão Guarda, Puddy, Claudinha 'Portuga', Kutuk, Grud, -Zum, Viliña, Pagu's, Corn, Xuleta, Bell, Tãma, Pastor, Hadja, Amino, Sapo, Prision, Samuk, Crau e Vi, Jonny, Liso, Clau, Dêva, Pirikito e Jack, Sturi e Fê, todos

vocês que fizeram parte da minha vida nesses últimos anos, compartilharam sentimentos, momentos e conhecimentos.

Aos finados bois dos experimentos, Pirulito, Rochedo, Pablito, Veludo, Rivelino, Taquara e Rayban, que foram nossa alegria e razão da união do nosso grupo por muito tempo.

Aos amigos da 'Harley-Davidson' e a própria *Harley-Davidson*®, que me proporcionaram alívio do stress nos momentos difíceis.

À *Jim Beam*® *Kentucky Straight Bourbon Whiskey*, por fazer o melhor whiskey e me proporcionar tanto prazer, relaxamento e inspiração.

À minha família pelo apoio financeiro, emocional e espiritual.

À *Watchtower Bible and Tract Society of New York, Inc.* pelo ensino.

Por último, porém mais importante, הוא ברוך הקדוש בורא יהוה, por permitir tudo isso e muito mais.

À todos o meu 'Muito obrigado!'

Sumário

1. Resumo 11

2. Abstract 13

Lista de tabelas 15

Lista de figuras 17

3. Introdução 19

3.1 Referências 20

4. Revisão Bibliográfica 22

4.1 Composição químico-bromatológica da cana-de-açúcar 22

4.2 Ensilagem de cana-de-açúcar 25

4.3 Microrganismos associados à ensilagem 28

4.3.1 Bactérias 28

4.3.1.1 Bactérias ácido láticas 28

4.3.1.2 Enterobactérias e bactérias ácido-acéticas 29

2.3.1.3 Bactérias dos gêneros Clostridium, Bacillus e Listeria 30

4.3.2 Mofos 32

4.3.3 Leveduras 33

4.4 Aditivos microbianos na ensilagem de cana-de-açúcar 36

4.5 Atividade de aditivos microbianos 38

4.6 Hipótese 40

4.7 Objetivo 40

5 Material e Métodos 41

5.1 Local, duração e tratamentos avaliados no experimento 41

5.2 Mensurações climáticas 44

5.3 Delineamento experimental 46
5.4 Avaliação agronômica de plantas de cana-de-açúcar 46
5.5 Descrição da população de microrganismos em plantas de cana-de-açúcar 48
5.6 Avaliação nutricional de plantas de cana-de-açúcar 49
6 Resultados e discussão 50
6.1 Avaliação agronômica de plantas de cana-de-açúcar 51
6.1.1 Produtividade de cana-de-açúcar 51
6.1.2 Avaliação morfológica de cana-de-açúcar 52
6.1.2.1 Folhas secas e folhas verdes 52
6.1.2.2 Colmo 53
6.1.3 Maturidade 55
6.1.3.1 ^{o}Brix 55
6.1.3.1 Índice de maturidade 56
6.2 Avaliação químico bromatológica de plantas de cana-de-açúcar 57
6.2.1 Teor de matéria seca 58
6.2.2 Componentes fibrosos 60
6.2.3 Coeficiente de digestibilidade 622
6.2.4 Correlação entre ^{o}Brix e DIVMS 65
6.3 Descrição da população de microrganismos em plantas de cana-de-açúcar 66
6.3.1 Bactérias ácido-láticas 66
6.3.2 Leveduras 68
6.3.3 Bactérias ácido-láticas e a associação com as leveduras 69
7 Conclusões 73
8 Referências 74

1. Resumo

Avaliação da dinâmica da população de microrganismos em plantas de cana-de-açúcar IAC (93-3046)

O número das espécies microbianas presentes na forragem no ato da colheita é responsável pelo padrão de fermentação da silagem, sendo que o número de unidades formadoras de colônia (ufc) é alterado ao longo do ciclo da cultura e das condições ambientais, e esse fato, influencia fortemente a eficácia de aditivos utilizados no processo. Neste contexto, três experimentos foram conduzidos a fim de caracterizar a população microbiana em plantas de cana-de-açúcar. No primeiro experimento foi caracterizada a população microbiana em plantas de cana-de-açúcar por meio da técnica de plaqueamento. Os tratamentos impostos foram compostos por duas fontes de adubação (NPK e NPK associado a esteco bovino curtido – 120kg de N/ha) da cana-de-açúcar colhidas manualmente com vista à quantificação do número de bactérias ácido láticas, leveduras e mofos, bem como relacionar suas freqüências de ocorrência com efeitos ambientais, fonte de fertilizante e estádio de maturação, com colheitas realizadas aos 10, 12, 14 e 18 meses, correspondendo aos meses de Março, Maio, Julho e Novembro de 2009, respectivamente. No segundo experimento foram avaliadas as variáveis biométricas, morfológicas, dinâmica de acúmulo de MS e dos nutrientes em cana-de-açúcar submetida às fontes de fertilização, descritas anteriormente. No terceiro experimento foi realizada avaliação química e bromatológica de cana-de-açúcar submetida à fontes de adubação. O experimento composto por blocos inteiramente casualizados sendo 6 blocos sub-divididos em 2 parcelas. Os dados gerados foram analisados pelo procedimento Proc Mixed e Proc NLIN, do programa *SAS.* Não se observou efeito do tratamento sobre nunhuma variável avaliada. A produtividade média de massa verde variou entre 162 e 188 tMV/ha, podendo ser considerada elevada. O número de folhas verdes partiu de 9,5 aos 10 meses e atingiu cerca de 10 aos 18, o que é esperado, uma vez que ao passar do tempo há aumento da biomassa das plantas. O mesmo se observo para folhas secas, partindo de cerca de zero folhas por planta até cerca de 3 folhas. O peso das folhas também foi crescente. O peso e comprimento do colmo aumentaram de Março para Maio, mas apartir de Maio e Julho esse crescimento foi estagnado, não aumentando significativamente devido à seca. Porém, apartir de Julho esse crescimento voltou a ocorrer com o aumento das chuvas. A cana-de-açúcar apresentou 10 ^{o}Brix aos 10 meses, 17°Brix aos 12 meses e 20°brix aos 20 meses. O índice de maturidade aumentou, saindo de 33,46 aos 10 meses e atingindo 88,5 aos 18 meses. Aos 12 meses a cana-de-açúcar apresentou teor de matéria seca de 24%, e aos 18 meses 28%. Os teores de FDN e FDA da planta inteira dimunuiu ao longo do tempo, dos 10 meses (61% e 38,4% de FDN e FDA, respectivamente) para os 12 meses e permanecendo constante até os 18 meses (55% e 35,6% de FDN e FDA, respctivamente). Foi observado que existe correlação positiva entre DIVMS e do ^{o}Brix,e a equação, $DIVMS = 41,35 + {}^{o}Brix$; com $R^2=0,73$ e $P<0,01$ se estabelecendo como ferramenta importante para se estimar a DIVMS. Ao longo do tempo, a contagem de bactérias ácido láticas e de leveduras foi crescente. De forma geral, todas as frações da planta apresentaram contagem numericamente semelhante, partindo de cerca de 4

log ufc/gMV aos 10 meses e atingindo cerca de 5,5 log ufc/gMV aos 18 meses. Aos 10 meses a planta inteira de cana-de-açúcar apresentou contagem de leveduras de 4 log ufc/g MV permanecendo constante até os 18 meses, quando atingiu 5,7 log ufc/g MV. A fonte de adubação, quer seja química ou orgânica, não interfere na população de microrganismos, que entretanto, varia em função do período experimental e das condições climáticas.

Palavras-chave: Bactérias ácido-láticas, cana-de-açúcar; colmo; folhas secas; folhas verdes; planta inteira; leveduras

2. Abstract

Assessment of microorganisms dynamics in sugarcane IAC (93-3046) plants

The numbe of microbial species in forages during the ensiling is responsible for the silage fermentation, and the numbeof colony forming units (cfu) changes during the crop cycle and environmental conditions. It suggests that the initial microbial profile strongly influences the effectiveness of additives used in the process. In this context, we propose three trials to characterize the microbial population in plants of sugarcane. The first trial evaluated the microbial population in plants of sugarcane by the technique of pour plating. The treatment consisted of two levels of fertilization (NPK and NPK associated with solid manure - 120kg N / ha) applied immediately after sugarcane was harvested by hand. The objective was quantify the number of lactic acid bacteria, yeasts and molds, as well as relating their frequencies with environmental effects, fertilization and stage of maturation, with samples taken at 10, 12, 14 and 18 months, corresponding to the months of March, May, July and November 2009. The second trial measured the biometric variables, morphological, the accumulation of dry matter and nutrients in sugarcane subjected the sources of fertilization, as mensioned. The third trial performed chemical assessments of sugarcane subjected to the sources of fertilization. The trials consisted of a completely randomized design with six blocks sub-divided into two plots. Data were analyzed by the procedure Proc Mixed and Proc NLIN of SAS program. There was no effect of treatment in any trial. The fresh yield ranged from 162 to 188tGM/ha which can be considered high. The number of green leaves was increased from 9.5 to 10 to 10 to 18, which is expected, since there is an increase of plant biomass across the time. The same was observed for dead leaves, from about 0 leaves per plant up to 3 leaves. The weight of the leaves was also increased. The weight and length of the stem increased from March to May, and became more intensive from July with increasing rainfall. However, during the dry season (May - July) there was a decreased growing rate.The sugarcane ^{o}Brix was 10 at 10 months, 17 ^{o}Brix at 12 months and 20°Brix to 20 months. The maturity index increased, from 33.46 to 10 months reaching 88.5 at 18 months. At 12 months the sugarcane showed dry matter content of 24% and 28% at 18 month. The NDF and ADF of the whole plant decreased over time from 10 months (61% and 38.4% NDF and ADF, respectively) for 12 months and remained constant until 18 months (55% and 35 6% NDF and ADF, respectively). A is positive correlation between IVDMD and ^{o}Brix was observed, and the equation, IVDMD = 41.35 + ^{o}Brix, with R^2 = 0.73 and P <0.01 is an important tool to estimate IVDMD. Over time, the counts of lactic acid bacteria were increased. In general, all plant fractions showed similar counts, starting from 4 log cfu/gGM to 10 months and reaching about 5.5 log cfu/gGM to 18 months. At 10 months the whole plant sugarcane had yeast count of 4 log cfu/gGM remaining constant until 18 months, when it reached 5.7 log cfu / g MV. The source of fertilizer, whether chemical or organic, does not interfere in the population of microorganisms, however, varies depending on the experimental period and climatic conditions.

Key words: Dry leaves, green leaves, lactic acid bacteria, stem, sugar cane, whole plant, yeast

Lista de tabelas

Tabela 1 – Valores médios de variáveis bromatológicas e microbiológicas de frações de plantas de cana-de-açúcar na fase pré-experimental.

Tabela 2 – Valores médios de variáveis agronômicas de frações de plantas de cana-de-açúcar na fase pré-experimental.

Tabela 3 – Variáveis climáticas observadas durante o período de coleta.

Tabela 4 – Produtividade média em matéria verde e seca (t/ha) do talhão de cana-de-açúcar (IAC 93-3046) ao longo do período experimental.

Tabela 5 – Média de número e peso (kg) de folhas verdes e secas de plantas de cana-de-açúcar (IAC 93-3046) ao longo do tempo.

Tabela 6 – Média do comprimento, diâmetro e peso de colmo, número de nós e internós de plantas de cana-de-açúcar ao longo do período experimental.

Tabela 7 – Média do ^{o}Brix da planta toda e de partes da plantas de cana-de-açúcar ao longo do período experimental.

Tabela 8 – Índice de maturidade de plantas de cana-de-açúcar (IAC 93-3046) ao longo do período experimental.

Tabela 9 – Valores médios dos teores de matéria seca (MS) de frações de plantas de cana-de-açúcar ao longo do período experimental.

Tabela 10 – Valores médios dos teores de FDN de frações de plantas de cana-de-açúcar ao longo do período experimental.

Tabela 11 – Valores médios dos teores de FDA de frações de plantas de cana-de-açúcar ao longo do período experimental.

Tabela 12 – Valores médios do coeficientes de DIVMS de frações de plantas de cana-de-açúcar ao longo do período experimental.

Tabela 13 – Contagem de bactérias ácido-láticas em frações de plantas de cana-de-açúcar ao longo do período experimental.

Tabela 14 – Média de contagem de leveduras em frações de plantas de cana-de-açúcar ao longo do período experimental.

Lista de figuras

Figura 1 – Vista superior da área experimental no Departamento de Zootecnia da ESALQ

Figura 2 – *Croqui* das parcelas experimentais com identificação das linhas para avaliações agronômica, nutricional e microbiológica

Figura 3 – Precipitação (mm), temperatura média (^{o}C) e umidade relativa do ar (UR, %) do município de Piracicaba - SP, no ano de 2009. Fonte: : ESALQ, Universidade de São Paulo, Departamento de Ciências Exatas, 2009

Figura 4 – Correlação entre ^{o}Brix e coeficiente de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de plantas de cana-de-açúcar (IAC 93-3046). DIVMS=40,74+1,04^{o}Brix; R^2=0,73; P<0,01; P=0,61 para inclinação=1.

Figura 5 – Comparação das médias de contagem do número bactérias ácido-láticas e leveduras em plantas e frações de plantas de cana-de-açúcar (IAC 93-3046) ao longo do período experimental.

3. Introdução

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com área estimada de cerca de 5,343 milhões de hectares e produção estimada de 691,7 milhões de toneladas (IBGE, 2009). O estado de São Paulo, o maior produtor brasileiro apresenta produtividade média de 78 toneladas de cana por hectare, e possui diversas unidades produtoras que ultrapassaram a marca de 90 a 95 toneladas de cana por hectare (MACEDO, 2008). Nas ultimas décadas o Brasil dobrou sua área de cana-de-açúcar plantada, basicamente em função da produção do álcool, essa expansão ocorreu principalmente em regiões de solo fértil e climas favoráveis (TAKESHI, 2008). Além do uso industrial, a pecuária tem sido um dos destinos dessa cultura.

A cana-de-açúcar, como recurso forrageiro, já é conhecido há muitos anos, mas só em anos recentes é que essa cultura tem ganhado espaço dentro da pecuária nacional. Isso se deve a uma série de vantagens como alta produtividade (80 - 150t/ha), baixo custo por unidade de matéria seca, manutenção do valor nutritivo por até seis meses após a maturação e período de colheita coincidente com a época de escassez de forragem nas pastagens (SILVA, 1993).

Porém, o uso da cana-de-açúcar em regime de capineira apresenta algumas limitações como, por exemplo, a dificuldade de se trabalhar com um grande rebanho, onerosa mão-de-obra e maquinário, dificuldade do movimento de máquinas na época das chuvas e redução no teor de sacarose durante as chuvas e susceptibilidade a perda da cultura por geada ou incêndio.

Assim, o processo de ensilagem apresenta-se como alternativa mais coerente de se evitar os riscos da cultura e melhorar a logística, pois permite a colheita de grandes áreas em tempo reduzido, além de permitir o corte no estágio ideal de maturação.

A ensilagem traz como desvantagem a elevada fermentação alcoólica, oriunda da atividade intensa de leveduras, o que acarreta na queda de carboidratos solúveis, alta concentração de etanol e perdas excessivas de matéria seca durante o processo de conservação (ALLI et al, 1983).

Aditivos químicos e inoculantes microbianos têm sido utilizados com o intuito de melhorar o padrão de fermentação e conservação das silagens, promovendo o

desenvolvimento dos microrganismos benéficos, como as bactérias produtoras de ácido lático, ao mesmo tempo em que se inibe aqueles indesejáveis, como as leveduras e clostridia.

Porém, para que as bactérias ácido-láticas tenham êxito em preservar a silagem, estas devem superar a população epifítica da forragem, tornando-se a população dominante no ambiente. Pereira e Santos (2006), verificaram que população de bactérias aeróbias é muito maior que a população de bactérias láticas no momento da ensilagem, o que acarreta em falhas no processo fermentativo.

Poucos são os trabalhos que caracterizaram a população microbiana da cana-de-açúcar, o que dificulta o entendimento da dinâminca da população de microrganismos que afetará diretamenta a fermentação das silagens e a viabilidade de aditivos usados o controle da fermentação para silagens de cana-de-açúcar.

Com isso, o objetivo desse trabalho é realizar análise descritiva da população microbiana em plantas de cana-de-açúcar (IAC 93-3046), utilizando à técnica de ‘plaqueamento’, bem como estabelecer possíveis relações entre fatores ambientais, estádio de maturação e valor nutritivo.

3.1 Referências

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

IBGE; 2009. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Web Page: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias.

MACEDO,N.Variedades da cana-de-açúcar,2008.ComCiência.Disponível em: http//www.comciencia.br/comciencia/?section=23hjd=258>. Jun 2009

PEREIRA, O. G., SANTOS, E. M. Microbiologia e processo de fermentação de silagens. In: **III Simpósio sobre manejo estratégico da pastagem**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. 1: 393-430, 2006.

SILVA, S. C. A cana-de-açúcar como alimento volumoso suplementar. In: **Volumosos para bovinos**. Peixoto, A M. et al. (ed), FEALQ, 1993. p. 59-74.

TAKESHI,H. Cana no estado e São Paulo,2008.Disponível em: http//www.takeshi.inf.br>. Jun 2009.

4. Revisão Bibliográfica

A produção mundial de cana-de-açúcar ocupa área aproximada de 22 milhões de hectares, atingindo uma produção anual de 1590 milhões de toneladas (FAO, 2009).

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes do país, com área estimada de 8,5 milhões de hectares plantados, cerca de 1% da área nacional, sendo que nos próximos 10 anos a estimativa é de 12 milhões de hectares (CANAL DA CANA, 2009). Além do uso industrial, a pecuária tem sido um dos destinos dessa cultura.

Relatos do início do século XX já mencionavam a cana-de-açúcar como sendo ótimo recurso forrageiro complementar, porém só em anos recentes é que essa cultura tem ganhado espaço dentro da pecuária nacional devido a vantagens como alta produtividade (80 - 150t/ha), baixo custo por unidade de matéria seca, manutenção do valor nutritivo por até seis meses após a maturação e período de colheita coincidente com a época de escassez de forragem nas pastagens (SILVA, 1993), além de alto teor de carboidratos solúveis de alta digestibilidade, podendo chegar até a 23% da MS (PEDROSO et al., 2005).

A variedade de cana-de-açúcar utilizada com foco à produção animal deve ter características semelhantes às desejadas pelas indústrias de açúcar e álcool. É preciso que as variedades tenham alta produtividade, reduzindo custo por unidade de área, boa capacidade de rebrota, uma vez que a cana-de-açúcar é colhida no inverno, sendo que a vantagem econômica está na quantidade de cortes por plantio, elevado teor de sacarose durante longo período e resistência a pragas e doenças (TORRES & COSTA, 2001). Porém, quando utilizada exclusivamente em dietas para animais, a cana-de-açúcar apresenta limitações quanto a disponibilidade de nutrientes como proteinas e minerais (PEDROSO, 2003), além existirem limitações no consumo por parte dos animais devido, principalmente, ao alto conteúdo e à baixa digestibilidade de sua fibra (BOIN, 1985; RODRIGUES, 2000; PEREIRA et al., 2001).

4.1 Composição químico-bromatológica da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é um alimento pobre em proteínas, lipídios e minerais. Isto pode ser observado em correlações não significativas destas características com a digestibilidade *in*

vitro da matéria orgânica, a partir de dados de 66 cultivares avaliados por Pate e Coleman (1975).

Cerca de 90% da matéria seca da cana-de-açúcar é composta por caboidratos estruturais, como a fibra em detergente neutro (FDN) e não estruturais, representado especialmente pela sacarose (BARNES, 1974). Entretanto, os teores de sacarose de FDN são mutuamente exclusivas, uma vez que o aumento no teor de sacarose implica em redução no teor de FDN. Assim, recomenda-se para a alimentação animal variedades com alto teor de sacarose, o que promove incremento da digestibilidade (TORRES et al., 2001; LANDELL et al., 2002).

Compostos nitrogenados são pouco representativos na cana-de-açúcar, sendo o principal representante os aminoácidos (WIGGINS e WILLIAMS, 1951). O teor de proteina bruta também é inferior ao de outras fontes de forragem como o milho (SILVA, 1997; FONSECA et al., 2002)

As folhas da cana-de-açúcar apresentam conteúdo cinco vezes maior de nitrogênio que o colmo, embora o colmo represente cerca de 80% da planta. Ainda assim, o teor de proteina bruta geralmente não ultrapassa os 2% da matéria seca. (RODRIGUES et al., 1997). Mesmo assim, o ideal é uma variedade que apresente menor proporção de folhas, uma vez que esta porção da planta está associada à maiores teores de fibra e, portanto, menor digestibilidade que a fração representada pelos colmos.

Em relação ao teor de extrato-etéreo, a cana-de-açúcar possui baixa expressividade, uma vez que a maior parte é representada pela camada de cera que cobre os colmos, provavelmente uma proteção contra o excesso de perda de água dos colmos pela evaporação (BARNES, 1974). No interior da planta apenas traços de ácidos graxos são encontrados, o que faz com que a cana-de-açúcar tenha pouca importância como fonte de energia na forma de gordura.

O teor de minerais na cana-de-açúcar é muito baixo, especialmente cálcio e fósforo (BOIN et al., 1987). O teor de sílica é alto, embora este não possua importância nutricional (BARNES, 1974). Apenas o potássio apresenta importância nutricional na cana-de-açúcar.

A porção fibrosa da cana-de-açúcar é reduzida quando comparada à outras forrageiras tropicais com alto potencial de produção, mas os valores observados para essa fração são muito variáveis (NUSSIO et al., 2006), o que provavelmente explica as grandes diferenças no

desempenho animal em diferentes experimentos, uma vez que a fração FDN está associada ao consumo e digestibilidade do alimento (TEIXEIRA, 2004).

Segundo Gooding (1982), um importante fator na escolha de variedades de cana-de-açúcar para alimentação animal é a relação entre FDN e teor de açúcares, sendo que quanto menor essa relação, melhor a variedade para uso forrageiro. Isso é corroborado por Rodrigues et al. (2001), pois esses autores observaram que é melhor selecionar variedades com menor relação FDN/açúcares para a alimentação animal com o intuito de evitar maiores teores de fibra na dieta, e, conseqüentemente maximizar o consumo de açúcares, que é o componente mais digestível da cana-de-açúcar.

Apesar da concentração de FDN apresentar-se em torno de 50% da matéria seca na cana-de-açúcar, que pode-se considerar como intermediária, sua digestibilidade é baixa (PRESTON, 1975), em torno de 20%, quando comparada à do milho, que é de cerca de 40% (ANDRADE, 1999; CORRÊA et al., 2003). Dietas à base de cana-de-açúcar apresentam fibra de lenta degradação ruminal e elevado teor de fibra não-degradável, o que limita a ingestão (PEREIRA et al., 2001). Porém, essa baixa digestibilidade é compensada pelo alto teor de açúcares de elevada digestibilidade, superior à 90%, o que confere à cana-de-açúcar digestibilidade semelhante ao da planta de milho (COSTA, 2002).

Comparando dietas em que FDN de silagem de milho foi parcialmente substituída por FDN de cana-de-açúcar, Andrade (1999), observou que novilhas holandesas alimentadas por 8 semanas com dietas isonutricionais, apresentaram ganho de peso diário de 1kg para dietas com cana-de-açúcar enquanto animais alimentados com silagem de milho apresentaram ganho de peso diário de 1,2kg, sendo esses valores estatisticamente diferentes. Isso por que o consumo para as dietas com cana-de-açúcar foi 0,5 kg menor que as dietas com silagem de milho, o que reduziu o consumo de energia. Já Gallo et al. (2000), avaliaram teores crecentes de cana-de-açúcar nas dietas de novilhas holandesas e constataram que houve queda linear no consumo de matéria seca com o aumento dessa forragem na dieta.

Tradicionalmente a cana-de-açúcar é utilizada *in natura* na alimentação de rebanhos com base no corte e fornecimento diário. Entretanto, o uso da cana-de-açúcar em regime de capineira apresenta algumas limitações como, por exemplo, a dificuldade de se trabalhar com um rebanho grande, mão-de-obra onerosa e maquinário, dificuldade do movimento de máquinas na época das chuvas, redução no teor de sacarose durante as chuvas e

susceptibilidade a perda da cultura por geada ou incêndio (NUSSIO e SCHMIDT, 2004). Assim, a ensilagem é uma forma de se solucionar tais problemas logísticos na fazenda.

4.2 Ensilagem de cana-de-açúcar

A ensilagem da cana-de-açúcar apresenta-se como solução para alguns problemas operacionais, permitindo a colheita de grandes áreas num curto espaço de tempo, na época em que a forrageira apresenta seu melhor valor nutritivo, o que coincide com o período mais propício aos trabalhos no campo, ou seja, durante a seca, além de permitir o aumento da longevidade do talhão devido à melhor execução das práticas agronômicas de manejo (SCHMIDT, 2008).

O principal objetivo da ensilagem é preservar ao máximo a composição original da planta e maximizar a quantidade de nutrientes ingeridos pelo animal (SANTOS et al., 2008) por meio da acidificação da massa ensilada pela concentração de ácidos orgânicos oriundos da atividade de bactérias láticas, e que inibem a atividade de microrganismos espoliadores (LUIZ e RAMÍREZ, 1986). Assim, durante o processo fermentativo ocorrem transformações bioquímicas na massa de forragem. A atividade enzimática das plantas e a atividade de bactérias láticas, clostrídios, enterobactérias, fungos e leveduras são as responsáveis por essas transformações (McDONALD, 1981).

O processo de ensilagem ocorre basicamente em duas fases principais: a respiração, onde ocorre a depleção do oxigênio da massa ensilada e outra de fermentação ou acidificação, em que ocorre, sobretudo, a produção de ácido lático. A fase de respiração permite o estabelecimento das condições anaeróbias no silo e a fase de fermentação promove a inibição do desenvolvimento de microrganismos indesejáveis.

Quando a quantidade de ácidos orgânicos é suficientemente grande, a fermentação é paralisada e o processo estabiliza-se (VILELA, 1998). De acordo com Torres (1984), a respiração no início do processo de ensilagem, decorrente da atuação de microrganismos aeróbios, somada à respiração das células do material ensilado, consome, num período de 4 a 6 horas, todo o oxigênio disponível, produzindo, dióxido de carbono, água e calor. A temperatura ideal nesta fase deve estar entre 27°C e 38°C, sendo propícia ao crescimento de bactérias ácido-láticas.

Porém, se a compactação e vedação do silo não forem respeitadas, haverá excesso de oxigênio na massa ensilada, que induzirá à maior respiração celular e atividade microbiana, causando aumento da temperatura inicial acima de 44°C, reduzindo as chances de ocorrer fermentação lática. Como conseqüência, haverá redução no valor nutritivo da forragem ensilada, devido, principalmente, às perdas de digestibilidade de proteína (TORRES, 1984). Nesta fase, as enterobactérias, produtoras de ácido acético, se multiplicam em função da taxa de oxigênio, temperatura e pH. À medida que o pH diminui, estes microrganismos são substituídos por bactérias ácido-lácticas como *Streptococcus* e *Leuconostoc*, as quais reduzem ainda mais o pH, possibilitando a ação de *Pediococcus* e *Lactobacillus*, que crescem mais lentamente, mas com alta produção de ácido lático, estabelecendo pH entre 3,8 a 4,2, que é fundamental para a estabilidade da silagem (McDONALD et al., 1991). A queda do pH protege a silagem contra a ação de microrganismos espoliadores, como *Clostridium* spp, responsáveis pela produção de ácido butírico e que são incorporados durante o processo de ensilagem na forma de esporos deteriorando a silagem (WOOLFORD, 1984).

Segundo Costa et al. (2001), três características interferem no processo de ensilagem: alto teor de umidade; alta capacidade tampão e baixos teores de carboidratos solúveis. Estes fatores têm influência negativa sobre o processo fermentativo, impedindo o rápido abaixamento do pH, permitindo fermentações secundárias indesejáveis e, assim, prejudicando a qualidade do produto preservado.

A cana-de-açúcar apresenta características favoráveis à ensilagem como teor de matéria seca variando entre 25-30%, alta concentração de carboidratos solúveis e poder tampão que permite o rápido abaixamento do pH até 3,5 (FREITAS et al., 2006). No entanto, a ensilagem da cana-de-açúcar traz como desvantagem a elevada fermentação alcoólica, oriunda da atividade intensa de leveduras que podem estar presentes na forragem na ordem de 10^6 ufc/g de forragem fresca, e convertem os carboidratos solúveis presentes na forragem a etanol, dióxido de carbono e água, limitando a atividade de bactérias ácido-láticas. Essa reação bioquímica foi descrita por McDonald et al. (1991):

$$Glicose + 2\ ADP + 2\ Pi = 2\ etanol + 2\ CO_2 + 2\ ATP + 2\ H_2O$$

Isso acarreta queda no teor de carboidratos solúveis, alta concentração de etanol e perdas excessivas de matéria seca durante o processo de conservação (KUNG E STANLEY, 1982; ALLI et al., 1983), além de contribuir para a deterioração aeróbia da silagem (DHIEHUIS

et al., 1999), uma vez que que o alto teor de carboidratos residuais e ácido lático predispõe a silagem à ação de microorganismos espoliadores (McDONALD et al., 1991). Em relação ao teor de etanol, embora haja a utilização parcial por parte do animal como fonte de energia, grandes quantidades são volatilizadas durante a abertura (PEDROSO et al., 2005).

A diminuição do valor nutritivo da cana-de-açúcar com a ensilagem pode ser observada nos dados gerados por Alcântara et al. (1989), que relataram redução na digestibilidade *in vivo* da MS (66,4 vs 55,3%) em carneiros machos alimentados com silagem, em relação aos que receberam a forragem fresca, tendo sido ambas as dietas suplementadas com uréia e minerais. Esses autores constataram que a cana-de-açúcar ensilada após 30 dias apresentou aumento de 17 unidades percentuais de fibra em detergente neutro (FDN) (de 50,25% para 67,48%), 9 unidades percentuais de fibra em detergente ácido (FDA) (de 34,96% para 44,15%) e 8 unidades percentuais de hemicelulose (de 15,29% para 23,33%) em relação à cana-de-açúar *in natura*.

Alli et al. (1983), observaram grande acúmulo de carboidratos solúveis em plantas de cana-de-açúcar, com teores próximos a 34% no momento da colheita. Entretanto, após a ensilagem e 55 dias de fermentação, os teores residuais de carboidratos solúveis de apenas 1,27% da MS e teores de etanol da ordem de 8,7% da MS. A diminuição dos teores de carboidratos levou o aumento da porção fibrosa, representando um aumento em 24 unidades percentuais no teor de FDA da silagem.

Kung e Stanley (1982), utilizando cana-de-açúcar em diferentes estadios de maturação, observaram que a porção fibrosa da silagem apresentou incremento em relação à cana-de-açúcar freca, para todas as idades de corte, refletindo isso na queda de carboidratos solúveis. O mesmo foi observado por Coan et al. (2002), com cana-de-açúcar colhida aos doze meses de rebrota e ensiladas por 55 dias.

Castro Neto (2003) verificou redução no teor de carboidratos solúveis de 19,7% na planta original para 2,5% na cana-de-açúcar ensilada sem o uso de aditivo.

Pedroso et al. (2005), relataram síntese de etanol e gases oriundos da fermentação alcoólica gerando perdas de até 31% da materia seca total. Esses autores também relataram redução no valor de carboidratos solúveis de 23% para 6,8% da MS e teor de etanol de 8% da MS.

Portanto, para melhorar a qualidade da fermentação no silo, reduzir perdas de nutrientes e aumentar a ingestão e o desempenho animal, é indicado o uso de aditivos (WILKINSON, 1998). De acordo com Vilela (1984), os aditivos podem desempenhar diferentes funções como estimular a fermentação ou inibí-la. Mas sua ação, entre outros fatores, depende da população epifítica da forragem, pois essa afeta diretamente a eficiência do aditivo.

4.3 Microrganismos associados à ensilagem

Geralmente, os microrganismos existentes em maior número nas plantas forrageiras são enterobactérias, leveduras e fungos, que consomem açúcares durante a ensilagem, sendo considerados indesejáveis (BOLSEN et al., 1992). Embora bactérias indesejáveis estejam associadas à perdas qualitativas da silagem, bem como risco de intoxicação dos animais, seu desenvolvimento está associado à silagens de fermentação incompleta ou reduzida (BRAVO-MARTINS, 2004). É necessário considerar que além das alterações na composição química da silagem, o desenvolvimento de fungos (WOOLFORD, 1990) pode prejudicar à saúde dos animais e das pessoas. Além disso, a presença de leveduras é considerada prejudicial ao processo de ensilagem, porque estes microrganismos não contribuem para a acidificação e estão associados com a deterioração aeróbia das silagens (DRIEHUIS et al., 1999).

4.3.1 Bactérias

4.3.1.1 Bactérias ácido láticas

As bactérias ácido-láticas são as mais abundantes nas forragens e as mais importantes para o processo fermentativo. De acordo com Stefanie et al. (2000), as bactérias mais encontradas nas silagens são dos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*. Essas bactérias suportam, no geral, temperaturas entre 5°C e 50°C, sendo o ideal para seu desenvolvimento faixa de temperatura variando entre 25°C e 40°C, denominadas de mesófilas. (McDONALD et al., 1991). Também, elas são gram-positivas, catalase negativas, anaeróbias aerotolerantes e incapazes de sintetizar ATP pela via respiratória (LIMA et al., 1975).

Em relação ao metabolismo, as bactérias ácido-láticas podem ser homofermentativas obrigatórias, heterofermentativas facultativas e heterofermentativas obrigatórias (STEFANIE et al., 2000).

As homofermentativas obrigatórias produzem mais de 85% de ácido lático a partir de hexoses como glicose, mas não podem degradar pentoses como xilose. Podem ser citadas espécies como *Pediococcus damnosus* e *Lactobacillus ruminis*. Já as heterofermentativas facultativas, como as homofermentativas, produzem ácido, principalmente lático, a partir de hexoses, mas podem também degradar algumas pentoses a ácido lático, produzindo dióxido de carbono, etanol e/ou ácido acético. Exemplos de heterofermentativas facultativas são *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* e *Enterococcus faecium*. As heterofermentativas obrigatórias, degradam hexoses e pentoses, produzindo dióxido de carbono, etanol e/ou ácido acetico. As heterofermentativas obrigatórias são membros do gênero *Leuconostoc* e algumas espécies de lactobacilos como *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus buchneri* (DEVRIESE et al., 1992; WEISS, 1992; HOLZAPFEL e SCHILLINGER, 1992; HAMMES et al., 1992).

4.3.1.2 Enterobactérias e bactérias ácido-acéticas

Outro grupo importante de bactérias que afeta a qualidade da silagem é o de enterobactérias. Essas são gram-negativas, não formadoras de esporos, aeróbias facultativas, que fermentam carboidratos à ácido acético (McDONALD et al., 1991). Embora o ácido acético seja desejável no processo fermentativo, pois possui ação anti-micótica (WOLLFORD, 1975; MOON, 1983), o crescimento de enterobactérias durante a ensilagem é indesejável, pois, competem com as bactérias ácido láticas pelos açúcares disponíveis, podendo também degradar proteína. Esta degradação de proteína não só causa redução no valor nutricional, mas também conduz à produção de aminas e ácidos graxos ramificados, apresentando efeito negativo na palatabilidade da silagem, diminuindo consumo voluntário. Ademais, a amônia formada por proteólise aumenta a capacidade tampão do material ensilado, dificultando a diminuição do pH da silagem (WOOLFORD, 1984; McDONALD et al., 1991). As enterobactérias normalmente crescem intensivamente durante os primeiros dias de ensilagem,

mas sua população decresce rapidamente à medida que o pH diminui (MUCK, 1988; OSTLING e LINDGREN, 1995).

Uma característica especial desses microrganismos é a sua capacidade de reduzir nitrato (NO_3) à nitrito (NO_2) durante a ensilagem. Os produtos finais dessa redução são os gases óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O) (SPOELSTRA, 1985). Esses gases possuem efeito prejudicial no tecido pulmonar dos animais e podem causar uma enfermidade com sintomas parecidos com a pneumonia (WOOLFORD, 1984).

Para impedir que os animais entrem em contato com óxidos de nitrogênio gasoso, eles não devem ser alojados próximos aos silos de armazenamento durante o enchimento e nas primeiras semanas de armazenagem da silagem (O'KIELY et al., 1999). Uma pequena redução à nitrito (NO_2) é considerada positiva para qualidade de silagem, pois o nitrito (NO_2) e óxido nítrico (NO) formados têm efeito inibitório muito efetivo contra clostrídios (SPOELSTRA, 1985).

Outro grupo de bactérias produtoras de ácido acetico que são indesejáveis no processo de ensilagem são as bactérias ácido-acéticas. Diferente das enterobactérias que são aeróbias facultativas, essas são bactérias aeróbias obrigatórias, ácido-tolerantes e pertencem ao gênero *Acetobacter* (SPOELSTRA et al., 1988). A atividade de *Acetobacter* spp na ensilagem é indesejável porque podem iniciar a deterioração aeróbia, diminuendo a estabilidade aeróbia das silagens, uma vez que podem oxidar lactato e acetato a gás carbônico e água (DRIEHUIS e VAN WIKSELAAR, 1996).

Ainda assim, a presença desses microrganismos na silagem é indesejável, e portanto, métodos de ensilagem como compactação eficaz, rápida e eficiente vedação do silo, exaurindo as reservas de oxigênio e que induzam à rápida e suficiente diminuição nos valores de pH, auxiliam a diminuir o crescimento desses (McDONALD et al., 1991).

4.3.1.3 Bactérias dos gêneros Clostridium, Bacillus e Listeria

Dentre as bactérias mais indesejáveis relacionadas ao processo de ensilagem, as bactérias do gênero Clostriduim são as principais. Esses microrganismos são anaeróbios estritos, gram-positivos, esporulados, que crescem sob condições estritamente anaeróbias, com algumas exceções aerotolerantes (McDONALD et al., 1991). Nussio et al. (2002) relataram que perdas da silagem podem ser quantificadas por meio de desaparecimento de

matéria seca ou energia durante o processo de fermentativo. 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 e MUCK, 1994).

Silagens que apresentam típica fermentação clostrídica são caracterizadas por alto conteúdo de ácido butírico, pH alto e elevado conteúdo de amônia e aminas (STEFANIE et al., 2000). 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). Segundo Lindgren e Dobrogosz (1990), esporos de *Clostridium* spp podem ser veiculados pela silagem, contaminando o leite. Isto ocorre por que os esporos de clostrídios podem sobreviver à passagem pelo trato digestivo dos animais. Esporos de clostrídios presentes na silagem podem ser transferidos para o leite, para as fezes e, por contaminação fecal, para o úbere.

Os bacilos, assim como os clostrídios, são bactérias formadoras de esporos. Entretanto, elas são aeróbias ou aeróbias facultativas e todos os clostrídios são anaeróbios obrigatórios (CLAUS e BERKELEY, 1986; CATO et al., 1986). Os bacilos aeróbios facultativos fermentam grande variedade de carboidratos formando ácidos orgânicos como acetato, lactato, e butirato; ou etanol, 2,3-butanediol e glicerol, o que predispõe a silagem a ação de microrganismos espoliadores em condições aeróbias, reduzindo a estabilidade aeróbia das silagens (CLAUS e BERKELY, 1986). Entretanto, algumas espécies específicas de bacilos podem produzir substâncias antifúngicas e têm sido usadas para inibir a deterioração aeróbia de silagem (PHILLIP e FELLNER, 1992; MORAN et al., 1993). Porém, as bactérias do gênero *Bacillus* estão freqüentemente envolvidas na deterioração inicial de silagens, sendo que *Bacillus cereus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus Polymyxa* são as species que mais estão envolvidas no processo de deterioração (PEREIRA e REIS, 2001).

Os representantes do gênero Listeria pertencem à família *Corynebacteriaceae*, representados pelas species *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria*

seeligeri, *Listeria welshimeri* e *Listeria* grayi. Todas as espécies de Listeria são encontradas na natureza e podem, eventualmente, ser contaminantes de alimentos (BEUCHAT e RYU, 1997). Esses microrganismos são aeróbios ou aeróbios facultativos. Em tratando-se de qualidade de silagem, o representante desse gênero mais importante é a aeróbia facultativa *Listeria monocytogenes*, pois esta espécie é patogênica à animais superiores (SCHLECH, 1996). Silagem contaminada com *Listeria monocytogenes* tem sido associada com casos fatais de listeriose em ovelhas e cabras (VAZQUEZ-BOLAND et al., 1992; WIEDMANN et al., 1994). Além disso, Sanaa et al. (1993) identificaram silagem de baixa qualidade como uma das principais fontes de contaminação do leite cru por *Listeria. monocytogenes*. O crescimento e a sobrevivência desta bactéria em silagem são determinados pelo grau de anaerobiose e o pH de silagem. A *Listeria monocytogenes* tolera valores de pH entre 3,8 – 4,2 por longos períodos, porém, apenas em condições aeróbias. Sob condições estritamente anaeróbias este organismo pode ser rapidamente destruído nesta faixa de pH acima citado (Donald et al., 1995).

4.3.2 Mofos

Principalmente por apresentarem crescimento lento, bastante inferior a taxa de crescimento das leveduras, os mofos são responsáveis por pequeno efeito na deterioração aeróbia das silagens. Entretanto, esses microrganismos exigem atenção devido à capacidadede produção de toxinas, podendo acarretar em graves problemas para o desempenho animais. De acordo com Edds (1983), os animais são sensíveis à ação das micotoxinas, as quais podem causar lesões hepáticas graves de efeito quase sempre letal e/ou crônicas, lesões progressivas, severa depressão no crescimento e alterações hepátomas após período prolongado de ingestão de silagens contaminados. Dependendo do tipo e concentração da toxina presente ocorrem problemas digestivos secundários ou danos severos no fígado e rins, abortos, problemas de fertilidade e depressão do sistema imunológico (SCUDAMORE e LIVESEY, 1998).

Esses microrganismos se desenvolvem principalmente em ambientes com teor de umidade acima de 13%, umidade relativa acima de 70%, temperatura acima de 13°C,

nutrientes prontamente disponíveis, pH maior que 5,0 e presença de O_2. O crescimento de está associado à silagens mal compactadas e mal vedadas (ARCHUNDIA e BOLSEN, 2001).

Os mofos, principalmente dos gêneros *Aspergillus, Fusarium* e *Penicillum*, crescem em silagens onde há presença de oxigênio, produzindo micotoxinas que podem acarretar danos aos animais quando ingeridas (MAHANNA, 1994; MUCK, 1988). A espécie *Penicillium roqueforti* é uma das mais problemáticas para o processo de ensilagem, pois é ácido-tolerante e que pode crescer em baixos níveis de oxigênio e em níveis altos de CO_2, predominando em tipos diferentes de silagem (LACEY, 1989; NOUT et al., 1993).

4.3.3 Leveduras

As leveduras são organismos eucarióticos, aeróbios facultativos e heterotróficos e ocupam papel importante na deterioração de silagens, pois, sob condições anaeróbias, as leveduras fermentam os açúcares solúveis da forragem convertendo-os em etanol, CO_2 e água, dando origem a silagens com baixos teores de ácidos lático e acético (ALLI et al., 1983). Sob condições aeróbias, muitas espécies de leveduras degradam ácidos orgânicos (lático, acético, propiônico, cítrico, málico) e etanol, produzidos durante a fermentação, à CO_2 e H_2O, elevando o pH da silagem e predispondo-a a ação de outros microrganismos espoliadores (McDONALD et al., 1991). Por exemplo, as leveduras *Candida krusei*, *Pichia fermentans* e *Hansenula anomala* são iniciadoras do processo de deterioração aeróbia da silagem. Em etapa subsequente, bactérias *Bacillus cereus, Bacillus firmes, Bacillus lentus e Bacillus sphaericus* podem estar envolvidas no processo de deterioração aeróbia da silagem (PEREIRA e REIS, 2001).

A presença de leveduras em silagens foi identificada inicialmente em 1932, mas só em 1964, quando alguns pesquisadores demonstraram que essas leveduras têm papel importante na deterioração da silagem quando da exposição ao ar durante o fornecimento da silagem aos animais, ou por problemas de vedação inadequada, é que ela assumiu papel de destaque na área de pesquisa em silagens (McDONALD, 1991; LINDGREN et al., 1985; JASTER, 1994). Estes microrganismos não contribuem para a acidificação e estão associados com a deterioração aeróbia das silagens (DRIEHUIS et al., 1999).

As leveduras estão associadas com intensa produção de etanol e o seu desenvolvimento não é inibido pela presença do ácido lático (ALLI et al., 1983). Populações de leveduras podem alcançar até 10^7 unidades formadoras de colônia (UFC) g^{-1} de silagem durante as primeiras semanas após a vedação, porém o armazenamento prolongado conduzirá à diminuição gradual no número de leveduras (JONSSON e PAHLOW, 1984).

Os fatores que afetam a sobrevivência de leveduras durante armazenamento da silagem são o grau de anaerobiose e as concentrações de ácidos orgânicos. Assim, a presença de oxigênio ajuda na sobrevivência e crescimento das leveduras durante o armazenamento (JONSSON e PAHLOW, 1984; DONALD et al., 1995). Jonsson e Pahlow (1984) verificaram que as espécies predominantes de leveduras na silagem depende do nível de anaerobiose estabelecido. Estes autores observaram que o ar que se difunde na silagem durante a fermentação induz leveduras dos gêneros *Candida* e *Hansenula*, quando presentes, a fermentar o lactato. Se condições anaeróbias são estabelecidas e mantidas, estas leveduras são reduzidas, para mais ou menos, 15% do total, sendo que o restante inclui principalmente *Saccharomyces* sp, que também é fermentativa, porém não pode utilizar lactato.

Níveis altos de ácidos orgânicos como ácidos fórmico, acético e propiônico reduzem a sobrevivência de leveduras durante o armazenamento (WOOLFORD, 1975; MOON, 1983; DRIEHUIS e VAN WIKSELAAR, 1996; OUDE ELFERINK et al., 1999 e CARVALHO et al., 2009). Esses ácidos penetram por difusão nas células das leveduras na forma ácida onde agem afetando a absorção de fosfato pela membrana plasmática, a atividade de enzimas glicolíticas ou reduzindo o pH interior das células, obrigando-as a consumir ATP para expulsar ions H^+ do interior das células após sua dissociação. Isso acarreta em exautão energética da célula de levedura, inviabilizando-a (FERRO, 1994).

Entretanto, as leveduras não são inibidas pelos valores de pH alcançados durante o processo fermentativo da silagem. Segundo McDonald et al. (1991), muitas espécies de leveduras são relativamente insensíveis ao pH, sendo encontradas em silagens com valores de pH entre 3,0 a 8,0. Woolford (1990) observou que as leveduras capazes de fermentar açúcares além de glicose podem tolerar os efeitos adversos de baixo pH e da anaerobiose, melhor do que aquelas capazes de fermentar somente a glicose, pois podem utilizar fonte extra de energia.

Embora o pH seja uma medida eficiente para indicar a qualidade da silagem de gramíneas, a cana-de-açúcar é uma excessão devido ao desenvolvimento de leveduras epifíticas. Jonsson (1989), citado por McDonald et al. (1991), relatou cerca de 25 espécies de leveduras que colonizam silagens, sendo essas divididas em dois grupos. O primeiro, são as leveduras com alta capacidade de fermentação, as quais obtem energia de carboidratos solúveis em condições anaeróbias. O segundo grupo são as leveduras de alta capacidade respiratória, que utilizam os ácidos produzidos na fase fermentativa, e em condições aeróbias, as oxidam à CO_2 e H_2O. Por serem resistentes à baixo pH, algumas leveduras podem manter-se vivas em pH próximo à 2, sendo que a maioria desenvolve-se em pH variando de 3 à 8 (McDONALD, et al., 1991; ARCHUNDIA e BOLSEN, 2001). Também, as leveduras são menos sensíveis à baixa atividade de água, podendo crescer à níveis inferiores à 0,9.

Como dito anteriormente, um dos fatores que afetam a sobrevivência de leveduras durante armazenamento da silagem é o grau de anaerobiose. Entretanto, existe o efeito *Crabtree* (CHAPMAN e BARTLEY, 1968), onde a alta concentração de glicose no meio, acima de $2gL^{-1}$, causam depressão catabólica das enzimas respiratórias forçando as leveduras a realizarem fermentação como principal via de degradação de açúcares. Esse efeito ocorre mesmo considerando que a respiração é energéticamente o processo metabólico mais eficiente para as leveduras, pois pela respiração obtem-se mais energia, em comparação ao consumo de glicose, quando utilizada pela fermentação. Com o aumento do teor de glicose no meio, há aumento da atividade de enzimas glicolíticas e das descarboxilase pirúvica e desidrogenase alcoólica, o que leva ao desaparecimento das mitocôndrias, favorecendo a síntese de etanol. Assim, em silagens bem preservadas, em que há alto teor de sacarose residual, mesmo durante a exposição aeróbia, pode haver produção de etanol.

Assim, a produção de etanol e, conseqüentemente, a diminuição do valor nutritivo da silagem, é a principal dificuldade apresentada pela ensilagem de cana-de-açúcar, e portanto, o maior desafio da pesquisa. Por isso, a maioria dos estudos com silagens de cana-de-açúcar têm-se focado na busca de aditivos e doses ideais que, associados à silagens, minimizem tanto a fermentação alcoólica como as perdas decorrentes dela. Esses aditivos, tanto químicos como inoculantes microbianos, têm sido utilizados com o intuito de melhorar o padrão de fermentação e conservação das silagens, promovendo o desenvolvimento dos microrganismos benéficos, como as bactérias produtoras de ácido lático, ao mesmo tempo em que se inibe os

indesejáveis, como as leveduras e clostridia. De acordo com Kung Jr. (2000), os aditivos são empregados com o objetivo de elevar a recuperação de nutrientes e energia e, assim, melhorar o desempenho dos animais.

O não uso de aditivos na ensilagem de cana-de-açúcar é caracterizado pela fermentação alcoólica, com elevadas perdas de matéria-seca, resultando em redução de valor nutritivo e redução de consumo vonluntário (ALLI e BACKER, 1982; KUNG Jr. e STANLEY, 1982; PEDROSO, 2003; JUNQUEIRA, 2006; SCHMIDT, 2006 e QUEIROZ, 2006). Assim, a ensilagem de cana-de-açúcar sem a utilização de aditivos, mesmo que justificada logisticamente, apresenta-se como fonte pouco interessante de volumoso suplementar, com valor nutritivo abaixo do da cana-de-açúcar original, baixo potencial de exploração de animais (NUSSIO, SCHMIDT E PEDROSO, 2003).

Portanto, faz-se necessário o uso de aditivos, tanto químicos como microbianos no controle da fermentação alcoólica em silagem de cana-de-açúcar (CASTRO NETO, 2003; PEDROSO et al., 2005; SOUSA et al., 2005; JUNQUEIRA, 2006 e QUEIROZ, 2006). No entanto, a escolha do aditivo deve considerar fatores técnicos e econômicos, bem como características como controle de perdas quantitativas e qualitativas, tanto no período fermentativo como em anaerobiose, desempenho de animais, facilidade de aplicação e riscos ambientais e à saúde, tantos dos animais como das pessoas. (SANTOS, 2007).

4.4 Aditivos microbianos na ensilagem de cana-de-açúcar

Aditivos microbianos têm sido usados com o objetivo de alterar a principal via fermentativa nas silagens de cana-de-açúcar e assim reduzir perdas de matéri seca e de valor nutritivo, por inibir a população de leveduras e/ou por bloquear a via fermentativa de produção de etanol (SCHMIDT, 2006)

A maioria dos inoculantes microbianos contém cepas de bactérias homofermentativas acidoláticas, cuja finalidade é estimular rapidamente a fermentação lática, reduzir o pH e inibir a ação microorganismos indesejáveis (VILELA, 1998; WILKINSON, 1998 e FILYA et al., 2000).

Entre os aditivos microbianos, *Lactobacillus plantarum* é o principal representante do grupo das bactérias ácido-láticas. Pedroso (2003), Castro Neto (2003) e Pedroso et al. (2005) relataram elevação no teor de etanol de silagens de cana-de-açúcar aditivadas com esse

microrganismo em relação à silagem controle. Quando avaliado o teor de ácido lático, Castro Neto (2003), Freitas et al. (2006) e Muños-Maldonado (2007) não observaram diferença estatística dessa variável. Pedroso (2003), relatou piora na estabilidade aeróbia desse aditivo em silagens de cana-de-açúcar. Freitas et al. (2006) testou doses acima da recomendada (20% e 40%) pelo fabricante, sem verificar efeito sobre as variáveis avaliadas. Provavelmente, esses resultados devem-se ao fato de que as leveduras não são eficientemente inibidas pelo ácido lático (MOON, 1983 e DANNER, 2003).

Muños-Maldonado (2007), citado por Schmidt (2008), observou que a associação de três tipos de bactérias acido-láticas à benzoato de sódio não causou efeito positivo em nenhuma das variáveis estudas em relação a silagem aditivada apenas com benzoato de sódio.

A bactéria *Lactobacillus buchneri* é uma bactéria heterolática, conhecida por produzir grandes quantidades de ácido acético, cuja ação é anti-fúngica (MOON, 1983) tem-se mostrado eficiente no controle da fermentação em silagens de milho (DRIEHUIS et al., 1999) e também na silagem de cana-de-açúcar (PEDROSO, 2003; SCHMIDT, 2006). No entanto, Mari (2008) relatou elevação das perdas de matéria seca das silagens de cana-de-açúcar aditivadas com esse microrganismo nem relação à silagens não aditivadas (11,3% e 6,7%, respectivamente). Sousa (2006), relatou que as silagens aditivadas com *L. buchneri* apresentou as maiores produções de etanol, acima da silagem não-aditivada (11,53% e 8,27%, respectivamente), e como conseqüência maiores perdas de matéria seca, baixa digestibilidade e acúmulo da porção fibrosa. Freitas et al. (2006), não encontrou diferença na queda dos teores de matéria seca entre as silagens controle e as silagens aditivadas com *L. buchneri*. Esses mesmo autores encontraram valores maiores para os teores de FDN (64,7% e 60,3% da MS) e menores para carboidratos solúveis (4,8% e 6,4% da MS) nas silagens aditivadas com *L. buchneri* em relação às silagens não aditivadas, respectivamente.

Pedroso et al. (2003), verificaram que o uso de *L. buchneri* reduziu o teor de carboidratos solúveis, mesmo em relação à silagem controle (5,69% e 9,13% respectivamente. Porém, Queiroz (2006), mostrou haver preservação de carboidratos solúveis nas silagens aditivadas com *L. buchneri* em relação a silagens controle (3,66% e 1,79%, respectivamente).

Portanto, a inoculação nem sempre produz respostas consistentes ou resultados estatisticamente significativos (HIGGINBOTHAN et al., 1998; EICHELBERGER et al., 1997;

CHEN et al., 1994; BOLSEN et al., 1992; LUTHER, 1986; SHOCKEY et al., 1985), sendo alguns, até mesmo, controversos.

Vale ressaltar que são poucos os trabalhos como os de González e McLeod (1976), Alli et al. (1983) e Bernardes et al. (2002), que determinaram o efeito de aditivos sobre a contagem de leveduras em silagens de cana-de-açúcar, e mais raros ainda os que caracterizam a população epifítica da cana-de-açúcar, como o de López et al. (1988) e Bravo-Martins (2004), o que dificulta ainda mais o entendimento da dinâminca da população de microrganismos que afetará diretamenta a fermentação das silagens e a viabilidade de aditivos usados o controle da fermentação para silagens de cana-de-açúcar.

Portanto, considerando os possíveis efeitos positivos e negativos de agentes microbianos no processo de conservação de forragens, é essencial concentrar esforços na avaliação microbiológica das forragens e das silagens.

4.5 Atividade de aditivos microbianos

Segundo Filya et al. (2000), a maioria dos inoculantes microbianos contém cepas de bactérias homofermentativas acido láticas, cuja finalidade é estimular rapidamente a fermentação lática, reduzir o pH e inibir a ação microorganismos indesejáveis, corroborado por Vilela, 1998 e Wilkinson, 1998. Segundo Whittenburry (1968), as espécies produtoras de ácido lático são representadas pelo gênero *Lactobacillus sp.* e *Pediococcus sp.* A rápida produção de ácido lático por essas bactérias causa a redução e manutenção do pH baixo, permitindo a adequada preservação do material ensilado, minimizando as perdas de nutrientes causados por microorganismos e contribuindo de forma significativa para a dominância final de bactérias láticas (SPECKMAN et al, 1981).

Para que as bactérias ácido-láticas tenham êxito em preservar a silagem, estas devem superar a população epifítica da forragem, tornando-se a população dominantes no ambiente. A microflora total, em forragens frescas, antes da ensilagem, varia geralmente entre 10^5 e 10^9 unidades formadoras de colônia (ufc) g^{-1} de forragem, segundo Langston e Bowman (1960), sendo que Pahlow (1986), em revisão de literatura, observou que a população de bactérias láticas epifíticas nas forragens varia de 10^4 a 10^5 ufc/g de forragem. Porém, Pereira e Santos (2006), verificaram que população de bactérias aeróbias é muito maior que a população de

bactérias láticas no momento da ensilagem, o que acarreta em falhas no processo fermentativo.

As bactérias láticas epifíticas são indispensáveis para o processo fermentativo. Segundo Muck (1988), o sucesso da fermentação lática se baseia em 3 fatores: anaerobiose, substrato adequado e suficiente para bactérias ácido-láticas se desenvolvam e população dessas bactérias em quantidade suficiente para que essas se tornem dominantes na silagem. Entretanto, esse grupo de microrganismos é o que mais varia nas forragens frescas, desde de 10^1 à 10^5 ufc/g de matéria verde em alfafa, 10^6 em gramíneas perenes e 10^7 em milho e sorgo (PAHLOW et al., 2003). A população de bactérias láticas epífitas é muito variável; oscila de nenhuma a diversos milhões de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de forragem (SATTER et al., 1988).O mesmo pode ser observado para plantas forrageiras de clima tropical (ROCHA, 2003 e SOUSA et al., 2006). Mahanna (1993), Weinberg e Muck (1996) e Kung Jr. et al. (2003), afirmaram que a inoculação de microrganismos nas taxas de 10^5 a 10^6ufc/g de forragem fresca é suficiente para que bactérias homoláticas dominem a fermentação e preservem o material.

Entretanto, a qualidade da silagem varia em função de vários fatores extrínsecos, como o manejo de confecção do silo, condições climáticas e microbiota epifítica (MAHANNA, 1997), e intrínsecos, como teor de matéria seca e carboidratos solúveis, poder tampão, nitratos e outras substâncias nitrogenadas (MORAIS, 1995).

O estudo da microbiota epifítica das plantas, segundo Pahlow (1989), apresenta resultados altamente variáveis quanto à diversidade e número de microrganismos. De acordo com Ely et al. (1982), essa microbiota epifítica pode interferir no desempenho do inoculante, competindo pelo substrato, afetando a eficiência dos aditivos, incluindo inoculantes contendo microrganismos exógenos. O número de cepas de microrganismos epifíticos é variável, sendo afetado pelo tipo de forragem, estádio de maturação da planta, pelo clima, por tratos culturais, pelo tipo de corte e condicionamento da forrageira (GALLO e CANHOS, 1991; LIN et al., 1992).

4.6 Hipótese

A inoculação de aditivos microbianos nem sempre produz respostas consistentes ou resultados estatisticamente significativos (HIGGINBOTHAN et al., 1998; EICHELBERGER et al., 1997; CHEN et al., 1994; BOLSEN et al., 1992; LUTHER, 1986 e SHOCKEY et al., 1985), sendo alguns, até mesmo, controversos.

Vale ressaltar que são pucos os trabalhos como os de González e McLeod (1976), Alli et al. (1983) e Bernardes et al. (2002), que determinaram o efeito de aditivos sobre a contagem de leveduras em silagens de cana-de-açúcar, e mais raros ainda os que caracterizam a população epifítica da cana-de-açúcar, como o de López et al. (1988) e Bravo-Martins (2004), o que dificulta ainda mais o entendimento da dinâminca da população de microrganismos que afetará diretamenta a fermentação das silagens e a viabilidade de aditivos usados o controle da fermentação para silagens de cana-de-açúcar.

Portanto, considerando os possíveis efeitos positivos e negativos de agentes microbianos no processo de conservação de forragens, é essencial envidar esforços na avaliação microbiológica das forragens e das silagens.

A hipótese desse trabalho é que a população de microrganismos em plantas de cana-de-açúcar varia de acordo com o estádio de maturação, fatores ambientais e diferentes partes da planta.

4.7 Objetivo

O objetivo do trabalho é realizar análise descritiva da população microbiana em plantas de cana-de-açúcar (IAC 93-3046), submetida a diferentes tipos de fertilização, utilizando à técnica de plaqueamento, bem como estabelecer possíveis relações entre fatores ambientais, estádio de maturação e valor nutritivo.

5. Material e Métodos

5.1 Local, duração e tratamentos avaliados no experimento

O experimento foi conduzido nas dependências do Departamento de Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus 'Luiz de Queiroz' – USP/ESALQ – no município de Piracicaba SP. O solo é caracterizado como Terra Roxa, tipo *Kandiuldolfic Eutrudox* (Estruturado Eutrófico A Moderado, de textura Argilosa).

O período de experimentação foi de um ano, período correspondente à avaliação de um ciclo de produção da cana-de-açúcar.

Tabela 1 – Valores médios de variáveis bromatológicas e microbiológicas de frações de plantas de cana-de-açúcar na fase pré-experimental.

	Frações de plantas de cana-de-açúcar			
Variáveis	Colmo	Folhas verdes	Folhas secas	Planta inteira
MS (%)	7,7	17,3	#ND	11,4
FDN (%MS)	72	78	ND	75
FDA (%MS)	45,7	49	ND	47
DIVMO (%MS)	44,6	35,3	ND	39,8
DIVMS (%MS)	47,6	41	ND	43
log BAL (ufc/gMV)	ND	ND	ND	ND
log LEV (ufc/gMV)	6	6,15	6,17	6,17

#ND – Não determionado;

A cana-de-açúcar variedade IAC 93-3046 foi plantada em Maio de 2008 em uma área de 0,74ha. Essa variedade é considerada de alta produtividade, de ciclo médio à tardio, rústica e responsiva (IAC, 2010). Foi aplicado cupinicida (Endosulfan – 10,7 l/ha) e feita adubação (250 kg/ha de NPK 08:24:15 acrescido de esterco curtido) no momento do plantio. Do total de 0,74ha, foi selecionada uma área homogênea de 0,18ha onde foi implantada a área experimental (Figura 1).

As tabelas 1 e 2 apresentam as médias das variáveis avaliadas no talhão de cana-de-açúcar da variedade IAC 93-3046 antes de se estabelecer o presente experimento. As avaliações foram realizadas no dia anterior à implantação dos tratamentos e foi seguida a mesma metodologia descrita nos ítens 5.4, 5.5 e 5.6.

Tabela 2 – Valores médios de variáveis agronômicas de frações de plantas de cana-de-açúcar na fase pré-experimental.

Variáveis	Valores
Produtividade tMS/ha	4,7
Produtividade tMV/ha	56
Número de folhas verdes/planta	7,1
Número de secas verdes/planta	0,2
Peso Folhas verdes/planta (kg)	0,18
Peso Folhas secas/planta (kg)	0,18
Comp. Colmo (m)	0,8
Diâm. Colmo (cm)	2,3
Peso Colmo (kg)	0,4
Número nós/planta nós	4
Número de inter-nós/planta	3
^{o}Brix	5
Maturidade	68

A área experimental foi composta por 6 blocos, divididos em 12 parcelas de dimensões de 15m x 10m (150m²), cada uma sendo considerada como unidade experimental, com os tratamentos aplicados às parcelas. Entre cada bloco, havia duas linhas de cana e duas ruas para separação de áreas.

Cada parcela foi composta por 7 linhas de avaliação de 15m cada, sendo o espaçamento entre linhas de 1,4m, onde duas linhas foram consideradas bordas inertes, três

utilizadas para avaliação de microbiologia e duas linhas para avaliação agronômica e nutricional, todas alternadamente (Figura 2). No início de cada linha, em cada parcela, foram desconsiderados 1,5m de borda, para minimizar os efeitos de borda, restando 12 metros lineares onde foram coletadas as amostras mensais para avaliação agronômica e nutricional (figura 2).

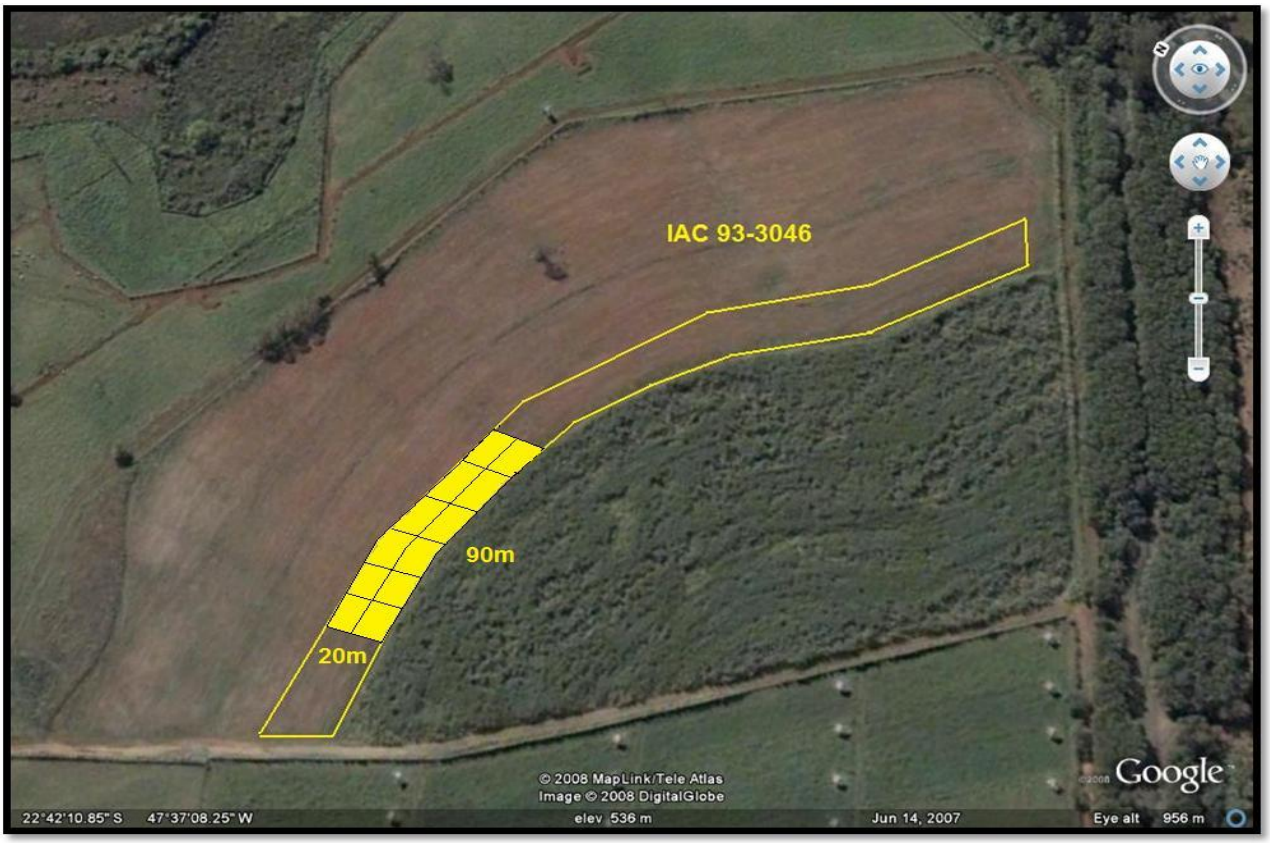

Figura 1 – Vista superior da área experimental no Departamento de Zootecnia da ESALQ

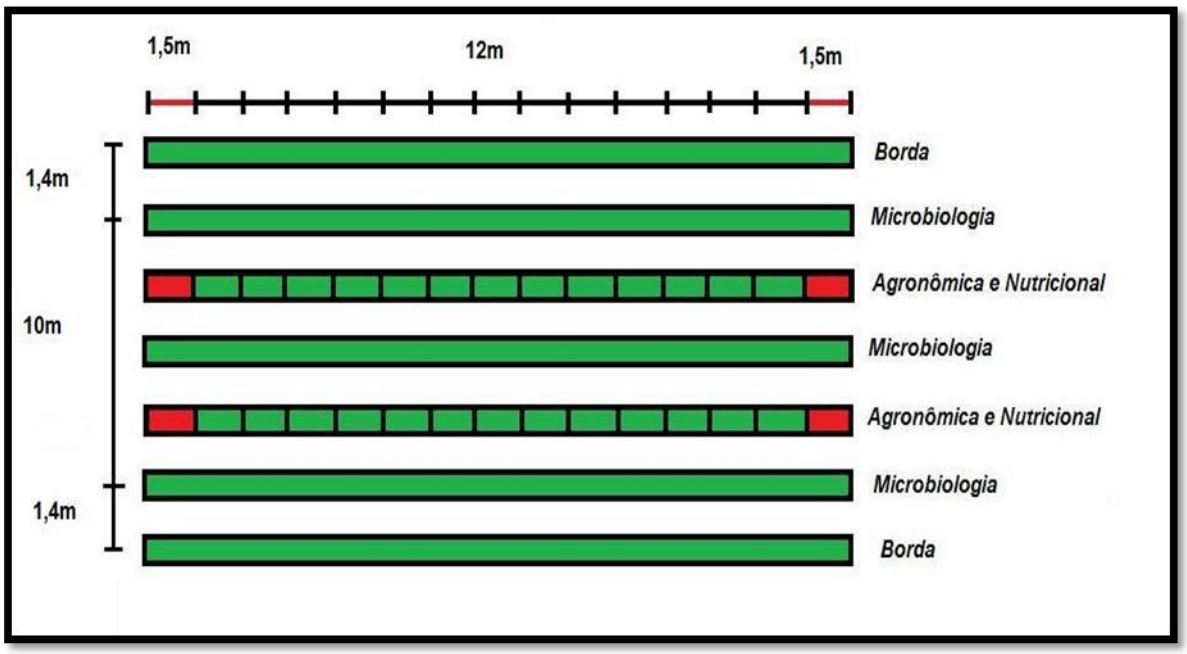

Figura 2 – *Croqui* das parcelas experimentais com identificação das linhas para avaliações agronômica, nutricional e microbiológica

Os tratamentos foram compostos por dois níveis de adubação, sendo equivalentes à:

1) 600kg/ha de NPK 20:00:20 (NPK) e 2) 300kg/ha de NPK 20:00:20 acrescido de 6t/ha de esterco curtido (esterco), objetivando a mesma dosagem de nitrogênio (120kg de N/ha), segundo recomendações do IAC (2002).

5.2 Mensurações climáticas

Durante todo o período experimental foram monitoradas a temperatura máxima, mínima e média diária (uso de termômetros, expresso em ^{o}C), a precipitação (obtida por meio de pluviômetros, expresso em mm) e umidade relativa do ar (obtida com base em higrômetro, expresso em %) e radiação solar (obtida por heliógrafo, expresso em cal/cm^{2}.dia^{-1}), sendo os dados descritos na Tabela 3 e na Figura 3. Estes dados são monitorados diariamente pelo posto meteorológico do Departamento de Ciências Exatas do Campus 'Luiz de Queiroz' da Universidade de São Paulo (USP/ESALQ), localizado à cerca de 500m da área experimental.

Tabela 3 – Variáveis climáticas observadas durante o período de coleta.

	Variáveis avaliadas					
Mês de coleta	Radiação Solar (cal/cm^2d^{-1})	Precipitação (mm)	U.R[1] (%)	Temp. Máx[2] (^oC)	Temp. Mín.[3] (^oC)	Temp. Média (^oC)
Janeiro	429,81	5,23	84	28,9	19,24	24,07
Março	457,42	4,04	78,9	30,81	19,43	25,12
Maio	357,23	0,34	78,45	27,46	13,94	20,70
Julho	268,0	1,99	83,58	24,2	12,63	18,42
Novembro	501,27	6,55	74,43	31,72	20,14	25,93

Fonte: ESALQ, Universidade de São Paulo, Departamento de Ciências Exatas, 2009. [1]Umidade relativa; [2]Temperatura maxima; [3]Temperatura minima.

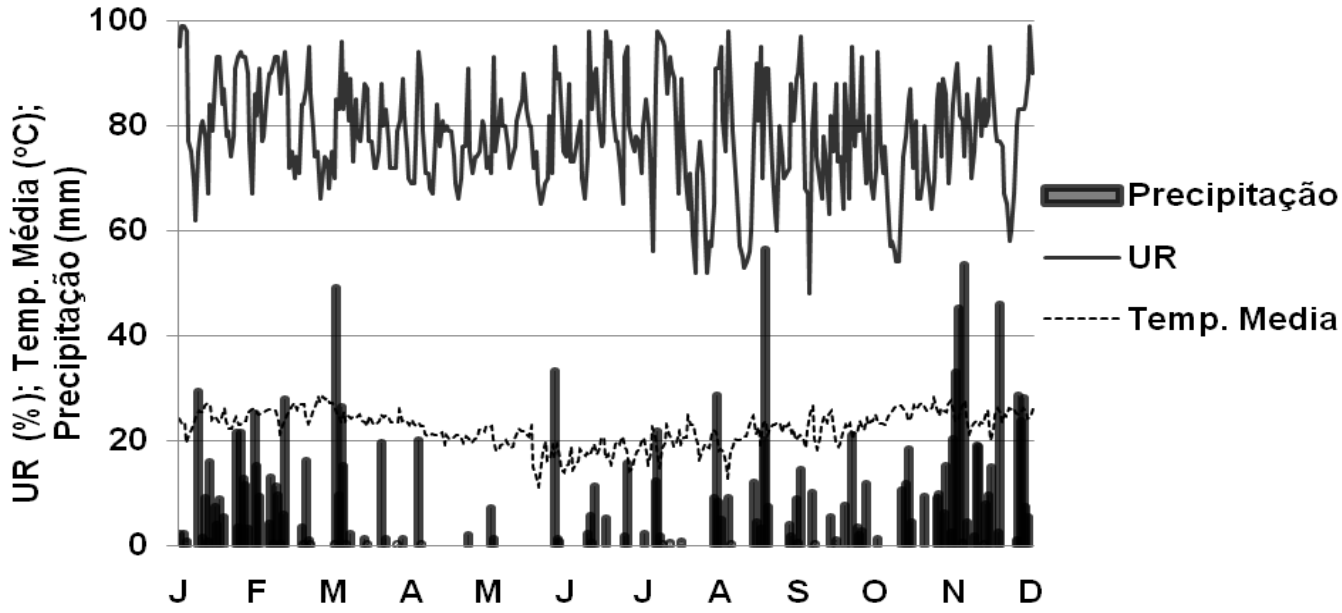

Figura 3 - Precipitação (mm), temperatura média (^oC) e umidade relativa do ar (UR, %) do município de Piracicaba - SP, no ano de 2009. Fonte: : ESALQ, Universidade de São Paulo, Departamento de Ciências Exatas, 2009.

5.3 Delineamento experimental

O experimento foi composto por blocos inteiramente casualizados, sendo 6 blocos com 2 parcelas cada, com dois tratamentos (tipos de adubação). As variáveis mensuradas foram submetidas à análise de correlação de Pearson e aplicado o teste Tukey à 5% de significância para a comparação das médias.

O estudo dos modelos para ajuste em curvas de tendência temporal foi realizado segundo o procedimento Proc Mixed e Proc NlLIN, do pacote estatístico *SAS*, versão 6.12 para Windows® (SAS, 1996).

5.4 Avaliação agronômica de plantas de cana-de-açúcar

Foram usados para a coleta das plantas facões pré-esterilizados, entre cada tratamento, com solução quaternária de amônio à 1%, aplicado com aspersor manual e deixado-se agir por cerca de 5 minutos, seguido de álcool 70%.

Em cada uma das duas linhas destinadas à avaliação agronômica foi colhida a forragem disponível em 1 metro linear, totalizando 2 metros por parcela. Após a colheita, os perfilhos foram cuidadosamente acondicionados e enrolados em lonas plásticas para que não houvesse perda física de nenhuma estrutura e imediatamente levados ao Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia (USP/ESALQ) onde for realizada a avaliação biométrica. O feixe foi pesado, em balança móvel com capacidade para 300kg, e todos os perfilhos contados para a estimativa da produtividade da parcela.

Do feixe de cada parcela, 10 perfilhos foram selecionados aleatóriamente e foram realizadas avaliações biométricas e morfológicas.

A análise biométrica consistia em:

- comprimento dos colmos (altura da planta): mensurado com uso de fita métrica com precisão de 1mm, sendo o comprimento definido como a distância entre a base da planta (colo) e a última região auricular visível da folha +1, segundo método Kuijper (Dillewinj, 1952).

- diâmetro médio dos colmos: avaliado com uso de paquímetro, obtendo-se medidas em centímetros, realizada no internós central do colmo, de acordo com método proposto por Zacarias (1977).

- número de internós e de nós: realizadas pela contagem do número de internós e de nós presentes nos perfilhos, considerando como internós aquele delimitado nas duas extremidades por nós e sem a presença da folha bandeira, de acordo com metodologia proposta por Teixeira (2004).

- peso do colmo: o peso em massa foi obtido por pesagem dos perfilhos em balança com precisão de cinco gramas.

A análise morfológica consistia em:

- folha verde: folhas com ou sem lígula visível, expandidas ou não, podendo apresentar sinais de senescência (Sbrissia, 2004).

- folha morta: folha que apresentou mais de 50% do limbo foliar comprometido pela senescência (Sbrissia, 2004).

- colmo: a fração contida entre a base da planta (colo) e a última região auricular visível da folha +1, segundo método Kuijper (Dillewinj, 1952).

Nessas frações foram realizadas as seguintes avaliações:

- peso do colmo: após separação morfológica, os colmos foram pesados em balança de precisão de cinco gramas.

- peso folhas verdes e mortas . colmo^{-1}: após separação morfológica, as folhas verdes e as mortas foram pesadas isoladamente em balança com precisão de 5 gramas.

- número de folhas verdes e mortas . colmo^{-1}: após a separação morfológica, foi contado o número de folhas verdes e mortas de cada perfilho.

Além das avaliações descritas acima, todos os 10 colmos foram submetidos a avaliação do ^{o}BRIX (teor de sólidos solúveis por cento, em peso, de caldo), de acordo com método proposto por CONSECANA (2003), sendo colhida amostra na base, no meio e na ponta de cada colmo. Esse parâmetro é o mais utilizado na industria de açúcar e álcool. Expressa a porcentagem peso/peso dos sólidos solúveis contidos em uma solução pura de sacarose, ou seja, mede o teor de sacarose na solução (FERNANDES, 2003)

Após avaliações, as amostras foram picadas e acondicionadas em sacos de papel, secas em estufa de circulação forçada à 60°C por 72 horas e processadas em moínhos tipo *Wiley* com peneira de crivo de 1mm para posterior análises bromatológicas (ítem 5.6).

5.5 Descrição da população de microrganismos em plantas de cana-de-açúcar

Foram usados para a coleta das plantas facões pré-esterilizados, entre as coletas de cada tratamento, com solução quaternária de amônio à 1%, aplicada com aspersor manual e deixado-se agir por cerca de 5 minutos, seguida de álcool 70%

Ao todo, nove plantas foram coletadas aleatóriamente nas diversas linhas de coletas para microbiologia dentro de cada parcela, a fim de se obter amostra representativa da área, sendo três plantas em cada uma das três linhas de avaliação. Os perfilhos foram acondicionados em lonas plásticas novas e levadas ao Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia (USP/ESALQ), onde foram processadas.

As plantas colhidas foram picadas em unidade picadora estacionária de forragens (Trapp – TRF70) estaciónaria pré-esterilizada, antes e após o processamento de cada amostra, com solução de quaternária de amônio à 1%, deixando-se agir por cinco minutos, seguido de aspersão de álcool 70%. Os perfilhos colhidos foram separados e processados separadamente em planta inteira, folhas verdes, folhas secas e senescentes (com de 50% do limbo foliar seco) e colmo. Entre cada amostra processada, os manipuladores usaram luvas de látex esterilizadas com álcool 70%, para evitar contaminação entre amostras. Imediatamente após a picagem, amostras foram coletas e congeladas à -26°C para posterior análises bromatológicas (ítem 5.6).

Uma alíquota de 25g de cada amostra foi homogeneizada com 250 mL de solução tampão, composta de 2,25g/L de NaCl, 0,105g/L de KCl, 0,12g/L de CaCL hexaidratado e 0,05g/L de $NaHCO_3$. Essas soluções foram pré-esterilizadas em autoclave por 15 minutos à 121°C e sob 1 atm de pressão. Os 25g de amostras foram homogeinizados com as soluções no equipamento *Stomacher® 80 Biomaster* por 4 minutos e à 120 rpm. As soluções já homogeinizadas foram filtradas em gaze estéril para liberação das células microbianas e acondicionadas nos mesmos tubos onde estavam previamente os 250mL de solução tampão.

O isolamento e a contagem dos microrganismos foram realizads em capela de fluxo vertical no por meio da técnica de plaqueamento em meio seletivo, segundo método descrito por Kung Jr. et al. (1984), nas dependências do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola (USP/ESALQ). Diluições em série (x 10) foram realizadas em 9,9mL de solução tampão pré-esterilizadas em autoclave

por 15 minutos à 121°C. Os microrganismos foram isolados na sequência com o uso de meios de cultura seletivos

O meio de cultura utilizado na contagem de bactérias ácido láticas (BAL) foi o MRS ágar (Oxoid®) e adicionado de natamicina (0,25g/L), para inibir o crescimento de células eucariontes, especificamente leveduras e mofos. O plaqueamento foi realizado em dupla camada para a manutenção da anaerobiose, sendo que as *placas de petri* foram incubadas por 48 horas à 32°C.

O meio de cultura utilizado para a contagem de leveduras e mofos foi o YGC ágar (Fluka®), contendo clorofenicol para a inibição de eventual crescimento de bactérias. As *placas de petri* foram incubadas à 32°C por 48 e 72 horas para a contagem de leveduras e mofos, respectivamente.

Todas as placas de petri foram mantidas em estufas tipo BOD (biochemistry oxygen demand) da marca Tecnal® de acordo com o tipo de microrganismo, sendo uma estufa para bactérias ácido láticas e outra para mofos e leveduras. O número de colônias, tanto de bactérias como de leveduras e mofos presentes nas placas, contados com auxílio do contador de colônias CP600 plus da Phonix® foi registrado como sendo unidade formadora de colônia (ufc) e expressa como logarítimo na base 10.

As coletas foram realizadas respeitando-se a não ocorrência de chuva com a finalidade de coletar amostras isentas de alterações tanto na população microbiana como nos teores de materia seca, em virtude da alteração na atividade de água.

5.6 Avaliação nutricional de plantas de cana-de-açúcar

As análises bromatológicas de todas as amostras geradas no decorrer do experimento (ítens 5.4 e 5.5) foram realizadas nas dependências do Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia (USP/ESALQ).

As amostras foram secas em estufas de circulação forçada à 60°C por 72 horas ou até atingirem peso constante para se determinar os valores de matéria seca (SILVA, 1981) e, posteriormente moídas em moínhos di tipo *Wiley*, providos de peneira com crivo de 1mm e armazenadas em potes plásticos com tampa provida de rosca.

Em função do número expressivo de amostras geradas durante o experimento, a estimativa da composição químico-bromatológica, foi realizada com base no método de espectroscopia de reflectância de infravermelho proximal (NIRS) (COZZOLINO et al., 2001). O equipamento utilizado foi o espectrometro modelo NIRS 5000 (NIRSystem®, SILVER SPRING, MD, USA) acoplado a microcomputador equipado com software WinISI II versão 6.2 9 Intrasoft International, PA).

As amostras moídas foram acondicionadas em células de leitura modelo Transport quarter cup (código IH – 0379), sendo em seguida escaneadas para a obtenção do espectro NIRS. Após o escaneamento das amostras, as leituras assumiram comprimentos de onda entre 700 e 2100nm e armazenados em curvas log (1/R, onde R é o valor da reflectância), em intervalos de 2 nm.

Com base no software do programa então, se estimou a composição químico-bromatológica das amostras por meio de equações de predição criadas com base em métodos estatísticos contidos no programa.

Foram determinadas as variáveis equivalentes à:

- matéria seca (MS): determinada em estufa a 105 ºC durante 24h (A.O.A.C., 1990), com anterior pré-secagem em estufa à 60 ºC;

- porção fibrosa: determinados o teor de fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN), de acordo com Van Soest et al. (1991);

- digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da matéria orgânica (DIVMO): determinados por meio do método ANKON Fiber Analyzer (ANKON Technology Corporation, Fairport, NY).

6 Resultados e discussão

Todas as tabelas e figuras apresentas no ítem 6 mostram os valores das variáveis referentes à todo período experimental, inclusive o mês de Janeiro, relativo à fase pré-experimental. Entretanto, como visto no ítem 5.1, no mês de Janeiro ainda não haviam sido impostos os tratamentos. Assim, os dados obtidos na fase pré-experimental (Janeiro) não participaram nas análises estatísticas.

6.1 Avaliação agronômica de plantas de cana-de-açúcar

6.1.1 Produtividade de cana-de-açúcar

A Tabela 4 apresenta os valores médios de produtividade, expressos em matéria seca e matéria verde de cana-de-açúcar IAC (93-3046) ao longo do período experimental. Não se observou efeito do tratamento sobre a variável avaliada (P>0,05).

Tabela 4 – Produtividade média em matéria verde e seca (t/ha) do talhão de cana-de-açúcar (IAC 93-3046) ao longo do período experimental

	Época do ano				
Variável	Março	Maio	Julho	Novembro	EPM*
Prod. MV	161,7ab	177,7ab	152,6b	188,5a	11,4
Prod. MS	30,6c	44,2ab	37,9b	51,6a	2,47

*EPM – erro padrão da média;
Médias na linha seguidas de mesma letra não diferem entre si (P>0,05).

Entretanto, ao longo do tempo observou-se aumento significativo da produtividade (P<0,05), tanto na massa verde como seca. Porém, esse aumento não foi linear como se era esperado, uma vez que no mês de Julho houve uma queda significativa na produtividade. Isso provavelmente é reflexo do período de estiagem, que atingiu os meses de Maio à Setembro. Nesse período, há escassez de água e diminuição do fotoperíodo diminuindo a taxa fotossintética e, conseqüentemente, o acúmulo de biomassa. Isso faz com que a planta utilize suas reservas energéticas, no caso da cana-de-açúcar a sacarose, levando à queda no acúmulo de biomassa. Isso pode ser comprovado pela diminuição no diâmetro e peso do colmo e estagnação do comprimento do colmo das plantas de cana-de-açúcar durante o mesmo período do experimental (Tabela 6). Segundo Ramesh (2000), a deficiência hídrica pode afetar o crescimento, a produção de MS e a produtividade final da cultura, o que foi observado no presente experimento.

Os valores de produtividade obtidos no experimento variaram de 162 à 188 tMV/ha, o que pode ser considerado bem elevado, uma vez que Silva (1993) relatou que a produtividade média da cana-de-açúcar estaria entre de 80 e 120 tMV/ha. Porém, Câmara (1993) reportou valores cana-de-açúcar de ‘ano-e-meio’ entre 140 e 180 tMV/ha. Considerando-se que a cana-

de-açúcar do presente experimento foi plantada em Maio de 2008, em Maio de 2009 essa planta já apresentava 12 meses e em Novembro de 2009, 18 meses, ‘cana-de-açúcar de ano-e-meio’, e os valores de produtividade estão dentro da amplitude observada por Câmara (1993) e, superior aqueles reportados por Silva et al. (2004) com o valor de 136,5 t/ha e Schmidt (2006), que encontrou valor de 144,3 t/ha em cana-de-açúcar aos 15 meses, ambos com a variedade IAC 86-2480.

Foi observado aumento na variável ^{o}Brix durante o período experimental (Tabela 7 e figura 7). Isso provavelmente deve-se ao fato de que a diminuição do colmo associada à menor disponibilidade de água, gerou aumento na concentração de sacarose, e portanto do ^{o}Brix. Isso pode ser comprovado pela queda expressiva da produtividade medida em massa verde em relação à produtividade expressa em matéria seca. A produtividade em matéria seca teve diminuição de 4 unidades percentuais, ao passo que em massa verde a diminuição foi de cerca de 25 unidades percentuais, resultante da queda no teor de umidade da planta.

6.1.2 Avaliação morfológica de cana-de-açúcar

Os dados referentes à avaliação morfológica das plantas de cana-de-açúcar (IAC 93-3046) estão expressos nas tabelas 5, 6 e 7. Os tratamentos não apresentaram diferenças entre si para as variáveis de composição morfológica analisadas ($P>0,05$).

6.1.2.1 Folhas secas e folhas verdes

Observa-se pela Tabela 5 que o número e peso de folhas verdes e secas variaram significativamente ao longo do tempo ($P<0,05$), sendo que os valores aumentaram para o número de folhas e peso de folhas secas e diminuiram para peso de folhas verdes.

O número de folhas verdes partiu de 9,5 no primeiro mês de avaliação e atingiu cerca de 10 no último mês, o que é esperado, uma vez que ao passar do tempo houve aumento da biomassa das plantas. Porém, esse aumento não foi linear, pois observou-se que nos meses de Março a Julho o número e o peso de folhas verdes diminuiu, provavelmente devido ao período de estiagem, que ofertou menor disponibilidade de água. Contudo, em Novembro o número de folhas verdes passou a aumentar significativamente devido ao início do período das

águas (Tabela 3). Isso pode ser corroborado pelo aumento do número e peso de folhas secas, uma vez que a falta de água induziu a senescência das folhas. nos meses de Maio, Julho e Novembro esse número aumentou apenas, partindo de cerca de zero folhas por planta até cerca de 3 folhas. Esses valores mostraram o avanço da maturidade da planta e a influência ambiental sobre a composição morfológica da planta, pois segundo Taiz e Zeiger (2006), a resposta mais significativa das plantas ao déficit hídrico resulta no de decréscimo da produção de área foliar e aceleração da senescência e da perda de folhas. Embora o número de folhas secas aumente ao longo do tempo, esse valor provavelmente foi subestimado devido à fácil desfolha da cana-de-açúcar e da manipulação dos perfilhos entre a fase do campo e de laboratório.

Tabela 5 – Média de número e peso (kg) de folhas verdes e secas de plantas de cana-de-açúcar (IAC 93-3046) ao longo do tempo

	Tempo				
Variável	Março	Maio	Julho	Novembro	EPM*
Folhas verdes	9,58a	8,01b	8,17b	10,15ª	0,23
Folhas secas	1,26b	2,92a	2,53a	3,01ª	0,18
Peso folhas verdes	0,19a	0,14b	0,12b	0,13b	0,007
Peso folhas secas	0,01c	0,03a	0,021b	0,022b	0,002

*EPM – erro padrão da média;
Médias na linha seguidas de mesma letra não diferem entre si (P>0,05).

6.1.2.2 Colmo

Os dados referentes ao colmo das plantas de cana-de-açúcar estão expressos nas tabelas 6 e 7. Não houve influência de tratamento nas variáveis (P>0,05), entretanto, houve efeito significativo do período experimental sobre as variáveis do colmo (P<0,05).

É evidente que durante o período experimental houve crescimento significativo do colmo, tanto no comprimento como no peso. Porém, a variável diâmetro de colmo apresentou decréscimo significativo a partir do mês de Maio e Julho. Como se deu com as variáveis de folha, a explicação para isso se devem às influências ambientais, especificamente a disponibilidade de água (Figura 3).

Tabela 6 – Média do comprimento, diâmetro e peso de colmo, número de nós e internós de plantas de cana-de-açúcar ao longo do período experimental.

	Época do ano				
Variável	Março	Maio	Julho	Novembro	EPM*
Comprimento, m	2,3c	2,6b	2,6b	2,9a	4,01
Diâmetro, m	2,9a	2,8ab	2,6b	2,7b	0,03
Peso, kg	1,4c	1,57b	1,55bc	1,9a	0,06
Número nós, n	12c	15b	15b	27a	0,33
Número internós, n	11c	14b	14b	26a	0,33

*EPM – erro padrão da média;
Médias na linha seguidas de mesma letra não diferem entre si (P>0,05).

O peso e comprimento do colmo aumentam de Março para Maio, mas que a partir de Julho esse crescimento esteve estagnado, não aumentando significativamente. A partir de Julho esse crescimento voltou a ocorrer, provavelmente como reflexo da pouca disponibilidade de água, que freou o crescimento durante a estação seca, sendo que quando a estação chuvosa se iniciou por volta dos meses de Setembro e Outubro, o crescimento voltou a ser expressivo (Tabela 3). Isso é corroborado por Ramesh (2000), que observou que a deficiência hídrica afetou o crescimento, a produção de MS e a produtividade final da cultura. Ainda assim, os valores de comprimento de colmo encontrados (2,3 à 2,9m) estão acima dos reportados na literatura; Silva et al. (2004) reportaram a altura com 221 cm para a variedade IAC86-2480, em cana planta. Landell et al. (2002) apresentaram dados médios dos três primeiros ciclos de produção da variedade IAC86-2480 com 222,2 cm de altura.

O peso do colmo é a porção que mais representa o peso final da planta. No presente estudo, variou de 0,4 à 1,9 kg, sendo que as folhas verdes e secas apresentaram valores de 0 à 0,13 kg (Tabela 5). Machado (1987) e Suguitani (2006), citados por Schogor (2009), relataram que esse comportamento é devido ao fato da massa seca de colmos representar porção significativa da massa seca total da parte aérea, exceto nas primeiras semanas em que a massa de folhas é mais significativa. No entanto, a variável diâmetro de colmo diminuiu durante a estiagem e permaneceu assim durante todo o período experimental. Esse valor foi superior ao encontrado por Schogor (2009), que relatou valores de 2,1 cm, sendo que seus valores também não diferiram para os tratamentos impostos. Entretanto os valores encontrados no presente experimento estão próximos aos de Silva et al. (2004), que reportaram valores de diâmetro de 2,6 cm para a variedade IAC86-2480 e Landell et al. (2002),

que apresentaram dados médios dos três primeiros ciclos de produção da variedade IAC86-2480 de 2,47 cm de diâmetro. Porém, de acordo com Teixeira (2004), o diâmetro dos colmos pouco interfere sobre as características químicas e nutricionais da cana-de-açúcar, com base na análise de correlação entre essas características.

O número de nós e internós também não apresentou diferença quanto ao tratamento imposto (P>0,05), porém, como os outros dados relacionados ao colmo, apresentou diferença significativa durante o período de avaliação (P<0,05).

Os valores observados estão de acordo com os dados de comprimento e peso de colmo, partindo de 12 nós no início do experimento e alcançado 27 nós com um ano e meio de idade. O peso e comprimento do colmo aumentaram de Março para Maio, mas entre Maio e Julho esse crescimento esteve estagnado, porém a partir de Julho retomou o crescimento devido à presença de água no período das chuvas (Tabela 3). Os números de nós observado atestam o fato de que durante todo o experimento as plantas de cana-de-açúcar apresentaram crescimento, tanto em comprimento como em peso, mesmo sendo em menor taxa nos meses de estiagem.

6.1.3 Maturidade

6.1.3.1 ^{o}Brix

A tabela 7 apresenta as médias do ^{o}Brix de diferentes partes das plantas de cana-de-açúcar durante o período experimental. Não se observou diferença estatítica quanto ao tratamento imposto sobre a cana-de-açúcar (P>0,05), entretanto, a variável ^{o}Brix variou significativamente ao longo do tempo (P<0,05).

A variável ^{o}Brix é descrita como o teor de sólidos solúveis, e no caso da cana-de-açúcar, a sacarose é o principal representante. Ao longo do período experimental, os valores de ^{o}Brix foram ascendentes, atingindo valores de cerca de 20.

Tabela 7 – Média do ^{o}Brix da planta toda e de partes da plantas de cana-de-açúcar ao longo do período experimental

Variável	Época do ano				EPM*
	Março	Maio	Julho	Novembro	
^{o}Brix ponta	5d	19b	18c	21a	0,26
^{o}Brix meio	12c	18b	20a	20a	0,37
^{o}Brix base	15b	14b	20a	19a	0,39
^{o}Brix médio	10d	17c	19b	20a	0,25

*EPM – erro padrão da média;
Médias na linha seguidas de mesma letra não diferem entre si (P>0,05).

Os valores médios de ^{o}Brix estão de acordo com reportados pela literatura. Marques e Silva (2008), estudando a variedade IAC86-2480, reportaram valores de 15°Brix aos 10 meses, acima do encontrado no presente trabalho. Também, Thiago (2009), encontrou valor médio de 19,7^{o}Brix aos 10 meses. Porém, Rodrigues et al., (1997) estudando 11 variedades diferentes de cana-de-açúcar, reportaram valores de 16,4 à 19,9^{o}Brix aos 15 meses. No presente estudo foram encontrados 19°Brix aos 14 meses. Isso sugere que a variedade IAC 93-3046 está dentro da amplitude normal de variação para a cultura.

O ^{o}Brix sofre influência direta do teor de umidade no solo (FERNANDES, 2003). Durante o período de Julho a Novembro observa-se que o ^{o}Brix varia muito pouco, provavelmente devido à incidência de chuvas maior apartir do mês de Agosto (figura 3).

6.1.3.1 Índice de maturidade

A tabela 8 apresenta os valores referentes ao índice maturidade da cana-de-açúcar IAC 93-3046 ao longo do período experimental. Os valores de maturidade foram obtidos com base no quociente entre o ^{o}Brix da ponta da planta de cana-de-açúcar pelo ^{o}Brix da base, sendo o resultado multiplicado por 100.

Não se observou diferença significativa entre os tratamentos (P>0,05), porém o tempo influenciou o índice de maturidade das plantas (P<0,05). Pois ao longo do tempo o índice de maturidade aumentou, de 33,46% no mês de Março e atingindo 88,5% no mês de Novembro.

Considerando-se o índice de maturação como referência para distinção das fases do ciclo fenológico da cana-de-açúcar, observou-se incrementos do peso do colmo, no número de nós e, portanto aumento em altura das plantas (Tabela 6).

Entre os meses de Julho e Novembro não houve diferença estatistica, provavelmente devido ao fato de índices superiores à 85% de maturidade refletirem o máximo acúmulo de sacarose na cana-de-açúcar (CONSECANA, 2003).

Tabela 8 – Índice de maturidade de plantas de cana-de-açúcar (IAC 93-3046) ao longo do período experimental

	Época do ano			
Variável	Março	Maio	Julho	Novembro
Maturidade, %	33,46c	71b	86,54a	88,51a
*EPM	1,48	2,92	0,91	0,84

*EPM – erro padrão da média;
Médias na linha seguidas de mesma letra não diferem entre si (P>0,05).

No mês de Maio, o talhão de cana-de-açúcar usado no experimento atingiu 12 meses, período em que a planta atingiu sua maturidade. Isso foi observado, pois na coleta de Maio o índice de maturidade atingiu 71. De acordo com CONSECANA (2003), entre 60 e 85 de índice de maturidade a cana-de-açúcar pode ser considerada madura, e portanto, pronta para colheita. De Março à Maio, em apenas dois meses, o incremento no índice de maturidade chegou a ser de 38, porém nos dois meses seguintes, de Maio a Julho, foi apenas de 16 unidades percentuais. Após esse período a planta atingiu sua maturidade e, após isso, o crescimento foi gradativamente diminuindo. Isso pode ser observado e comprovado pelo ^{o}Brix médio da cana-de-açúcar no mesmo período (figura 7), onde nos meses de Março a Maio o acúmulo de sólidos totais, que na cana-de-açúcar corresponde basicamente à sacarose, apresentou aumento de 7 ^{o}Brix e, nos meses seguintes apenas 2 ^{o}Brix. Isso, de acordo com Carvalho et al., (2009), é evidência de que até Maio as plantas ainda estavam em fase de crescimento e após atingir a maturidade o crescimento foi desacelerado.

6.2 Avaliação químico bromatológica de plantas de cana-de-açúcar

As tabelas 9, 10, 11, 12 e 13 apresentam os valores médios das variáveis bromatológicas avaliadas

6.2.1 Teor de matéria seca

A tabela 9 apresenta os valores médios dos teores de matéria seca das plantas de cana-de-açúcar e de suas diferentes frações ao longo do tempo. Não houve diferença estatística em relação ao tratamento imposto à cana-de-açúcar (P>0,05). Porém, houve diferença significativa ao longo do período experimental para todas as frações da planta (P<0,05).

De modo geral, os teores de matéria seca aumentaram ao longo do tempo, com excessão da fração folha seca (Tabela 9) que apresentou decréscimo nos meses de Julho à Novembro. Isso provavelmente, deveu-se à maior incidência de chuva no mês de Novembro (Tabela 3), chegando à 6,55 mm no mês.

As folhas verdes aumentaram seu teor de matéria seca de 24% até 29%. Isso é esperado, pois as folhas verdes com o tempo tendem a aumentar seu teor de matéria seca até se tornarem folhas secas (mais de 50% do limbo foliar seco). Ao observar-se a Tabela 5 (ítem 6.1.3), pode-se concluir que o peso das folhas verdes diminuiu significativamente após o mês de Maio, uma evidência de que essas folhas estiveram perdendo água, aumentando o teor de matéria seca e se tornando folhas secas. Isso é explicado por Cesnik e Miocque (2004), que relataram a ocorrenia de translocação de fotoassimilados, principalmente sacarose, das folhas para o colmo, onde estes são armazenados.

Tabela 9 – Valores médios dos teores de matéria seca (MS) de frações de plantas de cana-de-açúcar ao longo do período experimental.

	Teor de MS (%)				
	Época do ano				
Fração	Março	Maio	Julho	Novembro	EPM*
Colmo	17c	23b	23b	27a	0.42
Folhas secas	60b	76a	78a	70ab	2.43
Folhas verdes	24b	27ab	28ab	29a	1.06
Planta inteira	19c	24b	24b	28a	0.5

*EPM – erro padrão da média;
Médias na linha seguidas de mesma letra não diferem entre si (P>0,05).

A fração colmo foi, provavelmente, toda a grande responsável pela variação do teor de matéria seca da planta toda, uma vez que os colmos variaram de forma semelhante à planta

inteira e praticamente na mesma intensidade. Os dados do presente experimento estão de acordo com os reportados na literatura. Muraro (2007) encontrou resultados para teor de matéria seca de colmo em torno de 25,3% para cana-de-açúcar com 16 meses. Thiago (2009), reportou valores de 23,65% de matéria seca no colmo de cana-de-açúcar com 12 meses de idade.

O teor de matéria seca da planta inteira como mancionado, variou de forma semelhante ao colmo, uma vez que essa fração correspondeu a maior porção da planta. Como as coletas do experimento foram iniciadas quando a cultura atingiu cerca de 10 meses, a variação do teor de matéria seca, embora tenha sido significativa não foi muito expressiva, havendo apenas cerca de 10% de incremento ao longo de todo o experimento.

Aos 12 meses a cana-de-açúcar apresentou teor de matéria seca de 24%, sendo que dados reportados pela literatura são variáveis. Thiago (2009), trabalhando com a variedade IAC 86-2480, relatou valores de 32,3% de matéria seca. Entretanto, Freitas et al., (2006), trabalhando com 13 variedades de cana-de-açúcar voltadas para produção animal, reportaram valores variando entre 20,1 e 27,8% de matéria seca, concordantes com outros trabalhos que encontraram valores de cerca de 27% de matéria seca (COAN et al., 2002; BERNARDES et al., 2002).

Schmidt (2006), reportou valores semelhantes aos encontrados no presente trabalho (24%), com excessão à cana-de-açúcar colhida aos 12 meses, onde o autor relatou teor de 30,4%. O autor encontrou teores de matéria seca de cerca de 24,2% aos 15 meses e 27,7% aos 18 meses de idade para a variedade IAC 86-2480, semelhantes aos do presente estudo, que foram 24% aos 14 meses e 28% de matéria seca aos 18 meses de idade. O acúmulo de matéria seca crescente ao longo do tempo também foi observado por Azevedo et al. (2003), que avaliarma 15 variedades de cana-de-açúcar cortadas aos 14 e 18 meses, e verificaram teores médios de 26,3% e 29% aos 14 e 18 meses respectivamente. Kung Jr. e Stanley (1982), em estudo com cana-de-açúcar e sua composição química, observaram aumento do teor de matéria seca com o aumento da idade da planta, cortada aos 6, 9, 12, 15 e 24 meses. Assim, os valores do teor de matéria seca do presente experimento estão dentro do esperado.

6.2.2 Componentes fibrosos

Os valores dos teores de fibra em detergente neutro (FDN) estão expressos na tabela 10 e os teores de fibra em detergente ácido (FDA) estão expressos na tabela 11. Não houve diferença significativa (P>0,05) para os teores de FDN e FDA nos diferentes tratamentos. Porém, a diferença foi significativa para as frações ao longo do tempo, com excessão da fração FDA para folhas secas, que apresentou-se com cerca de 48% de FDA na base seca para todos os meses de avaliação.

As frações de foi aquela que apresentou o maior teor de fibra. Os teores de FDN e FDA não foram alterados de forma expressiva nas folhas verdes, uma evidência de que não houve acúmulo expressivo de carboidratos solúveis nessa fração, ao contrário do que ocorreu no colmo, uma vez que este atua como dreno metabólico na planta.

Tabela 10 – Valores médios dos teores de FDN de frações de plantas de cana-de-açúcar ao longo do período experimental.

	Teor de FDN (%MS)				
	Época do ano				
Fração	Março	Maio	Julho	Novembro	EPM*
Colmo	55a	46b	48b	46b	0.65
Folhas secas	80a	78ab	79a	80a	0.30
Folhas verdes	79a	78ab	78a	75c	0.31
Planta inteira	61a	55b	53b	55b	0.76

*EPM – erro padrão da média;
Médias na linha seguidas de mesma letra não diferem entre si (P>0,05).

O maior valor de FDN na fração folha verde foi observado aos 10 meses, 79% da matéria seca, e o menor aos 18 meses, com teor de 75% da matéria seca. Os teores de FDA variaram de 50% à 46,6% nos meses de Março e Novembro, respectivamente. Em relação às folhas secas, a porção mais fibrosa da planta, ao longo dos meses os teores de FDN pouco variaram, sendo que apenas no mês de Maio houve diferença estatística, atingindo 78% de FDN, sendo na média 79% da matéria seca.

Os valores de FDA para as folhas secas atingiram 48% da matéria seca e permaneceram assim ao longo do experimento, sem manifestaram diferença estatística entre sí (P>0,05). Apesar dos teores de FDA para folha seca não variarem, para a fração folha verde

estes diminuiram. Rodrigues et al. (1997), reportaram que os valores de FDN na fração folha estiveram entre 76,6% e 80,8% da matéria seca. Thiago (2009) também encontrou valores decrescentes com o tempo de 81,39% à 72,04% de FDN aos 4 e 12 meses e de 54,5% a 46,6% de FDA. Embora esse autores tenham avaliado apenas a fração folha, sem distinção entre folha verde e folha seca, ainda assim os valores relativos encontrados estão de acordo com os avaliados no presente estudo.

Tabela 11 – Valores médios dos teores de FDA de frações de plantas de cana-de-açúcar ao longo do período experimental.

	Teor de FDA (%MS)				
	Época do ano				
Fração	Março	Maio	Julho	Novembro	EPM*
Colmo	33,8a	30,6b	31,4b	29,7b	0,39
Folhas secas	48,3	48,1	48	48,4	0,14
Folhas verdes	50a	49b	48,2b	46,6c	0,20
Planta inteira	38,4a	35,9b	34,6b	35,6b	0,46

*EPM – erro padrão da média;
Médias na linha seguidas de mesma letra não diferem entre si (P>0,05).

A fração colmo apresentou queda no teor de fibra, tanto de FDN quanto para FDA. O colmo partiu de 55 e 33,8% em Março até 46% e 29,7% em Novembro para FDN e FDA, respectivamente . Isso é esperado uma vez que o acúmulo de sacarose ao longo do tempo dilui a concentração de fibra. Valores semelhantes foram encontrados por Thiago (2009), que relatou valores de FDN para o colmo variando entre 45% e 48% (média de 46,72%) da matéria seca aos 12 meses de idade. Rodrigues et al. (1997), observaram variação no teor de FDN do colmo variando entre 40,5% e 48,9% da matéria seca em variedades de cana-de-açúcar. Thiago (2009) observou variação de 27,9% à 41,8% de FDA na matéria seca. Muraro (2007), em colmos de cana-de-açúcar, em diferentes idades de corte, observou variação de 37,9% à 31,21% de FDA na matéria seca. Esses dados corroboram os encontrados no presente experimento.

Os teores de FDN e FDA da planta inteira se comportou do mesmo modo, dimunuindo de Março (61% e 38,4% de FDN e FDA, respectivamente) para Maio e permanecendo constante até Novembro (55% e 35,6% para FDN e FDA, respectivamente). Os teores de fibra

da planta inteira acompanharam os teores de fibra do colmo, uma vez que essa fração é a majoritaria na planta e, portanto, a mais expressiva.

A forragem apresentou valores mádios superiores aos encontrados por Rodrigues et al., (2001), que observaram teor médio de FDN igual a 44,18% para a cana-de-açúcar IAC 86-2480. Também maiores que os de Andrade et al., (2002), que avaliaram 60 variedades de cana-de-açúcar para uso na alimentação de ruminantes, colhidas aos 12 meses de idade, onde foram encontrados valores variando para de FDN entre 36 e 56% da matéria seca, e de FDA entre 21 e 36%. Pedroso et al., (2005) observaram para FDA valores médios entre 35,3 e 42%, e para entre 45,7 e 57,9%, da matéria seca. Já Schmidt (2006), encontrou valores superiores de FDN aos 12 meses de idade, 61,8% da matéria seca, enquantoque para FDA esse autor relatou teor de 36,8% da matéria seca. Azevêdo et al., (2003) estudando 15 variedades de cana-de-açúcar, encontraram valores de FDA com variação antre 24,3% a 29,7% na matéria seca

Rodrigues et al., (1997) sugeriram que teores de FDN acima de 52% da matéria seca poderiam limitar o consumo e comprometer o desempenho animal. Os dados de FDN do presente experimento sugerem que a variedade de cana-de-açúcar IAC 93-3046 encontram-se dentro da variação normal para os teores de FDN e FDA, conforma os relatos da literatura.

6.2.3 Coeficiente de digestibilidade

Na tabela 12 estão apresentados os dados referentes aos coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS). Não houve efeito significativo (P<0,05) das variáveis com o tratamento imposto. Porém, houve diferença significativa (P>0,05) ao longo do período experimental.

Tendo em vista que os coeficientes de DIVMS e a porção fibrosa são grandezas inversamente proporcionais, os valores se comportaram de forma.antagônica

Os maiores coeficientes de DIVMS foram encontrados na fração colmo, chegando à 69% da matéria seca. Já as folhas secas foram as que apresentaram menores coeficientes de DIVMS, cerca de 32% e a as folhas verdes permanecendo com cerca de 40%. De acordo com Van Soest et al., (1991), a fração colmo apresenta diminuição do coeficiente de digestibilidade em função do maior teor de fibra acumulado ao longo do tempo. Porém isso não ocorre com a

cana-de-açúcar, uma vez que no colmo é onde estão localizadas a maior parte das reservas da planta. Assim, o teor de fibra, menos digestível, é diluído (Tabela 10) pelo alto teor de sacarose (Tabela 7), aumentando assim a digestibilidade. O coeficiente de DIVMS do colmo partiu de 62,1% e se estabilizou aos 69% no mês de Maio. Nesse período a cana-de-açúcar atingiu 12 meses e, portanto a maturidade (Tabela 8), e o acúmulo de sacarose no colmo foi desacelerado, o que fez com que a DIVMS se estabilizasse. Rodrigues et al., (1997), trabalhando com 11 variedades de cana-de-açúcar, reportaram valores de 72,5% a 83,8% e Thiago (2009), com a variedade IAC 86-2480, valores médios de 71,3% de DIVMS para a fração colmo. Portanto os valores encontrados no experimento estão dentro do esperado.

Tabela 12 – Valores médios do coeficientes de DIVMS de frações de plantas de cana-de-açúcar ao longo do período experimental.

	Coeficiente de DIVMS (%MS)				
	Época do ano				
Fração	Março	Maio	Julho	Novembro	EPM*
Colmo	62,1b	69a	67a	68,1a	0,71
Folhas secas	31,3b	34,1a	32,6ab	31,3b	0,50
Folhas verdes	38c	40,8b	40,9b	43,4a	0,40
Planta inteira	55,2b	58,9ab	61,8a	58,6ab	0,85

*EPM – erro padrão da média;
Médias na linha seguidas de mesma letra não diferem entre si (P>0,05).

Entretanto, as folhas verdes com menor quantidade de nutrientes apresentaram menor digestibilidade que o colmo, sendo as folhas secas ainda menores. No mês de Novembro, a DIVMS das folhas secas caiu significativamente e das folhas verdes aumentou significativamente. Provavelmente isso se deve ao fim do período de estiagem e o início da estação chuvosa, que fez com que a planta apresentasse crescimento significativo, uma vez que se observou nesse período aumento no número de folhas verdes (figura 5) e no comprimento do colmo (Tabela 6) e na produtividade (Tabela 4). Nesse período os poucos nutrientes disponíveis nas folhas secas podem ter sido drenados para a formação de novas folhas verdes, o que resultou no acréscimo da DIVMS das folhas verdes e decréscimo nas secas.

A média dos coeficientes de DIVMS das folhas verdes permaneceram em torno de 40,7% da matéria seca, sendo em Março (38%) o seu menor valor e em Novembro o maior (43,4%). Esses valores de DIVMS estão abaixo dos reportados na literartura. Thiago (2009),

relatou que a variedade IAC 86-2480 aos 12 meses apresentou folhas com média de 51,2% de DIVMS. Já Rodrigues et al., (1997), trabalhando com 11 variedades de cana-de-açúcar, encontraram valores de DIVMS nas folhas de 51,4% da matéria seca. Isso sugere que a variedade IAC 93-3046 apresentou folhas com menor digestibilidade em comparaçào com a variedade IAC 86-2480, já consolidade como variedade forrageira.

A planta inteira apresentou média do coeficiente de DIVMS aos 12 mesesde 58,9% no mês de Julho atingiu o maior valor, 61,8%. Aparentemente isso se apresenta como paradoxo, uma vez que todos outros componentes da planta, colmo e folhas secas apresentaram decréscimo nos valores de DIVMS, e a planta toda deveria acompanhar esse decréscimo na DIVMS, porém isso não foi observado. Entretanto, nesse mês, Julho, os teores de fibra na planta inteira mostraram decréscimo (Tabelas 11 e 12), o que foi responsável pelo aumento da DIVMS, como evidenciado.

Esses valores estão dentro dos limites estabelecidos por Rodrigues (2001), que estudou 18 variedades diferentes de cana-de-açúcar e sugeriu que os coeficientes de DIVMS deveriam permanecer entre 58% e 69%, e de Boin e Tedeschi (1993), que preconizaram valores entre 54% e 64%. Entretanto, Freitas et al., (2006) reportaram valores de até 77,5%, que podem ser considerados muito elevados.

Schmidt (2006), utilizando a variedade IAC 86-2480 para a confecção de silagens, encontrou valores de DIVMS aos 12 meses de 65,8%. Rodrigues et al., (2001), trabalhando com a mesma variedade de Schmidt (2006), resportaram valor de 64,2%, enquanto Oliveira et al., (2004), para cana-de-açúcar aos 15 meses encontraram 64,66% de DIVMS. Já Rodrigues et al., (1997), em 11 variedades diferentes de cana-de-açúcar, encontrou valores de 67,57% até 77,23%.

Apenas o trabalho de Kung Jr. e Stanley (1982), relataram valores semelhantes ao do presente trabalho, com DIVMS de cana-de-açúcar colhida aos 6, 9, 12, 15 e 24 meses de idade, variando de 52,6% até 60,3% da matéria seca.

Thiago (2009), citando Rodrigues et al., (1997), resaltou que os coeficientes de DIVMS da cana-de-açúar devem servir apenas para comparação entre diferentes variedades uma vez que *in vivo*, esses valores são menores devido à baixa digestibilidade da fibra da cana-de-açúcar. Além disso, o mesmo autor sugeriu que a DIVMS não deve ser utilizada isoladamente como parâmentro único na escolha de variedades com fins de forragem.

6.2.4 Correlação entre ^{o}Brix e DIVMS

A figura 4 apresenta a correlação entre a o coeficiente de DIVMS e a variável ^{o}Brix. Observa-se que existe correlação positiva entre as duas variáveis (r=0,73).

A regressão ajustada para que a inclinação da reta fosse igual à 1, é a seguinte:

$$DIVMS = 41,35 + {}^{o}Brix \text{ ; com } R^2=0,73 \text{ e } P<0,01$$

A equação mostra que a variável ^{o}Brix é uma ferramenta importante para se estimar a DIVMS, pois é uma medida simples e rápida de ser realizada (CONSECANA, 2003) e pode ser usada no campo como ferramenta útil para se estimar essa variável. O mesmo foi observado por Thiago (2009), que relatou que a variável ^{o}Brix da cana-de-açúcar apresenta correlação positiva com o coeficiente de DIVMS da planta inteira, com elevado r^2 (0,8085).

Esse resultado revela que a variável ^{o}Brix pode satisfatóriamente estimar a DIVMS da planta toda, como os trabalho de Rodrigues et al., (1997) e Thiago (2009).

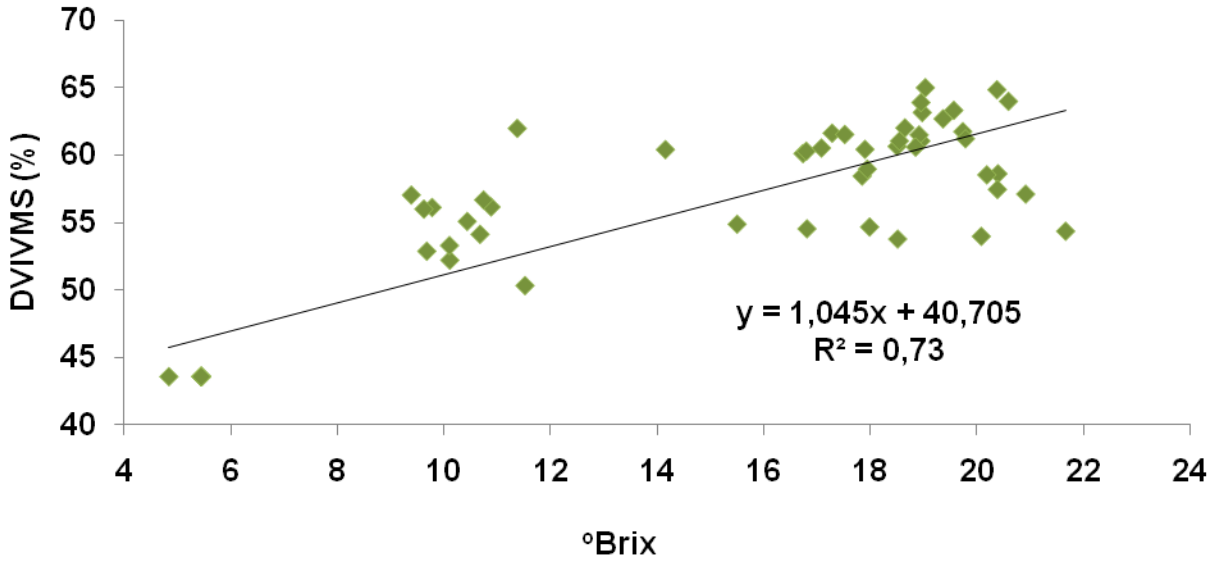

Figura 4 – Correlação entre ^{o}Brix e coeficiente de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de plantas de cana-de-açúcar (IAC 93-3046). DIVMS=40,74+1,04^{o}Brix; R^2=0,73; P<0,01; P=0,61 para inclinação=1.

6.3 Descrição da população de microrganismos em plantas de cana-de-açúcar

6.3.1 Bactérias ácido-láticas

A Tabela 13 apresenta as contagens de bactérias ácido-láticas encontradas nas frações e na planta interia de cana-de-açúcar. Não houve diferença significativa entre os tratamentos (P>0,05), porém ao longo do tempo houve diferença estatística (P<0,05).

Ao longo do tempo, a contagem de bactérias ácido láticas foi crescente. De forma geral, todas as frações apresentaram contagem numericamente semelhante, iniciando com média de 4 log ufc/gMV no mês de Março, com cerca de 10 meses de idade e atingindo cerca de 5,5 log ufc/gMV aos 18 meses em Novembro.

Tabela 13 – Contagem de bactérias ácido-láticas em frações de plantas de cana-de-açúcar ao longo do período experimental.

Fração	Contagem (log ufc/g MV)				
	Época do ano				
	Março	Maio	Julho	Novembro	EPM*
Colmo	4ab	3,7ab	4,1a	5,7a	0,34
Folhas secas	4ab	4,2ab	4,5a	5,3a	0,23
Folhas verdes	4,1b	4,4ab	3,8b	5,4a	0,25
Planta inteira	4,1b	4,2b	3,6b	6a	0,28

*EPM – erro padrão da média;
Médias na linha seguidas de mesma letra não diferem entre si (P>0,05).

De forma geral, a planta de cana-de-açúcar não apresentou variação significativa de contagem de bactérias entre 10 e 14 meses, sendo que aos 18 meses, mês de Novembro, o aumentou foi expressivo, chegando à 6 log ufc/g MV. Ao se observar a figura 3, nota-se que de Março à Julho houve queda na temperatura e na disponibilidade de água, sendo que a temperatura apresentou maior declínio em Julho. Lin et al., (1992) relatam que dentre os diversos fatores responsáveis pela variação da população de microrganismos nas plantas, no caso alfafa, a temperatura é o principal. Isso corrobora os resultados do presente estudo, que se observa o aumento crescente da contagem de bactérias na planta toda, uma vez que nesse período a população de bactérias se manteve estável. Nesse experimento observamos que a temperatura e atividade de água foram vitais para o aumento de bactérias ácido-láticas.

As bactérias ácido láticas suportam, no geral, temperaturas entre 5°C e 50°C, sendo o ideal para seu desenvolvimento a faixa de temperature variando entre 25°C e 40°C, sendo chamadas portanto, de mesófilas. (McDONALD et al., 1991). Estando a temperatura ambiente na média de 18 ^{o}C (Tabela 3), a população provavelmente diminuiu, sendo esse o fator que mais influencia os microrganismos de forma geral (LIN et al., 1992). Mudanças na microflora epifítica em gramíneas e na alfalfa durante a estação quente têm sido relatadas (LINDGREN et al., 1985). Ruser (1989), encontrou que a contagem de bactérias ácido-láticas em milho e capim aumentaram com o aumento da temperatura. Entretanto Moran et al. (2000) não encontraram nenhuma relação entre o número de bactérias ácido-láticas e as condições climáticas na Irlanda. No entanto, é estabelecido na literatura como consenso que as mudanças de temperatura influenciam na quantidade de bactérias ácido-láticas epífiticas (MUCK, 1989; PAHLOW, 1991).

Para que as bactérias ácido-láticas tenham êxito em preservar a silagem, estas devem superar a população epifítica da forragem, tornando-se a população dominante no ambiente. A microflora total, em forragens frescas, antes da ensilagem, varia geralmente entre 5 e 9 log ufc/g MV, segundo Langston e Bowman (1960). Segundo Pahlow (1986), em revisão de literatura, observou que a população de bactérias láticas epifíticas nas forragens varia de 4 a 5 ufc/g MV. Assim, a população de bactérias láticas epífitas é muito variável, pois oscila milhões de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de forragem (SATTER et al., 1988).

Mahanna (1993), Weinberg e Muck (1996), Lin et al. (1992) e Kung Jr. et al. (2003), relataram que a inoculação de microrganismos nas taxas de 5 a 6 log ufc/g de forragem fresca é suficiente para que bactérias homoláticas dominem a fermentação e preservem o material em ambiente de clima temperado.

Na literatura, há poucos relatos da microbiologia da cana-de-açúcar, sendo que não foi encontrado trabalhos que avaliaram a microbiologia de frações de cana-de-açúcar. Bravo-Martins (2004), trabalhando silagens de diversas variedades de cana-de-açúcar, encontrou média de 8,6 log ufc/g MV de bactérias ácido-láticas em cana-de-açúcar fresca, valor considerado elevado. Entretanto, Pedroso (2003), encontrou população inicial de bactérias ácido-láticas de 4,58 log ufc/g MV na cana-de-açúcar com 12 meses de idade. Já Alli et al. (1983) encontraram a população inicial de lactobacilos de 6,2 log ufc/g MV, valores semelhante ao do presente experimento. Assim, os valores reportados no presente experimento, entre 4,1

e 6 log ufc/g MV, estão de acordo com a literatura. Porém, apenas aos 18 meses, coleta de Novembro, é que a cana-de-açúcar utilizada no presente estudo atingiu 6 log ufc/g MV de bactérias ácido-láticas, o preconizado na literatura para que ocorra boa fermentação lática (MUCK, 1988; MAHANNA, 1993; WEINBERG e MUCK, 1996 e KUNG JR. et al., 2003).

Curiosamente, essa é a época do ano em que a maioria dos canaviais destinados à produção animal encerra sua colheita, e por isso, em geral, durante a seca a contagem de bactérias ácido lálitcas é menor que o sugerido como ideal.

6.3.2 Leveduras

A Tabela 14 apresenta as contagens de leveduras encontradas nas frações e na planta inteira de cana-de-açúcar. Não houve diferença significativa entre os tratamentos (P>0,05), nem ao longo do tempo para as frações. Para a planta toda houve aumento da população com o decorrer do período experimental (P<0,05).

A contagem aos 12 meses de idade, coleta de Maio, não foi realizada devido à contaminação com mofos na placa, impedindo a identificação das colônias de leveduras. O meio de cultura utilizado para a contagem de leveduras e mofos foi o YGC ágar (Fluka®), contendo clorofenicol para a inibição de eventual crescimento de bactérias. As *placas de petri* foram incubadas à 32°C por 48 e 72 horas para a contagem de leveduras e mofos, respectivamente. Entretanto, após a contagem de leveduras às 48 horas, o aparecimento de mofos foi grande, sendo que esses tomaram conta da superfície das placas e foi impossível a diferenciação das colônias, sendo por isso totalmente invalidadas as contagens de mofos.

Aos 10 meses a planta inteira de cana-de-açúcar apresentou contagem de leveduras de 4 log ufc/g MV, sendo que esse valor foi de 4,5 log ufc/g MV aos 14 meses, não doferindo estatísticamente (P>0,05). Entretanto, aos 18 meses (Novembro), a contagem atingiu 5,7 log ufc/g MV, com elevação significativa. Esse aumento provavelmente foi devido ao aumento da atividade de água, uma vez que no mês de Novembro a disponibilidade de chuvas e a temperatura foiram maiores (Tabela 3).

Tabela 14 – Média de contagem de leveduras em frações de plantas de cana-de-açúcar ao longo do período experimental.

Fração	Contagem (log ufc/g MV)				
	Época do ano				
	Março	Maio	Julho	Novembro	EPM*
Colmo	4	NQ#	4,5	5,5	0,41
Folhas secas	4,7	NQ	5	4,7	0,25
Folhas verdes	4,1	NQ	4,3	5	0,40
Planta inteira	4b	NQ	4,5b	5,7a	0,28

*EPM – erro padrão da média;
#NQ – não quantificado;
Médias na linha seguidas de mesma letra não diferem entre si (P>0,05).

Na literatura, há poucos trabalhos referentes a população de microrganismos epifíticos em cana-de-açúcar. Entretanto, os estudos relatam população de leveduras na ordem de 5 log ufc/g MV de silagem como freqüentes e esses estão associadas à rápida deterioração após a abertura do silo (McDONALD et al., 1991).

Embora no presente estudo foi detectado média de 4,7 log ufc/g de MV de cana-de-açúcar *in natura*, sugerindo que mesmo antes da colheita a população de leveduras já era alta, sobretudo aos 18 meses, os dados da literatura relatam populações de leveduras mais altas que a encontradas nesse trabalho. Bravo-Matins (2004), trabalhando com identificação de leveduras em silagens de diversas variedades de cana-de-açúcar, encontrou média de 6,5 log ufc/g MV em cana-de-açúcar fresca. Cabral Jr. et al. (2009) relataram média de 7,03 log ufc/g MV de leveduras em cana-de-açúcar. Alli e Baker (1982), avaliaram o desenvolvimento microbiano em silagem de cana-de-açúcar, relatando população inicial de 6,15 log ufc/g MV de leveduras. Pedroso (2003), encontrou população inicial de leveduras de 6,15 log ufc/g MV na cana-de-açúcar com 12 meses de idade.

6.3.3 Bactérias ácido-láticas e a associação com as leveduras

A Figura 5 mostra a variação da população de bactérias ácido-láticas e de leveduras durante o experimento. Aos dez meses de idade, ambos microrganismos iniciaram com população média de 4 log ufc/g de MV. Aos 14 meses, coleta de Julho, a contagem de leveduras foi maior que a de bactérias ácido-láticas, provavelmente devido a disponibilidade de

água, uma vez que as leveduras suportam menor atividade de água. Entretanto, aos 18 meses, mês de Novembro, o início das chuvas fez com que os dois microrganismos apresentassem contagens elevadas em relação a coleta anterior, devido ao aumento das chuvas e o padrão térmico (Tabela 3), porém o número de bactérias láticas foi maior que o de leveduras, sendo os valores de 5,7 e 6 log ufc/g MV, respectivamente para leveduras e bactérias ácido-láticas.

Mahanna (1993), Weinberg e Muck (1996), Lin et al. (1992) e Kung Jr. et al. (2003), afirmaram que a inoculação de microrganismos nas taxas de 5 a 6 log ufc/g de forragem fresca são suficientes para que bactérias homoláticas dominem a fermentação e preservem o material. Já McDonald et al. (1991), relataram que população de leveduras na ordem de 5 log ufc/g MV de silagem são freqüentes e estão associadas à rápida deterioração após a abertura do silo.

Alli e Baker (1983), avaliaram o desenvolvimento microbiano em silagem de cana-de-açúcar, relatando que a população inicial de 6,15 log ufc/g MV de leveduras e fungos aumentou no primeiro dia da ensilagem, até aproximadamente 7 log ufc/g, e a partir deste ponto decresceu de forma constante durante todo o período de conservação, atingindo 3,3 log ufc/g aos 21 dias. Em relação à população de lactobacilos, os mesmos autores relataram contagem inicial de 6,2 log ufc/g, sendo que atingiu aproximadamente 8,3 log ufc/g no primeiro dia da ensilagem, a partir de quando apresentou redução constante até a última observação aos 21 dias. Assim, como no presente trabalho, esses autores observaram que a população de bactérias ácido-láticas pode ser semelhante ou até mesmo maior que a de leveduras.

Embora o número de bactérias ácido-láticas tenha sido maior que a de leveduras, ainda assim sempre a cana-de-açúcar apresenta extensa fermentação alcoólica, com elevadas perdas de matéria-seca, resultando em redução de valor nutritivo e redução de consumo vonluntário pelo animal (ALLI e BACKER, 1982; KUNG Jr. & STANLEY, 1982; PEDROSO, 2003; JUNQUEIRA, 2006; SCHMIDT, 2006 QUEIROZ, 2006).

Os fatores que mais afetam a sobrevivência de leveduras durante armazenamento da silagem são o grau de anaerobiose e as concentrações de ácidos orgânicos (JONSSON e PAHLOW, 1984; DONALD et al., 1995).

Bravo-Martins (2004) também observou que a população de leveduras foi menor (acima de 5 log ufc g^{-1} de silagem) que o número de bactérias láticas (acima de 9 log ufc g^{-1} de

silagem) no processo de ensilagem sem aditivos. Entretanto, esse autor relatou que as leveduras estiveram presentes em todo o processo de estocagem em populações consideráveis (acima de 5 log uf g^{-1} de silagem) e não foram inibidas pelo abaixamento do pH, o que provavelmente alterou o sucesso da fermentação e a conservação de nutrientes. Isso é esperado, uma vez que sabe-se que as leveduras não são inibidas pelos valores de pH alcançados durante a ensilagem, pois, segundo McDonald et al. (1991), muitas espécies de leveduras são relativamente insensíveis ao pH, sendo encontradas em silagens com valores de pH entre 3,0 a 8,0.

Novos estudos de genética têm mostrado que as leveduras apresentam vantagens sobre outros microrganismos na síntese de etanol. Segundo Piskur et al. (2004), durante a fermentação as leveduras convertem acetaldeído à etanol sendo catalizado pela álcool desidrogenase, assim quanto maior a atividade dessa enzima, maior a síntese de etanol. Sousa (2006), trabalhando com silagens de cana-de-açúcar, observou aumento significativo da produção de etanol nos primeiros dias de fermentação em relação à produção de ácido lático, 0,18 e 0% MS no primeiro dia e 1,32 e 0,13% MS no terceiro dia, respectivamente para etanol e ácido lático. A atividade da enzima álcool desidrogenase corroborou esse resultado, pois foi de 19,53 $nmol^{-1}Pbmin^{-1}$ no primeiro dia e 97,39 $nmol^{-1}Pbmin^{-1}$ no terceiro dia, mostrando extensa e crescente produção de etanol nos primeiros dias de fermentação em relação a produção de ácido lático.

Outro fator, a presença de oxigênio, ajuda na sobrevivência e crescimento das leveduras durante o armazenamento, e isso geralemnte é decorrente de flahas na vedação. Jonsson e Pahlow (1984), observaram que o ar que se difunde na silagem durante a fermentação induz leveduras dos gêneros *Candida* e *Hansenula*, quando presentes, a fermentar o lactato, reduzindo a queda do pH da massa ensilada. Porém, se condições anaeróbias são estabelecidas e mantidas, estas leveduras são reduzidas, para mais ou menos, 15% do total, sendo que o restante inclui principalmente *Saccharomyces* sp, que também é fermentativa, porém não pode utilizar lactato.

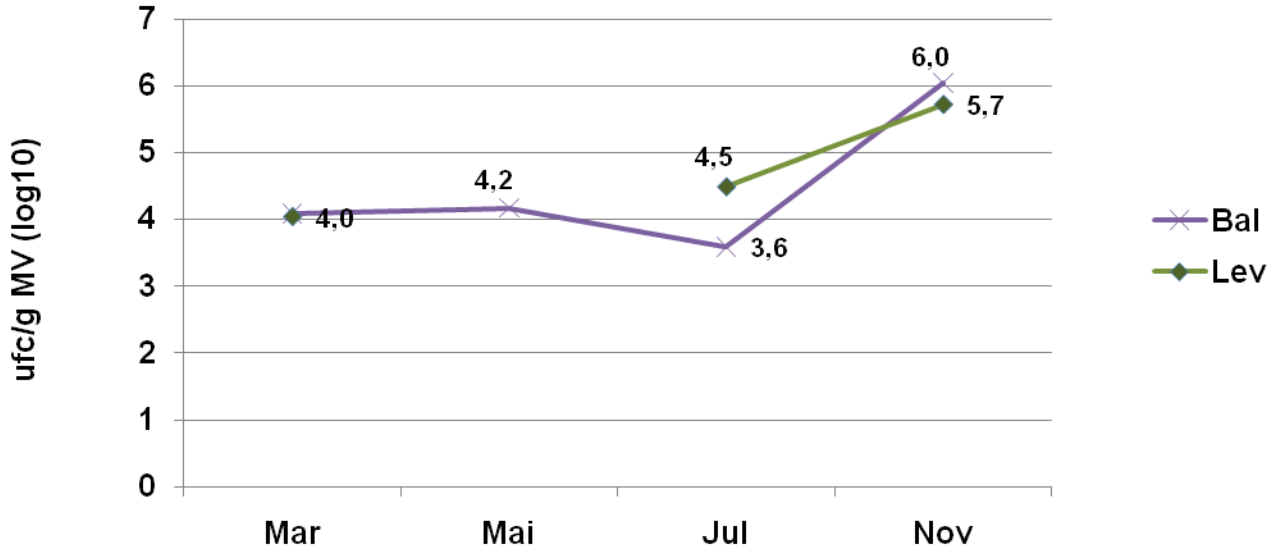

Figura 5 – Comparação das médias de contagem do número bactérias ácido-láticas e leveduras em plantas e frações de plantas de cana-de-açúcar (IAC 93-3046) ao longo do período experimental.

Aproximadamente 25 espécies de leveduras que colonizam as silagens foram citados por Jonsson (1989), divididas em dois grupos fisiológicos sendo esses as leveduras de alta capacidade fermentativa, que obtém energia de açúcares em anaerobiose; e leveduras com alta capacidade respiratória, que utilizam principalmente ácido lático sob condições aeróbias.

Bravo-Martins (2004), isolou 81 leveduras diferentes de cana-de-açúcar e observou que todas apresentaram alta capacidade metabólica, e capazes de assimilar várias fontes de carbono e nitrogênio, capazes de crescer em meio de cultura, sem requerimento de vitaminas e em todas as temperaturas testadas, sendo que 70% delas eram capazes de fermentar lactato.

Embora Pedroso (2003), Schmidt (2006) e Junqueira (2006) tenham observado redução da fermentação alcoólica em silagens de cana-de-açúcar aditivadas com *Lactobacillus buchneri*, e sugerido esse microganismo como promissor na redução de leveduras, Sousa (2006), observou que as silagens aditivadas com *L. buchneri* apresentaram fermentação alcoólica semelhante as silagens controle. Era esperado que as silagens aditivadas com *L. buchneri* em conjunto ou não com bactérias homoláticas levasse à redução significativa na produçào de etanol pela atividade de leveduras, o que não foi observado naquele estudo. O

mesmo foi relatado por Freitas et al. (2006), que avaliaram diferentes aditivos e a inclusão de soja em silagens de cana-de-açúcar, e não encontrou diferenças entre as silagens controle e aditivadas com *L. buchneri* em relação à produção de etanol.

O conjunto dessas observações sugere que, as leveduras apresentam variações na sua população e que são extremamente eficazes na produção de etanol e consumo de lactato, e mesmo que a carga microbiana de bactérias ácido-láticas seja igual ou até maior que a de leveduras, não é o suficiente para competir e reduzi-las, sendo talvez necessária alta dose de aditivo para que a fermentação alcoólica seja afetada negativamente.

Embora no presente trabalho não se tenha realizado a identificação das espécies de leveduras observadas da cana-de-açúcar, ainda assim, é evidente que tanto sob condições aeróbias como anaeróbias, as leveduras se apresentam como o grande desafio da técnica de ensilagem de cana-de-açúcar, pois podem tanto produzir etanol, consumindo carboidratos solúveis, como reduzir a queda do pH, consumindo o ácido lático.

7. Conclusões

Os resultados desse experimento permite concluir que a cana-de-açúcar da variedade IAC 93-3046, apresenta alta produtividade e alto teor de sólidos totais. A média de digestibilidade dessa planta é dependente da maior presença de colmos, sendo a fração de folhas responsável pelo aumento do teor de fibras.

A variável ^{o}Brix apresenta alta correlação com a digestibilidade *in vitro* da matéria seca, gerando uma equação que pode ser ferramenta útil e rápida para se estimar a digestibilidade da cana-de-açúcar, sobretudo em situações de campo, fornecendo informações importantes relacionada ao valor nutritivo da cana-de-açúcar.

A fonte de adubação, quer seja química ou orgânica, não interfere na população de microrganismos, uma vez que não foi observado efeito de tratamento no experimento.

A população de microrganismos varia em função do período experimental e das condições climáticas. Acréscimos de temperatura e umidade foram favoráveis ao desenvolvimento de bactérias ácido-láticas e leveduras na variedade IAC 93-3046.

8. Referências

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

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

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

ANDRADE, M.A.F**. Desempenho de novilhas holandesas alimentadas com cana-de-açúcar como forrageira única.** 1999. 56p.Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

ANDRADE, J.B.; FERRARI JÚNIOR, E.; POSSENTI, R.A.; OTSUK, I.P.; ZIMBACK, L.; LANDELL, M.G.A. Produção e composiçào de cultivares de cana-de-açúcar. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais**...Recife: Sociedade Brasileria de zootecnia, 2002. 1CD-ROM.

ARCHUNDIA, M.E.U, BOLSEN, K.K. Aerobic deterioration of silage: processes and prevention. In: Proceedings of Alltech's 17th Annual Symposium. Thrumpton Nottingham, UK. 2001, p. 127 - 144.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 15th Ed., Arlington, 1990, v1, 1117p.

AZEVEDO, J. A. G.; PEREIRA, J. C.; CARNEIRO, P. C. S.; QUEIROZ, A. C.; BARBOSA, M. H. P.; FERNANDEZ, A. M.; RENNÓ, F. P. Avaliação da divergência nutricional de variedade de

cana-de-açúcar (*Saccharum ssp*.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v.32, n.6, p. 1431-1442, 2003.

BARNES, A.C. **The sugar cane**. London: Leonard Hill Books, 1974. 572p.

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

BEUCHAT, L. R.; RYU, J. H. Produce handling and processing practices. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 3, n. 4, p. 459-465, Oct./Dec. 1997.

BOIN, C. Cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. In: D'ARCE; R. D.; BOIN, C.; MATTOS, W. R. S. (Ed.) **Utilização de resíduos agroindustriais da cana-de-açúcar na alimentação de rumiantes**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1985. p. 19-52.

BOIN, C.; MATTOS, W.R.S.; D'ARCE, R.D. Cana-de-açúcar e seus subprodutos na alimentação de ruminantes. In: PARANHOS, S. B. **Cana-de-açúcar, cultivo e utilização.** Campinas: Fundação Cargill, 1987.v.2,p.805-856.

BOIN, C.; TEDESCHI, L.O. Cana-de-açúcar na alimentação de gado de corte. In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 5., 1993, Piracicaba, **Anais**...Piracicaba: FEALQ, 1993. P. 107-126.

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

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. 161p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2004.

CABRAL JR., C.; SILVA, D.; AMORIM, E.; ESFRAIN, W.; MIRANDA, E.; PINHEIRO, D.; CARNAUBA, J. Análise ultivariada da microflora epífita em *S. officinarum* ensilada com *G. sepium.* ***Arch. Zootec****. Year 2009 Vol. 58 Num. 223 pp: 395-404 Arch. Zootec. 58 (223): 395-404. 2009.*

CÂMARA, G.M.S. **Produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: FEALQ, 1993. 242 p.

Canal da cana. Áreas de pastagens degradadas podem ser usadas em projetos sucroenergéticos em Mato Grosso do Sul. Web page: http://www.canaldacana.com/novo/view/noticias/?act=listar&pag=1&noticia_id=714.

CARVALHO, B. F. ; AVILA, C. L. S. ; PINTO, J. C. ; PEREIRA, M. N. ; SCHWAN, R. F. . Efeito de ácidos orgânicos no crescimento de leveduras isoladas de silagem de cana-de-açúcar. **In: 25 Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2009, Porto de Galinhas. 25 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009.

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

CATO, E. P.; GEORGE, W. L.; FINEGOLD, S. M. Genus *Clostridium*. In:
SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (Ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology.** Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. p.1141-1200.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 307p.

CHAPMAN, C.; BARTLEY, W. The kinetics of enzymes changes in yeast under conditions that cause the loss of mitochondria. **Biochemical Journal**, London, v.107, p. 455-465, 1968.

CHEN, J.; STOKES, M.R.; WALLACE, C.R. Effects of enzyme inoculant systems on preservation and nutritive value of haycrop and corn silage. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.1, p.501-512, 1994.

CLAUS, D.; BERKELEY, R. C. W. Genus *Bacillus*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (Ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology.** Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. P. 1105-1139.

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

CONSECANA, CONSELHO DOS PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Manual de instruções. 4. ed. Piracicaba: CONSECANA - SP, 2003. 115 p.

CORREA, C.E.S.; PEREIRA, M.N.; RAMOS, M.H.Performance of Holstein cows fed sugarcane or corn silage of different grain textures. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.60, n.4, p.621-629, out/dez. 2003.

COSTA, H. N. **Efeito do ambiente ruminal sobre a degradabilidade in situ da cana-de-açúcar**. 2002. 51. Dissertação (Mestrado em Zootencia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

COSTA, C.; MONTEIRO, A. L. G.; BERTO, D. A. et al. Impacto do uso de aditivos e/ou inoculantes comerciais na qualidade de conservação e no valor alimentício de silagens. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÂO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 1., 2001, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 2001. p. 87-126.

COZZOLINO, D.; ACOSTA, Y.; GARCIA, J. Application of near reflectancy spectroscopy (NIRS) to forage evaluation in Uruguay. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., 2001. São Pedro. **Proceedings**…Piracicaba: FEALQ, 2001. 370p.

DANNER, H.; ET AL.; Acetic acid increase stability of silage under aerobic condition. **Applied and Environmental Microbiology** , v. 69, n.1. 2003

DEVRIESE, L. A.; COLLINS, M. D.; WIRTH, R. 1992. The Genus *Enterococcus*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (Ed.) **The prokaryotes**. 2. ed. New York: Springer Verlag, 1992. p. 1465-1481

DRIEHUIS, F., and P. G. VAN WIKSELAAR. 1996. The occurrence of alcoholic fermentation in high dry matter grass silages, p. 254–255. *In* D. I. H. Jones, R. Jones, R. Dewhurst, R. J. Merry, and P. M. Haigh (ed.), Proceedings of the 11th International Silage Conference. University of Wales, Aberystwyth, United Kingdom.

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

DILLEWIJN, C. V. Botany of sugarcane. Waltham, Mass. USA. 1952. 371p.

DONALD, A.S., Fenlon, D.R. and Seddon, B. (1995) The relationship between ecophysiology, indigenous microflora and growth of *Listeria monocytogenes* in grass silage. ***Journal of Applied Microbiology*** 79, 141-148.

EDDS, G.T. Acute aflatoxicosis: A Review Journal of American Veterinary Medical Association, London, v.162, n.4, p. 304-309. 1983.

EICHELBERGER, L.; SIEWERDT, L.; SILVEIRA JR., P. Efeitos da inclusão de níveis crescentes de forragem de soja e uso de inoculantes na qualidade da silagem de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.5, p.867-874, 1997.

ELY, L.O.; SUDWEEKS, E.M.; MOON, N.J. Chemical evaluation of Lactobacillus addition to alfalfa, corn, sorghum and wheat forage at ensiling. **Journal of Dairy Science**, v.65, n.4, p.1041-1046, 1982.

FAO, **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.** Disponível em: http://faostat.org?\/faostat/form?collection= Production. Crops.Primary>.2009.

FERNANDES, A.C. **Cálculos na agroindustria da cana-de-açúcar**. 2.ed. Piracicaba: STAB, 2003. 240p.

FERRO, L.A. **Efeito de alguns herbicidas sobre a fermentação alcoólica realizada por leveduras *Saccharomyces cerevisiae.*** 1994. 82p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

FILYA, I; ASHBELL, G; HEN, Y .et al. The effect of bacterial inoculants on the fermentation and aerobic stability of wholecrop wheat silage. **Animal Feed Science and Technology**, v.88, p. 39-46, 2000.

FONSECA, A.H.; VON PINHO, R.G.; PEREIRA,M.N.; BRUNO, R.G.S.; CARVALHO,G.S. Características agronômicas, químicas e nutricinais de híbridos de milho visando à produção de silagem de alto valor nutritivo. **Revista Ceres**, viçosa, v.49, n.281, p.41-54, jan/fev.2002.

FRANSEN, S.C.; STRUBI, F.J. Relationship among absorvents on the reduction of grass silage effluent and silage quality. **Journal of Dairy Science**., v.81 p.2633-2644, 1998.

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

FREITAS, A. W. P.; PEREIRA, J. C.; ROCHA, F. C.; COSTA, M. G.; LEONAEL, F. P.; RIBEIRO, M. D. (2006) Avaliação da qualidade nutricional da silage de cana-de-açúcar com aditivos microbianos e enrriquecida com resíduo da colheita de soja (Evaluation of the nutritional quality of sugar cane silage treated with microbial additives abd soybean crop residue). **Brazilian Journal of Animal Science**, 35, 38-47.

GALLO, C.R.; CANHOS, V.P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica – Revisão. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, 9(4/5):35-40, 1991.

GALLO, P. C. S.; PEREIRA, M.N.; ANDRADE, M.A.F. Effects of dietary sugarcane concentration on heifer growth. **Journal of Dairy Science**, Champain, v.83 p. 114, 2000. Supplement 1.

GONZÁLEZ, E.; MAcLEOD, N.A. Spontaneous fermentation of sugar cane. **Tropical Animal Production**, v. 1, p. 80-84, 1976.

GOODING, E.G.B. Efecto de la calidad de la caña sobre su valor como alimento para bovinos. Tropical Animal Production, Edinburgh, v.7, n.1, p.76-97, Mar. 1982.

HAIGH, P.M. Effluent production from grass treated additives and made in large-scale bunker silos**. Grass and Forage Science**., v.54, p.208-218, 1999.

HAMMES, W.P.; WEISs, N.; HOLZAPFEL, W. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER,W.; SCHLEIFER, K. H. (Ed.) **The prokaryotes**. 2. ed. New York: Springer Verlag, 1992. p. 1535-1594.

HIGGINBOTHAM, G.E.; MUELLER, S.C.; BOLSEN, K.K.; DePETERS, E.J. Effects of inoculants containing propionic acid bacteria on fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2185-2192, 1998.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. The Genus *Leuconostoc*. P. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (Ed.) **The prokaryotes**. 2.d ed. New York: Springer Verlag, 1992. p. 1508-1534.

IAC; A variedade IAC 86-2480 como nova opção de cana-de-açúcar para fins forrageiros: manejo de produção e uso na alimentação animal./ Marcos Guimarães de Andrade landell; et al. – **Campinas Instituto Agronômico**, 2002 39p. :il. – (Série Tenologia APTA, boletim técnico IAC; 193).

IAC; Cultuvares. Web page: http://www.iac.sp.gov.br/Cultivares/Relatórios/Listagens/ , 2010.

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

JONSSON, A. 1989. The role of yeasts and clostridia in silage deterioration. Ph. D. thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Microbiology, Report 42. Uppsala, Sweden.

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

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

LIN, C.; BOLSEN, K.K.; BRENT, B.E.; HART, R.A.; DICKERSON, J.T. Epiphytic microflora on alfafa and whole-plant corn. **Journal of Dairy Science**, 75:2484-2493, 1992.

Kung, L. and Stanley, R. W. (1982) effect os atage of maturity on the nutritive value of whole-plant sugar cane preserved as silage. Journal of Animal Science, 54, 689-696.

KUNG Jr., L.; GRIEVE, D.B.; THOMAS, J.W. 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, p.299-306, 1984.

KUNG JUNIOR, L. Microbial and chemical additives for silage – effects on fermentation and animal response. In: WORKSHOP SOBRE MILHO PARA SILAGEM, 2000, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fealq, v.2, p.53, 2000.

KUNG JUNIOR, L.; TAYLOR, C.C.; LYNCH, M.P.; NEYLON, J.M. The effect of treating alfafa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science** , Albany, v. 86, p. 336-343, 2003

LACEY, J. Pre-and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. **Journal of Applied Bacteriology,** Oxford, v. 67, p. 11S-25S, 1989.

LANDELL, M.G. de A.; CAMPANA, M.P.; RODRIGUES, A.A.; CRUZ, G.M.; BATISTA, L.A.R.; FIGUEIREDO, P.; SILVA, M.A.; BIDOIA, M.A.P.; ROSSETTO, R.; MARTINS, A.L.M.; GALLO, P.B.; KANTHACK, R.A.D.; CAVICHIOLI, J.C.; VACONCELOS, A.C.M.; XAVIER, M.A. **A variedade IAC86-2480 como nova opção de cana para fins forrageiros:** manejo de

produção e uso na alimentação animal. Campinas: Instituto Agronômico, 2002. 36p. (IAC. Boletim Técnico, 193).

LANGSTON, C. W., and BOUMA C. 1960. A study of the microorganisms from grass silage. II. **The lactobacilli. Appl. Microbiol**. 8:223-234.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia: tecnologia das fermentações. São Paulo: Edgar Blucher, 1975. v. 1, 286 p.

LINDGREN. S., K**.** PETTERSSON, A. JONSSON, P. LINGVAU, AND A. KASPERSSON. 1985. Silage inoculation-selected strains, temperature, wilting and practical application. Swed. J. Agric. Res. 159.

LINDGREN, S., PETTERSSON, K., KASPERSSON, A., et al., 1985. Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. Journal of the Science of Food Agriculture, 36: 765-774.

LINDGREN, S. E., and W. J. DOBROGOSZ. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiol. Rev. **87:**149–164.

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

LUIS, L.; RAMÍREZ, M. Cinética de los principales grupos de microrganismos en un ensilage de buffel formidable. **Pastos y Forrajes**, La Habana, v. 11 n. 1, p.71-78, 1986.

LUTHER, R.M. Effect of microbial inoculation of whole plant corn silage on chemical characteristics, preservation and utilization by steers. **Journal of Animal Science**, v.63, n.5, p.1329-1336, 1986.

MACHADO, E.C. Fisiologia de produção de cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B. **Cana-de-açúcar:** cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 56-87.

MAHANNA, W. C. Silage fermentation and additive use in North America. In: NATIONAL SILAGE PRODUCTION CONFERENCE, Ithaca, 1993. **Proceedings**. Ithaca: NRAES: 1993. p. 85-95.

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

MAHANNA, B. **Troubleshooting silage problems**. Assessado em 20 de outubro de 1997. Disponível em http://www.pioneer.com/xweb.

MARI, L. J. **Desempenho de bovinos de corte alimentados com rações contend silagens de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) fresco ou ensilada e o padrão de fermentação e estabilidade aeróbia das silagens aditivadas**. Piracicaba, 2008. 315p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, 2008.

MARQUES, T. A. DA SILVA, W. H. Crescimento vegetativo e maturação em três cultivares de cana-de-açúcar. Revista de Biologia e Ciências da Terra, João Pessoa. V. 8, n.1, p.54-60, 2008.

McDONALD, P. **The biochemistry of silage**. New York: John Wiley, 1981. 207p.

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

MERTENS, D.R. Rate and extent of digestion. In: FORBES, J.M.; FRANCE, J. (Eds.) **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. Cambridge: CAB International, Cambridge University Press, 1993. p.13-51.

MORAIS, J.P.G. **Avaliação do efeito de inoculantes bacterianos sobre a qualidade de silagem e desempenho animal**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1989. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1995.

MORAN, J. P.; PULLAR, D.; OWEN, T. R. The development of a novel bacterial inoculant to reduce mould spoilage and improve the silage fermentation in big bale silage. In: O’KIELY, P.; O’CONNELL, M.; MURPHY, J. (Ed.) **Silage research. E em,** INTERNATIONAL CONFERENCE SILAGE RESEARCH, 10., 1993, Dublin, Ireland. **Proceedidngs...** Dublin, Ireland: Dublin City University, 1993. p. 85-86.

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

MUCK, R. E. 1989. Initial bacterial numbers on lucerne prior to ensiling. Grass Forage Sci. 44:19.

MUÑOS-MALDONADO, J. G. **Associação de aditivos químicos e microbianos no controle da fermentação e estabilidade aeróbia em silagens de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2007. 100p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo, 2007.

MURARO, G. **Impacto do espaçamento, número de cortes e da idade de corte na produção e composição bromatológica de cana-de-açúcar para silagem**. 2007. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

NOUT, M. J. R.; BOUWMEESTER, H. M.; HAAKSMA, J.; van DIJK, H. Fungal growth in silages of sugarbeet press pulp and maize. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 121, n. 3, p. 323-326, dec. 1993.

NUSSIO, L.G., PAZIANI, S. F., NUSSIO, C. M. B. Ensilagem de capins tropicais. In: Anais de Palestras – XXXIX Reunião Anual da SBZ, Recife-PE, 2002, *Anais...* Recife, p.60-99, 2002.

NUSSIO, L. G.; SCHMIDT, P.; PEDROSO, A. F. Silagem de cana-de-açúcar. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS: TEMAS EM EVIDÊNCIA – SUSTENTABILIDADE, 2003, Lavras. *Anais*...Lavras: Universidade Fedral de lavras, 2003. P. 49-74.

NUSSIO, L.G.; SCHMIDT, P. Tecnologia de produção e valor alimentício de silagens de cana-de-açúcar. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 2., 2004, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 2004. p.01-33.

NUSSIO, L.G.; CHMIDT, P. SCHOGOR, A.L.B.; MARI, L.J. Cana-de-açúcar como alimento para bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 3., 2006, Viçosa. **Anais...**Viçosa:UFV,DZO, 2006.p.277-328.

OLIVEIRA, R. A.; DAROS, E.; ZAMBON, J. L. C.; WEBER, H.; IDO, O. T.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; KOEHLER, H. S.; SILVA, D. K. T. Crescimento e desenvolvimento de três cultivares de cana-de-açúcar, em cana-planta, no estado do Paraná. **Scientia Agrária**, Curitiba, v. 5, n. 1/2, p. 87-94, 2004.

O'KIELY, P.; MOLONEY, A.; KEATING, T. et al. **Maximum output of beef within cost efficient, environmentally compatible forage conservation systems**. Dunsany: Grange Research Center, 1999. 64 p. (Beef Production Series 10).

OSTLING, C. and LINDGREN, S. (1995) Influence of Enterobacteria on the fermentation and aerobic stability of grass silage. *Grass Forage* Sci **50**, 41- 47.

OUDE ELFERINHK, S. J. W. H.; DRIEHUIS, F.; GOTTSCHAL, J. C.; SPOELSTRA, S. F. Silage making in tropics with emphasis on smallholders. In: ELETRONIC CONFERENCE ON TROPICAL SILAGE, 1999, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 1999. p. 17-30.

REYNOLDS, A.M.; WILLIAMS, A.G. A model of silage consolidation and effluent flow. **Journal Agricultural Enginnering Research**. V 61, p. 173-182, 1995.

RODRIGUES, A. A.; PRIMAVESI, O.; ESTEVES, S. N. Efeito de variedades de cana-de-açúcar sobre seu valor como alimento para bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n. 12, p. 1333-1338, 1997.

RODRIGUES, A.A.; CRUZ, G.M.C.; BATISTA, L.A.R. Qualidade de dezoito variedades de cana-de-açúcar como alimento para bovinos. In: REUNIÃO ANULA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., Piracicaba, 2001. **Anais**...Piracicaba:SBZ, 2001. P.1111-1112.

PAHLOW, G. Verbesserung der aeroben Stabilität von Silage durch Impfpräparate. **Das wirtschaftseigene Futter**, Frankfurt, v. 28, n. 2, p. 107-122, 1986.

PAHLOW, G., and B.Ruser. 1989. Influence of the harvesting procedure on the determination of epiphytic latic acid bacteria from forage crops. Page 975 *in* VDLUFA-Schriftenreihe 28, Kongressband 1988, Teil II. Bonn, Germany.

PAHLOW, G. 1991. Role of microflora in forage conservation. Page 26 ***in*** Forage Conservation Towards 2000. G. Pahlow and H. Honig, **ed. Inst. Grassl. Forage Res.**, Braunschweig, Germany.

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.

PATE, F. M.; COLEMAN, S.W. Evaluation of sugarcane varieties as cattle feed. Belle Glade, AREC, Res. Rep., EV-1975.

PEREIRA, J. R. A.; REIS, R. A. Produção e utilização de forragem pré-secada. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS. TEMAS EM EVIDÊNCIA, 2., 2001, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2001. p. 235-254.

PEREIRA, O. G., SANTOS, E. M. Microbiologia e processo de fermentação de silagens. In: **III Simpósio sobre manejo estratégico da pastagem**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. 1: 393-430, 2006.

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

PEDROSO, A. F.; NUSSIO, L. G.; PAZIANI, S. F. et al. Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. **Scientia Agricola**, v.62, n.5, p.427-432, 2005

PEREIRA, E.S.; QUEIROZ, A.C.; PAULINO, M.F.; CECON, P.R.; VALADARES FILHO, S.C.; MIRANDA, L.F.; ARRUDA, A.M.V; FERNANDES, A.M.; CABRAL, L.S. Fontes nitrogenadas e uso de *Sacharomyces cereviseae* em dietas à base de cana-de-açúcar para novilhos: consumo, digestibilidade, balanço nitrogenado e par6ametros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.30, n.2, p563-572, 2001

PHILLIP, L. E.; FELLNER, V. Effects of bacterial inoculation of high-moisture ear corn on its aerobic stability, digestion, and utilization for growth by beef steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 10. p. 3178-3187, Oct. 1992.

PISKUR, J.; LANGKJAER, R.B. Yeast genome sequency: the power of comparative genomics. **Molecular Microbiology**, Milão, v.53, p.381-389, 2004.

PRESTON, T.R. Sugar cane as the bases for intensive animal production in the tropics. In: CONFERENCE ON ANIMAL FEEDS OF TROPICAL AND SUBTROPICAL ORIGIN, 1975, London. **Proceedings…**London, 1975. P.69.

QUEIROZ, O. C. M. **Associação de aditivos microbianos na ensilagem e o desempenho de vacas em lactação recebendo sil;agem de cana-de-açúcar comparada a volumosos tradicionais**. 2006. 120p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

RAMESH, P. Effect of different levels of drought during the formative phase on growth parameters and its relationship with dry matter accumulation in sugarcane. **Journal of Agronomy and Crop Science,** Berlin, v. 185, p. 83-89, 2000.

RUSER, B. 1989. Erfassung und Identifizierung des epiphytischen **Michsaure-bakterienbesatzes** auf Gras und Mais in Abwgigkeit von Standort, Sorte, Entwicklungsstadium Sowieernte-und Klimaeinflussen. Ph.D. Diss., Inst. Grassl. Forage Res., Braunschweig, Germany.

ROCHA, K. D. 2003. **Silagens de capim-elefante cv. Cameroon, de milho e de sorgo produzidas com inoculantes ênzimo-bacterianos: populacões microbianas, consumo e digestibilidade**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa. 93p.

RODRIGUES, A.A.; PRIMAVESI, O.; ESTEVES, S.N. Efeito da qualidade de variedades de cana-de-açúcar sobre seu valor como alimento para bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.12, p.1333-1338, 1997.

RODRIGUES, A. A. Cana-de-açúcar como recurso forrageiro para a alimentação de bovinos na época da seca. In: SEMANA DO ESTUDANTE –ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS NA SECA, NOS SISTEMAS INTENSIVOS DE PRODUÇÃO, 14., 2000. **Anais...** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2000. p. 1-20.

RODRIGUES, A.A.; CRUZ, G.M.; BATISTA, L.A.R.; LANDELL, M.G.A. Qualidade de dezoito variedades de cana-de-açúcar como alimento para bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...**Piracicaba:SBZ, 2001. P.1111-1113.

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.

SAS INSTITUTE. SAS user's guide: Statistics. Cary, 1996. 983p.

SANAA, M.; POUTREL, B.; MENARD, J. L.; SERIEYS, F. Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 10, p. 2891-2898, Oct. 1993.

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

SANTOS, M. C.; QUEIROZ, O. C. M.; NUSSIO, L. G. Microbiologia de forragens conservadas e suas aplicações. **Simpósio sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas**, 3. Produção e Utilização de Forragens Conservadas/ Editores Clóves Cabreira Jobim, Ulysses Cecato, Marcos Weber do Carmo. – Maringá: Masson, 2008

SATTER, L.D.; MUCK, R.E.; WOODFORD, J.A. et al. Inoculant research: what has it shown us. In: FORAGE PRODUCTION AND USE SYMPOSIUM, 12., 1988, Wisconsin Dells. *Proceedings…* Wisconsin Dells: Wisconsin Forage Council, 1988. p.108-119.

SBRISSIA, A. F. **Morfogênese, dinâmica do perfilhamento e do acúmulo de forragem em pasto de capim marandu sob lotação contínua**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, SP. 171p. 2004.

SCHLECH, W. F. Pathogenesis and immunology of *Listeria monocytogenes*. **Pathologie Biologie,** Paris, v. 44, p. 775-782, 1996.

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

SCHMIDT, P. Aditivos químicos e biológicos no tratamento da cana-de-açúcar para alimentação de bovinos. **Simpósio sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas**, 3. Produção e Utilização de Forragens Conservadas/ Editores Clóves Cabreira Jobim, Ulysses Cecato, Marcos Weber do Carmo. – Maringá: Masson, 2008

SCHOGOR, A. L. B. **Avaliação agronômica da cana-de-açúcar submetida a métodos de colheita para produção animal,** 2008. 165p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba 2008.

SHOCKEY, W.L.; DEHORITY, B.A.; CONRAD, H.R. Effects of microbial inoculant on fermentation of alfalfa and corn. **Journal of Dairy Science**, v.68, n.11, p.3076-3080, 1985.

SILVA, S. C. A cana-de-açúcar como alimento volumoso suplementar. In: **Volumosos para bovinos**. Peixoto, A M. et al. (ed), FEALQ, 1993. p. 59-74.

SILVA, L.F.P. **Avaliação de características agronômicas e nutricionais de híbridos de milho para silagem**. 1997. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animnal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’ Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

SILVA, M.A.; OKAMOTO, F.; PORTO, A.J.; CAMPANA, M.P.; SILVA, D.N. Avaliação de genótipos de cana-de-açúcar visando alimentação animal no município de Gália (SP). **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 61, n. 2, p. 127-134, 2004.

SIQUEIRA, G. R.; REIS, R. A.; SHOCKEN-ITURRINO, R. P. et al. Perdas de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e bacterianos. **Revista Brasileria de Zootecnia**, Viçosa, v.36, n.6, p.2000-2009, 2007.

SCUDAMORE KA, LIVESEY T. 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. **J Sci Food Agric** 77:1–17.

SOUSA, D. P.; MATTOS, W.R.S.; NUSSIO, L.G.; MARI, L.J.; SANTOS, M.C.; ZOPOLLATTO, M.; SCHMIDT, P.; RIBEIRO, J.L. ; QUEIROZ, O.C.M.; JUNQUEIRA, M.C.; CAMARGO, M.S.; TOLEDO FILHO, S.G.; FIGUEIRÓ, R.N. Avaliação das perdas por efluentes e gases em silagens de cana-de-açúcar aditivadas com inoculantes químicos e bacterianos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia, **Anais…** Goiânia: UFG/SBZ, 2005. 1 CD ROM.

SOUSA, D.P. **Avaliação de aditivos químicos e microbianos como inibidores da síntese de etanol em silagens de cana-deaçúcar (*Saccharum officinarum* L.).** 2006. 146p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2006.

SPECKMAN, C. A.; PHILLIPS, R. M.; LINNERTZ, D. P.; BERGER, J. C. A.; CARVER, L. A.; PARKER, R. B. Lactobacillus population of the epiphytic flora of corn just prior to ensiling. **J. Anim. Sci**., v. 53, p. 432, 1981. Supplememt, 1.

SPOELSTRA, S. F. Nitrate in silage. A review. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 1-11, Mar. 1985.

SPOELSTRA, S. F. Degradation of nitrate by enterobacteria during silage fermentation of grass. **Netherlands Journal of Agriculture Science**, Wageningen, v. 35, n. 1, p. 43-54, 1987.

SPOELSTRA, S.F., COURTIN, M.G., VAN BEERS, J.A.C.1988. Acid acetic bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. J**. Agric. Sci**. 111: 127-132.

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

SUGUITANI, C. **Fenologia da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob efeito do fósforo.** 2001. 79 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** Sunderland: Sinauer Associates, 2006. 764 p.

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

THIAGO, R. D. T. **Avaliação nutricional da cana-de-açúcar submetida a métodos de colheita para produção animal,** 2009. 100p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba 2009.

TORRES, R. A. Conservação de forragem. **In: CURSO DE PECUÁRIA LEITEIRA**, 3., 1984, São Paulo. Companhia industrial e Comercial Brasileira de Produtos Alimentares/NESTLE.

TORRES, R. A..; COSTA, J. L. RESENDE, H. Utilização da mistura de cana-de-açúcar com uréia na alimentação de bovinos leiteiros. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.22, n.211, p. 69-76, 2001.

VAN SOEST, P.J; ROBERTSON, J.B;.LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v74, p 3583-3597, 1991.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd. Ed. Ithaca: Corneel University Press, 1994. 476p.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A.; DOMINGUEZ, L.; BLANCO, M.; ROCOURT, J.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F.; GUTIERREZ, C. B.; RASCON, R.I.; RODRIGUEZ-FERRI, E. F. Epidemiologic investigation of a silage-associated epizootic of ovine listeric encephalitis, using a new *Listeria*-selective enumeration medium and phage typing. **American Journal of Veterinary Research,** Sharimburg, v. 53, n. 3, p. 368-371, Mar. 1992.

VILELA, D. **Aditivos na ensilagem.** Coronel Pacheco, MG: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de gado de Leite, 1984. (EMBRAPA-CNPGL. Circular técnica, 21).

VILELLA, D. Aditivos para silagem. In:Aditivos para silagem de plantas de clima tropical. In.: REUNIAO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35. Botucatu, 1998. **Anais**. Botucatu: SBZ, 1998. p. 73-108.

ZACARIAS, C. A. B. **Estimação de parâmetros genéticos e fenotípicos em clones de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e suas implicações no melhoramento**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, SP. 82p. 1977.

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.

WEISS, N. The Genera *Pediococcus* and *Aerococcus*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W. ; SCHLEIFER, K. H. (Ed.) **The prokaryotes**. 2. ed. New York: Springer Verlag, 1992. p. 1502-1507.

WIEDMANN, M.; CZAJKA, J.; BSAT, N.; BODIS, M.; SMITH, M. C.; DIVERS, T. J.; BATT, C. A. Diagnosis and epidemiological association of *Listeria monocytogenes* strains in two outbreaks of listerial encephalitis in small ruminants. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 4, p. 991-996, Apr.1994.

WIGGENS, L.F.; WILLIANS, J.H. The constituents of sugarcane juice – Part 2: The qualitative examination of the amino-acids of cane juice. In: BRITSH WOLD INDUSTRY SUGAR TECHNOLOGY, 1951. London. **Proceedings…**London, 1951 p.40-49.

WILKINSON, J. M. Additives for ensiled temperate forage crops. In: Simpósio sobre Aditivos na Produção de Ruminantes e não ruminantes. (Ed) WECHSLER, F. S. ***Anais***... XXXV REUNIÀO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1998. P.53-72.

WHITTENBURRY, R. Microbiology of grass silage. **Process Biochemistry**, v. 3, p. 27-31, 1968.

WOOLFORD, M.K. 1975. Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. J. Sci. Food Agric. 26: 229-237.

WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation**. New York: Marcel Dekker, 1984. (Microbiological Series, 14).

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