**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Efeitos de *L. buchneri* e 1-propanol no valor nutritivo de silagens de milho
para vacas leiteiras**

Janielen da Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2014**

Janielen da Silva
Médica Veterinária

**Efeitos de *L. buchneri* e 1-propanol no valor nutritivo de silagens de milho para vacas
leiteiras**

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ GUSTAVO NUSSIO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Silva, Janielen da
Efeitos de *L. buchneri* e 1-propanol no valor nutritivo de silagens de milho para vacas
leiteiras / Janielen da Silva. - - Piracicaba, 2014.
89 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Ácido acético 2. Álcoóis 3. Consumo 4. Estabilidade aeróbia 5. Heterofermentativo
6. Inoculante 7. Produção de leite I. Título

CDD 636.214
S586e

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

Aos meus pais, Teresinha e José, pelo amor incondicional, por sempre estarem ao meu lado e por me ensinarem valores que levarei para sempre em minha vida. Esta vitória é também de vocês! Amo muito vocês!

A minha irmã Joseane por ser minha confidente e conselheira e por sempre me apoiar. Mana, você é mais que minha irmã, você é minha segunda mãe. Te amo muito!

A minha afilhada Giovana, por ser luz e força para minha vida. A madrinha te ama muito!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por estar sempre guiando meus passos e me protegendo, por me abençoar com uma família maravilhosa que me deu forças para superar os obstáculos e seguir em frente.

Ao Prof. Dr. Luiz Gustavo Nussio pelo apoio, orientação e confiança em meu trabalho.

Ao Dr. João Luiz Pratti Daniel, pela paciência e por compartilhar seus ensinamentos comigo. Seu apoio científico foi muito importante na construção do meu trabalho. Muito obrigada.

Ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens, pelo suporte ao meu trabalho e crescimento profissional.

A FAPESP pelo apoio financeiro concedido.

Aos professores, funcionários e colegas do departamento de Zootecnia da Esalq/USP.

Aos meus pais, José e Teresinha, a minha irmã Joseane, ao meu cunhado Daniel e a minha afilhada Giovana, por sempre estarem ao meu lado e por me darem forças para seguir em frente. Eu amo vocês!

Ao meu namorado, Almir Junior Bottani, pelo amor e carinho, por não medir esforços para me proteger e para me fazer feliz. Nos momentos em que mais precisei você esteve do meu lado e serei sempre grata por isso. Obrigada por ter sido paciente com minhas faltas de paciência e com meus desabafos, obrigada pelo ombro para que eu pudesse chorar, e pelas conversas e conselhos. Amor, sem você a minha batalha seria mais dura, você deu forças para que eu pudesse me reerguer a cada tombo, você faz parte de minha conquista. Eu amo você!

Aos colegas do grupo de Qualidade e Conservação de Forragens: Paula, Max, João Pedro, Janaina, Evandro, Cristiano, Greici, Juliana, Daniel, Pedro, pelas conversas, convivência e ajuda na elaboração de meu trabalho.

João Pedro, por além de ser meu colega, ser meu grande amigo durante o mestrado. Pela paciência, conversas, ajuda e conselhos. Sem sua ajuda tudo seria mais difícil. Você foi meu braço direito na condução de meu experimento. Devo isso a você! Obrigada!

A família do meu namorado, por ter me acolhido e ter sido minha família aqui em Piracicaba.

Aos estagiários que me ajudaram na condução de meu trabalho de mestrado.

A todos meu Muito Obrigada!

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Processo de deterioração e estabilidade aeróbia.....	23
2.2 Aditivos microbianos.....	27
2.3 Efeitos de <i>L.buchneri</i> na fermentação e estabilidade aeróbia.....	28
2.4 Efeitos de <i>L.buchneri</i> no metabolismo e desempenho animal.....	35
2.5 Efeitos de 1-propanol no metabolismo e desempenho animal.....	39
3 OBJETIVOS E HIPÓTESE.....	43
3.1 Objetivo geral.....	43
3.1.1 Objetivos específicos.....	43
3.2 Hipótese.....	43
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 Ensilagem e tratamentos.....	45
4.2 Avaliação dos silos.....	46
4.3 Ensaio de lactação.....	48
4.4 Análises estatísticas.....	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 Caracterização da silagem.....	53
5.2 Perda de compostos voláteis das rações experimentais.....	60
5.3 Desempenho dos animais.....	63
6 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	77

RESUMO

Efeitos de *L. buchneri* e 1-propanol no valor nutritivo de silagens de milho para vacas leiteiras

Lactobacillus buchneri é um microrganismo heterolático capaz de produzir quantidades significativas de ácido acético, que tem ação anti-fúngica e melhora a estabilidade aeróbia de silagens. Além de ácido acético, silagens inoculadas com *L. buchneri* tipicamente apresentam maiores teores de 1-propanol. Acredita-se que este álcool estaria associado à depressão de consumo de matéria seca (CMS). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de silagens de milho com *L. buchneri* e da suplementação com 1-propanol no desempenho de vacas leiteiras. O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP). A cultura do milho foi colhida com aproximadamente 35% de matéria seca (MS) e ensilada em bags com capacidade de 40 t. No momento da ensilagem, dois tratamentos foram impostos: controle (C) e *L. buchneri* 1×10^5 ufc/g (LB). Após 247 dias de armazenamento, os silos foram abertos e o ensaio de lactação foi iniciado. Vinte vacas Holandesas foram alocadas em sete Quadrados Latinos 3×3 , com períodos de 21 dias (14 d adaptação). As dietas experimentais continham (% MS): 8% de caroço de algodão, 9,5% de polpa cítrica, 18% de farelo de soja, 9,0% de milho moído, 2,5% de premix mineral+vitaminas e 53% de silagem de milho C ou LB ou silagem de milho C + 1,0% de 1-propanol (PROP). O 1-propanol foi diluído em água (1:1) e aspergido na ração total durante a mistura, imediatamente antes da oferta das refeições. Parâmetros de fermentação e composição bromatológica das silagens foram realizadas nos períodos experimentais, assim como ensaio de estabilidade aeróbia. A taxa de desaparecimento de ácido acético, etanol e 1-propanol foram mensuradas em cada período durante a exposição das rações no cocho. O CMS, a produção e a composição de leite, a digestibilidade aparente no trato total, o comportamento ingestivo e o índice de seleção de partículas foram registrados entre os dias 15 e 21 de cada período experimental. Nos mesmos dias, foram realizadas coletas de fluido ruminal para determinação das concentrações de ácidos graxos voláteis e 1-propanol e, de sangue para avaliação das concentrações de glicose e ácidos graxos não esterificados (AGNE). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey-Kramer ($\alpha=0,05$), utilizando-se o procedimento MIXED do SAS. Os parâmetros de fermentabilidade e a estabilidade aeróbia das silagens foram semelhantes entre os tratamentos. O CMS, a produção e a composição do leite também não diferiram. Entretanto, a digestibilidade da matéria orgânica, foi menor para o tratamento LB. Animais alimentados com 1-propanol apresentaram maior concentração ruminal deste álcool, maior concentração sanguínea de glicose e menor de AGL. A inoculação das silagens com *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g não modifica a qualidade e a estabilidade aeróbia de silagens de milho. A inoculação com *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g e a adição de 1-propanol na dieta não alteraram o desempenho de vacas leiteiras.

Palavras-chave: Ácido acético; Álcoóis; Consumo; Estabilidade aeróbia; Heterofermentativo; Inoculante; Produção de leite

ABSTRACT

The effects of *Lactobacillus buchneri* and 1-propanol on the nutritive value of corn silage for dairy cows

L. buchneri is a heterolactic microorganism capable of producing significant amounts of acetic acid that has antifungal action and usually increase the aerobic stability of silage. In addition, silages inoculated with *L. buchneri* typically exhibit higher levels of 1-propanol. There is a claim that 1-propanol is associated with decreased dry matter intake (DMI). Thus, the objective of this work was to evaluate the effects of inoculating *L. buchneri* at corn ensiling and supplementing total mixed rations (TMR) with 1-propanol on the performance of lactating dairy cows. The experiment was conducted in the Department of Animal Science, College of Agriculture "Luiz de Queiroz" (ESALQ / USP). Corn crop was harvested at 35% DM and ensiled in farm scale bags (40 t/bag). At ensiling, treatments were: control (C) and *L. buchneri* 1×10^5 cfu/g (LB). After 247 d of storage, silos were opened and the lactation trial was carried out. Twenty Holstein cows housed in a Tie-stall barn were assigned to a replicated 3×3 Latin square design, with 21 d periods (14 d adaptation). Diets contained (DM basis): 8% whole cottonseed, 9.5% citrus pulp, 18% soybean meal, 9% dry ground corn, 2.5% premix mineral + vitamins, and 53% corn silage C or LB or corn silage C + 1% of 1-propanol (PROP). The 1-propanol was diluted in water (1:1) and sprayed onto the TMR during mixing, immediately before each feeding. Silage fermentation and chemical composition were evaluated in each period, as well as the aerobic stability. Fractional disappearance rates of ethanol, acetic acid and 1-propanol were determined in TMR during feedbunk exposure. The DMI, milk yield and composition, total tract digestibility, ingestive behavior and particle sorting index were recorded from d-15 to d-21 in each period. In addition, rumen fluid and blood were sampled to determine the concentrations of VFA and 1-propanol, and glucose and non-esterified fatty acids (NEFA), respectively. Analysis of variance was performed using the Mixed procedure of SAS and treatment means were compared by Tukey-Kramer test ($\alpha = 0.05$). Silage fermentability and aerobic stability were similar between treatments. The DMI, milk yield and milk composition did not differ among treatments. However, the organic matter digestibility was lower for the treatment LB. Animals fed 1-propanol had higher ruminal concentration of this alcohol, higher blood glucose and lower blood NEFA. Inoculation of silage with *L. buchneri* at 1×10^5 cfu/g does not alter fermentation and is not sufficient to improve the aerobic stability of corn silages. The inoculation of silages with *L. buchneri* at 1×10^5 cfu/g and the supplementation of TMR with 1-propanol do not alter the performance of dairy cows.

Keywords: Acetic acid; Aerobic stability; Alcohols; heterolactic; Inoculant; Intake; Milk yield

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Influência da dose de inoculação com <i>L.buchneri</i> (ufc/g) na concentração de ácido acético em silagens de milho.....	30
Figura 2 – Influência da dose de inoculação com <i>L.buchneri</i> (ufc/g) na estabilidade aeróbia de silagens de milho.....	31
Figura 3 – Influência da dose de inoculação com <i>L.buchneri</i> (ufc/g) na concentração de ácido propiônico em silagens de milho.....	32
Figura 4 – Influência da dose de inoculação com <i>L.buchneri</i> (ufc/g) na concentração de 1-propanol em silagens de milho.....	32
Figura 5 – Influência da dose de inoculação com <i>L.buchneri</i> (ufc/g) na perda de MS em silagens de milho.....	35
Figura 6 – Painel do silo tipo “bag” destacando os cinco pontos de amostragem.....	48
Figura 7 – Valores médios de temperatura, umidade relativa do ar e velocidade dos ventos registrados no período de coletas das rações contendo silagem de milho inoculada com <i>L.buchneri</i> ou enriquecida com 1-propanol, nos períodos da manhã e tarde.....	62
Figura 8 – Índice de seleção de partículas.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Desempenho de vacas leiteiras alimentadas com rações contendo silagens de milho inoculadas com <i>L.buchneri</i>	39
Tabela 2 – Características da forragem no momento da ensilagem.....	46
Tabela 3 – Composição química das dietas experimentais consumidas pelos animais	50
Tabela 4 – Perfil fermentativo e microbiologia de silagem de milho controle ou inoculada com <i>L.buchneri</i>	53
Tabela 5 – Produtos de fermentação de silagem de milho controle ou inoculada com <i>L. buchneri</i>	54
Tabela 6 – Estabilidade aeróbia de silagem de milho inoculada com <i>L.buchneri</i> ou acrescida de 1-propanol.....	56
Tabela 7 – Taxa fracional de desaparecimento de compostos voláteis (%/h) de rações contendo silagem de milho inoculada com <i>L.buchneri</i> ou enriquecidas com 1-propanol.....	60
Tabela 8 – Desempenho de vacas leiteiras alimentadas com dietas a base de silagem de milho inoculada com <i>L.buchneri</i> ou acrescidas de 1-propanol.....	66
Tabela 9 – Comportamento ingestivo de vacas leiteiras alimentadas com dietas a base de silagem de milho inoculada com <i>L.buchneri</i> ou acrescidas de 1-propanol.....	68
Tabela 10 – Digestibilidade dos nutrientes das dietas consumidas pelos animais.....	70
Tabela 11 – Partição energética de vacas leiteiras alimentadas com dietas a base de silagem de milho inoculada com <i>L.buchneri</i> ou acrescidas de 1-propanol.....	72
Tabela 12 – Concentração ruminal (mol/100mol) de ácidos graxos voláteis em vacas leiteiras alimentadas com dietas a base de silagem de milho inoculada com <i>L.buchneri</i> ou acrescidas de 1-propanol.....	73
Tabela 13 – Concentrações sanguíneas de glicose e ácidos graxos livres (AGL) de vacas leiteiras alimentadas com dietas a base de silagem de milho inoculada com <i>L. buchneri</i> ou acrescidas de 1-propanol.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

°C - Grau Celsius

AGV – Ácidos graxos voláteis

BAL - Bactéria lácticas

cm – Centímetro

COV – Compostos orgânicos voláteis

CO₂ - Dióxido de carbono

EE- Extrato etéreo

FDN- Fibra em detergente neutro

FDA- Fibra em detergente ácido

g – Grama

H⁺ - íon hidrogênio

H₂O – Água

kg - quilograma

L – Litros

LB - *Lactobacillus buchneri*

m - Metro

mg - Miligrama

min - Minutos

mL - Mililitro

mm - Milímetro

MM- matéria mineral

MO- matéria orgânica

MS - Matéria Seca

NH₃ - Amônia

O₂ - Oxigênio

PB- Proteína Bruta

pH - Potencial Hidrogeniônico

pKa - Constante de dissociação

rpm - Rotações por Minuto

s – Segundos

t – Tonelada

ufc - Unidades formadoras de colônias

1 INTRODUÇÃO

Silagem pode ser definida como o produto final de fermentação anaeróbia, em que, os carboidratos solúveis presentes na forragem fresca são convertidos em ácidos orgânicos, principalmente ácido lático, por bactérias epifíticas e/ou inoculadas (JASTER, 1995). Para obtenção de silagens com padrões qualitativos desejáveis, algumas características inerentes à forrageira a ser ensilada são importantes (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991) tais como concentração adequada de carboidratos solúveis, (mínimo de 8% MS) (WOOLFORD; SAWCZYK, 1984; McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991) poder tampão reduzido (20 a 40 g de ácido lático/kg de MS) (WEIßBACH, 1967) e, teor de matéria seca acima de 30% estão entre as mais importantes. Estas características são imprescindíveis para que os processos fermentativos ocorram de forma eficiente, com redução de pH e inibição de microrganismos indesejáveis ao processo de conservação (BOLSEN; ASHBELL; WILKINSON, 1995).

Embora existam diversas forrageiras que podem ser utilizadas para produção de silagens no Brasil, o milho se destaca entre as espécies mais utilizadas, tanto para bovinos de leite quanto para bovinos de corte, por apresentar teor elevado de energia por quilograma de matéria seca, alta produção de matéria seca por unidade de área e por apresentar características ideais para ensilagem (DEMINICIS et al., 2009).

Silagens resultantes de fermentações desejáveis, como é o caso do milho, normalmente apresentam concentrações altas de ácido lático e carboidratos solúveis que podem ser utilizados por microrganismos indesejáveis, podendo desta forma, apresentarem baixa estabilidade aeróbia após a abertura dos silos para fornecimento das silagens aos animais (TAYLOR et al., 2002; MUCK, 2010). Isto ocorre porque, microrganismos deterioradores como as leveduras têm a capacidade de utilizar ácido lático e carboidratos solúveis residuais em aerobiose como substrato para a produção de CO₂, água e calor, fazendo com que o pH da massa se eleve e, permitindo assim, o crescimento de outros microrganismos indesejáveis que são menos tolerantes ao baixo pH (WOOLFORD, 1990). Dentre diversas alternativas para solucionar este problema, vários aditivos foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar a estabilidade aeróbica das silagens (WEISS, 1996).

Até muito recentemente a atenção das pesquisas estava focada basicamente na obtenção de alta produção de ácido lático através da inoculação com bactérias homofermentativas (KUNG; STOKES; LIN, 2003). Porém, por não serem capazes de manter a estabilidade após a abertura do silo para fornecimento da silagem aos animais (RIBEIRO; QUEIROZ;

NUSSIO, 2005), as pesquisas começaram a se interessar pelas bactérias heterofermentativas, como *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus Kefiri*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus cerevisiae*, *Propionibacterium shermani* e *Propionibacterium acidipropionici*, capazes de produzir ácidos com efeito antifúngico e aumentar a estabilidade de silagens (DANNER et al., 2003).

O *L. buchneri* tem sido utilizado como alternativa para melhoria da estabilidade aeróbia em silagens como a de milho por ter se mostrado efetivo na inibição de leveduras que normalmente iniciam o processo de deterioração aeróbia (RANJIT; KUNG, 2000; TAYLOR et al., 2002). A ação anti-fúngica do *L. buchneri* advém da capacidade que este microrganismo tem de utilizar o ácido láctico, transformando-o em ácido acético e 1,2-propanodiol. Na presença de *Lactobacillus diolivorans* o 1,2- propanodiol é convertido a 1-propanol e ácido propiônico (OUDE ELFERINK et al., 2001). Tanto o ácido acético, quando o ácido propiônico apresentam ação contra leveduras e, portanto podem ser eficientes na melhoria da estabilidade aeróbia de silagens. Isto ocorre porque estes ácidos são capazes de reduzir o crescimento ou até mesmo provocar a morte de leveduras por estenderem a fase lag e reduzirem a produção de novas células, uma vez que há inibição da respiração e do transporte ativo (MOON, 1983; WOOLFORD, 1975; McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991; DAVIDSON, 1997).

No entanto, apesar das melhorias apresentadas na estabilidade aeróbia de silagens inoculadas com *L.buchneri*, existem questionamentos quanto aos possíveis efeitos negativos dos produtos de fermentação, como o ácido acético e 1-propanol, sobre o consumo de alimentos, o metabolismo e o desempenho dos animais.

Desta maneira no presente trabalho foram verificados os efeitos de *L. buchneri* e 1-propanol no valor nutritivo de silagens de milho para vacas leiteiras.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Processo de deterioração e estabilidade aeróbia

Segundo Wilkinson e Davies (2012) a preservação dos nutrientes de uma forrageira inicia na sua colheita e termina quando ela é consumida pelo animal. Neste contexto, a cultura destinada a produção de silagem é sujeita a quatro fases: (1) fase aeróbia no silo imediatamente após a colheita; (2) fase de fermentação; (3) fase de estabilidade da fermentação da silagem durante o armazenamento e (4) fase de abertura para fornecimento da silagens aos animais, em que a silagem é exposta ao ar (BOLSEN; ASHBELL; WILKINSON 1995). Grandes esforços sempre estiveram voltados para a segunda e terceira fase, como na busca de estimulantes e/ou inibidores da fermentação. Porém, nos últimos anos têm se reconhecido que a fase de pós-abertura (desabastecimento) é tão importante quanto às demais, especialmente se considerados a preservação de nutrientes e a qualidade higiênica da silagem para os animais (WILKINSON; DAVIES, 2012).

Quando a silagem é exposta ao ar com a abertura do silo os microrganismos dependentes de oxigênio, como bactérias aeróbicas, bolores e leveduras, que permaneciam inativos ou com baixa atividade na ausência de oxigênio são ativados e podem ser multiplicar, levando à oxidação de substratos, resultando na deterioração da silagem (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). No campo, esta deterioração é normalmente manifestada pelo aparecimento de mofos e elevação da temperatura, sendo que esta deterioração pode ocorrer antes mesmo do desapastecimento por problemas de vedação, mas também durante o transporte da silagem e alimentação dos animais (WILKINSON; DAVIES, 2012). Estas alterações visíveis tipicamente são indicadoras de perdas reais muito maiores que estão ocorrendo na massa ensilada, sendo que a deterioração aeróbia pode gerar perdas de matéria seca (MS) de 10 a 20%, podendo chegar a 40% nos casos em que boas práticas de ensilagem não foram adotadas (WOOLFORD, 1990).

Perda de MS não é o único problema quando o assunto é deterioração aeróbia. Também há nesta fase o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis como algumas espécies de bactérias (*Bacillus*, *Clostridium* e *Listeria*) e fungos filamentosos que podem causar problemas sanitários no rebanho (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002). O desenvolvimento de fungos pode levar a produção de micotoxinas e redução no consumo de matéria seca (CMS), desempenho e problemas reprodutivos em vacas leiteiras que são alimentadas com grandes quantidades de silagem (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK, 2000). A

ocorrência de micotoxinas em alimentos para vacas leiteiras e sua transferência para o leite foi abordado por Fink-Gremmels (2008). Zearalenona, fumonisinas, patulina, roquefortinas são micotoxinas típicas em silagens (PAVEL, 2011; DRIEHUIS, 2011). Já o crescimento de bactérias formadoras de esporos como as do gênero *Clostridium* e *Bacillus* podem levar a contaminação e redução da qualidade do leite, já que estes esporos podem passar pelo trato gastrointestinal e serem transferidos indiretamente para o leite via contaminação fecal e má higienização do úbere, resultando em riscos à saúde humana (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002) e perdas à indústria de lácteos.

Apesar dos clostrídios serem anaeróbios, durante a degradação aeróbica, os números tendem a aumentar, juntamente com outros microrganismos deterioradores. Isto pode ser explicado pela formação de nichos dentro do silo propícios a multiplicação destes microrganismos, com baixa concentração de O₂ e pH elevado, devido a ação de microrganismos aeróbios que utilizam o ácido láctico e o O₂, como as leveduras (JONSSON, 1991; BORREANI; TABACCO; COLOMBARI, 2002; DRIEHUIS; Te GIFFEL, 2005).

Alguns estudos demonstram que silagens deterioradas podem resultar em menor CMS pelos animais devido a presença de toxinas e aminas biogênicas (BOLSEN; WHITLOCK; URIARTE-ARCHUNDIA, 2002; BORREANI; TABACCO; COLOMBARI, 2002; HOFFMAN; OCKER, 1997), além de menor digestibilidade dos componentes orgânicos, menor retenção de nitrogênio e decréscimo na disponibilidade de energia (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Para Pitt (1990) a “vida útil” de uma silagem pode ser determinada pelo tempo em que ela permanece estável em aerobiose, sendo que vários fatores podem influenciar a estabilidade aeróbia: temperatura ambiental, espécie forrageira, conteúdo de umidade da cultura, concentração de O₂ e CO₂, população de microrganismos aeróbicos, concentração de ácidos orgânicos e concentração de carboidratos solúveis residuais. A concentração dos produtos de fermentação é determinada tanto pela composição química da cultura, quanto pelo perfil microbiano que se desenvolve durante o período de armazenamento (BUXTON; O'KIELY, 2003; PAHLOW et al., 2003).

Esta instabilidade que leva a deterioração da silagem se inicia normalmente com a ação de leveduras ácido tolerantes embora bactérias do gênero *Acetobacter* e outros microrganismos possam iniciar o processo (SPOELSTRA et al., 1988). No caso das leveduras, a deterioração se inicia por elas terem a capacidade de utilizar o ácido láctico e carboidratos solúveis residuais das silagens como substrato para a produção de CO₂, água e calor, fazendo com que o pH da massa se eleve, permitindo assim, o crescimento de outros

microrganismos indesejáveis que são menos tolerantes ao baixo pH, como fungos filamentosos e bactérias aeróbias (WOOLFORD, 1990). Além da perda de matéria seca ocorre a degradação de aminoácidos, gerando amônia que contribui ainda mais para a elevação do pH (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

As leveduras do processo de deterioração da silagem podem ser divididas em dois grupos: as que consomem os ácidos orgânicos e as que consomem carboidratos solúveis (JONSSON; PAHLOW, 1984). Por serem capazes de se desenvolver em concentrações baixas de oxigênio e em pH baixo (<4,0) o número de leveduras nas silagens variam de $<10^2$ a 10^{12} ufc/g de MS, tendo uma sucessão de populações ao longo das etapas de ensilagem. Segundo Woolford (1990), silagens com contagens de leveduras acima de 10^5 são mais propensas à deterioração aeróbia, porém, isto não é fator determinante, pois também depende do grupo de leveduras que estará atuando, sendo as leveduras que consomem o ácido láctico o grupo mais importante.

Portanto, silagens deterioradas normalmente apresentam temperaturas e pH elevados e baixas concentrações de ácido láctico e carboidratos solúveis, pois são substratos para crescimento de microrganismos aeróbios. Embora existam outras definições para o termo estabilidade aeróbia, o mais utilizado é o tempo que a massa de silagem leva para superar em 2° C a temperatura ambiente (KUNG; STOKES; LIN, 2003). Em geral, após a exposição das silagens ao ar ocorrem dois picos de temperaturas. O primeiro pico está associado com o desenvolvimento de leveduras e bactérias ácido acéticas e, a segunda elevação de temperatura, é um reflexo do desenvolvimento de fungos (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

A preocupação com o problema da deterioração aeróbia é maior em casos em que o descarregamento do silo não é efetuado próximo a alimentação dos animais; quando os silos são grandes demais e o descarregamento em fatias sem descompactação do remanescente é impossível; em silagens de alta qualidade como as de milho; quando silos e cochos são contaminados por restos de forragem e; em ambientes quentes, onde a deterioração ocorre mais rapidamente, visto que as leveduras aeróbias são mais ativas entre 20 e 30° C (ASHBELL et al., 2002). Assim, a estabilidade aeróbia tende a ser menor em países de clima tropical, como é o caso do Brasil, devido às temperaturas mais elevadas.

Henderson et al. (1979) avaliaram as perdas de MS de silagens em que o descarregamento sem a descompactação da face do silo não é possível. Entre a data de abertura dos silos até 9 dias de exposição as perdas variaram de 0 a 20,3%. Os autores encontraram correlação positiva entre as perdas de MS e a elevação do pH ($r = 0,87$), entre as

perdas de MS e a temperatura máxima atingida pela massa de forragem ($r = 0,88$) e, entre o aumento de pH e a temperatura máxima atingida ($r = 0,89$). Segundo os autores, isto sugere que a temperatura é um indicador razoável das perdas de nutrientes durante a exposição aeróbia de silagens.

Dentre as culturas destinadas para produção de silagem, o milho (*Zea mays*) se destaca como a mais utilizada (PEREIRA et al., 2001), por ter características benéficas ao processo, como alta produtividade, alto valor nutritivo e teores de MS, carboidratos solúveis e poder tampão que propiciam bom processo de fermentação (DEMINICIS et al., 2009). Assim, silagens de milho bem manejadas apresentam normalmente alta concentração de ácido lático, carboidratos solúveis e outros nutrientes residuais. Embora o processo de fermentação seja adequado, normalmente este tipo de silagem apresenta baixa estabilidade aeróbia, pois microrganismos oportunistas, como as leveduras, utilizam o ácido lático e carboidratos solúveis residuais para se desenvolverem (TAYLOR et al., 2002; MUCK, 2010). Desta forma, mesmo a cultura favorecendo a preservação dentro do silo, após a abertura, os efeitos podem ser anulados pela exposição aeróbia, levando a perdas significativas de nutrientes e baixo consumo pelos animais.

O'Kiely e Muck (1992) demonstraram que culturas distintas diferem quanto a deterioração aeróbia, pois silagens de alfafa apresentaram 6,2% de perdas de matéria seca e silagens de milho 16,4%.

Ranjit e Kung (2000) avaliaram a deterioração aeróbia em silagem de milho e observaram, que o pH aumentou de 3,9 para 5,0, já os teores de ácido lático e ácido acético foram reduzidos de 7,52 para 1,35% e de 1,88 para 0,08% na MS, respectivamente. Estas observações foram feitas até o terceiro dia de exposição ao ar, sendo que também foram observadas perdas de 5,3% da matéria seca e 60% dos carboidratos solúveis existentes no dia da abertura do silo.

Portanto, mesmo que o processo de fermentação seja desejável e leve a conservação dos nutrientes da silagem que será destinada a alimentação animal, esta preservação pode ser anulada quando o silo é aberto e a silagem é exposta ao oxigênio. Várias alternativas vêm sendo buscadas com o objetivo de reduzir as perdas ocorridas durante esta fase. Dentre estas, a busca por aditivos, sejam eles químicos ou biológicos, capazes de inibir o crescimento de microrganismos espoliadores vêm ganhando destaque nos últimos anos.

2.2 Aditivos microbianos

Vários aditivos foram desenvolvidos com o objetivo de auxiliar no processo de fermentação, contribuindo de maneira geral, para redução das perdas de matéria seca que ocorrem durante a ensilagem, para aumento do valor nutritivo da massa ensilada ou melhora na estabilidade aeróbica da silagem após a abertura dos silos (WEISS, 1996). Para McDonald, Henderson e Heron (1991), os aditivos podem ser químicos ou biológicos e classificados de acordo com sua ação no material em: estimulantes da fermentação, inibidores da fermentação, inibidores da deterioração aeróbica, nutrientes e absorventes.

Os aditivos biológicos englobam os inoculantes microbianos como as bactérias homofermentativas, heterofermentativas, ou a combinação destas. As bactérias lácticas (BAL) podem ser classificadas como homofermentativas obrigatórias, que produzem ácido láctico a partir de hexoses como a glicose; heterofermentativas facultativas, que produzem tanto o ácido láctico a partir de hexoses, quanto de pentoses e dióxido de carbono, etanol e/ou ácido acético; heterofermentativas obrigatórias que degradam hexoses e pentoses a ácido láctico, acético e propiônico, entre outros (MUCK, 2010).

Até muito recentemente a atenção dos inoculantes estava focada basicamente na obtenção de alta produção de ácido láctico por meio da inoculação com bactérias homofermentativas (KUNG; STOKES; LIN, 2003). Porém, por não serem eficientes em manter a estabilidade aeróbia após a abertura do silo (RIBEIRO; QUEIROZ; NUSSIO, 2005) e, além disso, o fato de que inoculantes que melhoram a fase de fermentação, como é o caso dos homoláticos, normalmente pioram a estabilidade durante o armazenamento e desabastecimento dos silos por causa da produção baixa de compostos antifúngicos (KUNG; STOKES; LIN, 2003) com consequente contagem maior de leveduras no momento da abertura, incentivou as pesquisas por bactérias heterofermentativas, como *Lactobacillus buchneri*, capaz de produzir ácidos com efeito antifúngico durante o processo fermentativo (DANNER et al., 2003).

Segundo Muck (1988) para que os aditivos microbianos apresentem resultados positivos, a proporção de bactérias inoculadas deve ser superior a da população epifítica da planta, sendo que isto vai depender da habilidade da bactéria inoculada crescer em presença de substrato adequado. Além disso, o histórico agrícola da cultura, o manejo de aplicação do aditivo e o teor de MS da massa são fatores que também interferem na atividade dos inoculantes (MUCK; KUNG, 1997).

Segundo Henderson (1993), é preciso que algumas características relacionadas ao aditivo microbiano a ser utilizado sejam conhecidas como: eficiência na melhora do processo de

fermentação, valor nutritivo (consumo voluntário e digestibilidade), desempenho animal e viabilidade econômica. Porém, a maioria dos trabalhos com inoculantes normalmente abordam somente as características inerentes à silagem, havendo a necessidade da busca por mais informações dos efeitos destes inoculantes no desempenho dos animais (KUNG; STOKES; LIN, 2003).

2.3 Efeitos de *L. buchneri* na fermentação e estabilidade aeróbia

O principal objetivo das indústrias até a metade da década de 90 consistia em promover inoculantes a base de bactérias homofermentativas, que têm como princípio básico a produção de ácido láctico e redução rápida do pH, com inibição de microrganismos indesejáveis. Porém, as evidências de que, um perfil de fermentação desejável, nem sempre evitavam perdas após a abertura dos silos e, pelo contrário, podiam até mesmo ser elevadas, levou os pesquisadores a iniciar a busca por inoculantes, como o *L. buchneri*, que pudessem melhorar a preservação dos nutrientes das silagens durante a fase de fornecimento destas aos animais (WEINBERG; MUCK, 1996).

Alguns aditivos químicos, que são tóxicos para as leveduras, já mostraram melhorar a estabilidade aeróbica de silagens (KUNG et al., 2000). No entanto, estes produtos são frequentemente onerosos, podem ser corrosivos aos maquinários, poluentes ambientais e tóxicos às pessoas (WEINBERG; MUCK, 1996). Ao contrário, *L. buchneri* consiste em alternativa biológica que, quando adicionado à forragem a ser ensilada, pode levar a aumentos na concentração de ácido acético, menor contagem de leveduras e melhoria da estabilidade aeróbia em uma variedade de silagens (RANJIT; KUNG, 2000: milho planta inteira); (TAYLOR et al., 2002: cevada); (KUNG; STOKES; LIN, 2003: alfafa); (FILYA, 2003: milho e sorgo); (SIQUEIRA et al., 2007: cana-de-açúcar); (REIS et al., 2008: grãos úmidos de milho); (ÁVILA et al., 2009: gramínea tropical).

A rota metabólica de bactérias heterofermentativas é a conversão de glicose a ácido láctico e etanol, sendo a frutose convertida a ácido láctico, ácido acético e manitol (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Porém, por não apresentar a enzima acetaldeído desidrogenase que tem a função de reduzir acetaldeído a etanol, o *L. buchneri* tem produção de etanol praticamente nula e, aumento da concentração de ácido acético como produto final de sua fermentação (OUDE ELFERINK et al., 2001; McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Além da fermentação de carboidratos solúveis, *L. buchneri* é capaz de utilizar o ácido

lático, transformando-o em ácido acético, 1,2 - propanodiol e traços de etanol (OUDE ELFERINK et al., 2001).

Mesmo apresentando estruturas químicas diferentes, os ácidos fracos apresentam, de forma geral, mecanismo de ação comum. Quando estes se encontram em pH baixo, seu potencial antifúngico é potencializado porque podem atravessar as membranas de microrganismos devido sua forma não dissociada ter caráter lipofílico. Por exemplo, quando o ácido acético, que é considerado fraco, está em pH inferior ao seu pKa (4,73), permanece sob a forma não dissociada, e portanto, passível de penetrar a membrana de fungos filamentosos e leveduras por transporte passivo (MOON, 1983). Dentro da levedura ou do fungo, o ácido se dissocia ($\text{RCOO}^- + \text{H}^+$), uma vez que o pH intracelular é mais elevado (pH próximo de 7,0), liberando íons H^+ e, conseqüentemente, reduzindo o pH. O microrganismo, na tentativa de elevar o pH, inicia um processo de expulsão dos íons H^+ com gasto de ATP; esse gasto energético implica em redução do crescimento, podendo levar à morte celular (DAVIDSON, 1997).

Segundo Driehuis, Oude Elferink e Spolestra (1999a), o acréscimo na concentração de ácido acético nas silagens é benéfico em duas situações: na redução da sobrevivência das leveduras durante o processo fermentativo e na inibição do crescimento destes microrganismos durante a fase de exposição da silagem ao oxigênio.

Embora o ácido lático seja mais eficiente na redução de pH das silagens do que o ácido acético, devido ao seu menor pKa (3,86), segundo Nussio et al., (2002), restringir a produção de ácido acético nas silagens, pode levar a baixa estabilidade aeróbia. Por isso, o conceito de que, a concentração de ácido acético menor que 2% na MS caracterizam silagens como satisfatórias (DULPHY; DEMARQUILLY, 1981), atualmente é considerado obsoleto.

No presente trabalho, uma meta análise foi realizada com 36 comparações publicadas com silagens de milho inoculadas com *L. buchneri* de 1999 a 2013 (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOLESTRA 1999a; DRIEHUIS; VAN WIKSELAAR; OUDE ELFERINK 1999b; RANJIT; KUNG, 2000; FILYA; KARABULUT; SUCU, 2002; RANJIT; TAYLOR; KUNG, 2002; NISHINO et al., 2002; WEINBERG et al., 2002; WU-TAI; DRIEHUIS; WIKSELAAR, 2002; FILYA, 2003; NISHINO et al., 2003, 2004; MUCK, 2004; KLEINSCHMIT; SCHMIDT; KUNG, 2005; FILYA; SUCU; KARABULUT, 2006; NSEREKO et al., 2008; WEINBERG et al., 2007; NISHINO et al., 2007; MARI et al., 2009; LATRE et al., 2009; BASSO et al., 2009; HU et al., 2009; SARTURI et al., 2009; ZOPOLLATTO et al, 2009; NKOSI et al., 2009; SCHMIDT; KUNG., 2010; KRISTENSEN et al., 2010; TABACCO et al., 2011; ARRIOLA; KIM; ADESOGAN, 2011; LI; NISHINO,

2011; TELLER et al., 2012; LARA et al., 2012; EVA et al., 2012; KLEINSHMITT et al., 2013; SALVO et al., 2013; SÁ NETO et al., 2013). Os efeitos de *L. buchneri* sobre a produção de ácido acético e estabilidade aeróbia podem ser observados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. Para cada aumento de 1×10^6 na dose de *L. buchneri* houve acréscimo de 1,35 unidades percentuais na concentração de ácido acético (%MS) e, refletiu em aumento de 80 horas na estabilidade aeróbia. Os pontos de máximo foram alcançados com doses de 4×10^6 , para concentração de ácido acético, e $1,5 \times 10^6$ para estabilidade aeróbia.

Figura 1 - Influência da dose de inoculação com *L. buchneri* (ufc/g) na concentração de ácido acético em silagens de milho (ajustado para efeito aleatório de experimento). Ácido acético (%MS) = $1,99 + (1,94 \times 10^{-6} \times \text{Dose}) - (0,00000023 \times 10^{-6} \times \text{Dose}^2)$; $R^2_{\text{ajustado}} = 0,68$; RQME = 0,67; $P < 0,01$

Figura 2 - Influência da dose de inoculação com *L. buchneri* (ufc/g) na estabilidade aeróbia de silagens de milho (ajustado para efeito aleatório de experimento). Estabilidade aeróbia (h) = $81,7 + (123,5 \times 10^{-6} \times \text{Dose}) - (0,000041 \times 10^{-6} \times \text{Dose}^2)$; $R^2_{\text{ajustado}} = 0,48$; RQME = 28,8; $P < 0,01$

Na presença de *Lactobacillus diolivorans*, o 1,2-propanodiol produzido por *L. buchneri*, é convertido em 1-propanol e ácido propiônico. A redução da concentração de ácido láctico representa diminuição no substrato utilizado por algumas cepas de leveduras durante o processo de deterioração aeróbica (SIQUEIRA et al., 2005). Além disso, o ácido propiônico produzido possui ação antifúngica semelhante a do ácido acético (MOON, 1983). As concentrações de ácido propiônico e 1-propanol nos experimentos considerados na meta-análise descrita anteriormente estão reportadas nas Figuras 3 e 4, respectivamente. Quanto maior a dose de *L. buchneri* maior foi a concentração de 1-propanol, sendo que a cada aumento de 1×10^6 na dose do inoculante houve acréscimo de 0,8 unidades percentuais na concentração de 1-propanol (%MS). Já para o ácido propiônico o aumento da mesma dose (1×10^6 ufc/g) leva à acréscimo de 0,4 unidades percentuais na concentração deste ácido. O ponto de máxima para a concentração de ácido propiônico foi alcançado na dose de 1×10^6 . As concentrações máximas de ácido acético e ácido propiônico atingidas com altas doses de *L. buchneri* ($>4 \times 10^6$ para ácido acético e $>1 \times 10^6$ para ácido propiônico) pode ocorrer devido a produção destes compostos inibir o crescimento do microrganismos produtores (*feedback* negativo), assim como ocorre na fase inicial com o ácido láctico durante a estabilização da fermentação.

Figura 3 - Influência da dose de inoculação com *L. buchneri* (ufc/g) na concentração de ácido propiônico em silagens de milho (ajustado para efeito aleatório de experimento). Ácido propiônico (%MS) = $0,20 + (0,82 \times 10^{-6} \times \text{Dose}) - (0,00000041 \times 10^{-6} \times \text{Dose}^2)$; $R^2_{\text{ajustado}} = 0,59$; RQME = 0,13; $P < 0,01$

Figura 4 - Influência da dose de inoculação com *L. buchneri* (ufc/g) na concentração de 1-propanol em silagens de milho (ajustado para efeito aleatório de experimento). 1-Propanol (%MS) = $0,22 + 0,83 \times 10^{-6} \times \text{Dose}$; $R^2_{\text{ajustado}} = 0,72$; RQME = 0,2; $P < 0,01$

Segundo Yildirim (2001), *L.buchneri* é capaz de produzir bacteriocinas, denominadas buchnericina, que apresentam ação no controle de bactérias gram-positivas, que estão geralmente associadas a deterioração de alimentos, demonstrando que, o controle de microrganismos deterioradores pode não ser somente pela produção do ácido acético e propiônico.

Filya (2003) estudou a estabilidade de silagens de milho e sorgo e verificou que a adição de *L. buchneri* resultou em menor pH (4,7 vs 6,5), menor produção de CO₂ (20 g/kg vs 55 g/kg) e menor contagem de leveduras (2,6 vs 6,7 log da ufc/g de silagem) em relação à silagem controle durante a exposição aeróbia. Ranjit e Kung (2000) utilizaram *L.buchneri* em silagens de milho nas doses de 1×10^5 e 1×10^6 e relataram maiores concentrações de ácido acético, redução na população de leveduras e aumento na estabilidade aeróbia. A silagem controle permaneceu estável por 26,5 horas, já a silagem tratada com a maior dose permaneceu estável por 900 horas.

Kleinschmit e Kung (2006a) também realizaram meta análise de 43 experimentos que utilizaram *L. buchneri* como inoculante em silagens de milho, sorgo, trigo, cevada e gramíneas e, observaram redução na concentração de ácido láctico e aumento na concentração de ácido acético, com consequente aumento na estabilidade aeróbia e inibição no crescimento de leveduras. Silagens de milho não tratadas permaneceram estáveis em aerobiose por apenas 25 horas, enquanto que silagens inoculadas com doses ≤ 100.000 ufc/g de *L.buchneri* e ≥ 100.000 ufc/g permaneceram estáveis por 35 e 503 h, respectivamente.

Kleinschmit e Kung (2006b) avaliaram o efeito da inoculação de milho planta inteira no momento da colheita com *L. buchneri* na dose 4×10^5 ufc/g de forragem fresca e, embora tenham encontrado maiores concentrações de ácido acético e números inferiores de leveduras nas silagens inoculadas em 42, 56, 70 e 282 dias de ensilagem, a inoculação não foi consistente em melhorar a estabilidade aeróbia. Segundo os autores, isto sugere que outros microrganismos podem ter sido responsáveis pela instabilidade aeróbia destas silagens.

Taylor et al. (2002) e Kung et al. (2003) relataram melhorias na estabilidade aeróbia de silagens inoculadas com *L. buchneri*. No trabalho de Taylor et al. (2002), as silagens de cevada inoculadas (1×10^5 e 1×10^6 ufc/g) tiveram menores concentrações finais de ácido láctico e maiores concentrações de ácido acético que as silagens controle. No trabalho de Kung et al. (2003), silagens de alfafa inoculadas com *L. buchneri* (1×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6) tiveram pH mais elevado (4,55 vs 4,38) e concentrações mais elevadas de ácido acético (6,40% vs 4,24%), ácido propiônico (0,18% vs. 0,06%) amônia (0,35% vs. 0,29%) e, menores teores de ácido láctico (3,51% vs. 4,12%) quando comparadas com a silagem controle. Em ambos os

trabalhos, quando *L. buchneri* foi adicionado a outros alimentos para formar a ração, a estabilidade aeróbia foi melhorada. Segundo Kung, Stokes e Lin (2003), isto demonstra que os efeitos protetores deste inoculante puderam ser transferidos para outros alimentos, resultando em menor chance de deterioração da ração no cocho dos animais. Hu et al. (2009) ao avaliar a adição de *L. buchneri* e *L. plantarum* isolados e em combinação em silagens de plantas de milho colhidas com diferentes teores de MS, observaram que em silagens com elevado teor de MS (41%) a inoculação com *L. buchneri* não afetou a concentração de ácido láctico, mas reduziu em silagens com MS normal (33%). Maiores concentrações de ácido acético foram encontrados nas silagens tratadas com *L. buchneri* em comparação com as silagens não tratadas.

Em estudos de Ranjit e Kung (2000) e Taylor e Kung (2002), o acúmulo de ácido acético a partir do metabolismo de *L. buchneri* não foi imediato e, ocorreu após várias semanas de fermentação. Oude Elferink et al. (2001) relataram que a conversão de ácido láctico para ácido acético por *L. buchneri* ocorreu mais prontamente em baixo pH (<4,0), mas isso não explica totalmente o atraso na resposta pois, na maioria das silagens de milho o pH é abaixado rapidamente. Segundo Schmidt et al. (2009) embora, *L. buchneri* possa ser detectado por técnicas de biologia molecular com apenas dois dias de ensilagem, durante a fase inicial de fermentação, *L. buchneri* gera energia através da fermentação de açúcares simples semelhante a outras bactérias heteroláticas, o que resulta em um aumento em seu número. Porém, na fase posterior de ensilagem, este microrganismo é induzido pelo pH baixo a fermentar ácido láctico sob condições anaeróbicas, mas este é um processo lento, e produz baixas quantidades de energia (OUDE ELFERINK et al., 2001), por conseguinte, o aumento na concentração dos produtos finais dessa via metabólica (ácido acético e 1,2-propanodiol) são observadas após tempos prolongados de estocagem (>45 dias de armazenamento) (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOLESTRA 1999a; KLEINSCHMIT; KUNG, 2006b).

As magnitudes de perdas de MS e energia são diferentes durante o processo fermentativo dependendo dos microrganismos que podem se desenvolver na massa ensilada. A rota fermentativa das BAL homofermentativas é mais desejável durante o processo de conservação, pois convertem uma molécula de glicose em duas de ácido láctico, propiciando perdas de MS ou energia muito pequenas, variando entre 0,7 a 1,7%. As maiores perdas podem ser observadas pela atuação de BAL heterofermentativas que podem acarretar perdas de até 24% da MS, uma vez que essas bactérias heterofermentativas produzem, além do ácido láctico nas suas rotas metabólicas, ácido acético, dióxido de carbono e água (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991; ROTZ; MUCK, 1994).

Trabalhos como o Driehuis, Van Wikselaar e Oude Elferink (1999b), Ranjit, Taylor e Kung (2002), Nishino et al. (2002, 2003), Weinberg et al. (2002), Wu-tai, Driehuis e Wikselaar (2002) e Filya (2003) relatam maiores perdas de MS em silagens de milho inoculadas com *L. buchneri* em relação a silagem controle, corroborando com a afirmação de que as rotas metabólicas de *L. buchneri* geram maiores perdas de MS devido a produção de CO₂ e água. Os dados das 36 comparações utilizadas na meta-análise já descrita anteriormente demonstram maior perda de MS pela utilização de *L. buchneri*. As silagens de milho controle apresentaram média de perdas de MS de 6,92% sendo que a cada aumento de 1×10^6 na dose inoculado as perdas aumentam em 0,6 unidades percentuais.

Figura 5 - Influência da dose de inoculação com *L. buchneri* (ufc/g) na perda de MS em silagens de milho. Perda de MS (%) = $6,92 + 0,585 \times 10^{-6} \times \text{Dose}$; $R^2_{\text{ajustado}} = 0,42$; RQME = 0,79; $P < 0,01$

2.4 Efeitos de *L. buchneri* no metabolismo e desempenho animal

No que diz respeito à palatabilidade, as silagens com inoculações homofermentativas são normalmente consideradas preferíveis pelos animais porque o seu principal produto de fermentação é o ácido lático (BUCHANAN-SMITH, 1990), porém silagens contendo inoculantes heterofermentativos podem ter uma melhor preservação de seus nutrientes devido a maior estabilidade aeróbia (KLEINSCHMIT; KUNG, 2006b).

No trabalho realizado por Muck e Kung (1997), os resultados de melhora no desempenho animal com silagens inoculadas com BAL são inferiores aos resultados positivos na fermentação. Uma das hipóteses sugeridas para isso é, de que, os nutrientes que foram preservados durante a fermentação podem ter sido degradados por microrganismos deterioradores durante a fase em que as silagens são expostas ao ar, resultando em menor desempenho animal. Com isso, alternativas que aliem melhorias na fermentação, estabilidade aeróbia e desempenho animal vêm sendo estudadas. Segundo Bernardes (2006), a utilização de inoculantes como o *L. buchneri* que produz tanto o ácido láctico como o acético é uma destas alternativas.

Embora a utilização de inoculantes heterofermentativos, como *L. buchneri* resultem em melhorias na estabilidade aeróbia, o valor nutritivo das silagens deve ser medido pelo desempenho animal. Segundo Muck (2010), os aumentos de ganho de peso e produção de leite são de 5% e 3%, respectivamente, quando a inoculação gera efeitos positivos nas silagens. No entanto, alguns trabalhos mostraram que altas concentrações de ácido acético levam a depressão do consumo de MS em animais (JONES; LARSEN; LANNING, 1980; BUCHANAN-SMITH, 1990; WILKINS et al., 1971; ROOK; GILL, 1990).

Hetta et al. (2007) apresentaram resultados de correlação negativa entre o consumo de silagem e a concentração de ácido acético. Hutchinson e Wilkins (1971) trataram silagens de azevém com doses crescentes de ácido acético (2%, 5%, 8,8%) e, forneceram para ovinos adultos. O CMS diário não foi alterado, mas o tempo de ingestão foi reduzido nas primeiras 4 horas de oferecimento da ração. Hutchinson e Wilkins (1971) trabalharam com níveis de ácido acético entre 2,0 e 8,8% da MS em silagem de azevém perene, sem observar alterações no consumo diário de ovelhas. No entanto, o comportamento alimentar dos animais foi modificado, uma vez que o tempo de ingestão foi reduzido nas primeiras 4 horas e aumentado entre 16 e 20 horas após o arraçoamento. Vale ressaltar que, o CMS de vacas leiteiras e a proporção de inclusão de silagens na dieta são muito maiores do que para pequenos ruminantes e, portanto os efeitos do ácido acético sobre o CMS e desempenho podem ser mais pronunciados.

Dinius et al. (1968) avaliaram a inclusão de ácido acético (0; 1,5; 3,0; 4,5 e 6% da MS) à forragem de milho *in natura* e à silagem de milho para vacas e novilhas, e observaram redução linear no consumo de matéria seca, mas em maior intensidade no nível de 6%. Apesar disso, o consumo de energia não foi alterado. Quanto aos parâmetros sanguíneos, não houve alteração nos níveis de glicose e o acetato foi maior somente na primeira hora após alimentação, em dietas a base de silagem. Seis horas após a alimentação, os níveis sanguíneos

de acetato foram menores que os registrados após a primeira hora. Para os autores, a razão pela qual o consumo de energia não foi alterado, mesmo com redução do consumo é, de que, a proporção de energia fornecida pelo ácido acético reduziu o consumo de forragem, pois a demanda energética dos animais foi atendida.

Segundo Dinius et al. (1968), entre as hipóteses de regulação no consumo voluntário de ruminantes, estão os mecanismos químicos responsivos aos níveis de acetato no sangue ou de demanda energética dos animais. Respostas variáveis têm sido encontradas em trabalhos testando o acetato como hipótese de inibição do consumo voluntário. Reduções significativas na ingestão de alimentos foram encontradas quando o ácido acético foi administrado por via intravenosa ou intraruminal. No entanto, muitos resultados contraditórios foram obtidos quando o acetato foi adicionado aos alimentos para ruminantes. Segundo os autores, isto pode ser explicado uma vez que administração intravenosa ou intraruminal não permite ao animal regular a ingestão do metabólito.

Daniel et al. (2013), alimentaram vacas leiteiras com dietas a base de feno de tifton com inclusão de ácido acético de 4,26 % da MS, após descontadas as perdas na aplicação. Na primeira semana experimental, o ácido acético foi fornecido em metade da dose. A partir da 2ª semana de avaliação (início da aplicação da dose total), o ácido acético deprimiu o consumo de ração em relação ao tratamento controle. Após a terceira semana o consumo de MS foi recuperado, demonstrando adaptação dos animais. O consumo das dietas contendo ácido acético foram menores no período de 4 horas após o arraçoamento matinal. Segundo os autores, a taxa de volatilização elevada do ácido acético pode ter levado a recusa pelo olfato e, devido as altas produções de acetato ruminal é improvável que o CMS foi metabolicamente controlado pelo acetato, já que este representou menos de 18% do acetato total absorvido diariamente pelas vacas.

Kung, Stokes e Lin (2003) inocularam silagens de alfafa com *L. buchneri* na dose de 4×10^5 ufc/g e ensilaram em silos tipo bag. Vacas da raça Holandesa foram alimentadas com uma dieta composta de 32% de silagem de alfafa não tratada ou tratada, 11% de silagem de milho, 5% feno de alfafa picado e, 52% de concentrado. O CMS e a composição do leite não foram afetados pelo tratamento, mas vacas alimentadas com silagem tratada com *L. buchneri* produziram 0,8 kg a mais leite do que os animais alimentados com silagem não tratadas. Já Taylor et al. (2002), não encontraram diferenças na produção de leite, CMS e composição do leite para vacas alimentadas com silagem de cevada inoculada com *L. buchneri* e controle, sendo a silagem inoculada misturada com 30% de silagem de alfafa e 40% de concentrado. A falta de resposta no consumo de matéria seca com a inoculação de *L. buchneri* nestes

experimentos pode ter ocorrido pelo fato da silagem não ter sido a única fonte de volumoso da dieta, podendo ter diluído o efeito do ácido acético nestes casos.

De acordo com Weinberg, Chen e Gamburg (2004), um fator positivo que poderia beneficiar os animais alimentados com silagens inoculadas, seria um possível aumento no ganho de peso, devido à melhora na digestão da fibra por uma interação entre microrganismos da silagem e do rúmen, ou até mesmo por um efeito probiótico do inoculante.

Para Kung (2009) a melhora na digestão da fibra ocorre, possivelmente pela produção de ferulato-esterase pelo *L. buchneri*, que atua sobre a fração arabinoxilanas da parede celular, liberando ferulato e, aumento a digestão da fração fibrosa da silagem, resultando em mais carboidratos solúveis para a fermentação ou utilização pelas bactérias do rúmen. Em estudo feito por Nsereko et al. (2008) foi observado que algumas bactérias heterofermentativas (*Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*) produzem ferulato-esterases que levaram a aumento na degradação ruminal da FDN de silagens de azevém inoculadas. Porém, segundo Addah et al. (2012) não são todas as cepas de *L.buchneri* que são capazes de produzir este tipo de enzimas e, mesmo quando são produzidas, a sua atividade pode não ocorrer devido a condições ótimas de atuação, como pH entre 5,6 a 6,5.

Segundo Nsereko et al. (2008) a possível melhoria no desempenho animal pela inoculação com BAL está relacionada principalmente a alterações no valor nutritivo das silagens. A produção de bacteriocinas pelas bactérias inoculadas podem inibir o crescimento de microrganismos espoliadores reduzindo a produção de toxinas e aminas biogênicas, melhorando a digestibilidade e aceitabilidade e preservando o valor nutritivo da silagem, mas também podem influenciar os microrganismos ruminais, melhorando a fermentação.

Segundo Weinberg, Chen e Gamburg (2004) parte das BAL inoculadas em silagens teriam condições de chegar vivas e funcionais ao rúmen e interferir no perfil microbiano ruminal, alterando a eficiência alimentar. Weinberg, Muck e Weimer (2003), comprovaram que as BAL podem sobreviver em condições ruminais, ao aplicá-las em fluido ruminal *in vitro*.

Apesar de melhoria na estabilidade aeróbia de silagens de milho e sorgo inoculadas com *L. buchneri* na dose de 1×10^6 ufc/g, Filya (2003) não encontraram mudanças na degradabilidade ruminal *in situ* da matéria seca, matéria orgânica e FDN quando comparadas a silagens controle. Contudo, Muck (2010) salienta que os mecanismos de alterações do metabolismo e consequentemente do desempenho animal com bactérias lácticas ainda não estão totalmente elucidados, sendo necessária a realização de novas pesquisas.

Vários são os estudos que relatam o efeito da adição de ácido acético na dieta sobre desempenho de animais, porém são poucos os que abordam o impacto da inoculação com *L. buchneri* sobre o desempenho animal. Embora a silagem de milho seja o volumoso mais utilizado para vacas leiteiras, são escassos os trabalhos que avaliaram os efeitos de *L. buchneri* sobre o CMS e o desempenho desta categoria animal (Tabela 1).

Tabela 1 - Desempenho de vacas leiteiras alimentadas com rações contendo silagens de milho inoculadas com *L. buchneri*

Referência	Dose de aplicação	CMS (kg/d)	Leite (kg/d)
Driehuis et al. 1999b	Controle	20,8	38,8
	1x10 ⁵ ufc/g	20,4	38,8
		NS ¹	NS
Kristensen et al. 2010	Controle	-	30,6
	3x10 ⁵ ufc/g	-	31,3
		-	P = 0,49
Kleinshmitt et al. 2013	Controle	25,63	36,43
	1x10 ⁵ ufc/g	25,11	34,01
	5x10 ⁵ ufc/g	25,28	34,79
	1x10 ⁶ ufc/g	24,57	33,69
		C vs. LB ² = 0,08	C vs. LB = 0,05
		L = 0,19	L = 0,78
		Q = 0,28	Q = 0,43

¹NS: não significativo

²Efeito de aditivo: control vs (L.buchneri 1x10⁵+ 5x10⁵+ 1x10⁶); L: efeito linear de dose de aplicação de *L. buchneri*; Q: Efeito quadrático de dose de aplicação de *L. buchneri*

2.5 Efeitos de 1-propanol no metabolismo e desempenho animal

Conforme relatado anteriormente, uma das rotas metabólicas de *L. buchneri* é a conversão de ácido láctico em ácido acético, 1,2 propanodiol e traços de etanol (OUDE ELFERENIRINK et al., 2001). Em trabalho realizado por Driehuis, Oude Elferink e Spoelstra et al. (1999a) concentrações elevadas de 1-propanol e ácido propiônico (0,79 e 1,42 % MS) foram observadas em silagens de milho inoculadas com *L. buchneri*. Posteriormente, Krooneman et al. (2002) isolaram *Lactobacillus diolivorans* de silagem e relataram que este era capaz de converter 1,2-propanodiol a 1-propanol e ácido propiônico. Por isso, 1-propanol é um produto de fermentação comum em silagens inoculadas com bactérias

heterofermentativas. Além disso, 1-propanol pode ser formado em silagem por leveduras ou bactérias do gênero *Clostridium* através da fermentação de treonina ou metionina (GIUDICI et al., 1993; JANSSEN, 2004).

Kleinshmitt et al. (2013), em trabalho realizado com inoculação de *L. buchneri* em silagens de milho nas doses de 1×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6 , encontraram maiores concentrações de 1-propanol com doses maiores dos inoculantes (3,73 g/kg de MS de 1-propanol para a silagem controle; 4,83 para a dose de 1×10^5 ; 9,28 para a dose de 5×10^5 e; 9,13 para a dose de 1×10^6). Neste mesmo estudo, concentrações maiores de ácido propiônico e ácido acético também foram encontradas nas silagens inoculadas.

Driehuis, Oude Elferink e Spoelstra (1999a) em trabalho realizado com silagens de planta inteira de milho inoculadas com *L. buchneri* na dose de 10^3 a 10^6 ufc/g, observaram maiores concentrações de 1-propanol para as doses superiores a 10^4 . Os autores também relataram que até 7 a 14 dias depois da ensilagem não foram observados efeitos da inoculação com *L. buchneri*, porém, após isso, menores concentrações de ácido láctico e, maiores teores de ácido acético, ácido propiônico e 1-propanol foram encontrados.

Wu-tai, Driehuis e Wikselaar (2002) em trabalho realizado com silagens de milho também encontraram maiores concentrações de ácido acético, ácido propiônico e 1-propanol para silagens de milho inoculadas com *L. buchneri* da dose de 1×10^6 em comparação a silagem controle. A silagem controle apresentou concentração de 1-propanol de 6,72 g/kg de MS, enquanto a silagem inoculada diferiu do controle por apresentar 16,7 g/kg de MS.

Estes resultados comprovam que quando da inoculação com *L. buchneri*, o ácido acético, o 1-propanol e o ácido propiônico são produtos de fermentação normalmente encontrados e, conhecer os efeitos destes produtos sobre o desempenho animal é de fundamental importância.

No entanto, a conversão feita por *Lactobacillus diolivorans* parece ser inconsistente nas silagens. Por exemplo, Driehuis, Oude Elferink e Van Wikselaar (2001), detectaram quantidades elevadas de ácido propiônico e 1-propanol em silagem de azevém inoculada com *L. buchneri* e ensilada com 23% de MS. No entanto, estes compostos não foram detectados em silagem de azevém também inoculada e ensilada com 35% de MS. No trabalho feito por Kleinschmit e Kung (2006b), a inoculação com *L. buchneri* não afetou a concentração de ácido propiônico em silagens de milho, mas aumentou a concentração deste ácido em silagens de gramíneas e de grãos de cereais.

Raun e Kristensen (2010) investigaram a prevalência de 1-propanol em silagens de milho em fazendas na Dinamarca e observaram grandes variações nas concentrações deste álcool,

variando desde não detectável até 9,1 g/kg de MS. Além disso, concentrações de 1-propanol foram correlacionadas positivamente com acetato de propila, ácido acético, 2-butanol, amônia e propionato e, negativamente correlacionado com ácido láctico. Segundo os autores, essas correlações entre o 1-propanol e outros produtos de fermentação corroboram com os resultados anteriores do perfil de fermentação de silagens heterofermentadas (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991; NISHINO; HATTORI, 2007).

O odor característico de silagem de milho com fermentações heterofermentativas associadas com concentrações mais elevadas de ácido acético e 1-propanol (RAUN; KRISTENSEN, 2010) provocou inúmeros pressupostos entre agricultores e técnicos de campo para uma associação entre essas silagens com a saúde do rebanho e problemas de produção. Em estudo realizado por Kristensen et al. (2007) não foi possível detectar efeitos metabólicos negativos da alimentação de vacas leiteiras no meio da lactação com silagens heterofermentadas. No entanto, as vacas em condições de campo podem experimentar grandes variações (zero até 25g/kg MS) na ingestão deste álcool (KRISTENSEN et al., 2007; RAUN; KRISTENSEN, 2011).

A utilização de inoculantes heterofermentativos como o *L. buchneri* para aumento da estabilidade aeróbia das silagens tem levado a elevadas concentrações de 1-propanol (KRISTENSEN et al., 2010) e, no caso de qualquer efeito metabólico indesejado do 1-propanol para vacas leiteiras, esses efeitos podem aumentar com o uso de *L. buchneri*. Em amostras de silagem de milho colhidas aleatoriamente em 20 explorações leiteiras dinamarquesas que não usaram inoculantes heterofermentativos, observou-se que 4 das fazendas continham concentrações de 5 a 9 g de 1-propanol/kg de MS em silagens de milho (RAUN; KRISTENSEN, 2010), e quando a avaliação das silagens de milho foram feitas de explorações leiteiras com base no odor químico característico, as concentrações chegaram até 25 g de 1-propanol/kg de MS.

Ainda existem dúvidas se o 1-propanol pode inibir o CMS ou ser causador de estresse metabólico em vacas, devido a menor capacidade de metabolização hepática pela menor atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH) no fígado de ruminantes (KOVÁR et al., 1983; RAUN; KRISTENSEN, 2011). Vacas leiteiras não adaptadas a altas ingestões de 1-propanol podem ter uma baixa capacidade ruminal para fermentação deste composto e, também, podem ter uma menor capacidade de metabolização hepática de propanol absorvido para o sangue da veia porta, levando ao acúmulo de 1-propanol no sangue periférico com consequente estresse metabólico (RAUN; KRISTENSEN, 2011).

Raun e Kristensen (2012) avaliaram os efeitos metabólicos de 1-propanol e acetato de propila para vacas em lactação e observaram que a produção de gordura do leite diminuiu com adição de 1-propanol e acetato de propila em comparação com controle. No entanto, o CMS e a produção de leite não foram afetados pelos tratamentos. A captação portal de 1-propanol representou 48 a 61% do propanol ingerido e as concentrações de glicose plasmáticas foram aumentadas com os tratamentos. Segundo os autores, 1-propanol é intermediário importante no metabolismo ruminal de propilenoglicol para propionato e, por isso, a suplementação com 1-propanol aumentou a proporção molar de propionato no rúmen e a produção de glicose hepática.

Em trabalho realizado por Randby (2007) a adição de 200 g de 1-propanol na dieta de vacas leiteiras reduziu o CMS, porém a produção de leite não foi afetada. A inclusão de 1-propanol alterou a composição do leite, resultando em menores teores de proteína e gordura do que a dieta controle. Além disso, a qualidade organoléptica do leite foi alterada com a inclusão de 1-propanol.

Os trabalhos que estudaram o efeito do 1-propanol ou de outros compostos produzidos pela inoculação de silagens com *L. buchneri* sobre o desempenho de vacas leiteiras são ainda escassos na literatura e, no caso do 1-propanol eles ainda estão limitados a trabalhos publicados por Randby (2007) Kristensen et al. (2007) e Raun e Kristensen (2011, 2012).

3 OBJETIVOS E HIPÓTESE

3.1 Objetivo geral

Determinar a influência de *L. buchneri* e 1-propanol no valor nutritivo de silagens de milho para vacas leiteiras.

3.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade química, nutricional e a estabilidade aeróbia de silagens de milho inoculadas com *L. buchneri*.
- Avaliar o desempenho de vacas leiteiras alimentadas com silagens de milho suplementadas com 1-propanol ou inoculadas com *L. buchneri*.

3.2 Hipótese

Silagens de milho inoculadas com *L. buchneri* podem reduzir o CMS e o desempenho de vacas leiteiras. A maior concentração de 1-propanol encontrada em silagens inoculadas deve explicar, ao menos em parte, o menor consumo de MS causado pela inoculação com *L. buchneri*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ensilagem e tratamentos

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP). A cultura do milho (híbrido Agrocere AG 1051) foi implantada nas dependências do mesmo local e foi colhida com aproximadamente 35% de matéria seca. As plantas foram colhidas utilizando-se colhedora de uma linha acoplada ao trator. O equipamento foi regulado para tamanho teórico de 10 mm. Depois, a forragem foi compactada em silos tipo “bag” (1,5 m Ø × 60 m comprimento; Pacifil®) com capacidade de 40 toneladas.

No momento da ensilagem, dois tratamentos foram impostos: controle (C) e *L. buchneri* 1×10^5 ufc/g (LB). O inoculante microbiano contendo *L. buchneri* (cepa CNCM I - 4323-; Lallemand Animal Nutrition) foi diluído em água destilada (4 L/t) e aplicado de forma homogênea na forragem a ser ensilada por inoculador automático acoplado à embutidora (Mentamit). Houve o cuidado de adicionar à silagem controle somente água destilada, na mesma quantidade adicionada junto ao inoculante.

Amostras de forragem fresca foram coletadas e a composição bromatológica (Tabela 2) foi determinada a partir de amostras desidratadas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas. Após a secagem, as amostras foram moídas em moinho do tipo Willey em peneira com orifício de 1,0 mm. As concentrações de matéria seca a 105°C, matéria mineral (MM), e extrato etéreo (EE) foram determinadas conforme Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1990) e a concentração de proteína bruta (PB) segundo o método descrito por Wiles, Gray e Kissling (1998), por meio da combustão das amostras segundo o método de Dumas, utilizando-se auto-analisador de nitrogênio, marca LECO modelo FP-528. As concentrações de fibra em detergente neutro (FDN) foram analisadas conforme método proposto pela ANKON® Fiber Analyser (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY). Para análise do FDN foi utilizado amilase termoestável e sulfito de sódio.

O teor de carboidratos solúveis (CS) das silagens foi determinado em extrato alcoólico, pelo método Fenol-Sulfúrico (HALL, 2000). Para obtenção do extrato foi pesado 0,5 g de amostra seca e moída em peneira com orifício de 1,0 mm em balões tipo erlenmeyer e adicionou-se 100 mL de solução alcoólica (solução etanol 80%). As aberturas dos balões foram vedadas e em seguida foram submetidos a agitação durante 4 horas. Após o período de

agitação os extratos foram filtrados em papel Whatman N° 541 e armazenados em tubos do tipo *Eppendorf*® de 2,0 mL a -20°C. As leituras das amostras foram feitas em espectrofotômetro MARCONI® Janway 6305, com $\lambda=490$ nm e o açúcar utilizado como padrão foi a sacarose.

Tabela 2 – Características da forragem no momento da ensilagem

Item	Tratamentos	
	C	LB
MS, %MN	35,31	35,58
MM, %MS	4,37	4,51
PB, %MS	8,81	8,47
EE, %MS	3,35	3,59
FDN, %MS	51,50	52,30
CNF, %MS	31,97	31,13
CHO _{sol} , %MS	7,18	7,22

¹ MS: matéria seca; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDN: fibra em detergente neutro; CNF: carboidratos não fibrosos; CHO_{sol}: carboidratos solúveis

² C: silagem de milho controle; LB: silagem de milho inoculada com *L. buchneri* (1×10^5)

4.2 Avaliações dos silos

Decorridos 247 dias de armazenamento, os silos foram abertos e as silagens foram utilizadas para alimentação das vacas em lactação. Diariamente, eram realizadas retiradas de camadas de aproximadamente $40 \pm 2,8$ cm de espessura de silagem. Estas retiradas eram feitas manualmente nos períodos da manhã (06:00) e da tarde (16:00), para posterior mistura com os demais ingredientes da dieta e fornecimento aos animais.

Além das análises nas silagens descarregadas dos silos, também foram realizadas 3 avaliações (1 por período) nos painéis dos silos ao longo do experimento, imediatamente após a retirada das silagens para alimentação das vacas no período da manhã. Cinco pontos do painel foram definidos para aferição de temperatura com auxílio de termômetro de bulbo (Figura 6), sendo que os mesmos eram posicionados perpendicularmente em relação ao painel do silo a cerca de 10 cm de profundidade. Amostras de silagem foram utilizadas para elaboração de extrato aquoso segundo Kung (1996), em que 25 g de amostra foram processados em 225 mL de água destilada. O valor do pH do extrato de silagem foi medido por potenciômetro digital (DIGMED®- DM20). Após filtragem em papel Whatman® 54, a

amostra foi então centrifugada durante 15 minutos a $10.000\times g$. O extrato foi armazenado em tubos *ependorff* de 1,5 mL e, mantidos congelados a -20°C para posterior análise dos produtos de fermentação (acetona, acetato de etila, álcool isopropílico, etanol, acetato de propila, 2-butanol, 1-propanol, lactato de etila, ácido acético, 2,3-butanoldiol, ácido propiônico, ácido butírico, propilenoglicol, ácido iso-valérico, ácido valérico) utilizando-se cromatógrafo gasoso com detector de massas (GC-MS) (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), usando coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, USA, 60 m, 0,25 mm Ø, 0,25 µm crossbond carbowax polyethlylene glycol) e parâmetros analíticos conforme recomendação do fabricante. A determinação da concentração de ácido lático foi realizada por método colorimétrico, proposto por Pryce (1969). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro Janway 6305, com $\lambda=565$ nm.

O teor de nitrogênio amoniacal (N-NH_3) foi determinado por colorimetria, com base na metodologia descrita por Chaney e Marbach (1962), adaptada para amostras de silagens. Esta metodologia tem por base a reação da amônia presente nas amostras com soluções de hipoclorito e fenol, utiliza-se como catalizador o nitroprussiato diidratado, levando à formação de indofenol. A concentração de amônia é proporcional à absorbância de indofenol. A leitura das amostras foi realizada em leitor de microplacas Asys® Expert Plus, com filtro de 550 nm.

O teor CS das silagens foi determinado em extrato alcoólico, pelo método Fenol-Sulfúrico (HALL, 2000). Para obtenção do extrato foi quantificada 0,5 g de amostra seca e moída em peneira com orifício de 1,0 mm em balões tipo erlenmeyer e adicionou-se 100 mL de solução alcoólica (solução etanol 80%). As aberturas dos balões foram vedadas e em seguida foram submetidos a agitação durante 4 horas. Após o período de agitação os extratos foram pesados em papel Whatman N° 541 e armazenados em tubos do tipo *Eppendorf*® de 2,0 mL a -20°C . As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro MARCONI® Janway 6305, com $\lambda=490$ nm e o açúcar utilizado como padrão foi a sacarose.

Amostras de silagens também foram coletadas para contagem de microrganismos, sendo os extratos diluídos e filtrados em solução Ringer (decimal seriada, 10^{-2} a 10^{-6}). Em seguida foi realizado plaqueamento em profundidade (pour plate) para contagens de leveduras e fungos filamentosos em placas de Petri descartáveis contendo meio seletivo (Malt Extract Agar Base – Himedia®) que permaneceram em BOD com temperatura de 30°C . As contagens de leveduras e fungos foram efetuadas após 48 e 72 horas, respectivamente. Da mesma forma, para contagem de bactérias lácticas (BAL), foi realizado plaqueamento em profundidade (pour plate) em placas de Petri com meio seletivo (Lactobacilli MRS Agar - Acumedia®) que foram

colocadas em BOD em temperatura de 30°C por 48 horas. Após as incubações, os números de microrganismos nas placas com mais de 20 e menos de 300 colônias, foram contados como unidades formadoras de colônias (UFC) e expressos como logaritmo na base 10 (KUNG et al., 1984).

O ensaio de estabilidade aeróbia foi realizado em sala com controle da temperatura permitindo variação de $\pm 1^\circ\text{C}$ em relação a temperatura média. Amostras de 3 kg de silagens vindas dos silos bags, foram acomodadas em baldes plásticos abertos, sem que houvesse compactação da massa. Um sensor de temperatura “*datalogger*”, alocado no centro geométrico de cada balde foi calibrado para aferir a temperatura a cada 30 minutos. Com auxílio de programa computacional (Novus Produtos Eletrônicos Ltda) os dados foram recuperados ao final da avaliação. A estabilidade aeróbia foi avaliada quanto ao tempo necessário para atingir a variação de 2°C das silagens em relação à temperatura ambiente (KUNG; STOKES; LIN, 2003). Ainda com relação a estabilidade, calculou-se o acúmulo de temperatura aos 5 e 10 dias, a partir da diferença média diária entre a temperatura das silagens e a temperatura ambiente (expressa em °C).

Figura 6 - Painel do silo tipo “bag” destacando os cinco pontos de amostragem

4.3 Ensaio de lactação

Vinte e uma vacas Holandesas ($PV = 663 \pm 100$ kg), com média de 230 dias de lactação ao início do experimento foram alocadas aleatoriamente em sete Quadrados Latinos 3×3 , com períodos de 21 dias. Sete dias antes do início do experimento, os animais foram adaptados ao volumoso oferecido. Os animais foram alojados em confinamento do tipo *tie-stall* com sistema de arrefecimento (micro pulverizadores e ventiladores), bebedouro e cocho individuais, o qual permitiu o controle do consumo individual. A ordenha era realizada duas

vezes ao dia (06:00h e 17:00h). Após cada ordenha, os animais permaneciam em área com piso revestido por aproximadamente 1 hora.

O CMS e a produção de leite foram registrados entre os dias 15 e 21 de cada período experimental. As amostras de leite foram coletadas em quatro ordenhas e encaminhadas ao Laboratório de Análise de Leite, da Clínica do Leite do Departamento de Zootecnia da USP/ESALQ em Piracicaba – SP, para análise dos teores de proteína, gordura, lactose, sólidos totais, nitrogênio uréico e contagem de células somáticas. A excreção de energia líquida no leite (EL_L leite, Mcal/d) foi obtida multiplicando-se a produção de leite em (kg) pelo teor de energia líquida, calculado pela seguinte fórmula (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 2001): $EL_L \text{ leite (Mcal/kg)} = 0,0929 \% \text{gordura} + 0,0547 \times \% \text{proteína} + 0,0395 \times \% \text{lactose}$. Além disso, foi calculada a exigência de energia para manutenção [EL_L manutenção (Mcal/d) = $0,08 \times PV \ 0,75$] segundo (NRC, 2001). O CMS foi obtido por meio da diferença entre a quantidade de matéria seca fornecida e a de sobras, que foram coletadas e congeladas a -20°C para avaliação da composição químico-bromatológica.

As dietas experimentais continham (%MS): 8% de caroço de algodão, 9,5% de polpa cítrica, 18% de farelo de soja, 9% de milho moído seco, 2,5% premix mineral + vitaminas e 53% de uma das seguintes silagens de milho: controle (C) ou silagem de milho inoculada com *L.buchneri* na dose de 1×10^5 (LB) ou silagem controle + 1-propanol (PROP). O 1-propanol foi diluído em água (1:1) e aspergido na ração total imediatamente antes da oferta das refeições para obtenção de concentração na dieta de 1,0% na MS. A composição química das dietas experimentais estão apresentadas na tabela 3.

As silagens e os concentrados de cada tratamento foram misturados em vagão auto propelido (Super Callan, American Callan, USA) por período de 10 minutos. As rações foram fornecidas *ad libitum*, durante os períodos de ordenha (06:00 h e 17:00 h), sendo permitidas sobras de 10% do fornecido.

Amostras de silagens, concentrados e sobras foram analisadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP. As análises foram realizadas em amostras desidratadas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas para determinação do teor de MS. Após a moagem em moinho do tipo Willey em peneira com orifício de 1,0 mm, as concentrações de MS (105°C), MM, e EE foram determinadas conforme a Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1990) e a concentração de PB segundo os métodos descritos por Wiles, Gray e Kissling (1998), por meio da combustão das amostras segundo método de Dumas, utilizando-se auto analisador de nitrogênio, marca LECO modelo FP-528. As concentrações de FDN foram analisadas conforme método

proposto pela ANKON® Fiber Analyser (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY). Para análise de FDN foram utilizados amilase e sulfito de sódio. O teor de matéria orgânica (MO) foi calculado descontando o teor de MM do teor de MS. O teor de carboidratos não fibrosos (CNF) foi calculado como $100 - \text{MM} - \text{PB} - \text{FDN} - \text{EE}$ (NRC, 2001).

Tabela 3 – Composição química das dietas experimentais consumidas pelos animais

Item ¹	Tratamentos ²		
	C	LB	PROP
MS, %	43,30	43,20	43,80
PB, % MS	17,78	17,75	17,61
FDN, % MS	32,19	33,73	31,87
FDNi, % MS	14,14	14,78	14,00
EE, % MS	4,25	4,29	4,21
MM, % MS	5,38	5,66	5,32
CNF, % MS	40,40	38,57	41,00

¹ MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDNi: fibra em detergente neutro indigestível; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral; CNF: carboidrato não fibroso

² C= controle, LB = *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g e PROP = 1-propanol na dose 1,0% MS

Amostras de silagens, rações totais e sobras foram coletadas para determinação do tamanho de partículas, pelo método do “*Penn State Particle Size Separator*” (LAMMERS; BUCKMASTER; HEINRICHS, 1996). Dessa forma, foi obtido o material retido com diâmetro superior a 19 mm, entre 19 e 8 mm e inferior a 8 mm. O índice de seleção de partículas foi calculado como o consumo observado de cada fração retida em cada peneira expresso como porcentagem do consumo predito (% da matéria natural). A magnitude os valores relativos indicou recusa (<100%), ingestão preferencial (>100%) ou ausência de seleção (=100%) (LEONARDI; ARMENTANO, 2003).

Uma vez que as silagens oferecidas podiam apresentar alterações quanto à estabilidade em aerobiose e diferenças nas concentrações dos produtos de fermentação, foi realizada a avaliação do comportamento ingestivo dos animais com observações a cada 10 minutos e interpolação dos dados no período intermediário, computando atividades de ingestão, ruminação, ócio e ingestão de água (MAEKAWA et al., 2002).

A pesagem dos animais para avaliação do peso vivo em kg (PV) e variação no peso vivo foi realizada antes do início do experimento, no primeiro dia de cada período experimental e ao término do experimento.

Amostras de sangue foram coletadas no 18º dia dos períodos, por meio da punção dos vasos coccígeos medianos, duas horas após a alimentação da manhã (aproximadamente 09:00 h). A coleta foi realizada em tubos à vácuo contendo K₃ EDTA + fluoreto de sódio. O plasma foi separado por centrifugação (2.000 × g por 20 minutos) e submetido a análise de glicose realizada com base no uso do kit enzimático *Glicose HK Liquiform* (LABTEST Diagnostica S.A, Lagoa Santa, Mg, Brasil). A leitura das amostras foi realizada em leitor de microplacas Asys® Expert Plus, com filtro de 510 nm. Para determinação da concentração plasmática de AGNE, utilizou-se o kit Wako, NEFA C (kit nº 994-75409E®), que se baseia no método enzimático e leitura pela colorimetria, com comprimento de onda de 560 nm.

Amostras de fluido ruminal foram coletadas através de sonda esofágica flexível, conectada a uma bomba de vácuo. A coleta foi realizada no último dia do experimento duas horas após a alimentação. Amostras de aproximadamente 200 mL foram avaliadas quanto ao pH e congeladas a -20°C para posterior análise dos produtos de fermentação ruminal (acetato, propionato, butirato, propanol e propilenoglicol) utilizando-se cromatógrafo gasoso com detector de massas (GC-MS) (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), usando coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, USA, 60 m, 0,25 mm Ø, 0,25 µm crossbond carbowax polyethylene glycol) e parâmetros analíticos conforme recomendação do fabricante.

As taxas fracionais de desaparecimento de 1-propanol, ácido acético e etanol foram determinadas nas rações fornecidas tanto no período da manhã quanto da tarde. Para isso, aproximadamente 2,5 kg das rações foram alocadas em baldes próximos aos cochos das vacas. Temperaturas foram mensuradas a cada 30 minutos com auxílio de *data loggers* inseridos no centro geométrico da massa. Amostras foram coletadas em 0, 1, 2, 4, 8, 12 horas de exposição. Estas foram utilizadas para elaboração de extrato aquoso segundo Kung. Jr (1996), em que 25 g de amostra foram processados em 225 mL de água destilada. O valor do pH do extrato de silagem foi medido por potenciômetro digital (DIGMED®- DM20). Após filtragem em papel Whatman® 54, a amostra foi então centrifugada durante 15 minutos a 10.000×g. O extrato foi armazenado em tubos *ependorff* de 1,5 mL e, mantidos congelados a -20°C para posterior análise de 1-propanol, etanol e ácido acético, utilizando-se cromatógrafo gasoso com detector de massas (GC-MS) (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), usando coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, USA, 60 m, 0,25 mm Ø, 0,25 µm

crossbond carbowax polyethlylene glycol) e parâmetros analíticos conforme recomendação do fabricante.

A digestibilidade aparente no trato total foi determinada por meio de marcador interno, FDN indigestível (FDNi) (HUHTANEN; KAUSTELL; JAAKKOLA, 1994). Amostras dos ingredientes individuais e fezes secas e moídas a 1 mm foram alocadas em sacos para análise de fibra tipo ANKOM® Fiber Analyser, selados e incubados durante 288 horas, em vaca canulada em lactação recebendo dieta a base de silagem de milho (53%) e concentrado (8% de caroço de algodão, 9,5% de polpa cítrica, 18% de farelo de soja, 9% de milho moído seco, 2,5% premix mineral + vitaminas). Após esse procedimento, os sacos foram levados ao laboratório, onde foram submetidos a análise de FDN, seguindo recomendações propostas pela ANKOM® FiberAnalyser (ANKOM Technology Corporation, Faiport, NY), sendo utilizado sulfito de sódio e amilase termoestável.

4.4 Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelo procedimento Mixed do SAS (2003), utilizando-se o seguinte modelo:

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_{j(i)} + \gamma_k + \delta_l + \varepsilon_{ijkl}$$

Onde:

μ = média geral;

α_i = efeito fixo de Quadrado Latino ($i = 1$ a 7);

$\beta_{j(i)}$ = efeito aleatório de vaca dentro de Quadrado Latino ($j = 1$ a 21);

γ_k = efeito fixo de período ($k = 1$ a 3);

δ_l = efeito fixo de dieta ($l = C, LB$ or $PROP$);

ε_{ijkl} = resíduo.

As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey-Kramer ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da silagem

Ao observar-se o perfil fermentativo das silagens (Tabela 4), pode-se perceber que, a silagem de milho inoculada com *L.buchneri* na dose de 1×10^5 ufc/g apresentou maior contagem de bactérias lácticas (BAL) em comparação com a silagem controle. Porém, esta maior contagem não influenciou o perfil fermentativo, já que para as demais variáveis, não houve diferença entre a silagem com inoculante e a silagem sem inoculante (controle).

Tabela 4 – Perfil fermentativo e microbiologia de silagem de milho controle ou inoculada com *L. buchneri*

Item ¹	Tratamentos ²		EPM	P
	C	LB		
MS, %	33,58	33,96	0,56	0,51
MScorr, %	35,31	35,58	0,78	0,63
CS, % MS	3,29	2,63	0,23	0,13
pH	3,85	3,80	0,04	0,46
N-NH ₃ /N total, %	8,44	7,54	0,32	0,14
Temperatura média, °C	29,25	28,87	0,17	0,21
Taxa de retirada, cm/d	0,43	0,40	0,01	0,08
Densidade, kg MV/m ³	422	391	14,4	0,23
BAL, log ufc/g	5,89	6,33	0,06	0,02
Leveduras, log ufc/g	3,38	3,39	0,04	0,83
Fungos, log ufc/g	2,74	2,35	0,39	0,55

¹MS: matéria seca; MScorr: matéria seca corrigida para compostos voláteis; CS: carboidrato solúvel; BAL: bactérias lácticas

²C: controle; LB: *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g

Driehuis, Van Wikselaar e Oude Elferink (1999b) também encontraram maiores contagens de BAL em silagens de milho inoculadas com *L.buchneri* na dose de 1×10^5 ufc/g, tanto para silos laboratoriais quanto para silos de fazendas. Os autores também observaram que o pH das silagens inoculadas foi maior, indicando que os produtos de fermentação do

L.buchneri, como o ácido acético, são menos eficientes em baixar o pH quando comparados ao ácido láctico produzido pelas BAL homofermentativas. No presente trabalho, tanto a produção de ácido láctico (Tabela 5), quanto o pH não foram modificados com a adição de inoculante.

Tabela 5 – Produtos de fermentação de silagem de milho controle ou inoculada com *L. buchneri*

Item	Tratamentos ¹		EPM	P
	C	LB		
Ác. láctico, % MScorr	3,27	3,33	0,52	0,91
Ác. acético, % MScorr	1,30	1,38	0,40	0,54
Ác. propiônico, % MScorr	0,89	0,90	0,23	0,86
Ác. butírico, % MScorr	0,69	0,69	0,14	0,86
1,2-propanodiol, % MScorr	0,68	0,78	0,19	0,69
Etanol, % MScorr	0,35	0,50	0,09	0,34
2,3-Butanodiol, % MScorr	0,12	0,09	0,10	0,34
1- propanol, % MScorr	0,06	0,10	0,03	0,38
Ác. valérico, mg/kg MScorr	652	657	128	0,93
Ác. iso-valérico, mg/kg MScorr	491	492	85	0,98
Álcool isopropílico, mg/kg MScorr	36	49	15	0,65
Lactato de etila, mg/kg MScorr	23	38	10	0,21
Acetato de etila, mg/kg MScorr	12	32	7	0,14
Butanol, mg/kg MScorr	5	11	4	0,14
Acetato de propila, mg/kg MScorr	2	6	1	0,14

¹C= controle e LB = *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g

Filya, Karabulut e Sucu (2002), não encontraram diferenças entre as contagens de BAL em silagens de milho controle ou inoculadas com *L.buchneri* na dose de 1×10^6 e, também os valores de pH não foram diferentes. Segundo os autores, a silagem inoculada apresentou maiores concentrações de ácido acético e menores concentrações de ácido láctico.

Trabalhos como o Driehuis, Van Wikselaar e Oude Elferink (1999b) e Nishino et al. (2004) relatam menores concentrações de ácido láctico em silagens de milho inoculadas com *L.buchneri*, sendo o mesmo encontrado para outros tipos de silagens por Taylor et al. (2002) (cevada) e Kung, Stokes e Lin (2003) (alfafa). Isto ocorre devido a rota fermentativa das BAL heterofermentativas não terem como único produto o ácido láctico mas, também ácido acético, dióxido de carbono e água (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Além disso, *L. buchneri* é capaz de utilizar o ácido láctico, transformando-o em ácido acético, 1,2 - propanodiol e traços de etanol, auxiliando para menores concentrações de ácido láctico nas silagens e o maior pH encontrado (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991; ROTZ; MUCK, 1994).

O principal objetivo da inoculação com *L.buchneri* consiste na melhoria da estabilidade aeróbia e preservação dos nutrientes conservados durante o processo de fermentação. Por isso, ao realizar-se a inoculação com esta bactéria heterofermentativa, normalmente não se esperam melhorias fermentativas, devido a rota metabólica e, conseqüentemente, aos produtos de fermentação formados por este microrganismos.

Em relação às características de fermentação das silagens (Tabela 5), ambos os tratamentos foram muito semelhantes e, houve pouca eficiência no processo de fermentação, uma vez que os valores de ácido butírico encontrados são preocupantes por serem indicativos da presença de clostrídios em algum momento da fermentação e, podem explicar as concentrações de nitrogênio amoniacal encontradas. Segundo (PAHLOW et al., 2003) as bactérias do gênero *Clostridium* são capazes de fermentar carboidratos ou ácido láctico a ácido butírico, CO_2 e H_2O ou, utilizar proteínas ou aminoácidos produzindo, NH_3 , aminas biogênicas, CO_2 , entre outros. Vale ressaltar que, os valores de pH final das silagens foram suficientemente baixos para garantir o controle deste tipo de microrganismo, podendo estes estarem na forma de esporos nesta fase.

No trabalho de Filya (2003), silagens de milho inoculadas com *L.buchneri* apresentaram maiores teores de NH_3 e maiores perdas de MS que as silagens controle ou associada com *L. plantarum*. Driehuis, Oude Elferink e Van Wikselaar (2001) também relataram aumento na concentração de NH_3 em silagens de milho inoculadas com *L. buchneri*. Segundo os autores este resultado está associado com o aumento do pH durante o

armazenamento como resultado da elevada atividade metabólica de *L. buchneri* nestas silagens, que além de produzir ácidos mais fracos, metaboliza o ácido lático em outros compostos.

Ao observar-se as características inerentes a estabilidade aeróbia das silagens (Tabela 6), o único parâmetro alterado com a inoculação foi a menor temperatura máxima encontrada na silagem com *L. buchneri* com relação a silagem controle. No entanto, embora as silagens inoculadas tenham apresentado menor temperatura máxima, a estabilidade aeróbia destas silagens foi apenas 8,64 horas maior do que a controle e não foi significativa. Isto pode ser explicado pela contagem de leveduras, que são os principais microrganismos relacionados ao processo de deterioração de silagens, ter sido semelhante para ambas as silagens.

Kleinschmit e Kung (2006b) avaliaram o efeito da inoculação de milho planta inteira no momento da colheita com *L. buchneri* na dose 4×10^5 ufc/g de forragem fresca e, embora tenham encontrado maiores concentrações de ácido acético e contagem inferior de leveduras nas silagens inoculadas em 42, 56, 70 e 282 dias de ensilagem, a inoculação não foi consistente em melhorar a estabilidade aeróbia. Segundo os autores, isto sugere que outros microrganismos podem ter sido responsáveis pela instabilidade aeróbia destas silagens.

Tabela 6 – Estabilidade aeróbia de silagem de milho inoculada com *L. buchneri* ou acrescida de 1-propanol

Item ¹	Tratamentos ²				P ³
	C	LB	PROP	EPM	
EA, h	15,82	24,46	18,87	3,35	0,12
Temp. acum. 5d, °C	64,09	54,76	61,57	5,47	0,35
Temp. acum. 10d, °C	112,63	105,55	109,18	3,30	0,21
Temp. máxima, °C	47,57 ^a	45,65 ^b	45,53 ^b	0,49	<0,01
Tempo máxima, h	103,86	79,27	87,06	15,84	0,41

¹ EA: estabilidade aeróbia; Temp. acum. 5d: temperatura acumulada em 5 dias; Temp. acum. 10d: temperatura acumulada em 10 dias; Temp. máxima: Temperatura máxima; Tempo máxima: Tempo para atingir a temperatura máxima

²C= controle, LB = *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g e PROP = 1-propanol na dose 1,0% MS

³Médias seguidas de letras distintas na linha, diferem pelo ajuste de Tukey-Kramer a 0,05 de probabilidade.

A melhoria da estabilidade aeróbia de silagens de milho inoculadas com *L. buchneri* foi encontrada em trabalhos como o de Nishino et al. (2004), Muck (2004), Weinberg et al. (2002), Filya, Sucu e Karabulut (2006) Hu et al. (2009). Na maioria destes trabalhos a dose

de aplicação foi maior do que a aplicada no presente trabalho. Esta pode ser uma explicação plausível para os resultados encontrados, pois a melhora de parâmetros como a estabilidade aeróbia e as temperaturas acumuladas foram consideradas discretas com relação a silagem controle. Ao analisarmos a meta-análise realizada no presente experimento, podemos perceber que, existe uma alta variabilidade nas respostas para a concentração de ácido acético (Figura 1) e estabilidade aeróbia (Figura 2) de silagens inoculadas com até 200.000 ufc/g de *L.buchneri*, demonstrando que a inoculação até esta dose, não é consistente em melhorar a estabilidade aeróbia de silagens de milho.

A ação de *L. buchneri* para melhorar a estabilidade aeróbia de silagens esta relacionada principalmente a aumentos na concentração de ácido acético com consequente redução no número de leveduras (MUCK, 1996; WEINBERG et al., 1999; KUNG; RANJIT, 2001). Isto ocorre porque os ácidos fracos, como o ácido acético, são capazes de reduzir o crescimento ou até mesmo provocar a morte de leveduras por estenderem a fase lag e reduzirem a produção de células novas, uma vez que há inibição da respiração e do transporte ativo (DAVIDSON, 1997).

Na maioria dos trabalhos em que melhorias na estabilidade aeróbia foram alcançadas com a inoculação de *L.buchneri* também foram observados aumentos na concentração de ácido acético e redução na contagem de leveduras destas silagens. No trabalho de Schmidt e Kung (2010) silagens de milho inoculadas com *L.buchneri* na dose de 4×10^5 ufc/g apresentaram contagens de leveduras inferiores a silagem controle (2,42 e 4,39 log ufc/g, respectivamente), maiores concentrações de ácido acético (1,95 e 1,23 % MS, respectivamente) e aumento no tempo de estabilidade aeróbia (136 e 44 horas, respectivamente).

Como mencionado anteriormente, no presente trabalho não foram encontrados resultados significativos para melhoria na estabilidade aeróbia nas silagens inoculadas com *L.buchneri*, assim como o número de leveduras não diferiu da silagem controle. Isto pode ser explicado pelas concentrações de ácido acético entre a silagem inoculada e a controle também não terem sido diferentes (Tabela 5). Assim como no presente trabalho, Kleinschmit, Schmidt e Kung (2005), não observaram diferenças para silagens de milho controle e inoculadas com *L.buchneri* na dose de 1×10^5 ufc/g em relação a concentração de ácido acético (2,19 e 2,47 % MS, respectivamente), contagem de leveduras (4,43 e 3,70 log ufc/g, respectivamente) e estabilidade aeróbia (39 e 45 horas, respectivamente).

Além da dose aplicada, reações de esterificação ocorridas naturalmente em silagens podem explicar em parte, os baixos teores de ácido acético encontrados nesse estudo para as silagens inoculadas. A formação de acetato de etila a partir do etanol e ácido acético e a

formação de acetato de propila, a partir do 1-propanol e ácido acético são drenos espontâneos da silagem, devendo-se ressaltar que tais ésteres foram numericamente aumentados com a inoculação (Tabela 5).

Kleinschmit e Kung (2006a) realizaram meta-análise sobre os efeitos de *L. buchneri* na qualidade de silagens. Os trabalhos foram estratificados por cultura e dose de aplicação em controle, ≤ 100.000 ufc/g e > 100.000 ufc/g de forragem). Para a silagem de milho, o pH foi aumentado com a dose de inoculação (3,7; 3,75 e 3,88, respectivamente) ao passo que os teores de ácido láctico (6,59; 5,87 e 4,79 % da MS) e a população de leveduras das silagens (4,18; 3,10 e 1,88 ufc/g) apresentaram comportamento inverso. Os teores de ácido acético foram aumentados, com médias de 2,18; 2,63 e 3,89 % da MS, respectivamente. Em geral, as melhores respostas foram obtidas para doses de inoculação superiores a 100.000 ufc/g.

Além da fermentação de carboidratos solúveis, o *L. buchneri* é capaz de converter ácido láctico em ácido acético e 1,2-propanodiol. O 1,2-propanodiol pode ser convertido à ácido propiônico e 1-propanol (OUDE ELFERINK et al., 2001). O ácido propiônico apresenta ação semelhante ao do ácido acético contra leveduras e, portanto pode também ser eficiente na melhoria da estabilidade aeróbia de silagens. No presente trabalho, a concentração de ácido propiônico não foi diferente entre os tratamentos e, isto pode também ter influenciado a falta de melhoria na estabilidade aeróbia da silagem inoculada. Embora no presente trabalho, as concentrações dos outros produtos de fermentação do *L. buchneri* (1-propanol e 1,2-propanodiol) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, a silagem inoculada apresentou numericamente maior concentração de 1-propanol e 1,2-propanodiol.

Nos trabalhos de Nishino et al. (2002), Driehuis, Van Wikselaar e Oude Elferink (1999b) maiores concentrações de 1,2-propanodiol foram encontradas em silagens inoculadas com *L. buchneri*. Kleinshmitt et al. (2013) observaram concentrações crescentes de 1-propanol nas silagens à medida que a dose do inoculante a base de *L. buchneri* foi aumentada, com médias de 3,73; 4,83; 9,28 e 9,13 g/kg MS, respectivamente, para os tratamentos controle, 1×10^5 ufc/g, 5×10^5 ufc/g e 1×10^6 ufc/g. Da mesma forma, Wu-tai, Driehuis e Wikselaar (2002) encontraram maiores concentrações de 1-propanol para a silagem inoculada com *L. buchneri* na dose de 1×10^6 ufc/g em relação a silagem controle, com valores de 6,72 e 16,7 g/kg de MS para a silagem controle e inoculada, respectivamente.

Tabacco et al. (2011) não observaram diferenças para as concentrações de ácido acético e 1,2-propanodiol entre as silagens de milho de fazendas com ou sem inoculação com *L. buchneri* (dose de 1×10^5 ufc/g). Segundo os autores, silagens não inoculadas e estocadas por período superior à 200 dias podem apresentar desenvolvimento de bactérias epifíticas de

L.buchneri. Essas convertem anaerobicamente o ácido láctico para ácido acético e 1,2-propanodiol e, portanto podem apresentar semelhança nas concentrações destes produtos com silagens inoculadas com doses menores. Como relatado por Oude Elferink et al. (2001), a presença de 1,2-propanodiol em silagens de milho não inoculadas é consistente com os dados reportados por Kleinschmit e Kung (2006b), que encontraram este composto após 361 dias de conservação em silagens controle e, por Kristensen et al. (2010), que relataram valores de 1,2-propanodiol variando de 0,10 a 0,14% da MS para o mesmo tipo de silagens ensiladas por 3-11 meses.

Maiores concentrações de ácido propiônico têm sido encontradas em diversos trabalhos que utilizaram *L.buchneri* como inoculante em silagens de milho. Driehuis, Oude Elferink e Spoelstra (1999a) avaliaram silagens de milho inoculadas com *L.buchneri* na dose de 4×10^4 ufc/g aos 14, 98 e 106 dias de ensilagem e observaram maiores concentrações de ácido propiônico e 1-propanol para as silagens inoculadas com 98 e 106 dias, sendo que com 14 dias de ensilagem estes produtos não foram detectados tanto para silagem controle quanto para a inoculada. Segundo Schmidt et al. (2009) embora, *L. buchneri* possa ser detectado por técnicas de biologia molecular com apenas dois dias de ensilagem, durante a fase inicial de fermentação, *L. buchneri* gera energia por meio da fermentação de açúcares simples semelhante a outras bactérias heteroláticas, o que resulta em um aumento em seu número. Porém, na fase posterior de ensilagem, este microrganismo é induzido pelo pH baixo a fermentar ácido láctico sob condições anaeróbicas, mas este é um processo lento, e produz baixas quantidades de energia (OUDE ELFERINK et al., 2001). Por conseguinte, o aumento na concentração dos produtos finais dessa via metabólica (ácido acético e 1,2-propanodiol) são observadas após tempos prolongados de estocagem (>45 dias de armazenamento) (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOLESTRA 1999a; KLEINSCHMIT; KUNG, 2006b).

Kristensen et al. (2010) trabalharam com inoculante comercial a base de *L. buchneri*, na dose 3×10^5 ufc/g, em treze fazendas dinamarquesas e coletaram amostras de silagens em três períodos do ano. Os teores de 1-propanol nas silagens controle e tratadas respectivamente, foram, em janeiro: 0,07 vs 0,24 % MS; em abril: 0,06 vs 0,49 % MS e em agosto: 0,20 vs 0,71% MS. Os autores ressaltaram ainda, a alta correlação existente entre os teores do éster acetato de propila ($r = 0.86$, $r = 0.93$, e $r = 0.98$; $P < 0.01$) com os conteúdos de ácido acético, ácido propiônico e 1-propanol das silagens.

5.2 Perda de compostos voláteis das rações experimentais

Os produtos de fermentação produzidos durante a fermentação das silagens podem ser perdidos tanto, durante a estocagem, quanto, após a abertura dos silos. A maior perda destes compostos se dá após o silo ser aberto para alimentação dos animais, em que ocorre a exposição da silagem ao oxigênio. Estes compostos podem ser perdidos por volatilização (MITLOEHNER et al., 2009) ou ainda, podem ser oxidados por microrganismos aeróbicos (SPOELSTRA et al., 1988). Porém, trabalhos como o de Daniel et al. (2013) já demonstraram que estes compostos podem ser importantes fontes de energia para os animais. No trabalho destes autores, a suplementação com etanol (3,20 % MS) aumentou a ingestão de matéria seca e a produção de leite das vacas. Sendo assim, se torna importante a avaliação da taxa de desaparecimento destes compostos durante a alimentação dos animais, para estimativa das perdas de nutrientes ocorridas.

No presente estudo foram avaliadas as taxas fracionais de desaparecimento do ácido acético, etanol e 1-propanol nas rações experimentais (Tabela 7). Quanto aos fatores potencializadores desses processos, ressalta-se que os três compostos avaliados apresentam volatilidade próxima a 100% quando a silagem de milho passa por secagem em estufa a 105°C (WEISSBACH et al., 2009). Nas condições práticas de utilização das rações, variáveis climáticas como temperatura, umidade relativa do ar e velocidade dos ventos assumem importância por influenciarem a velocidade de perda dos compostos.

Tabela 7 – Taxa fracional de desaparecimento de compostos voláteis (%/h) de rações contendo silagem de milho inoculada com *L. buchneri* ou enriquecidas com 1-propanol

Item	Manhã ¹			Tarde ¹				P ³		
	C ²	LB1 ²	PROP ²	C	LB1	PROP	EPM	T	H	T×H
Etanol	5,32	6,15	4,59	5,91	4,83	4,33	0,46	0,15	0,50	0,34
Ácido acético	-1,01	1,07	0,46	0,64	-0,01	0,24	0,57	0,54	0,81	0,22
Propanol	4,93	3,61	2,71	4,22	4,33	3,98	0,39	0,26	0,49	0,37

¹ Manhã = horário de fornecimento do trato às 07:00hs, Tarde = horário de fornecimento do trato às 17:00hs

² C= controle, LB = *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g e PROP = 1-propanol na dose 1,0% MS

³ T= efeito de tratamento, H = efeito de horário, T×H = interação entre tratamento e horário

Na Figura 7 estão apresentadas as médias de temperatura, umidade relativa do ar e velocidade dos ventos dos dias em que foram feitas as avaliações das rações experimentais, com o início da tomada de dados nos períodos da manhã e da tarde. Trata-se de dias típicos do verão tropical, com temperaturas elevadas, o que favorece o metabolismo microbiano. Além disso, em dias mais quentes a perda de umidade dos ingredientes da ração é acelerada e, juntamente com a água, a volatilização de compostos orgânicos é favorecida. Essa emissão de água e compostos orgânicos voláteis pode ser regulada ainda pelo teor de umidade do ar. A velocidade dos ventos, por sua vez, atua sobre a volatilização uma vez que o extrato subsuperficial da ração é saturado de compostos voláteis e, sob ação de varredura dos ventos cria-se um gradiente de concentração, de modo a favorecer a saída de compostos da porção mais interna do monte de ração para a área superficial.

Nos estudos de Chung et al. (2010) e Alanis et al. (2010) as emissões de compostos orgânicos voláteis (COV) em geral e de ácido acético, foram aumentadas no verão em relação ao inverno. Sob condições controladas, a emissão de etanol foi aumentada em função de maiores temperaturas e velocidades do ar, segundo Montes et al., (2010).

Além de fatores climáticos, o pH também influencia a taxa de desaparecimento de compostos, sendo que, o pK_a das substâncias e o pH do meio definem a dissociação das moléculas e, portanto, quanto menor o pH, maior será a taxa de volatilização de ácidos, pois estes estarão na forma não dissociada (ATKINS, 1994).

A taxa de desaparecimento do etanol, ácido acético e 1-propanol não foram influenciadas pelos tratamentos ou horários de avaliação. Ao observar-se a taxa de volatilização do etanol e comparar-se com a do 1-propanol pode-se observar que a do primeiro álcool foi superior a do segundo. A taxa de volatilização é definida pela pressão de vapor, que depende da temperatura do meio e do tipo de substância. Pressão de vapor maior faz com que uma maior quantidade de moléculas sejam liberadas (ATKINS, 1994). Isto pode explicar o resultado obtido, já que a pressão de vapor do etanol é de 44 mm Hg a 20°C e a do propanol é de 15 mm Hg a 20°C.

Em todos os tratamentos, as taxas de desaparecimento líquido de ácido acético foram próximas de zero, o que não significa que não houve volatilização. Provavelmente, a atuação de bactérias aeróbias do gênero *Acetobacter*, capazes de oxidar etanol a ácido acético (SPOELSTRA et al., 1988) contrapuzeram o efeito de perda de ácido acético por volatilização. Essa produção suplementar de ácido acético pode inclusive suprimir o

crescimento de leveduras no início da deterioração aeróbia, devido ao reconhecido poder antifúngico do ácido acético (MOON, 1983).

Figura 7 - Valores médios de temperatura, umidade relativa do ar e velocidades dos ventos registrados no período de coletas das rações contendo silagem de milho inoculada com *L. buchneri* ou enriquecida com 1- propanol, nos períodos da manhã (A) e tarde (B).

Quanto ao 1-propanol, novamente não houve influência dos tratamentos ou horário de avaliação. Provavelmente sua volatilização foi mais lenta do que aquela do etanol por tratar-se de uma molécula de três carbonos (maior massa molar) e, portanto, menos volátil, como mencionado anteriormente.

Daniel et al. (2013) também avaliaram a taxa de desaparecimento de etanol e ácido acético e, observaram que a ração oferecida aos animais no período da manhã apresentou taxa maior de perda de etanol e tendência de maior perda de ácido acético do que a ração oferecida do período da noite. Segundo os autores, possivelmente devido a temperatura mais elevada durante o dia do que a noite (29,9 ° C durante o dia e 22,4 ° C durante a noite), já que a temperatura altera a cinética das moléculas e a pressão de vapor. No trabalho dos autores, quando consideradas as taxas de desaparecimento e o comportamento alimentar dos animais, estimou-se que mais de 90% dos produtos de fermentação que estiveram disponíveis no cocho foram realmente consumidos pelas vacas.

5.3 Desempenho dos animais

Não foram observadas alterações no desempenho das vacas leiteiras para os diferentes tratamentos (Tabela 8). O CMS não foi alterado devido a inoculação com *L.buchneri* na dose de 1×10^5 ufc/g MV forragem ou pela suplementação com 1-propanol na dose de 1% da MS da dieta. Ressalta-se que as dietas podem ser consideradas desafiadoras, uma vez que a inclusão de silagem de milho na ração total foi considerável (53% da MS), os teores naturais de 1-propanol das silagens foram baixos ($\leq 0,1\%$, MS, Tab. 5) em comparação à dose aplicada na dieta teste (1% da MS), além dos teores de ácido acético terem sido semelhantes e baixos nas silagens ($< 1,5\%$, MS), o que evita confundimentos e permite concluir que de fato a adição de 1-propanol não modificou o desempenho dos animais.

A similaridade no CMS pode explicar, em parte, as semelhanças nas produções de leite (média 30,58 kg/dia) e de leite corrigido para 3,5% de gordura (média 30,69 kg/dia). Kristensen et al. (2007) não observaram variações no CMS e produções de leite trabalhando com 53% de inclusão de silagem de milho em dietas para vacas leiteiras primíparas canuladas. O 1-propanol (proveniente da silagem) representava 0,6% da MS da ração total e o consumo das vacas foi restrito a 17 kg/dia. Os autores constataram que a presença do 1-propanol não foi suficiente para alterar o metabolismo esplâncnico ou saturar as vias hepáticas de metabolização do álcool. Em estudo posterior foi utilizada alta dose suplementar de propanol (1,4%, base na MS) para vacas em período de transição (n=8), com fornecimento iniciado a

partir do parto. O CMS e as produções de leite foram aumentados ao longo dos dias em lactação, porém, sem efeito do tratamento, o que permitiu concluir que vacas em transição têm capacidade de metabolizar altas concentrações de alcoóis primários, mesmo quando fornecidos abruptamente (RAUN; KRISTENSEN, 2011).

Raun e Kristensen (2012) utilizaram dose de 1-propanol (5%, base na MS) não usual em silagens para desafiar vacas leiteiras multíparas (n=3) e não obtiveram alterações em CMS, produção e composição do leite, exceto para o teor de gordura, que foi menor na suplementação com 1-propanol. Deve-se destacar que os trabalhos citados tinham como foco o metabolismo animal, trabalhando, portanto com número reduzido de animais. Esse fato inclusive motivou a condução do presente experimento, a fim de medir a influência do 1-propanol em condições de rebanhos mais numerosos e com consumo e potencial de produção maiores.

Com relação ao efeito da inoculação da silagem de milho com *L. buchneri* sobre o desempenho de vacas leiteiras, os trabalhos são divergentes devido a dose de aplicação e a concentração de ácido acético produzida. Kristensen et al. (2010) realizaram pesquisa em 39 fazendas na Dinamarca e encontraram que a digestibilidade *in vitro* da MS das silagens inoculadas com *L.buchneri* na dose de 3×10^5 ufc/g e sem inoculação não diferiram e, também não houve diferenças na produção de leite com média de $30,7 \pm 0,5$ kg/d nos dias de teste durante o estudo (janeiro a setembro de 2009).

Porém, Kleinshmitt et al. (2013) utilizaram silagem de milho como volumoso único (53%, base MS) para vacas leiteiras de alta produção e testaram as seguintes doses de *L.buchneri*: 1×10^5 ufc/g, 5×10^5 ufc/g e 1×10^6 ufc/g. O CMS apresentou tendência de redução, com médias de 25,63 kg/d para silagem não tratada; 25,11 kg/d para 1×10^5 ; 25,28 kg/d para 5×10^5 e 24,57 kg/d para 1×10^6 ufc/g, respectivamente. Consequentemente, a inoculação resultou em decréscimos na produção de leite corrigida para 3,5% de gordura, cujas médias foram: 36,43; 34,01; 34,79; 33,69 kg/d, respectivamente. Vale ressaltar, que as concentrações de ácido acético encontradas nas silagens inoculadas foram mais altas que as encontradas no presente experimento e, podem explicar a queda no CMS e produção de leite naquela ocasião. As concentrações de ácido acético (% MS) para a silagem controle foi de 2,85 %, para a silagem inoculada com dose de 1×10^5 foi de 4,0%, para a dose de 5×10^5 foi de 4,44% e 1×10^6 : 4,80%.

Kung et al. (2003) conduziram ensaio de lactação com vacas Holandesas de alta produção (39 kg/d), que receberam silagem de alfafa sem inoculante e inoculada com *L.buchneri* na dose de 4×10^5 ufc/g. As silagens foram avaliadas quanto ao teor de ácido acético e

apresentaram médias de 3,35 % MS para a silagem controle e 5,67% MS para a silagem inoculada. O CMS e a composição do leite não foram afetados pelo tratamento, mas vacas alimentadas com silagem tratada com *L. buchneri* produziram 0,8 kg a mais leite do que os animais alimentados com silagem não tratada. A dieta dos animais era composta de (% MS) 32% de silagem controle ou inoculada, 11% de silagem de milho, 5% feno de alfafa picado e 52% de concentrado. Neste trabalho, mesmo com concentração mais alta de ácido acético (5,67 % MS) o CMS não foi afetado pela inoculação, porém, a inclusão de silagem tratada com *L.buchneri* foi de somente 32% (% MS da dieta), não sendo a única fonte de volumoso da dieta dos animais, fato que deve ser considerado na análise global da resposta.

Tabela 8 – Desempenho de vacas leiteiras alimentadas com dietas a base de silagem de milho inoculada com *L. buchneri* ou acrescidas de 1-propanol

Item ¹	Tratamentos ²			EPM	P
	C	LB	PROP		
CMS, kg/d	20,77	20,20	19,96	0,52	0,29
Leite, kg/d	31,13	30,41	30,20	0,92	0,34
Leite 3,5%G, kg/d	31,15	30,44	30,48	1,03	0,72
Gordura, %	3,53	3,53	3,61	0,11	0,75
Gordura, kg	0,16	0,11	0,14	0,02	0,48
Proteína, %	3,38	3,31	3,40	0,12	0,86
Proteína, kg	1,04	1,00	1,02	0,05	0,81
Lactose, %	4,58	4,59	4,49	0,05	0,27
Caseína, %	2,69	2,50	2,60	0,11	0,43
Sólidos Totais, %	12,53	12,12	12,59	0,17	0,09
ESD, %	8,98	8,93	8,84	0,11	0,64
CCS, x1000/mL	158,82	98,94	206,41	40,65	0,15
N-uréico, mg/dL	11,42	12,12	12,22	0,54	0,39
AGL, mmol/10 L	2,19	1,84	1,51	0,28	0,19
EL _{leite} , Mcal/kg	0,69	0,69	0,69	0,01	0,99
EL _{leiteL} , Mcal/d	21,59	21,00	20,42	0,88	0,43
EL _L /CMS	1,03	1,06	1,03	0,04	0,70
pH leite	6,66	6,66	6,66	0,008	0,97

¹ CMS: consumo de matéria seca; Leite 3,5%G: produção de leite corrigida para 3,5% de gordura; ESD: extrato seco desengordurado; CCS: contagem de células somáticas; Log CCS: Log de contagem de células somáticas; N-uréico: nitrogênio uréico; AGL: ácido graxo livre; EL_{leite}: energia líquida no leite

² C= controle, LB = *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g e PROP = 1-propanol na dose 1% MS

Taylor et al. (2002) também testaram o desempenho de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo silagem de cevada inoculada com *L. buchneri* na dose de 4×10^5 ufc/g. O CMS (18,6 kg/d), a produção de leite (25,7 kg/d), e composição do leite não diferiram entre os tratamentos. A dieta dos animais era formada de 18% (com base na MS) de silagem de cevada, 17% de silagem de cevada inoculada com *L. buchneri*, 15% de silagem de milho, e

50% de concentrado. Da mesma forma que no experimento descrito anteriormente, a inclusão de silagem inoculada foi baixa (17% da MS) e não representou a única fonte de volumoso da dieta, o que pode ter atribuído efeito de diluição na concentração de ácido acético.

Driehuis, Van Wikselaar e Oude Elferink (1999b) realizaram experimento com vacas leiteiras recebendo 33% na MS de silagem de milho inoculada com a dose de 1×10^5 ufc/g ou silagem de milho controle e, não observaram diferenças para CMS, produção e composição do leite para os teores de gordura e proteína, apesar das concentrações de ácido acético encontradas serem diferentes para a silagem controle e inoculada (1,22% e 1,85%, respectivamente). No presente experimento, a proporção de silagem inoculada e controle foi maior (53% MS) e, também não foram encontradas diferenças de desempenho. As concentrações de ácido acético foram de 1,30 e 1,38% para silagem controle e inoculada, respectivamente e, por terem sido baixas, não foram suficientes para influenciar o desempenho dos animais.

Trabalhos que relatam redução no CMS ou alteração no comportamento ingestivo de animais encontraram estas respostas com concentrações maiores de ácido acético adicionadas à dietas dos animais do que as encontradas no presente experimento. Assim por exemplo, Daniel et al. (2013), alimentaram vacas leiteiras com dietas a base de feno de tifton com inclusão de ácido acético de 4,26 % da MS, após descontadas as perdas na aplicação. Na primeira semana experimental, o ácido acético foi fornecido em metade da dose. A partir da 2ª semana de avaliação (início da aplicação da dose total), o ácido acético deprimiu o consumo de ração em relação ao tratamento controle. Após a terceira semana o consumo de MS foi recuperado, demonstrando adaptação dos animais. O CMS das dietas contendo ácido acético foi inferior no período de 4 horas após o arraçoamento matinal. Segundo os autores, a taxa de volatilização elevada do ácido acético pode ter levado a recusa pelo olfato e, devido as altas produções de acetato ruminal é improvável que o CMS tenha sido metabolicamente controlado pelo acetato, já que este representou menos de 18% do acetato total absorvido diariamente pelas vacas.

Dinius et al. (1968) avaliaram a inclusão de ácido acético (0; 1,5; 3,0; 4,5 e 6% da MS) à forragem de milho ou à silagem de milho, observando redução linear no CMS de novilhos, mas em maior intensidade no nível 6%. Apesar disso, o consumo de energia não foi alterado. Animais recebendo a maior dose consumiram cerca de metade do alimento fornecido logo na primeira hora após alimentação, totalizando a ingestão de 28,2 g de acetato/100 kg de PV.

Hutchinson e Wilkins (1971) trabalharam com níveis de ácido acético entre 2,0 e 8,8% da MS em silagem de azevém perene, sem observar alterações no consumo diário de ovelhas. No

entanto, o comportamento alimentar dos animais foi modificado, uma vez que o tempo de ingestão foi reduzido nas primeiras 4 horas e aumentou entre 16 e 20 horas após o arraçoamento.

Krizsan et al. (2006) adicionaram 6% de ácido acético, base na MS, em silagens de gramíneas temperadas fornecidas para novilhos em crescimento. Quando expresso na MS em estufa, o consumo foi deprimido, porém, quando o ácido acético ingerido foi computado, o consumo de MS foi similar. Deve-se ressaltar que a volatilidade do ácido acético a 105°C é próxima de 100% (WEISSBACH, 2009).

Assim, provavelmente devido as concentrações baixas de ácido acético encontradas nas silagens estudadas no presente experimento, o comportamento ingestivo dos animais (ingestão, ruminação e mastigação) também não foi alterado com a inoculação de *L. buchneri* na dose de 1×10^5 ufc/g. Da mesma forma, a adição de 1-propanol na dieta não influenciou as mesmas variáveis (Tabela 9).

Tabela 9 – Comportamento ingestivo de vacas leiteiras alimentadas com dietas a base de silagem de milho inoculada com *L. buchneri* ou acrescidas de 1-propanol

Item ¹	Tratamentos ²				P
	C	LB	PROP	EPM	
Ingestão, min/d	179,74	191,24	174,70	12,71	0,50
Ruminação, min/d	525,11	516,82	504,39	14,61	0,52
Mastigação, min/d	705,50	708,93	672,49	19,94	0,22
Mastigação/CMS, min/kg MS	34,77	35,71	33,88	1,57	0,38
Mastigação/CFDN, min/kg MS	110,53	109,39	110,57	5,26	0,95

¹ CMS: consumo de matéria seca; CFDN: consumo de fibra em detergente neutro

² C= controle; LB = *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g; PROP = 1-propanol na dose 1,0% MS

Quando se analisa o índice de seleção de partículas, indicativo do consumo preferencial de partículas pelos animais pode-se observar que, no geral, os animais tiveram preferência pelo consumo de partículas menores (<19 mm) (Figura 8). Trabalhos como o de Leonardi e Armentano (2003), Leonardi, Giannico e Armentano (2005) e Daniel (2011), demonstraram resultados semelhantes, em que os animais tiveram maior preferência por partículas finas. Segundo os autores, complicações decorrentes da seleção dos animais podem existir, sendo

que a preferência pela ingestão de partículas finas pode levar a redução da atividade de mastigação e pH ruminal. Segundo Daniel (2011) uma das alternativas para redução da seleção consiste na melhor uniformização do tamanho das partículas com colhedoras de forragens mais eficientes.

Em relação as diferenças entre os tratamentos, houve diferença somente para as maiores partículas (>19 mm), sendo que os animais que consumiram dietas contendo silagem inoculada com *L. buchneri* apresentaram menor preferência por este tipo de partículas que os animais alimentados com dietas contendo silagem controle ou acrescidas de 1-propanol, sendo que, não foi encontrada nenhuma razão plausível com respaldo na literatura para ocorrência dessa resposta.

Figura 8 - Índice de seleção de partículas. $P < 0,01$ para efeito de tratamento, $P < 0,01$ para efeito de peneira e $P < 0,01$ para interação tratamento e peneira. a,b,c,d Indicam diferenças entre peneiras (Tukey-Kramer, $\alpha = 0,05$)

As digestibilidades da maioria dos nutrientes das dietas dos animais não foram alteradas pelos tratamentos (Tabela 10), com exceção da digestibilidade da matéria orgânica para o tratamento *L. buchneri*, que foi menor que os demais. A menor ingestão de partículas maiores encontrada para as dietas inoculadas pode ter acarretado leve redução do pH ruminal e menor digestibilidade da matéria orgânica encontrada. Mesmo apresentando menor digestibilidade da MO, a produção de leite foi semelhante aos demais tratamentos, mostrando que este resultado não teve influência no desempenho das vacas.

Filya, Karabulut e Sucu (2002) não encontraram diferenças na digestibilidade da MS, MO e FDN de silagens de milho com e sem inoculação com *L. buchneri* na dose de 1×10^6 ufc/g. Em trabalho posterior, Filya, Sucu e Karabulut (2006) também não observaram diferenças nas digestibilidades da MS, MO e FDN de silagens tratadas ou não com doses de 1×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6 ufc/g de *L. buchneri*. Kristensen et al. (2010) também não encontraram diferenças na digestibilidade *in vitro* da MS de silagem de milho controle e inoculadas com *L. buchneri* na dose de 3×10^5 ufc/g.

Tabela 10 – Digestibilidade dos nutrientes das dietas consumidas pelos animais

Item ¹	Tratamentos ²			EPM	P ³
	C	LB	PROP		
MS, %	68,83	67,56	68,98	0,70	0,22
MO, %	71,69 ^a	69,92 ^b	71,75 ^a	0,63	0,02
PB, %	73,58	72,38	73,60	0,98	0,61
FDN, %	33,92	33,15	33,07	1,15	0,81
CNF, %	96,35	96,13	97,00	0,41	0,16
EE, %	92,33	91,62	92,39	0,41	0,21
NDT, %	72,78	71,65	72,35	0,60	0,33
EL _L dieta, Mcal/kg	1,58	1,54	1,59	0,02	0,15

¹MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; CNF: carboidrato não fibroso; EE: extrato etéreo; NDT: nutrientes digestíveis totais; EL_L dieta: energia líquida da dieta estimada segundo NRC (2001) utilizando-se dados de digestibilidade

²C= controle, LB = *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g e PROP = 1-propanol na dose 1,0% MS

³Médias seguidas de letras distintas na linha, diferem pelo ajuste de Tukey-Kramer a 0,05 de probabilidade

Salvo et al. (2013) avaliaram a digestibilidade da MS, MO, FDN, PB, EE e carboidratos não fibrosos, em novilhas alimentadas com dietas contendo silagem inoculada com *L. buchneri* na dose de 1×10^5 ufc/g e, embora não tenham encontrado diferenças para o CMS, a digestibilidade da MS e MO foi maior para o tratamento com inoculante. Os autores atribuíram este resultado a produção de enzima ferulato esterase por algumas BAL, embora a digestibilidade de FDN não tenha sido diferente dos demais tratamentos.

Trabalhos como o de Kung (2009) sugeriram que a melhora na digestão da fibra em silagens inoculadas com *L. buchneri* ocorre, possivelmente pela ação de ferulato-esterase, que atua sobre a fração arabinoxilanas da parede celular, liberando ferulato e, aumento a digestão

da fração fibrosa da silagem, resultando em mais carboidratos solúveis para a fermentação ou utilização pelas bactérias do rúmen. No presente experimento, a utilização do inoculante não melhorou a digestibilidade da fibra e, pelo contrário, numericamente foi inferior que os demais tratamentos, não só para esta variável, mas também para as outras.

Addah et al. (2011), testaram uma terceira geração de inoculantes, dentre estes, *L.buchneri* LN4017, capaz de produzir enzima ferulato-esterase (FAE). A atividade da enzima só foi detectada com três dias de ensilagem, sendo que com sete, 14, e 95 dias não foi detectada. Segundo os autores isto ocorre devido ao intervalo de pH ótimo para a expressão da atividade da enzima que é de 5,6 a 6,5. Além disso, várias classes de microrganismos produzem FAE que diferem na sua afinidade pelas ligações formadas entre ácido ferúlico e unidades de arabinose, sendo que algumas FAE apresentam capacidade moderada de hidrólise. Portanto, a enzima pode não diminuir a concentração de FDN da silagem, como foi encontrado no trabalho. Assim, mesmo que *L.buchneri* seja capaz de produzir este tipo de enzima, sua atividade é dependente de condições ótimas de atuação, como é o caso de todas as enzimas e, portanto, a melhora na digestibilidade da fibra das silagens pode não ocorrer.

No presente experimento, a digestibilidade de FDN das silagens foram baixas para ambos os tratamentos. Uma explicação para isso pode ser o híbrido utilizado na ensilagem (AG 1051), que já mostrou ter menor digestibilidade que os demais (SALIBA et al., 2002).

Ao observa-se os parâmetros relacionados a partição de energia dos animais (Tabela 11) pode-se inferir que a menor digestibilidade da matéria orgânica para o tratamento LB resultou em menor balanço de energia líquida, já que os demais parâmetros (energia líquida para manutenção e lactação não foram alterados). Portanto, os animais que receberam as rações inoculadas com *L.buchneri* não apresentaram diferenças na exigência de energia para manutenção e para a lactação e, por isso não apresentaram diferenças de produção de leite como mostrado anteriormente. No entanto, estes animais apresentaram menor balanço de energia líquida, ou seja, menor acúmulo de reservas corporais, indicada pela variação de PV, quando comparado aos demais tratamentos.

Daniel (2011) observou que animais alimentados com ácido acético (4,26% na MS) apresentaram maior eficiência energética que os demais tratamentos (controle e etanol) em razão da manutenção da produção de leite mesmo com menor CMS. No entanto, após a adaptação dos animais ao ácido acético e retomada do CMS a eficiência energética (excreção de energia no leite/kg de MS consumida) foi similar entre os tratamentos.

Tabela 11 – Partição energética de vacas leiteiras alimentadas com dietas a base de silagem de milho inoculada com *L. buchneri* ou acrescidas de 1-propanol

Item ¹	Tratamentos ²			EPM	P ³
	C	LB	PROP		
PV, kg	661,44	662,91	659,61	27,48	0,18
Var PV, kg/d	0,31	0,18	0,26	0,08	0,54
ELm, Mcal/d	10,40	10,41	10,38	0,33	0,25
EL _{leite} , Mcal/d	21,59	21,00	20,42	0,88	0,43
Consumo EL _L , Mcal/d	32,52	30,67	31,52	0,85	0,18
Bal EL _L , Mcal/d	2,88 ^a	0,01 ^b	1,59 ^a	1,00	0,04

¹PV: peso vivo; Var peso vivo: variação do peso vivo; ELm: energia líquida de manutenção; EL_L: energia líquida para lactação; Bal EL_L: balanço de energia líquida

²C= controle; LB = *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g; PROP = 1-propanol na dose 1% MS

³Médias seguidas de letras distintas na linha, diferem pelo ajuste de Tukey-Kramer a 0,05 de probabilidade

As proporções dos principais ácidos graxos voláteis (AGV) do rúmen (acetato, propionato, butirato) não foram modificadas em função dos tratamentos (Tabela 12), indicando que as dietas testadas não alteraram a fermentação ruminal. Mesmo na dieta a base de *L. buchneri*, não houve alteração importante na concentração de ácido acético proveniente da silagem, capaz de alterar a participação do acetato, de modo que a relação acetato:propionato não foi modificada entre os tratamentos. Ao contrário, o teor de 1-propanol no ambiente ruminal foi aumentado para a dieta suplementada com 1-propanol, como reflexo do maior consumo desse álcool.

Raun e Kristensen (2012) pesquisaram os efeitos metabólicos de vacas Holandesas em lactação alimentadas com dietas contendo altas doses de 1-propanol (5% da MS) e, diferente do presente trabalho, observaram redução na concentração de acetato e, aumento na proporção de propionato ruminal nos animais que reberam 1-propanol. Os autores também encontraram que a captação portal de 1-propanol representou 48 a 61% de 1-propanol ingerido, com consequente aumento na captação hepática de 1-propanol, maior resposta glicogênica, aumento no fluxo hepático de glicose e, redução na concentração de gordura do leite que, sendo, segundo os autores, reflexo da maior produção de propionato a partir do 1-propanol hepático.

O 1-propanol é um intermediário importante no metabolismo ruminal de propilglicol para propionato (COZZI et al, 1996; CZERKAWSKI et al., 1984), e propilenoglicol também

foi relacionado ao aumento do status glicogênico de vacas (KRISTENSEN et al., 2007; PALMQUIST; BRUNENGRABER, 1997). Sugere-se que o propilenoglicol é glicogênico não somente no sentido clássico (KREBS, 1963), mas também por indução de resistência à insulina no tecido muscular (LOMEO et al., 1988; XU et al., 1998).

Tabela 12 – Concentração ruminal (mol/100mol) de ácidos graxos voláteis em vacas leiteiras alimentadas com dietas a base de silagem de milho inoculada com *L. buchneri* ou acrescidas de 1-propanol

Item ¹	Tratamentos ²			EPM	P ³
	C	LB	PROP		
1- Propanol	0,015 ^b	0,005 ^b	0,500 ^a	0,111	0,04
Acetato	56,18	57,57	56,78	3,46	0,96
Propionato	25,50	25,05	25,04	1,52	0,97
Butirato	16,37	18,14	15,95	1,36	0,55
Propilenoglicol	0,16	0,11	0,14	0,02	0,48
A:P	2,27	2,40	2,26	0,32	0,93

¹A:C: Razão acetato:propionato

²C= controle, LB = *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g e PROP = 1-propanol na dose 1% MS

³Médias seguidas de letras distintas na linha, diferem pelo ajuste de Tukey-Kramer a 0,10 de probabilidade

Raun e Kristensen (2011) estudaram os efeitos metabólicos de vacas leiteiras alimentadas com dietas acrescidas de 1,4% de propanol (base MS) ou 1,4% de etanol (base MS) e, encontraram maior proporção molar de acetato com a suplementação de etanol e maior proporção molar de propionato com a adição 1-propanol na dieta. O CMS e a produção de leite não foram afetados pelos tratamentos, mas o tratamento com 1-propanol reduziu o teor de gordura no leite. O aparecimento portal de 1-propanol e etanol foi intensificado com o aumento da concentração ruminal do respectivo álcool. A recuperação portal representou 43 a 85% do 1-propanol ingerido e 36 a 57% do etanol ingerido.

A fermentação ruminal é componente importante no metabolismo de alcoóis em vacas leiteiras (ORSKOV et al., 1967; FREDERIKSEN; OCHIA, 1970; PRADHAN; HEMKEN, 1970), sendo que o metabolismo microbiano e do epitélio ruminal respondem por mais da metade da dose de alcoóis ingeridas, reduzindo as quantidades que atingem o fígado (RAUN; KRISTENSEN, 2011).

As concentrações sanguíneas de glicose foram maiores para o tratamento suplementado com 1-propanol (Tabela 13). Embora as concentrações ruminais de acetato e propionato, bem como a razão acetato:propionato não foram modificadas pelos tratamentos, os animais que receberam 1-propanol na dieta apresentaram maiores concentrações deste álcool no rúmen e, possivelmente, após sua absorção, este foi convertido a glicose pelo fígado e, conseqüentemente as concentrações sanguíneas de glicose foram aumentadas. Segundo Raun e Kristensen (2012), 1-propanol é parcialmente oxidado no fígado e utilizado para a gliconeogênese, com aumentos na produção de glicose hepática. Esta maior produção de glicose levou à menor mobilização de triglicerídeos para produção de energia ou gliconeogênese a partir do glicerol, levando à menor concentração sanguínea de AGNE nos animais suplementados com 1-propanol, já que a demanda de energia deve ter sido atendida pela oxidação da glicose.

Quando a glicose sanguínea encontra-se elevada, não há a secreção de glucagon, hormônio este que, a partir da cascata da lipólise, ativa a enzima lipase hormônio sensível a iniciar o processo de mobilização de ácidos graxos (CORRÊA et al., 2010). Os AGNE resultantes da hidrólise de triglicerídeos são transportados na corrente sanguínea e podem ser utilizados pelos tecidos como fonte de energia (tecido muscular), como precursores da gordura no leite pela glândula mamária ou então serem direcionados para o fígado para oxidação à CO_2 e energia. Sendo assim, quando a concentração de glicose é alta, esta mobilização diminui, levando à menor concentração de AGNE no sangue.

Tabela 13 – Concentrações sanguíneas de glicose e ácidos graxos não esterificados de vacas leiteiras alimentadas com rações contendo silagem de milho inoculada com *L. buchneri* ou enriquecidas com 1-propanol

Item ¹	Tratamentos ²				<i>P</i> ³
	C	LB	PROP	EPM	
Glicose, mg/dL	59,46 ^{xy}	58,88 ^y	64,23 ^x	2.01	0,08
AGNE, mmol/L	0,180 ^x	0,183 ^x	0,151 ^y	0,012	0,03

¹AGNE: ácidos graxos não esterificados

²C= controle, LB = *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g e PROP = 1-propanol na dose 1% MS

³Médias seguidas de letras distintas na linha, diferem pelo ajuste de Tukey-Kramer a 0,10 de probabilidade.

6 CONCLUSÕES

Dietas contendo silagens de milho inoculadas com *L. buchneri* na dose de 1×10^5 ufc/g ou acrescidas de 1% de 1-propanol (base MS) não alteram o desempenho e o comportamento ingestivo de vacas leiteiras.

A inoculação com *L. buchneri* na dose de 1×10^5 ufc/g não tem grandes influências sobre a qualidade e a estabilidade aeróbia de silagens de milho.

Dietas acrescidas de 1-propanol (1% da MS) aumentam a gliconeogênese hepática e conseqüentemente levam à maior concentração de glicose e menor concentração de ácidos graxos não esterificados no sangue de vacas leiteiras.

REFERÊNCIAS

- ADDAH, W.; BAAH, J.; OKINE, E.K.; MCALLISTER, T.A. A third-generation esterase inoculant alters fermentation pattern and improves aerobic stability of barley silage and the efficiency of weight gain of growing feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign v. 90, p. 1541–1552, 2012.
- ALANIS, P.; ASHKAN, S.; KRAUTER, C.; CAMPBELL, S.; HASSON, A.S. Emissions of volatile fatty acids from feed at dairy facilities. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 44, p. 5084-5092, 2010.
- ALANIS, P.; SORENSON, M.; BEENE, M.; KRAUTER, C.; SHAMP, B.; HASSON, A.S. Measurement of non-enteric emission fluxes of volatile fatty acids from a California dairy by solid phase micro-extraction with gas chromatography/mass spectrometry. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 42, p. 6417-6424, 2008.
- ARRIOLA, K.H.; KIM, S.C.; ADESOGAN, A.T. Effect of applying inoculants with heterolactic or homolactic and heterolactic bacteria on the fermentation and quality of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 1511–1516, 2011.
- ASHBELL, G.; WEINBERG, Z.G.; HEN, Y.; FILYA, I. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 28, p. 261-263, 2002.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTIS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, 1990. v. 1, 1117 p.
- ATKINS, P.W. **Physical Chemistry**. 5th ed. Oxford: Oxford University Press, 1994. 1031 p.
- ÁVILA, C.L.S.; PINTO, J.C.; FIGUEIREDO, H.C.P.; MORAIS, A.R.; PEREIRA, O.D.; SCHWAN, R.F. Estabilidade aeróbia de silagens de capim-mombaça tratadas com *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p. 779-787, 2009.
- BASSO, F.C.; ROTH, A.P.T.P.; LODO, B.N.; REIS, R.A.; BERNARDES, T.F. The effect of *Lactobacillus buchneri* on chemical composition and aerobic stability of corn silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15., 2009, Madison. **Proceedings...** Madison: CALS, 2009. p. 207-208.
- BEAUCHEMIN, K.A.; BUCHANAN-SMITH, J.G. Effects of fiber source and method of feeding on chewing activities, digestive function, and productivity of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, p. 749-762, 1990.
- BERNARDES, T.F. **Controle da deterioração aeróbia em silagens**. 2006. 103 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2006.
- BOLSEN, K.K.; ASHBELL, G.; WILKINSON, J.M. Silage additives. In: BIOTECHNOLOGY IN ANIMAL FEEDS AND ANIMAL FEEDING, 1995 New York. **Proceedings...** New York: VCH Weinheim, 1995. p. 33-54.

- BOLSEN, K.K.; WHITLOCK, L.A.; URIARTE-ARCHUNDIA, M.E. Effect of surface spoilage on the nutritive value of maize silages diets. In: THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 13., 2002, Auchincruive. **Proceedings...** Auchincruive: Scotland SAC, 2002. p. 75-77.4.
- BORREANI, G.; TABACCO, E.; COLOMBARI, G. Influenza del deterioração aeróbico degli insilati sulla qualità dei prodotti caseari. **L'informatore Agrário**. Piemonte, v. 11, p. 57-62, 2002.
- BUXTON, D.R.; O'KIELY, P. Preharvest plant factors affecting ensiling. **Silage Science and Technology**, Madison, v. 5, p. 199-250, 2007.
- CARD, T.R.; SCHMIDT, C.E. **Dairy air emissions**: summary of dairy emission estimation procedures. 2006. Disponível em: <<http://www.arb.ca.gov/ag/caf/SchmidtDairyEmissions2005.pdf>>. Acesso em: 03 abr. 2012.
- CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 8, p. 130-137, 1962.
- CHARMLEY, E. Towards improved silage quality: a review. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 81, p. 157-168, 2001.
- CHUNG, M.Y.; BEENE, M.; ASHKAN, S.; KRAUTER, C.; HASSON, A.S. Evaluation of non-enteric sources of non-methane volatile organic compound (NMVOC) emissions from dairies. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 44, p. 786-794, 2010.
- CORRÊA, M.N.; GONZALEZ, F.H.; SILVA, S.C. **Transtornos metabólicos nos animais domésticos**. Pelotas: Ed. Universitária UFPEL, 2010. 522 p.
- COZZI, G.; BERZAGHI, P.; GOTTARDO, F.; GABAI, G.; ANDRIGHETTO, I. Effects of feeding propyleneglycol to mid-lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, Philadelphia, v. 64, p. 43-51, 1996.
- CZERKAWSKI, J.W.; PIATKOVA, M.; BRECKENBRIDGE, G. Microbial metabolism of 1,2-propanediol studied by the rumen simulation technique (Rustic). **Journal of Applied Bacteriology**, Bedford, v. 56, p. 81-94, 1984.
- DANIEL, J.L.P. **Contribuição da fração volátil no valor nutricional de silagens**. 2011. 160 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- DANIEL, J.L.P.; AMARAL, R.C.; SÁ NETO, A.; CABEZAS-GARCIA, E.H.; BISPO, A.W.; ZOPOLLATTO, M.; CARDOSO, T.L.; SPOTO, M.F.F.; SANTOS, F.A.P.; NUSSIO, L.G. Performance of dairy cows fed high levels of acetic acid or ethanol. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, p. 398-406, 2013.
- DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 562-567, 2003.

DAVIDSON, P.M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: _____. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: American Society for Microbiology, 1997. p. 520-556.

DEMINICIS, B.B.; VIEIRA, H.D.; JARDIM, J.G.; ARAÚJO, S.A.C.; CHAMBELA NETO A.; OLIVEIRA, V.C.; LIMA, E.S. Silagem de milho: características agronômicas e considerações. **Revista Eletrônica de Veterinária**, Garça, v. 10, p. 1-17, 2009.

DINIUS, D.A.; HILL, D.L.; NONER, C.H. Influence of supplemental acetate feeding on the voluntary intake of cattle fed green corn and corn silage. **Journal of Dairy Science** Champaign, v. 51, p. 1505-1507, 1968.

DRIEHUIS, F. Occurrence of mycotoxins in silage In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION: 2., 2011, São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2011. p. 85-103.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. **Veterinary Quarterly**, Oxfordshire, v. 22, n. 4, p. 212-216, 2000.

DRIEHUIS, F.; Te GIFFEL, M.C. Butyric acid bacteria spores in whole crop maize silage. In: THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 14., 2005, Belfast. **Proceedings...** Belfast: R.S. Park and M.D. Stronge, 2005. p. 271.

DRIEHUIS, F.; VAN WIKSELAAR, P.G. Effects of addition of formic, acetic or propionic acid to maize silage and low dry matter grass silage on the microbial flora and aerobic stability. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 11., 1996, Wales. **Proceedings...** Wales, 1996. p. 256-257.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOLESTRA, 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**, Bedford, v. 87, p. 583-594, 1999a.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; VAN WIKLEAAR, P.G. *Lactobacillus buchneri* improves the aerobic stability of laboratory and farm scale whole crop maize but does not affect feed intake and milk production of dairy cows. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 12., 1999, Uppsala. **Proceedings...** Uppsala: Swedish University of Agricultural Science, 1999b. p. 106-107.

_____. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchaneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, Oxford, v.56, p.330-343, 2001.

DULPHY, J.P.; DEMARQUILLY, C. Problèmes particuliers aux ensilages. In: DEMARQUILLY, C. **Prevision de la valeur nutritive des aliments des ruminants**. Versailles: INRA, 1981. p. 81-104.

EVA, W.; JOOS, L.; GEERT, H. Study of the effect of *Lactobacillus buchneri* inoculation on the aerobic stability and fermentation characteristics of alfalfa-ryegrass, red clover and maize silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 16., 2012, Finland. **Proceedings...** Finland: MTT, 2012. p. 408.

FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 3575-3581, 2003.

FILYA, I.; KARABULUT, A.; SUCU, E. The effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of maize silage in warm climate. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 13., 2003, Auchincruive. **Proceedings...** Auchincruive: Scotland SAC, 2003. p. 192-193.

FILYA, I.; SUCU, E.; KARABULUT, A. The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of maize silage. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 101, p. 1216-1223, 2006.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 25, p. 172-180, 2008.

FREDERIKSEN, J.H.J.; OCHIA, B.A. The effect of ethanol and acetic acid on milk yield and milk composition of cows given rations high in concentrates. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Stockholm, v. 20, p. 17-24, 1970.

GIUDICI, P.; ZAMBONELLI, C.; KUNKEE, R.E. Increased production of n-propanol in wine by yeast strains having an impaired ability to form hydrogen sulfide. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 44, p. 17-22, 1993.

HALL, M.B. **Neutral detergent-soluble carbohydrate nutritional relevance and analysis**. Gainesville: University of Florida, 2000. 42 p. (Bulletin, 339).

HENDERSON, F.W.; COLLIER, A.M.; CLYDE, W.A.; DENNY, F.W. Respiratory syncytial virus infections, reinfections and immunity: a prospective longitudinal study in young children. **New England Journal of Medicine**, Massachussets, v. 300, p. 530-534, 1979.

HENDERSON, N. Silage additives. **Animal Feed Science and Technology**, Philadelphia, v. 45, p. 35-56, 1993.

HETTA, M.; CONE, J.W.; BERNES, G.; GUSTAVSSON, A.M.; MARTINSSON, K. Voluntary intake of silages in dairy cows depending on chemical composition and in vitro gas production characteristics. **Livesotock Science**, Amsterdam, v. 106, p. 46-56, 2007.

HOFFMAN, P.C.; OCKER, S.M. Quantification of milk yield losses associated with feeding aerobically unstable high moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 234, 1997.

- HU, W.; SCHMIDT, R.J.; MCDONELL, E.E.; KLINGERMAN, C.M.; KUNG JUNIOR, L. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, p. 3907-3914, 2009.
- HUHTANEN, P.; KAUSTELL, K.; JAAKKOLA, S. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Animal Feed Science and Technology**, Philadelphia, v. 48, p. 211-227, 1994.
- HUTCHINSON, K.J.; WILKINS, R.J. The voluntary intake of silage by sheep. II. The effects of acetate on silage intake. **Journal of Agricultural Science**, Islamabad, v. 77, p. 539-543, 1971.
- JANSSEN P. Propanol as an end product of threonine fermentation. **Archives of Microbiology**, New York, v. 182, p. 482-486, 2004.
- JASTER, E.H. Legume and grass silage preservation. In: MOORE, K.J.; PETERSON, M.A. (Ed.). **Post-harvest physiology and preservation of forages**. Wisconsin: CSSA, 1995. p. 91-114.
- JONES, G.M.; LARSEN, R.E.; LANNING, N.M. Prediction of silage digestibility and intake by chemical analyses or in vitro fermentation techniques. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, p. 579-86, 1980.
- JONSSON, A. Growth of *Clostridium tyrobutyricum* during fermentation and aerobic deterioration of grass silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 4, p. 557-568, 1991.
- JONSSON, A.; PAHLOW, G. Systematic classification and biochemical characterization of yeast growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* culture. **Animal Research and Development**, Tubingen, v. 20, p. 7-22, 1984.
- KLEINCHMIT, D.H.; KUNG, L. JR. A meta analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability de corn and grass and small grain silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, p. 4005-4013, 2006a.
- _____. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, p. 3999-4004, 2006b.
- KLEINSCHMIT, D.H.; SCHMIDT, R.J.; KUNG, L. JR. The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 2130-2139, 2005.
- KLEINSHMITT, C.; MORAIS, G.; CUSTÓDIO, L.; FERNANDES, J.; SANTOS, M.C.; DANIEL, J.L.P.; NUSSIO, L.G. Performance of lactating dairy cows fed maize silage with increased dosages of *L. buchneri*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON FORAGE CONSERVATION, 15., 2013, High Tatras. **Proceedings....** Nitra: ICFS, 2013. p. 141-142.

KOVÁŘ, J.; RACEK, P.; VLCKOVÁ, V. Alcohol dehydrogenase activity and isoenzyme distribution in the organs of cow, pig and sheep. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 76, p. 161–165, 1983.

KREBS, H.A. Renal gluconeogenesis. **Advances in Enzyme Regulation**, Oxford, v. 1, p. 385–400, 1963.

KRISTENSEN, N.B.; STORM, A.B.; RAUN, M.L.B.; RØJEN, A.; HARMON, D.L. Metabolism of silage alcohols in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p.1364–1377, 2007.

KRISTENSEN, N.B.; SLOTH, K.H.; HØJBERG, O.; SPLIID, N.H.; JENSEN, C.; THØGERSEN, R. Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 3764–3774, 2010.

KROONEMAN, J.; FABER, F.; ALDERKAMP, A. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 52, p. 639-646, 2002.

KRIZSAN, S.J.; RANDBY, A.T.; WESTAD, F. The effect of acetic acid, caproic acid and tryptamine on voluntary intake of grass silage by growing cattle. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM FORAGE CONSERVATION, 1., 2006, Czech Republic. **Proceedings...** Czech Republic: BRNO, 2006. p. 143-145.

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**, Champaign, v.67, p.299-306, 1984.

KUNG JR., L. **Preparation of silage water extracts for chemical analyses**: standard operating procedure. Worrlow: Ed. Delaware; University of Delaware, Ruminant Nutrition Lab., 1996. 32 p.

_____. Effects of microbial additives in silages: facts and perspectives. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 1., 2009, São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2009. p. 7-22.

KUNG JR., L.; RANJIT N.K. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 5, p. 1149-1155, 2001.

KUNG JR., L.; STOKES, M.R.; LIN, C.J. Silage additives. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 305-360.

KUNG JR., L.; ROBINSON, J.R.; RANJIT, N.K.; CHEN, J.H.; GOLD, C.M.; PESEK, J.D. Microbial populations, fermentation endproducts, and aerobic stability of corn silage treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, p. 1479-1486, 2000.

LARA, E.C.; BASSO, F.C.; RABELO, C.H.S.; SOUZA, F.A.; GODOY, H.P.; GOLÇALVES, G.S.; REIS, R.A. Fermentation losses and dry matter recovery of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* and exogenous fibrolytic enzymes. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 16., 2012, Finland. **Proceedings...** Finland: MMT, 2012. p. 366.

LAMMERS, B.P.; BUCHMASTER, D.R.; HEINRICHS, E.J. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, p. 922-928, 1996.

LATRE, J.; WAMBACQ, E.; NOLLET, J.; HAESAERT, G. Effects of silage additives on aerobic stability of maize silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15., 2009, Madison. **Proceedings...** Madison: CALS, 2009. p. 47-48.

LEONARDI, C.; ARMENTANO, L.E. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 557-564, 2003.

LEONARDI, C.; GIANNICO, F.; ARMENTANO, L.E. Effect of water addition on selective consumption (sorting) of dry diets by dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 1043-1049, 2005.

LI, Y.; NISHINO, N. Effects of inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability and microbial communities in whole crop corn silage. **Grassland Science**, Tochigi, v. 57, p. 184-191, 2011.

LINDGREN, S.; OLDENBURG, E.; PAHLOW, G. Influence of microbes and their metabolites on feed and food quality. In: GENERAL MEETING OF THE EUROPEAN GRASSLAND FEDERATION, 19., 2002, La Rochelle. **Proceedings...** Paris: La Rochelle, 2002. p. 503-511.

LOMEO, F.; KHOKHER, M.A.; DANDONA, P. Ethanol and its novel metabolites inhibit insulin action on adipocytes. **Diabetes**, Alexandria, v. 37, p. 912-915, 1988.

MAEKAWA, M.; BEAUCHEMIN, K.A.; CHRISTENSEN, D.A. Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 85, p. 1165-1175, 2002.

MALKINA, I.L.; KUMAR, A.; GREEN, P.G.; MITLOEHNER, F.M. Identification and quantitation of volatile organic compounds emitted from dairy silages and other feedstuffs. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 40, p. 28-36, 2011.

MARI, L.J.; SCHMIDT, R.J.; NUSSIO, L.G.; HALLADA, C.M.; KUNG JR., L. An evaluation of the effectiveness of *Lactobacillus buchneri* 40788 to alter fermentation and improve the aerobic stability of corn silage in farm silos. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, p. 1174-1176, 2009.

MCDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2nd. ed. Lincoln: Chalcombe Publ., 1991. 340 p.

MONTES, F.; HAFNER, S.; ROTZ, C.A. Characterization and measurement of VOC emissions from silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15., 2009, Madison. **Proceedings...** Madison: CALS, 2009. p. 273-274.

MONTES, F.; HAFNER, S.D.; ROTZ, C.A.; MITLOEHNER, F. Temperature and air velocity effects on ethanol emission from corn silage with the characteristics of an exposed silo face. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 44, p. 1987-1995, 2010.

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

MUCK, R.E. Factors influencing silage quality and their implications for management. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, p. 2992-3002, 1988.

_____. Inoculant of silage and its effects on silage quality. In: INFORMATIONAL CONFERENCE WITH DAIRY AND FORAGE INDUSTRIES, 1., 1996, Madison. **Proceedings...** Madison: US Dairy Forage Research, 1996. p. 43-52.

_____. Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. **Transactions of the ASAE**, Madison, v. 47, p. 1011-1016, 2004.

_____. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 183-19, 2010.

MUCK, R.E.; KUNG JR., L. Effects of silage additives on ensiling. In: SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK, 1., 1997, Ithaca. **Proceedings...** Ithaca: NRAES, 1997. p. 187-199.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington, 2001. 381p.

NISHINO, N.; HATTORI, H.; KISHIDA, Y. Alcoholic fermentation and its prevention by *Lactobacillus buchneri* in whole crop rice silage. **Letters in Applied Microbiology**, Bedford, v. 44, p. 538-543, 2007.

NISHINO, N.; HATTORI, H.; WADA, H.; TOUNO, E. Biogenic amine production in grass, maize and total mixed ration silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 103, p. 325-332, 2007.

NISHINO, N.; WADA, H.; YOSHIDA, M.; SHIOTA, H. Microbial counts, fermentation products and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, p. 2563-2570, 2003.

NISHINO, N.; YOSHIDA, M.; SHIOTA, H.; SAKAGUCHI, E. Evaluation of *Lactobacillus buchneri* derived from by-products ensiling as an inoculum for whole crop maize silage. In:

INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE SCOTTISH AGRICULTURAL COLLEGE, 13., 2002, Ayr. **Proceedings...** Auchincruive: Scotland, 2002. p. 146–147.

_____. Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole crop maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 94, p. 800–807, 2004.

NKOSI, B.D.; MEESKE, R.; VAN DER MERWE, H.J.; GROENEWALD, I.B. The effect of Lalsil Fresh LB on the fermentation quality and digestibility of a potato hash silage diet in rams. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE PROCEEDINGS, 15., 2009, Madison. **Proceedings...** Madison: CALS, 2009. p. 427–428.

NSEREKO, V.L.; SMILEY, B.K.; RUTHERFORD, W.M.; SPIELBAUER, A.; ORRESTER, K.J.; HETTINGER, G.H.; HARMAN, E.K.; HARMAN, B.R. Influence of inoculating forage with lactic acid bacterial strains that produce ferulate esterase on ensilage and ruminal degradation of fiber. **Animal Feed Science and Technology**, Philadelphia, v. 145, p. 122–135, 2008.

NUSSIO, L.G.; PAZIANI, S.F.; NUSSIO, C.M.B. Ensilagem de capins tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2002, 39., Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. p. 60–83.

OHYAMA, Y.; HARA, S.H.; MASAKI, S.H. Analysis of the factors affecting aerobic deterioration of grass silages. In: FORAGE CONSERVATION IN THE 80'S. OCCASIONAL SYMPOSIUM, 11., 1980, London. **Proceedings...** London: British Grassland Society, 1980. p. 257–263.

O'KIELY, P.; MUCK, R.E. Aerobic deterioration of lucerne (*Medicago sativa*) and maize (*Zea mays*) silage effects of yeast. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 59, p. 139–144, 1992.

ORSKOV, E.R.R.; HEMKEN, W.; MOORE, L.A. Effect of ethanol infusion on milk fat content and composition and on volatile fatty acids in the rumen liquor. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 50, p. 692–695, 1967.

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

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. Microbiology of ensiling. In: SILAGE: SCIENCE AND TECHNOLOGY, 1., 2003, Madison. **Proceedings...** Madison, 2003. p. 1–927.

PALMQUIST, D.L.; BRUNENGRABER, H. Role of 1,2 propanediol in ruminant glucose metabolism. In: ENERGY METABOLISM OF FARM ANIMALS, 1., 1997, Wallingford. **Proceedings...** Wallingford: Cab International, 1997. p. 115–118.

PAVEL, K. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: a review. **Food Chemistry**, Barking, v. 125, p. 307–317, 2011.

PEREIRA FILHO, I.A.; CRUZ, J.C. Tratos culturais do milho para silagem. In: PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE SILAGEM DE MILHO E SORGO, 6, 2001, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: Emprapa Milho e Sorgo, 2001. p. 85-117.

PITT, R.E. Additives for silage and hay preservation. In: SILAGE AND HAY PRESERVATION, 5., 1990, New York. **Proceedings...** New York: NRAES, 1990. p. 28-44.
PRADHAN, K.; HEMKEN, R.W. Utilization of ethanol and its effect on fatty acid patterns in ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 53, p. 1739-1746, 1970.

RANDBY, A.T. Effect of propanol and dimethylsulphide in grass silage on organoleptic milk quality. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Ottawa, v. 16, p. 102-107, 2007.

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

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

RAUN, B.M.L.; KRISTENSEN, N.B. Propanol in maize silage at Danish dairy farms. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science**, Copenhagen, v. 60, p. 53-59, 2010.

_____. Metabolic effects of feeding ethanol or propanol to postpartum transition Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 2566-2580, 2011.

_____. Metabolic effects of feeding high doses of propanol and propylacetate to lactating Holstein cows. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 144, p. 37-47, 2012.

RIBEIRO, J.L.; QUEIROZ, O.C.; NUSSIO, L.G. Desenvolvimento de aditivos microbianos para ensilagem: realidade e perspectivas. In: VOLUMOSOS NA PRODUÇÃO DE RUMINANTES, 2., 2005, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 2005. p. 1-23.

ROOK, A.J.; GILL, M. Prediction of the voluntary intake of grass silages by beef cattle. 1. Linear regression analyses. **Animal Production**, USDA, p. 425-438, 1990.

ROTZ, C.A.; MUCK, R.E. Changes in forage quality during harvest and storage. In: NATIONAL CONFERENCE ON FORAGE QUALITY, EVALUATION, AND UTILIZATION, 1., 1994, Lincoln. **Proceedings...** Lincoln: Nebraska University, 1994. p. 828-868.

SÁ NETO, A.; NUSSIO, L.G.; ZOPOLLATTO, M.; JUNGES, F.; BISPO, A.W. Silagem de milho ou de cana-de-açúcar com *Lactobacillus buchneri* exclusivamente ou em associação com *L. plantarum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, p. 528-535, 2013.

SALIBA, E.O.S.; MAIA, F.S.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUES, J.A.S.; BORGES, I.; RODRIGUEZ, N.M.; BORGES, A.L.C.C.; PEREIRA, L.G.R. Padrão de fermentação das silagens de seis cultivares de milho. 2- Digestibilidade in vitro da matéria seca e frações

fibrosas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. p. 1-5.

SALVO, P.A.R.; BASSO, F.C.L.; RABELO, C.H.S.; OLIVEIRA, A.A.; SADER, A.P.; CASAGRANDE, D.R.; BERCHIELLI, T.T.; REIS, R.A. Características de silagens de milho inoculadas com *Lactobacillus Buchneri* e *L. plantarum*. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 62, p. 379-390, 2013.

SARTURI, J.O.; ZOPOLLATO, M.; NUSSIO, L.G.; AMARAL, R.C.; LOMBARDI, N.L.; TOLEDO FILHO, S.G. Effects of *Propionibacterium acidipropionici* and associations on the aerobic stability of corn silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE PROCEEDINGS, 15., 2009, Madison. **Proceedings...** Madison: CALS, 2009. p. 311-312.

SCHMIDT, R.J.; KUNG, L. JR. The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silages made at different locations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 1616–1624, 2010.

SCHMIDT, R.J.; HU, W.; MILLS, J.A.; KUNG, L. JR. The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 10, p. 5005-5010, 2009.

SIQUEIRA, G.R.; BERNARDES, T.F.; REIS, R.A. Instabilidade aeróbia de silagens: efeitos e possibilidades de prevenção. In: VOLUMOSOS NA PRODUÇÃO DE RUMINANTES, 2, 2005, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 2005. p. 25-60.

SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, P.; PIRES, A.J.V.; BERNARDES, T.F.; AMARAL, R.C. Perdas de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 2000-2009, 2007.

SPOELSTRA, S.F.; COURTIN, M.G.; VAN BEERS, J.A.C. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of maize silage. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 111, p. 127-132, 1988.

TABACCO, E.; BORREANI, G. Extent of aerobic deterioration in farm maize silage as affected by silo management. In: THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 13., 2002, Auchincruive. **Proceedings...** Auchincruive: Scotland SAC, 2002. p. 178-179.

TABACCO, E.; PIANO, S.; REVELLOCHION, A.; BORREANI, G. Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 5589-5598, 2011.

TAYLOR, C.C.; KUNG JR., L. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 1526-1532, 2002.

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

TELLER, R.S.; SCHMIDT, R.J.; WHITLOW, L.W.; KUNJ JR., L. Effect of physical damage to ears of corn before harvest and treatment with various additives on the concentration of mycotoxins, silage fermentation, and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, p. 1428-1436, 2012.

VAN VUUREN, A.M.; P. HUHTANEN, P.; DULPHY, J.P. Improving the feeding and health value of ensiled forages. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE NUTRITION OF HERBIVORES, 4., 1995, Paris. **Recent developments in the nutrition of herbivores: proceedings...** Paris: Clermont-Ferrand, 1995. p. 279-307.

VILELA, D. **Aditivos na ensilagem**. Coronel Pacheco. EMBRAPA, CNPGL, 1984. 32 p. (Circular Técnica, 21).

WEIßBACH, F. Die Bertimmung der Pufferkapazität der Futterpflanzen and ihre Bedeutung fur ndie Beurteilung der Vergarbarkeit. **Academy Agricultural Sciences**, Berlin, v. 92, p. 211-220, 1967.

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

WEINBERG, Z.G.; CHEN, Y.; GAMBURG, M. The passage of lactic acid bacteria from silage into rumen fluid, in vitro studies. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, p. 3386-3397, 2004.

WEINBERG, Z.G.; MUCK, R.E.; WEIMER, P.J. The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in rumen fluid. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, p. 1066-1071, 2003.

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

WEINBERG, Z.G.; ASHBELL, G.; HEN, Y.; SZAKACS, G.; FILYA, I. Ensiling whole-crop wheat and corn in large containers with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 28, p. 7-11, 2002.

WEINBERG, Z.G.; SHATZ, O.; CHEN, Y.; YOSEF, E.; NIKBAHAT, M.; BEN-GHEDALIA, D.; MIRON, J. Effect of lactic acid bacteria inoculants on in vitro digestibility of wheat and corn silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 4754-4762, 2007.

WEISS, B. When to consider silage additives. In: TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 1., 1996, Fort Wayne. **Proceedings...** New York: FW, 1996. p. 125-138.

WEISSBACH, F. Correction of dry matter content of silages used as substrate for biogas production. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15., 2009, Madison. **Proceedings...** Madison: CALS, 2009. p. 483-484.

WILES, P.G.; GRAY, I.K.; KISSLING, R.C. Routine analysis of protein by Kjeldahl and Dumas methods: review and interlaboratory study using dairy products. **Journal of the AOAC International**, Gaithersburg, v. 81, p. 620-632, 1998.

WILKINS, R.J.; HUTCHINSON, K.J.; WILSON, R.F.; HARRIS, C.E. The voluntary intake of silage by sheep. I. Interrelationships between silage composition and intake. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 77, p. 531-537, 1971.

WILKINSON, J.M.; DAVIES, D.R. The aerobic stability of silage: Key findings and recent developments. **Grass and Forage Science**, Malden, v. 68, p. 1-19, 2012.

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

_____. The detrimental effect of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 68, p. 101-116, 1990.

WOOLFORD, M.K.; SAWCZYK, M.K. A investigation into the effect of cultures of lactic acid bacteria on fermentation in silage. 1. Strain selection, **Grass and Forage Science**, Malden, v. 39, p. 139-148, 1984.

WU-TAI, G.; DRIEHUIS, F.; WIKSELAAR, P.V. The influences of addition of sugar with or without *L. buchneri* on fermentation and aerobic stability of whole crop maize silage ensiled under anaerobic silos. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Pequim, v. 15, p. 1128-1133, 2002.

XU, D.; DHILLON, A.S.; ABELMANN, A.; CROFT, K.; PETERS, T.J.; PALMER, T.N.; Alcohol-related diols cause acute insulin resistance *in vivo*. **Metabolism**, Albany, v. 47, p. 1180-1186, 1998.

YILDIRIM, M. Purification of buchnericin LB produced by *Lactobacillus buchneri* LB. **Turkish Journal of Biology**, Turkey, v. 25, p. 59-65, 2001.

ZOPOLLATTO, M.; NUSSIO, L.G.; SARTURI, J.O.; AMARAL, C.; LOMBARDI, N.L.; MURARO, G.B.; DANIEL, J.L.P. Fermentative parameters of corn silages inoculated either with *Propionibacterium acidipropionici*, *Lactobacillus buchneri* or the combination of both microorganisms. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE PROCEEDINGS, 15., 2009, Madison. **Proceedings...** Madison: CALS, 2009. p. 345-346.