







## Silagens mistas de cana-de-açúcar e amendoim forrageiro tratadas com *Lactobacillus buchneri*

*Mixed silages of sugarcane and forage peanut treated with Lactobacillus buchneri*

Douglas Rodrigues da Costa<sup>1</sup> , Karina Guimarães Ribeiro<sup>1\*</sup> , Gabriel Ferreira de Lima Cruz<sup>1</sup> , Thiago Carvalho da Silva<sup>2</sup> , Lucas Ladeira Cardoso<sup>1</sup> , Odilon Gomes Pereira<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará, Brasil

\*Correspondente: [karinaribeiro@ufv.br](mailto:karinaribeiro@ufv.br)

### Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar composição química, perfil fermentativo, população de microrganismos e recuperação de matéria seca (RMS) de silagem de cana-de-açúcar contendo níveis crescentes (0, 25, 50 e 75%, na base da matéria natural) de amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* cv. Belmonte), tratadas ou não com *Lactobacillus buchneri*. Usou-se o esquema fatorial 4×2, no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Verificou-se efeito de interação níveis de amendoim forrageiro e inoculante para teores de matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente neutro e ácido, ácidos orgânicos e etanol, população de bactérias lácticas e leveduras, perdas por gases e por efluente e RMS. Houve efeito de níveis de amendoim forrageiro no teor de hemicelulose, nitrogênio insolúvel em detergente ácido, pH e nitrogênio amoniacal. Verificou-se que o aumento de níveis de amendoim forrageiro incrementou teor de proteína e diminuiu teor de fibra, além de reduzir a produção de etanol e de efluente. Recomenda-se inclusão de 40% a 75% de amendoim forrageiro na ensilagem de cana-de-açúcar para melhorar a composição química e o perfil de fermentação. A inoculação com *L. buchneri* associada ao amendoim forrageiro aumenta a concentração de ácidos antifúngicos na silagem e decresce a população de leveduras e a produção de etanol.

**Palavras-chave:** Ácidos orgânicos; Composição química; Etanol; Microrganismos; Recuperação de matéria seca

### Abstract

There is evidence for the beneficial effects of forage peanut on the nutritive value and fermentation profile of silages; however, its effects on sugarcane silage have not been determined. The objective of the study was to evaluate the chemical composition, fermentation profile, microbial composition, and dry matter recovery (DMR) of sugarcane silage containing various amounts of forage peanut (*Arachis pintoi* cv. Belmonte) (0%, 25%, 50%, and 75% on a fresh matter basis), treated or untreated with *Lactobacillus buchneri*. A completely randomized 4 × 2 factorial design was used with three replications. The interaction between forage peanut levels and inoculant influenced the concentrations of dry matter, crude protein, neutral detergent fiber and acid detergent fiber, organic acids and ethanol, populations of lactic acid bacteria and yeast, gas and effluent losses, and DMR. Forage peanut levels had effects on dry matter, hemicellulose, acid detergent insoluble nitrogen, pH, and ammonia nitrogen. Increasing proportions of forage peanut increased the protein content and decreased the fiber content in the silage, while also reducing the production of ethanol and effluent. We recommend the inclusion of 40%–75% forage peanut in the sugarcane ensilage to improve the chemical composition and fermentation profile. Furthermore, inoculation with *L. buchneri* associated with forage peanut increases the concentration of antifungal acids in the silage and decreases the yeast population and ethanol production.

**Keywords:** Chemical composition; Dry matter recovery; Ethanol; Microorganisms; Organic acids

Recebido: 25 de março de 2022. Aceito: 1 de junho de 2022. Publicado: 18 de julho de 2022.



## Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é um recurso forrageiro tradicionalmente utilizado na alimentação de ruminantes. Para facilitar seu manejo nas propriedades e otimizar o uso da mão-de-obra, recomenda-se sua ensilagem. Entretanto, a presença natural de elevadas populações de leveduras e carboidratos solúveis em silagens de cana-de-açúcar resultam em intensa fermentação alcoólica e perdas de MS<sup>(1)</sup>.

Aditivos bacterianos podem atuar como auxiliares nos processos de fermentação da silagem de cana-de-açúcar. Em particular, *Lactobacillus buchneri* reduz a população de leveduras e aumenta a estabilidade aeróbia<sup>(1,2)</sup> via produção de ácido acético<sup>(3,4)</sup>. Como alternativa aos aditivos, misturas de leguminosas e gramíneas têm sido avaliadas no momento da ensilagem, com o objetivo de melhorar as características nutricionais e/ou fermentativas da silagem<sup>(5)</sup>. *Arachis pintoi* 'Belmonte' originou-se de um acesso sem sementeira coletado na região de Belmonte, Bahia, Brasil e foi a primeira cultivar de *A. pintoi* liberada para propagação vegetativa<sup>(6)</sup>. Recentemente, verificou-se que o amendoim forrageiro melhora o valor nutritivo e o perfil de fermentação de silagens de capim-braquiária<sup>(7)</sup>.

A cana-de-açúcar tem um processo de fermentação intensivo. A adição de amendoim forrageiro, cultura com menor teor de carboidratos solúveis e maior capacidade tamponante, tem potencial para reduzir a intensidade da fermentação, com diminuição mais lenta do pH do material ensilado, aumentando assim a produção de ácidos orgânicos com efeito antifúngico e minimizando a produção de etanol.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química, o perfil de fermentação, a população de microrganismos e a recuperação de matéria seca (RMS) da silagem de cana-de-açúcar com níveis crescentes de amendoim forrageiro (0%, 25%, 50% e 75%, com base na matéria natural), com e sem a inclusão de *L. buchneri*.

## Material e Métodos

O ensaio foi realizado em duas áreas (área 1 e área 2) no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. O amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* 'Belmonte') foi colhido no mesmo dia da cana-de-açúcar 'RB 76-5418'. Ambas as forrageiras estavam estabelecidas e receberam manejo adequado para cada espécie em áreas separadas.

O solo da área 1 com cana-de-açúcar foi classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo Eutrófico<sup>(8)</sup>. A cana-de-açúcar recebia adubação orgânica com esterco bovino seco, com dose desconhecida. O solo da área 2 com amendoim forrageiro foi classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico, de acordo com a taxonomia do solo<sup>(8)</sup>. O amendoim forrageiro foi

implantado aproximadamente 10 anos antes do estudo e foi eventualmente utilizado para a produção de silagens experimentais, com manejo de adubação desconhecido e sem pastejo. Foi realizado um esquema fatorial (4 × 2) com delineamento inteiramente casualizado e três repetições. Os tratamentos consistiram de cana-de-açúcar ensilada com quatro níveis de amendoim forrageiro (0%, 25%, 50% e 75%, base de matéria fresca), com ou sem adição do inoculante microbiano *L. buchneri* NCIMB 40788 (Silomax Cana, 2,5 × 10<sup>10</sup> UFC/g, Matsuda, Brasil).

A cana-de-açúcar foi colhida manualmente e o amendoim forrageiro foi colhido no início do florescimento com roçadeira de lâmina de aço (STIHL®), ambos a uma altura de 5 cm acima do nível do solo. Ambas as forragens foram colhidas no mesmo dia e trituradas em máquina ensiladora estacionária (JF 60, Maxxium, São Paulo, Brasil) ajustada para obter um tamanho médio de partícula de 1 a 2 cm. A forragem foi submetida ao tratamento com o inoculante. Para cada tonelada de material natural foram aplicados cinco gramas de inoculante e diluídos em 1 L de água para aplicação, seguindo as recomendações do fabricante, com um pulverizador costal com capacidade de 5 L. No material não inoculado, foi aplicada a mesma quantidade de água usada para diluir o inoculante.

A forragem foi ensilada em baldes plásticos com capacidade de 20 L, e a compactação foi realizada gerando uma densidade média de 695 kg/m<sup>3</sup>. Os topos dos baldes continham uma válvula de Bunsen para permitir o escape dos gases de fermentação. Um saco de algodão contendo 4 kg de areia foi colocado no fundo de cada balde para permitir a estimativa da perda por efluente. Após a ensilagem, os silos foram armazenados por 60 dias. Posteriormente, as perdas de gases e efluente e as perdas totais de matéria seca foram calculadas de acordo com Jobim et al.<sup>(9)</sup>

Os grupos microbianos foram enumerados a partir de 25 g de cada amostra, aos quais foram adicionados 225 mL de solução salina tamponada com fosfato para obter uma diluição de 10<sup>-1(10)</sup>. Diluições sucessivas foram realizadas objetivando-se variações de 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-7</sup> para detecção de bactérias do ácido láctico (LAB), 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-6</sup> para enterobactérias e 10<sup>-1</sup> e 10<sup>-5</sup> para fungos filamentosos + leveduras, em amostras de forragem antes da ensilagem. Para amostras de silagens, diluições de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-6</sup> foram preparadas para LAB e diluições de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-6</sup> foram obtidas para enterobactérias, fungos filamentosos e leveduras.

Os meios de cultura seletivos em placas de Petri foram o MRS agar® (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) para LAB, com incubação por 48 h a 37°C, e Violet Red Bile (VRBGA; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) para enterobactérias, incubados por 24 h a 37°C, ambos utilizando a técnica *pour plate*. Para fungos e leveduras, utilizou-se o sistema Petrifilm (3M Microbiology Products, St. Paul, MN, EUA) após incubação por três e cinco dias a

25°C respectivamente. Foram consideradas passíveis de contagem as placas com valores entre 30 e 300 unidades formadoras de colônias (UFC). Para determinar os valores de pH, foram coletados 25 g de silagem de cada silo e adicionados 100 mL de água destilada. Após repouso por 1 h, o pH foi determinado utilizando um potenciômetro (Tecnal, São Paulo, Brasil).

Para determinação do teor de ácidos orgânicos, preparou-se um extrato aquoso utilizando 20 g de material fresco, diluído em água deionizada (1:10) e homogeneizado por 30 s em liquidificador industrial. Após homogeneização, a mistura foi filtrada em quatro camadas de gaze. Uma alíquota de 20 mL deste material filtrado foi centrifugada a 25.000 g × por 25 min a -20°C<sup>(11)</sup> para quantificar os ácidos orgânicos de acordo com Siegfried et al.<sup>(12)</sup>. Os ácidos orgânicos utilizados para a curva de calibração padrão foram ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico e ácido láctico, todos na concentração inicial de 10 mmol/L, exceto o ácido acético, que teve concentração inicial de 20 mmol/L. As amostras foram analisadas em um cromatógrafo duplo Ultimate 3000 Dual Chromatograph (Dionex, Sunnyvale, CA, EUA) acoplado a um detector de índice de refração Shodex RI-101 (Showa Denko; Kawasaki, Kanagawa, Japão) a 45°C e equipado com um detector de troca iônica 300 × 7,8 mm Rezex ROA (Phenomenex; Torrance, CA, EUA) mantida a 45°C. A fase móvel utilizada era 4,2 mmol/L de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e 0,35 mmol/L de ácido etilendiaminotetracético isento de sódio, a uma taxa de fluxo de 0,7 mL/min.

Para determinar a composição química das silagens, foram coletadas aproximadamente 400 g de amostras de cada silo, pré-secas em estufa com ventilação forçada a 55°C até atingir peso constante e, em seguida, moídas em moinho de facas “Willey”, com peneira de 1 mm. As amostras foram submetidas à análise de MS<sup>(13)</sup> seguindo o método 930.15; a proteína bruta (PB) foi avaliada pela determinação do nitrogênio total pelo método de Kjeldahl<sup>(13)</sup> segundo o método 976.05; fibra em detergente neutro corrigida para proteína (FDNp)<sup>(14)</sup> e fibra em detergente ácido (FDA)<sup>(13)</sup> foram obtidas pelo método 973.18; e foi avaliado o nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA)<sup>(15)</sup>. Os carboidratos solúveis em água foram extraídos em etanol 80%, conforme metodologia descrita por Silva e Queiroz<sup>(16)</sup>, e o teor de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>, %NT) foi determinado de acordo com Bolsen et al.<sup>(17)</sup>

A Tabela 1 mostra a composição química e as populações microbianas em forragens contendo misturas de cana-de-açúcar e amendoim forrageiro, sem o inoculante microbiano, antes da ensilagem.

Os dados foram avaliados por análise de variância, sendo as médias dos fatores quantitativos submetidas a análises de regressão e as médias dos fatores qualitativos comparadas pelo teste F, a 5% de probabilidade de erro tipo I, utilizando o programa estatístico SAEG 9.1. Para os fatores quantitativos, os modelos foram escolhidos com

base na significância dos coeficientes de regressão, pelo teste-*t*, e nos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>), adotando-se um nível de probabilidade de 5%.

**Tabela 1.** Composição química (%MS) e populações microbianas (UFC/g) em misturas de cana-de-açúcar e amendoim forrageiro, antes da ensilagem

	Níveis de amendoim forrageiro (%)			
	0	25	50	75
MS	17,56	18,15	19,41	19,78
PB	4	10,89	14,41	17,05
FDNp	58,28	58,36	59,23	56,59
FDA	40,13	35,46	33,16	33,79
NIDA	17,4	18,49	16,09	17,03
CSA	23,11	19,86	9,12	8,51
pH	5,06	5,11	5,35	5,54
LAB	7,85	7,32	7,73	7,39
FUN+LEV	5,67	5,89	5,96	6,21
ENT	6,83	6,76	6,88	7,46

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDNp: fibra em detergente neutro corrigido para proteínas; FDA: fibra em detergente ácido; NIDA: nitrogênio insolúvel em detergente ácido; CSA: carboidratos solúveis em água; LAB: bactérias do ácido láctico; FUN+LEV: fungos filamentosos e leveduras; ENT: enterobactérias

## Resultados

Com relação à composição química das silagens, a interação entre a proporção de amendoim forrageiro e inoculante microbiano teve efeitos sobre os teores de MS, PB, FDNp e FDA. O nível de amendoim forrageiro influenciou os teores de HEM e NIDA (Tabela 2). Apesar do efeito da proporção de amendoim forrageiro, não foi obtida equação para descrever efetivamente o teor de MS, com média de 19,2%.

O teor de PB das silagens aumentou linearmente com a inclusão de amendoim forrageiro na cana ensilada, variando de 4,26% a 16,4% e de 3,90% a 16,1%, sem e com inoculante, respectivamente. Houve decréscimo linear no teor de FDNp de silagens de cana-de-açúcar com níveis crescentes de amendoim forrageiro, variando de 55,3% a 49% e de 56,9 a 45,9%, sem e com inoculante, respectivamente. A FDA na silagem não inoculada também apresentou redução linear com o aumento dos níveis de amendoim forrageiro. Na presença de inoculante, um modelo quadrático ajustou-se aos dados de FDA, com teor mínimo de FDA de 30,3% para 54,5% de amendoim forrageiro na silagem.

**Tabela 2.** Composição química (%MS) de misturas de silagem de cana-de-açúcar e amendoim forrageiro, sem (NI) e com (I) *L. buchneri*, e respectivas equações de regressão

Inoculante	Nível de amendoim forrageiro (%)				EPM	P-valor		
	0	25	50	75		P	I	P × I
	MS				0,17	0,16	0,02	<0,01
NI	18,71	19,44	17,91	19,34				
I	20,26	19,37	19,63	18,69				
	PB				0,95	<0,01	0,06	0,02
NI	3,71	8,95	12,73	15,96				
I	3,91	8,13	11,72	16,27				
	FDNp				0,81	<0,01	0,37	<0,01
NI	54,72	53,25	52,57	47,94				
I	56,78	54,69	47,11	47,11				
	HEM				0,55	<0,01	0,44	0,41
NI	17,28	19,61	18,12	15,71				
I	18,87	22,1	16,75	15,69				
	FDA				0,55	<0,01	<0,01	<0,01
NI	37,44	33,64	34,44	32,23				
I	37,91	32,59	30,36	31,41				
	NIDN				0,47	<0,01	0,44	0,81
NI	11,99	15,6	16,53	17,33				
I	13,1	16,72	16,45	17,17				
	Equação de Regressão							R2
	PB							
NI	Y=4,262+0,16201P							0,98
I	Y=3,90367+0,16259P							0,99
	FDNp							
NI	Y=55,27233-0,08411P							0,52
I	Y=56,914-0,14644P							0,98
	HEM							
	Y= 18,02							
	FDA							
NI	Y=36,66167-0,05933P							0,67
I	Y=37,9195-0,27822P+0,00255P <sup>2</sup>							0,94
	NIDA							
	Y=12,73067+0,14336P-0,00114P <sup>2</sup>							0,62

N-NH<sub>3</sub>: nitrogênio amoniacal; NT: nitrogênio total; MS: matéria seca; P = nível de amendoim forrageiro; I = inoculante microbiano; P × I = interação de nível de amendoim forrageiro e inoculante microbiano; EPM = erro padrão da média

Os teores de hemicelulose, embora afetados pelos níveis de amendoim forrageiro, não se ajustaram a nenhuma equação de regressão, com valor médio de 18,0%. O teor de NIDA apresentou comportamento quadrático em função do aumento dos níveis de amendoim forrageiro, com teor máximo de 17,2%, para 62,9% de amendoim forrageiro na mistura.

O pH e o teor de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub> %NT) foram influenciados pelos níveis de amendoim forrageiro. Houve efeito da interação entre nível de amendoim forrageiro e inoculante sobre as concentrações de ácidos láctico, acético, propiônico, butírico e etanol (Tabela 3).

Os valores de pH apresentaram comportamento quadrático, com valor mínimo de 3,41, com 13,1% de amendoim forrageiro na silagem. O teor de N-NH<sub>3</sub> %NT também apresentou comportamento quadrático, com valor mínimo de 4,10%, obtido com a adição de 40,3% de amendoim forrageiro. Os modelos de regressão não se ajustaram aos teores de ácido láctico, cuja média foi 9,37% sem inoculante. Com inoculante, houve aumento linear com o acréscimo dos níveis de amendoim forrageiro.

Os teores de ácido acético e propiônico na silagem não inoculada foram descritos por função quadrática, com valores mínimos de 5,98% de ácido acético, com 54,6% de amendoim forrageiro, e 0,57% de ácido propiônico, com 39,2% de amendoim forrageiro. Na presença do inoculante, o comportamento foi linear para ambos os ácidos, com teores variando de 4,32% a 8,02%, para ácido acético, e de 0,53% a 0,75%, para ácido propiônico, com níveis crescentes de amendoim forrageiro.

O teor de ácido butírico apresentou tendência linear na ausência do inoculante, variando de 0,03% a 0,06%. Com o uso do inoculante, o teor de ácido butírico apresentou efeito quadrático, com teor mínimo de 0,02% na silagem de cana-de-açúcar com 15,8% de amendoim forrageiro. O etanol diminuiu linearmente, independente do uso do inoculante, variando de 5,35% a 2,71% e de 5,22% a 2,35% para níveis de 0% e 75% de amendoim forrageiro na silagem, respectivamente. Houve efeito de interação do nível de amendoim forrageiro e do inoculante microbiano nas populações de BAL e leveduras (Tabela 4). Não houve efeito dos tratamentos sobre as populações de fungos filamentosos.

**Tabela 3.** Características de perfil fermentativo de misturas de silagens de cana-de-açúcar e amendoim forrageiro, sem (NI) e com (I) *L. buchneri*, e respectivas equações de regressão

Inoculante	Nível de amendoim forrageiro (%)				EPM	P-valor		
	0	25	50	75		P	I	P × I
	pH				0,07	<0,01	0,74	0,14
NI	3,41	3,46	3,68	4,23				
I	3,44	3,52	3,61	4,26				
	N-NH <sub>3</sub> (%NT)				0,46	<0,01	0,86	0,56
NI	9,75	4,22	4,67	7,48				
I	8,55	4,7	4,75	7,8				
	Ácido láctico (%MS)				0,45	<0,01	<0,01	<0,01
NI	8,16	13,38	8,02	7,95				
I	6,44	6,39	8,9	10,25				
	Ácido acético (%MS)				0,26	<0,01	<0,01	<0,01
NI	8,13	6,02	6,53	6,07				
I	3,89	6,05	7,12	7,64				
	Ácido butírico (%MS)				0	<0,01	<0,01	<0,01
NI	0,03	0,04	0,06	0,05				
I	0,02	0,02	0,02	0,03				
	Ácido propiônico (%MS)				0,01	0,02	0,58	<0,01
NI	0,65	0,53	0,63	0,6				
I	0,51	0,61	0,63	0,7				
	Etanol (%MS)				0,23	<0,01	0,01	<0,01
NI	5,85	3,65	3,73	2,91				
I	4,97	4,7	3,07	2,46				
Equação de Regressão								r <sup>2</sup>
pH								
Y = 3,44383 - 0,00568P + 0,000216P <sup>2</sup>								0,96
N-NH <sub>3</sub> (%NT)								
Y = 9,04033 - 0,24582P + 0,00305P <sup>2</sup>								0,79
Ácido láctico (%MS)								
NI	Y = 9,37							
I	Y = 5,905 + 0,05573P							0,87
Ácido acético (%MS)								
NI	Y = 7,95433 - 0,07249P + 0,000664P <sup>2</sup>							0,71
I	Y = 4,325 + 0,04927P							0,89
Ácido butírico (%MS)								
NI	Y = 0,03367 + 0,00034667P							0,6
I	Y = 0,02017 - 0,00012667P + 0,000004P <sup>2</sup>							0,72
Ácido propiônico (%MS)								
NI	Y = 0,6295 - 0,00282P + 0,000036P <sup>2</sup>							0,14
I	Y = 0,526 + 0,00231P							0,77
Etanol (%MS)								
NI	Y = 5,34833 - 0,035P							0,77
I	Y = 5,17667 - 0,03763P							0,92

N-NH<sub>3</sub>: nitrogênio amoniacal; NT: nitrogênio total; MS: matéria seca; P = nível de amendoim forrageiro; I = inoculante microbiano; P × I = interação de nível de amendoim forrageiro e inoculante microbiano; EPM = erro padrão da média.

**Tabela 4.** Populações de microrganismos de misturas de silagens de cana-de-açúcar e amendoim forrageiro, sem (NI) e com (I) *L. buchneri*, e respectivas equações de regressão

Inoculante	Nível de amendoim forrageiro (%)				EPM	P-valor		
	0	25	50	75		P	I	P × I
	LAB (log ufc/g)				0,11	<0,01	0,09	<0,01
NI	7,27	6,76	6,98	7,75				
I	7,23	7,56	6,02	7,48				
	LEV (log ufc/g)				0,15	<0,01	<0,01	<0,01
NI	3,95	3,31	3,25	3,3				
I	4,27	5,29	3,46	3,38				
	FUN (log ufc/g)				0,08	0,26	0,11	0,85
NI	2,3	2,75	2,15	2,5				
I	2,74	3	2,65	2,45				
Equação de Regressão								r <sup>2</sup>
LAB								
NI	Y = 7,16415 - 0,0296616P + 0,000518842P <sup>2</sup>							0,75
I	Y = 7,32722 - 0,0431144P + 0,000585634P <sup>2</sup>							0,75
LEV								
NI	Y = 3,95151 - 0,20393P <sup>1/2</sup> + 0,0148857P							0,99
I	Y = 4,32318 + 0,468372P <sup>1/2</sup> - 0,0706733P							0,72

LAB: populações de bactérias do ácido láctico; LEV: populações de leveduras; FUN: populações de fungos filamentosos; P = nível de amendoim forrageiro; I = inoculante microbiano; P × I = interação de nível de amendoim forrageiro e inoculante microbiano; EPM = erro padrão da média.



Um modelo quadrático ajustou-se ao crescimento de BAL, obtendo população mínima de 6,7 UFC/g, com 28,6% de amendoim forrageiro, sem inoculante microbiano, e 6,5 UFC/g com 36,8% de amendoim forrageiro, com inoculante. Um modelo de raiz quadrática ajustou-se ao crescimento populacional de leveduras, com populações variando de 3,95 a 3,30 UFC/g e de 4,32 a 3,01 UFC/g, para silagem de cana-de-

açúcar com 0% a 75% de amendoim forrageiro, sem e com inoculante microbiano, respectivamente. As populações de fungos filamentosos não foram afetadas pelos tratamentos, com valor médio de 2,56 UFC/g. Detectamos efeitos da interação entre o nível de amendoim forrageiro e o inoculante nas perdas por gases e efluente e RMS (Tabela 5).

**Tabela 5.** Perdas por gases e efluentes e recuperação de matéria seca de misturas de silagens de cana-de-açúcar e amendoim forrageiro, sem (NI) e com (I) *L. buchneri*, e respectivas equações de regressão

Inoculante	Nível de amendoim forrageiro (%)				EPM	P-valor		
	0	25	50	75		P	I	P × I
	Perdas por efluentes (kg/t MN)				7,49	<0,01	0,02	<0,01
NI	85,13	92,34	32,47	12,92				
I	101,77	64,81	15,79	13,25				
	Perdas por gases (%)				0,72	<0,01	<0,01	<0,01
NI	8,99	3,11	2,87	3,64				
I	12,35	6,11	3,03	3,79				
	Recuperação de MS (%)				1,12	0,03	<0,01	<0,01
NI	95,73	97,73	88,78	95,82				
I	82,65	88,1	94,93	92,93				
	Equação de Regressão						r <sup>2</sup>	
	Perdas por efluentes							
NI	Y= 97,19067-1,10597P						0,83	
I	Y= 96,09033-1,25832P						0,88	
	Perda por gases							
NI	Y= 8,79483-0,25679P+0,00254P <sup>2</sup>						0,83	
I	Y= 12,38783-0,32535P+0,0028P <sup>2</sup>						0,98	
	Recuperação de MS							
NI	Y= 95,01							
I	Y= 83,79152+0,16308P						0,72	

MN: matéria natural; MS: matéria seca; P = nível de amendoim forrageiro; I = inoculante microbiano; P × I = interação de nível de amendoim forrageiro e inoculante microbiano; EPM = erro padrão da média.

A produção de efluente diminuiu linearmente com o aumento dos níveis de amendoim forrageiro, de 97,2 para 14,2 kg/t MN e 96,1 para 1,72 kg/t MN, sem e com inoculante, respectivamente. As perdas por gases, sem e com *L. buchneri*, apresentaram comportamento quadrático. Sem inoculante, o valor mínimo foi de 2,30%, para 50,5% de amendoim forrageiro na silagem; com o uso de inoculante, o valor mínimo foi de 2,94%, para 58,1% de amendoim forrageiro. As equações de regressão não foram adequadamente ajustadas aos valores de RMS obtidos sem o inoculante microbiano. Com o inoculante, os valores de RMS apresentaram tendência linear, variando de 83,8% a 96,0%, com 0% a 75% de amendoim forrageiro na silagem de cana-de-açúcar, respectivamente.

## Discussão

Os baixos teores de MS obtidos nas silagens foram

relacionados aos baixos teores de MS obtidos para cana-de-açúcar e amendoim forrageiro antes da ensilagem (Tabela 1). A relação linear entre o nível de amendoim forrageiro e o teor de PB pode ser explicada pelo alto teor desse nutriente na leguminosa, como observado por Gomes et al.<sup>(18)</sup> Assim, o teor de proteína da silagem de cana-de-açúcar pode ser melhorado pela adição de amendoim forrageiro, com aumento de até 4,12 vezes para um teor de leguminosa de 75%, o que é nutricionalmente favorável para ruminantes. Gomes et al.<sup>(18)</sup> observaram aumento do teor de PB em até 2,4 vezes ao ensilar *Urochloa brizantha* 'Marandu' com amendoim forrageiro compondo 75% da matéria natural.

À medida que os teores de amendoim forrageiro na silagem aumentaram, também foram verificadas reduções nos teores de FDNp e FDA na MS das silagens (Tabela 2). Quando a fermentação indesejável é frequente, como a fermentação alcoólica em cana-de-açúcar, o teor de fibras aumenta na MS da silagem à medida que os carboidratos

solúveis diminuem<sup>(1)</sup>, resultando em perdas por efluente<sup>(21)</sup>. Além disso, a alta proporção de FDN indigestível na cana-de-açúcar dificulta a solubilização da parede celular durante a fermentação no silo e no rúmen<sup>(19)</sup>. Portanto, silagens com menores teores de FDN podem proporcionar maior digestibilidade da fibra e, conseqüentemente, reduzir o efeito limitante no consumo de MS.

O valor de pH obtido para silagem de cana-de-açúcar exclusiva (3,44) (Tabela 3) foi semelhante aos valores relatados por Cardoso et al.<sup>(20)</sup> e Jesus et al.<sup>(21)</sup> de 3,41 e 3,39, respectivamente, e indicou uma boa qualidade de fermentação das silagens, principalmente devido aos teores relativamente baixos de ácidos butírico, acético e propiônico nas silagens inoculadas. As silagens de cana-de-açúcar com adição de leguminosas geralmente apresentam valores de pH mais elevados, como observado por Pereira et al.<sup>(22)</sup> em análises de silagens mistas de cana-de-açúcar e guandu, que também foram ajustados por equação quadrática.

As leguminosas têm maior capacidade tamponante devido à presença de cátions ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ ) que são neutralizados quando entram em contato com ácidos orgânicos, evitando uma redução acentuada do pH durante o processo de fermentação<sup>(23)</sup>, o que poderia explicar os maiores valores de pH na silagem com maior proporção de amendoim forrageiro, característica de silagens de espécies forrageiras da família *Poaceae*. Geralmente, as silagens inoculadas com algumas cepas de *L. buchneri* apresentam valores de pH levemente elevados devido à degradação do ácido láctico em ácido acético<sup>(24,25)</sup>. No entanto, em nosso estudo, o pH não foi afetado pelo inoculante.

Todos os valores médios de  $N-NH_3$ , independentemente do uso de inoculante e adição de amendoim forrageiro, permaneceram abaixo do limite de 10% recomendado por Kung Jr. et al.<sup>(26)</sup> para silagem de boa qualidade, indicando baixa atividade das bactérias clostrídios, o que resulta em proteólise e produção de ácido butírico. Como resultado, as concentrações de ácido butírico também foram mínimas (Tabela 3). A atividade clostridial é um dos principais indicadores de fermentação indesejável, causando perdas de MS e energia, além de afetar o consumo de silagem pelos animais<sup>(27)</sup>. Outros microrganismos, como leveduras e bacilos, também podem produzir pequenas quantidades de ácido butírico<sup>(28)</sup>.

A concentração de etanol foi negativamente relacionada aos teores de ácido acético e propiônico (Tabela 3) nas silagens inoculadas. Este resultado é interessante e fornece evidências do efeito interativo de *L. buchneri* e amendoim forrageiro na silagem de cana-de-açúcar ao aumentar a produção de ácido acético, considerando que em silagens de cana-de-açúcar a população de bactérias produtoras de ácido acético tende

a ser mínima devido à competição de substrato com leveduras<sup>(21)</sup>.

Devido à capacidade tamponante da leguminosa, houve aumento de espécies heterofermentativas, sustentado pelo efeito positivo do inoculante nas concentrações de ácido acético e propiônico, que possuem propriedades antifúngicas e inibem o crescimento de leveduras, segundo Danner et al.<sup>(29)</sup>, conseqüentemente, diminuindo a produção de etanol. Com a redução da atividade das leveduras, o ácido láctico também apresentou aumento linear devido à diminuição do seu uso para fermentação alcoólica, de acordo com Pahlow et al.<sup>(30)</sup>

Algumas cepas de *L. buchneri* não têm a capacidade de reduzir o acetil fosfato a etanol, possivelmente devido à falta da acetaldéido desidrogenase, aumentando assim a concentração de ácido acético como produto final da fermentação<sup>(31)</sup>. Embora *L. buchneri* não produza ácido propiônico, na conversão de ácido láctico em ácido acético também é formado 1,2-propanodiol, que pode ser um precursor para a conversão em ácido propiônico e 1-propanol pelo microrganismo epifítico *L. diolivorans*<sup>(32)</sup>, explicando porque silagens tratadas com *L. buchneri* podem apresentar aumento do teor de ácido propiônico na silagem<sup>(33)</sup>.

O efeito fungicida do ácido acético e propiônico é devido à sua lipofilicidade. Em um ambiente ácido, esses ácidos podem permear a membrana da célula da levedura; dentro da célula, em pH neutro, ocorre a dissociação e liberação de prótons e contra-íons, acidificando o meio intracelular e afetando a homeostase do pH, a organização lipídica e a função da membrana celular, o que pode levar à morte desses microrganismos<sup>(29, 34)</sup>.

Segundo Kung Jr. et al.<sup>(26)</sup>, em silagem de boa qualidade, as concentrações de ácido láctico devem ser de 60-80 g/kg MS, ácido acético de até 30 g/kg MS, ácido propiônico de até 5 g/kg MS, e as concentrações de ácido butírico devem ser inferiores a 5 g/kg MS. Embora os valores médios de ácido butírico no presente estudo estivessem dentro da faixa adequada, valores acima da faixa recomendada foram obtidos para os ácidos acético, láctico e propiônico (Tabela 3). Isso pode ser devido às altas concentrações de carboidratos solúveis nessas silagens, resultando em alta produção de compostos orgânicos durante a fermentação (principalmente ácido láctico, ácido acético e etanol), que pode corresponder a até 22% da MS das silagens de cana-de-açúcar, segundo Daniel et al.<sup>(35)</sup> Isso difere de outras silagens adotadas na alimentação animal, como a silagem de milho, que geralmente é utilizada como parâmetro para os valores médios de ácidos produzidos.

Um teor de ácido acético acima de 2% na MS é desejável para silagens com alto teor de carboidratos solúveis, como por exemplo a cana-de-açúcar, pois causa

menor atividade das leveduras. Isso se soma à baixa quantidade total de CO<sub>2</sub> liberada como subproduto da formação do ácido acético em relação à quantidade liberada durante a fermentação alcoólica<sup>(1)</sup>, reduzindo as perdas por gases e melhorando a estabilidade aeróbia após a abertura dos silos.

A adição de amendoim forrageiro atua como uma alternativa para reduzir a atividade das leveduras durante o processo de fermentação na silagem de cana-de-açúcar (Tabela 4), pois os microrganismos são um dos principais problemas na ensilagem dessa cultura<sup>(20)</sup>. Em todas as silagens deste estudo não foram detectadas enterobactérias, o que pode ser explicado pela acidez do meio. Os silos foram abertos 60 dias após a ensilagem. Segundo Luis e Ramirez<sup>(36)</sup>, essas bactérias normalmente se multiplicam até aproximadamente o sétimo dia de fermentação, quando são substituídas por grupos lácticos, que são mais resistentes às reduções de pH.

O teor de MS, o tipo de fermentação e a densidade da silagem (compactação) influenciam na produção de efluente<sup>(21)</sup>. Como a densidade (695 kg/m<sup>3</sup>) foi semelhante entre todos os tratamentos e o teor de MS apresentou pouca variação no momento da ensilagem ( $\pm 2\%$ ), acredita-se que a variação nas perdas por efluente se deva à variação nos microrganismos fermentativos, principalmente as leveduras<sup>(37)</sup>.

Segundo Kung Jr. et al.<sup>(38)</sup>, a massa ensilada deve conter um teor de MS de 30% a 35% para garantir perdas mínimas por efluente e manter o valor nutritivo da silagem, por meio da inibição de microrganismos indesejáveis, como clostrídios. Apesar dos teores de MS de todas as silagens do presente estudo estarem abaixo dessa faixa, a adição de amendoim forrageiro foi suficiente para reduzir as perdas por efluente, reduzindo a lixiviação do material (Tabela 5). As silagens do presente estudo apresentaram menor perda (Tabela 5) do que as silagens de cana-de-açúcar relatadas em outros estudos, embora o teor de MS no momento da ensilagem fosse maior<sup>(39,40)</sup>. Portanto, as perdas podem ser consideradas razoáveis para silagens mistas de cana-de-açúcar e amendoim forrageiro.

As perdas por gases estão diretamente relacionadas à atividade de microrganismos heterofermentativos na massa ensilada, principalmente leveduras, onde convertem carboidratos solúveis e ácido láctico em ácido acético, etanol, CO<sub>2</sub> e calor<sup>(20,41)</sup>. Os resultados para as perdas por gases no presente estudo podem ser explicados pelos efeitos sobre a população de leveduras e a redução na produção de etanol, resultando na redução da produção de gases com adição de até 58% de amendoim forrageiro na silagem de cana-de-açúcar. Ren et al.<sup>(42)</sup> demonstraram que a redução das perdas por gases e maior RMS indicam que as fermentações secundárias indesejáveis não foram tão frequentes durante a fermentação, o que é positivo do ponto de vista

nutricional, resultando em uma conservação mais adequada do material.

Em alguns estudos, não foram observados efeitos da inoculação com *L. buchneri* nas perdas e RMS de silagens de cana-de-açúcar<sup>(20,39)</sup>, enquanto outros estudos corroboram a eficácia de *L. buchneri*<sup>(1,40)</sup>. Esses resultados conflitantes podem ser atribuídos a diferenças entre as linhagens, incluindo diferenças no metabolismo e na capacidade de sobrevivência no ambiente de silagem, mesmo para linhagens da mesma espécie<sup>(43)</sup>. Portanto, esses resultados indicam que o amendoim forrageiro pode ser incluído em silagens de cana-de-açúcar para reduzir a produção de etanol e as perdas por gases e efluente, com conseqüente aumento da RMS. Isso proporciona uma estratégia complementar para gerar efeitos associativos com a ação do inoculante heterofermentativo, além de melhorar a RMS da silagem.

## Conclusões

A inclusão de 40% a 75% de amendoim forrageiro na ensilagem de cana-de-açúcar melhora a composição química e o perfil de fermentação. A inoculação com *L. buchneri* associada ao amendoim forrageiro aumenta as concentrações de ácidos antifúngicos na silagem e diminui a população de leveduras e a produção de etanol. Mais estudos, principalmente aqueles focados em dietas animais, melhorariam nossa compreensão dos efeitos benéficos dessa estratégia.

## Conflitos de Interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

## Contribuições do Autor

*Conceituação*: K. G. Ribeiro, T. C. da Silva e O. G. Pereira; *Curadoria de dados*: D. R. da Costa; *Análise formal*: T. C. da Silva; *Investigação*: D. R. da Costa e L. L. Cardoso; *Metodologia*: K. G. Ribeiro e T. C. da Silva; *Administração do Projeto*: K. G. Ribeiro; *Supervisão*: K. G. Ribeiro e O. G. Pereira; *Validação*: K. G. Ribeiro; *Visualização*: D. R. da Costa e K. G. Ribeiro; *Redação (rascunho original)*: D. R. da Costa; *Redação (revisão & edição)*: K. G. Ribeiro e G. F. de L. Cruz.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao INCT-CA/CNPq (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia-Ciência Animal/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor. A pesquisa foi financiada pelo INCT-CA/CNPq. K. Ribeiro e O. Pereira são bolsistas de pesquisa do CNPq.

## Referências

1. Gomes ALM, Bueno AVI, Osmari MP, Machado J, Nussio LG, Jobim CC, et al. Effects of Obligate Heterofermentative Lactic Acid Bacteria Alone or in Combination on the



- Conservation of Sugarcane Silage. *Front Microbiol* [Internet]. 2021;12. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.643879>
2. Ávila CLS, Carvalho BF, Pinto JC, Duarte WF, Schwan RF. The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. *J Dairy Sci* [Internet]. 2014;97(2):940–51. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030213008485>
  3. Oude Elferink S, Krooneman J, Gottschal J, Spoelstra SF, Faber F, Driehuis F. Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1,2-Propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Feb 1;67:125–32.
  4. Muck RE, Nadeau EMG, McAllister TA, Contreras-Govea FE, Santos MC, Kung L. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *J Dairy Sci* [Internet]. 2018;101(5):3980–4000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030218303229>
  5. da Silva JS, Ribeiro KG, Pereira OG, Mantovani HC, Cecon PR, Pereira RC, et al. Nutritive value and fermentation quality of palisadegrass and stylo mixed silages. *Anim Sci J*. 2018 Jan;89(1):72–8.
  6. Paganella M, Valls J. Caracterização morfológica de cultivares e acessos selecionados de *Arachis pintoi*. *Pasturas Trop*. 2002;24:22–9.
  7. Gomes FM, Ribeiro KG, De Souza IA, De Lima Silva J, Agarussi MCN, Da Silva VP, et al. Chemical composition, fermentation profile, microbial population and dry matter recovery of silages from mixtures of palisade grass and forage peanut. *Trop Grasslands-Forrajões Trop*. 2021;9(1):34–42.
  8. Santos HG, Jacomine PKT, Anjos LHC, Oliveira VA, Lumberreras JF, Coelho MR, et al. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Brasília: Embrapa; 2018.
  9. Jobim C, Nussio L, Reis R, Schmidt P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. *Rev Bras Zootec J Anim Sci - REV BRAS ZOOTECA*. 2007 Jul 1;36.
  10. Kung Jr L. Preparation of silage water extracts for chemical analysis: Standard operating procedure-001 6.03.96. Delaware; 1996.
  11. Filya I, Muck RE, Contreras-Govea FE. Inoculant Effects on Alfalfa Silage: Fermentation Products and Nutritive Value. *J Dairy Sci* [Internet]. 2007;90(11):5108–14. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203020771980X>
  12. Siegfried V, Ruckermann H, Stumpf G, Siegfried B, Ruckemann H, Siegfried R, et al. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. *Landwirtsch Forsch*. [Internet]. 1984;37(3-4):298-304. Disponível em: <https://www.scienceopen.com/document?vid=12545918-f45c-4b26-ad06-72577b416f09>
  13. AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg, Maryland: AOAC International; 2005.
  14. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J Dairy Sci* [Internet]. 1991 Oct 1;74(10):3583–97. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
  15. Licitra G, Hernandez TM, Van Soest PJ. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* [Internet]. 1996;57(4):347–58. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0377840195008373>
  16. Silva DJ, Queiroz AC. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. 3th ed. Viçosa: UFV; 2002. 235 p.
  17. Bolsen KK, Lin C, Brent BE, Feyerherm AM, Urban JE, Aimutis WR. Effect of Silage Additives on the Microbial Succession and Fermentation Process of Alfalfa and Corn Silages. *J Dairy Sci*. 1992;75(11):3066–83.
  18. Gomes F, Ribeiro K, de Souza IA, Silva J, Agarussi M, Silva V, et al. Chemical composition, fermentation profile, microbial population and dry matter recovery of silages from mixtures of palisade grass and forage peanut. *Trop Grasslands-Forrajões Trop*. 2021 Jan 30;9:34–42.
  19. Daniel J, Jacovaci F, Junges D, Santos M, Lima J, Anjos I, et al. Fibre digestibility and its relationships with chemical and morphological traits in thirty-two sugarcane varieties. *Grass Forage Sci*. 2016;72.
  20. Cardoso LL, Ribeiro KG, Marcondes MI, Pereira OG, Weiß K. Chemical composition and production of ethanol and other volatile organic compounds in sugarcane silage treated with chemical and microbial additives. *Anim Prod Sci* [Internet]. 2019;59(4):721–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/AN16204>
  21. Jesus DLS, Rigueira JPS, Monção FP, Alves WS, Moura MMA, Sales ECJ, et al. Nutritive value of sugarcane silages added with increasing levels of acetic acid. *Semin Agrar*. 2019;40(5):2387–96.
  22. Pereira DS, Lana R de P, Carmo DL do, Costa YKS da. Chemical composition and fermentative losses of mixed sugarcane and pigeon pea silage. *Acta Sci Anim Sci* [Internet]. 2019;41(1):e43709. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/article/view/43709>
  23. Pirhofer-Walzl K, Søgaard K, Jensen HH, Eriksen J, Sanderson MA, Rasmussen J, et al. Forage herbs improve mineral composition of grassland herbage. *Grass Forage Sci*. 2011;66(3):415–23.
  24. Driehuis F, Elferink SJ, Spoelstra SF. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *J Appl Microbiol*. 1999 Oct;87(4):583–94.
  25. Kung Jr L, Stokes MR, Lin CJ. Silage Additives, In Silage Science and Technology. *Am Soc Agron*. 2003 Jan 1;305–60.
  26. Kung Jr L, Shaver RD, Grant RJ, Schmidt RJ. Silage review : Interpretation of chemical , microbial , and organoleptic components of silages 1. *J Dairy Sci* [Internet]. 2018;101(5):4020–33. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
  27. Borreani G, Tabacco E, Schmidt RJ, Holmes BJ, Muck RE. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *J Dairy Sci* [Internet]. 2018;101(5):3952–79. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030218303205>
  28. McDonald P, Henderson N, Heron S. The biochemistry of silage [Internet]. Marlow, England: Chalcombe; 1991. p. 340. Disponível em: <http://books.google.com/books?id=oUcjAQAAMAAJ>
  29. Danner H, Holzer M, Mayrhuber E, Braun R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2003 Jan;69(1):562–7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12514042>

30. Pahlow G, Muck R, Driehuis F, Oude Elferink S, Spoelstra SF. Microbiology of Ensiling. In: Silage Science and Technology. 2003. p. 31-93.
31. Axelsson L. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: Salminen S, Von Wright A, editors. Lactic acid bacteria. New York: Marcel Dekker; 2004. p. 1-63.
32. Krooneman J, Faber F, Alderkamp AC, Elferink SJHWO, Driehuis F, Cleenwerck I, et al. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002 Mar;52(Pt 2):639-46.
33. Hafner SD, Howard C, Muck RE, Franco RB, Montes F, Green PG, et al. Emission of volatile organic compounds from silage: Compounds, sources, and implications. *Atmos Environ* [Internet]. 2013;77:827-39. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1352231013003403>
34. Xu X, Williams TC, Divne C, Pretorius IS, Paulsen IT. Evolutionary engineering in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a TRK1-dependent potassium influx mechanism for propionic acid tolerance. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2019;12(1):97. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1427-6>
35. Daniel JLP, Weiß K, Custódio L, Neto AS, Santos MC, Zopollatto M, et al. Occurrence of volatile organic compounds in sugarcane silages. Vol. v. 185, *Animal feed science and technology*. Elsevier B.V.; 2013.
36. Luis L, M. Ramirez. Evolución de la flora microbiana em ensilaje de king grass. *Pastos y Forrajes*. 1988;11:249-53.
37. Schmidt RJ, Kung LJ. The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silages made at different locations. *J Dairy Sci*. 2010 Apr;93(4):1616-24.
38. Kung Jr L, Shaver RD, Grant RJ, Schmidt RJ. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J Dairy Sci* [Internet]. 2018;101(5):4020-33. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030218303242>
39. Moraes RL, Ribeiro KG, Pereira OG, Marcondes MI, Cardoso LL. Silagem de cana-de-açúcar tratada com inoculantes microbianos e suas misturas. *Rev Bras Agropecuária Sustentável* [Internet]. 2017 Oct 24;7(3):76-83. Disponível em: <https://periodicos.ufv.br/rbas/article/view/2943>
40. Silva L, Pereira O, Silva T, Leandro E, Paula R, Santos S, et al. Effects of *Lactobacillus buchneri* isolated from tropical maize silage on fermentation and aerobic stability of maize and sugarcane silages. *Grass Forage Sci*. 2018 Apr 23;73.
41. Muck RE. Silage microbiology and its control through additives. *Rev Bras Zootec*. 2010;39:183-91.
42. Ren H, Wang C, Fan W, Zhang B, Li Z, Li D. Effects of formic or acetic acid on the storage quality of mixed air-dried corn stover and cabbage waste, and microbial community analysis. *Food Tech. and Biotech*. 2018; 56:71-82.
43. Santos AO, Ávila CLS, Pinto JC, Carvalho BF, Dias DR, Schwan RF. Fermentative profile and bacterial diversity of corn silages inoculated with new tropical lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol*. 2016 Feb;120(2):266-79.