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

**Inoculação com leveduras e exposição ao ar modificam o valor
nutritivo de silagem de milho para vacas leiteiras**

Pedro Augusto Ribeiro Salvo

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

**Piracicaba
2016**

Pedro Augusto Ribeiro Salvo
Zootecnista

**Inoculação com leveduras e exposição ao ar modificam o valor nutritivo de
silagem de milho para vacas leiteiras**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2016

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

Salvo, Pedro Augusto Ribeiro

Inoculação com leveduras e exposição ao ar modificam o valor nutritivo de silagem de milho para vacas leiteiras / Pedro Augusto Ribeiro Salvo. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

72 p. : il.

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

1. Deterioração aeróbia 2. Perdas 3. Levedura 4. Desempenho animal I. Título

CDD 636.234
S227i

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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Antonio e Fátima

Ao meu irmão Leonardo

À minha namorada Diana

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, pelas oportunidades e vitórias concedidas na vida.

Ao Prof. Dr. Luiz Gustavo Nussio pela possibilidade de realizar o mestrado sob a sua orientação, pelos ensinamentos e pelo exemplo de pessoa.

Ao Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel pela amizade, ajuda e conselhos oferecidos para condução do experimento e para a vida.

À todos os contemporâneos do grupo de Qualidade e Conservação de Forragens: Mateus, Greiciele, Cristiano, Juliana, Janaína, Daniel, Álvaro, Fernando, Letícia, Atílio, Dario, João Pedro, Maximiliano, Janielen, Paula, Willian e Gustavo, pela convivência durante esses anos.

Aos colegas de grupo Evandro e Carla, especialmente por me ajudarem durante o experimento na fase de campo.

À todos da minha família pelo suporte e por me desejarem sempre o melhor.

Aos funcionários do Laboratório de Bromatologia, Carlos César e Edson, pela paciência e pela ajuda com as análises.

Ao Prof. Dr. Antonio Sampaio Baptista e seu aluno Fernando Tonoli pela ajuda na multiplicação das leveduras

Aos amigos de república: Fernando, Álvaro, Daniel, Junior, Ricardo e Airton pela convivência e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Silagem de milho	21
2.3 Deterioração aeróbia em silagens de milho	22
2.4 Microrganismos responsáveis pela deterioração aeróbia.....	23
2.5 Efeitos de silagens deterioradas sobre o desempenho animal	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Amostras de silagens de milho para quantificação e isolamento de leveduras	29
3.2 Identificação de espécies de leveduras por utilização de substrato seletivo	31
3.3 Preparo do inóculo	33
3.4 Ensilagem.....	33
3.5 Ensaio de avaliação de aditivos em silos experimentais	34
3.6 Abertura e amostras dos silos de larga escala	35
3.7 Ensaios de estabilidade aeróbia e contagem de microrganismos.....	36
3.8 Perfil fermentativo	36
3.9 Animais e instalações.....	37
3.10 Dietas experimentais e manejo alimentar.....	38
3.11 Análises bromatológicas.....	39
3.12 Controle leiteiro e análises do leite.....	40
3.13 Temperatura dos painéis.....	41
3.14 Tamanho médio de partículas e índice de seleção	41
3.15 Digestibilidade <i>in vivo</i>	41
3.16 Análises estatísticas	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
4.1 Composição microbiológica e nutricional da planta de milho	45

4.2 Ensaio de avaliação de aditivos sobre efeito das leveduras em silos experimentais.....	47
4.3 Caracterização das silagens de milho e das dietas utilizadas no ensaio de desempenho de animais	50
4.4 Perfil fermentativo e ensaio de estabilidade aeróbia das silagens inoculadas com leveduras.....	52
4.5 Avaliação de desempenho, digestibilidade e partição energética de vacas leiteiras alimentadas com as dietas experimentais	56
5 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS	65

RESUMO

Inoculação com leveduras e exposição ao ar modificam o valor nutritivo de silagem de milho para vacas leiteiras

Silagens de milho são mais propensas à deterioração quando expostas ao ar. As leveduras assimiladoras de ácido láctico são frequentemente os primeiros microrganismos a iniciar a deterioração aeróbia nas silagens. Alguns estudos reportam que silagem de milho aerobicamente instável está associada à redução no consumo, na produção de leite e depressão no teor de gordura do leite. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência de inoculação de leveduras (*Pichia norvegensis*) e a exposição ao ar por 48 horas sobre o valor nutritivo das silagens e o desempenho de vacas leiteiras. O milho foi colhido com 34% de MS, tratado sem (Controle) ou com *P. norvegensis*, na dose 1×10^5 ufc/g MV (Levedura) e armazenado silos tipo bolsa (40 t/silo). Após 123 dias de armazenamento, os silos foram abertos e a silagem foi fornecida para vacas leiteiras. Diariamente, as silagens foram retiradas e fornecidas imediatamente (Fresca) ou após 48 horas de exposição (Exposta). Vinte vacas Holandesas foram distribuídas em 5 quadrados latinos replicados 4x4, com períodos de 21 dias (15 d para adaptação + 6 d para amostragem). As dietas foram formuladas para conter: 53% silagem de milho, 8% caroço de algodão, 18% farelo de soja, 9,5% polpa cítrica, 9% milho seco moído e 2,5% premix vitamínico e mineral. Os quatro tratamentos foram assim constituídos: silagem controle fresca (CF), silagem controle exposta (CE), silagem inoculada com levedura fresca (LF) e silagem inoculada com levedura exposta (LE). A inoculação com levedura aumentou as perdas de matéria seca ($P < 0,001$) e reduziu o tempo de estabilidade aeróbia ($P = 0,03$) das silagens de milho. No ensaio de desempenho animal, reduziu a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura ($P = 0,03$) e a eficiência alimentar (EL_L leite/CMS) ($P < 0,01$), porém não alterou o teor de gordura do leite. Quanto aos efeitos da exposição ao ar por 48 horas, estes reduziram a concentração de ácido láctico ($P < 0,001$), que consequentemente aumentou o pH ($P = 0,004$) das silagens, além de reduzir outros produtos de fermentação. A exposição também reduziu a produção de leite corrigido para gordura ($P = 0,02$) e a eficiência alimentar ($P = 0,10$). Nenhum tratamento alterou o consumo de MS. Houve tendência para redução da digestibilidade da MS e FDN e do NDT, quando as silagens foram expostas ao ar. A inoculação com leveduras e a exposição ao ar por 48 horas deprimem o desempenho animal através da redução no valor nutritivo das silagens de milho.

Palavras-chave: Deterioração aeróbia; Perdas; Levedura; Desempenho animal

ABSTRACT

Yeast inoculation and air exposure modify the nutritive value of corn silages for dairy cows

Corn silages are prone to deterioration when exposed to air. The lactate-assimilating yeast species are frequently the first microorganisms to initiate the aerobic deterioration. Some studies reported that aerobically unstable corn silage is associated with reduced feed intake, milk production and milk fat depression. Therefore, the objective of this study was evaluate the influence of yeast inoculation (*Pichia norvegensis*) and the air exposure by 48 hours on the nutritive value of corn silages and the performance of dairy cows. Corn crop was harvested at 34% DM, treated without (Control) or with *P. norvergensis* at 1×10^5 cfu/g fresh matter (Yeast) and packed in bag silos (40 t/silo). After 123 d of storage, silos were opened and fed to lactating dairy cows. Every day, the silages were unloaded and fed immediately (Fresh) or after 48 h of air exposure (Exposure). Twenty Holsteins cows were assigned to five replicated 4x4 Latin squares, with 21 d periods (15 d for adaptation + 6 d for sampling). Diets were formulated to contain 53% corn silage, 8% whole cottonseed, 18% soybean meal, 9.5% citrus pulp, 9% dry corn meal, and 2.5 % vitamin and mineral premix. The four treatments were: control-fresh silage (CF), control-exposed silage (CE), yeast inoculated-fresh silage (YF), and yeast inoculated- exposed silage (YE). The yeast inoculation enhanced DM losses ($P < 0,001$) and reduced aerobic stability ($P = 0,03$) of corn silages. On the animal performance, decreased 3,5% fat correct milk ($P = 0,03$) and the feed efficiency (EL_L leite/CMS) ($P < 0,01$), but did not alter the milk fat content. The effects of air exposure by 48 hours reduced lactic acid concentration ($P < 0,001$), which consequently increased the pH ($P = 0,004$) of silages, and reduced others fermentation products. Also, the exposure decreased the 3,5% fat correct milk ($P = 0,02$) and the feed efficiency ($P = 0,10$). Neither treatment altered the DM intake. There was tendency of reduction for the DM and NDF digestibility and TDN, when the silages were exposed to air. The yeast inoculation and air exposure by 48 hours decreased animal performance by the reduction on the nutritive value of corn silages.

Keywords Aerobic deterioration; Losses; Yeast; Animal performance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de amostragem do painel do silo	29
Figura 2 - Distribuição das espécies de leveduras identificadas nas amostras de silagens de milho	32
Figura 3 – Pré-ensaio para avaliação da estabilidade aeróbia das silagens de milho sob o efeito de inoculação com leveduras	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Origem, pH, matéria seca, temperatura e contagem de leveduras e mofo em silagens de milho colhidas em diferentes fazendas.....	31
Tabela 2 – Tratamentos impostos para os silos experimentais*	35
Tabela 3 – Contagem de microrganismos e pH da planta de milho na ensilagem com ou sem a adição de melaço de cana e do inóculo com leveduras nos silos	45
Tabela 4 – Composição nutricional média da planta de milho na ensilagem imediatamente após a adição de melaço de cana e do inóculo com leveduras na forragem.....	46
Tabela 5 – Características microbiológicas da forragem adicionada aos silos experimentais com a inoculação de leveduras e aditivos.	48
Tabela 6 - Características da silagem de milho inoculada com levedura e aditivos após 10 dias de exposição ao ar	49
Tabela 7 – Caracterização bromatológica, contagem de leveduras e tamanho médio de partículas das silagens de milho inoculadas com leveduras e/ou expostas por 48 horas, utilizadas no ensaio de desempenho de vacas leiteiras	51
Tabela 8 – Caracterização bromatológica das e tamanho médio de partículas das dietas experimentais inoculadas com leveduras e/ou expostas ao ar por 48 horas.....	52
Tabela 9 – Produtos de fermentação de silagens de milho inoculadas com leveduras e/ou expostas ao ar por 48 horas	54
Tabela 10 – Características microbiológicas e estabilidade das silagens de milho inoculadas com levedura após exposição ao ar por 10 dias	55
Tabela 11 – Desempenho de vacas leiteiras alimentadas com silagens inoculadas com levedura e/ou expostas ao ar por 48 horas.....	57
Tabela 12 – Índice de seleção das dietas experimentais inoculadas com leveduras e/ou expostas ao ar por 48 horas	58
Tabela 13 – Digestibilidade das dietas experimentais inoculadas com leveduras e/ou expostas ao ar por 48 horas	60
Tabela 14 – Partição energética de vacas alimentadas com dietas contendo silagens inoculadas com leveduras e/ou expostas ao ar por 48 horas.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL – ácido graxos livres

BAL – bactérias ácido lácticas

CNF – carboidratos não fibrosos

CS – carboidratos solúveis

DVIVMO – digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica

DVIVMS – digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca

EE – extrato etéreo

EL – energia líquida

ELL – energia líquida de lactação

FDA – fibra insolúvel em detergente ácido

FDN – fibra insolúvel em detergente neutro

FDNi – fibra insolúvel em detergente neutro indigestível

LEV – leveduras

MM – matéria mineral

MO – matéria orgânica

MS – matéria seca

MV – massa verde

NDT – nutrientes digestíveis totais

NUL – nitrogênio uréico do leite

PB – proteína bruta

PV – peso vivo

UFC – unidade formadora de colônia

TMP – tamanho médio de partículas

1 INTRODUÇÃO

O processo de ensilagem, quando comparado com outros processos de conservação de forragens, é o que retém maior quantidade de nutrientes do material de origem (PAHLOW et al., 2003). Mundialmente, sobretudo na América do Norte e na Europa a silagem de planta inteira de milho é utilizada com fonte de alimento para o gado, sendo armazenada em silos horizontais por longos períodos (WILKINSON; TOIVONEN, 2003). No Brasil a silagem de milho é o volumoso mais utilizado para vacas em lactação (BERNARDES; REGO, 2014), devido ao seu alto valor nutritivo. Contudo, quando esta silagem é confeccionada ou manejada de forma inadequada, o crescimento de microrganismos deterioradores, como bactérias ácido acéticas, leveduras e fungos é favorecido após a abertura do silo.

A silagem de milho é particularmente susceptível à deterioração aeróbia (WEINBERG et al., 2011). Segundo Ranjit e Kung (2000) as leveduras são os primeiros microrganismos atuantes na deterioração das silagens, por utilizarem o ácido láctico como substrato para o seu crescimento. Como consequência, tem-se uma elevação no pH da massa, o que poderá favorecer o crescimento de microrganismos nocivos, como clostrídeos e listéria. Segundo Spoelstra; Courtin e Van Beers (1988), a deterioração de silagens de milho expostas ao ar pode ser iniciada também por bactérias ácido acéticas, capazes de oxidar o etanol a ácido acético em um processo que não produz CO₂ e altera sutilmente o pH e a temperatura das silagens. Os fungos filamentosos também participam na deterioração, porém em estágios mais avançados (WOOLFORD, 1990).

Alguns estudos revelam alterações no desempenho de animais alimentados com silagens deterioradas, como reduções no consumo (WHITLOCK et al., 2000), na produção de leite (HOFFMAN; OCKER, 1997) e na digestibilidade dos nutrientes (NADEU et al. 2011, WHITLOCK et al., 2000). No estudo de Santos et al. (2014) altas taxas de inoculação com leveduras no líquido ruminal também afetaram negativamente a digestibilidade dos nutrientes.

Observações a campo sugerem que o fornecimento de silagens expostas ao ar e com contagem elevada de leveduras, para vacas leiteiras, pode estar associado à alterações como a síndrome da baixa gordura no leite.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da inoculação de silagens de milho com leveduras e/ou sua exposição ao ar por 48 horas, sobre o valor nutritivo das silagens e desempenho de vacas leiteiras.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Silagem de milho

O milho é um cereal popularmente conservado como silagem e grandes áreas são cultivadas para este propósito em diversas partes do mundo (McDONALD, 1981). O milho é uma das espécies forrageiras mais utilizadas para produção de silagem em função do seu alto conteúdo de energia, facilidade de mecanização no processo de ensilagem e alta produção de matéria seca por unidade de área. Da família Poaceae, é a espécie que proporciona a melhor silagem, com grande aceitabilidade pelos animais e sem a necessidade de aditivos (EVANGELISTA; LIMA, 2000).

Segundo Weiss (1994), o conteúdo energético dos alimentos é influenciado pela proteína bruta, lipídeos, carboidratos não estruturais, fibra insolúvel em detergente neutro e a digestibilidade destes nutrientes. De acordo com Zopollatto e Sarturi (2009), alguns aspectos positivos do milho para justificar a sua utilização como silagem seriam:: alta produção de matéria seca, teor de matéria seca ótimo na colheita, mínimo de 3% de carboidratos solúveis, e baixa capacidade tamponante, resultando em uma fermentação adequada. Um estudo realizado por Loucka et al. (2014), durante 7 anos consecutivos, para avaliar o efeito entre os anos sobre o valor nutricional e fermentativo das silagens de milho, demonstrou que a variabilidade do ano afetou menos estes parâmetros qualitativos do que o teor de matéria seca das plantas. Desse modo, para obtenção de silagens de milho com boa qualidade nutritiva e fermentativa deve-se respeitar o teor de matéria seca na colheita entre 32% e 35%. Com essas características a silagem de milho proporciona aos microrganismos desejáveis, que são as bactérias lácticas, a capacidade de fermentar os carboidratos solúveis da planta até ácido láctico, que acidifica o meio, resultando na preservação dos nutrientes (MCDONALD; HENDERSON; HERON 1991).

Potenciais desvantagens da utilização do milho para ensilagem seria a concorrência com a alimentação humana (ALVES et al., 2007) e seu efeito sobre o solo, uma vez que o corte para produção de silagem deixa pouca cobertura vegetal sobre o solo, aumentando o potencial de erosão dessas áreas (ALLEN; COORS; ROTH, 2003).

De acordo com os valores de exigência do National Research Council (NRC), o consumo de silagem de milho de aproximadamente em 2,25 kg de matéria seca por 100 kg de peso corporal, com o valor de nutrientes digestíveis totais (NDT) de 68 % com base na matéria seca, é suficiente para suplementar a energia exigida para manutenção de uma vaca de 600 kg e ainda é suficiente para produzir 16 kg de leite com 4% de gordura (Coppock, 1969). Segundo o estudo feito por Daniel (2011), uma fração muito importante encontrada em silagens deve ser considerada quando calculado o valor energético dos ingredientes das rações, que são os valores encontrados para os compostos voláteis. Este mesmo autor concluiu que quando etanol e ácido acético foram incluídos na dieta de vacas leiteiras, estes dois compostos contribuíram positivamente para o desempenho dos animais.

2.3 Deterioração aeróbia em silagens de milho

Segundo Woolford (1984), a manutenção da condição de anaerobiose é difícil quando o silo é aberto para alimentar os animais, e virtualmente impossível quando o alimento foi removido do silo. Sendo assim, um aspecto negativo não só relacionado à silagem de milho, mas às demais silagens, são os microrganismos indesejáveis que podem atuar nas fases de armazenamento e pós-abertura, quando a silagem entra em contato com o ar, dando início à deterioração dos nutrientes.

A deterioração aeróbia é invariavelmente acompanhada das perdas de ácidos orgânicos advindos da fermentação, proteínas e carboidratos (WOOLFORD, 1984). Os principais fatores que afetam a estabilidade aeróbia das silagens são o ar, a disponibilidade de substratos e a temperatura (OHYAMA; MASAKI; HARA, 1975). Sendo assim, o estudo de Ashbell et al. (2002) sugere que em climas quentes deve-se tomar um cuidado especial durante o desabastecimento do silo para evitar altas perdas em aerobiose. A entrada de ar durante o armazenamento da silagem pode afetar a composição da população de leveduras. Jonsson e Pahlow (1984) observam que a manutenção de condições anaeróbias favorecem o crescimento de leveduras com habilidade fermentativa e que não são capazes de fermentar o ácido láctico. Por outro lado, os autores observaram que a penetração de oxigênio durante o armazenamento favoreceu o crescimento de leveduras assimiladoras desse composto. De acordo com Weinberg et al. (2011) devido à conversão de

carboidratos solúveis em ácido láctico durante a fase de fermentação, silagens de milho são mais instáveis em exposição aeróbia quando a concentração de ácido láctico é rapidamente consumida por leveduras assimiladoras de lactato. Na presença de oxigênio, esses microrganismos são capazes de oxidar açúcares e ácido láctico resultando na produção de CO₂, H₂O e calor, elevando as perdas de matéria seca e, conseqüentemente, reduzindo o valor nutritivo das silagens. Além disso, a degradação do ácido láctico resulta em aumento no pH da silagem, que por sua vez, desencadeia o crescimento de outros microrganismos indesejáveis (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

2.4 Microrganismos responsáveis pela deterioração aeróbia

Segundo Woolford (1990), a deterioração aeróbia é de longe a maior fonte de perdas no processo de ensilagem. Como resultado da infiltração de ar, microrganismos ácido tolerantes e aeróbios (facultativos) presentes na silagem começam a proliferar, oxidando açúcares residuais, ácido láctico, ácido acético e etanol como substratos (PAHLOW et al. 2003).

De acordo com Ranjit e Kung (2000), sabe-se que as leveduras assimiladoras de lactato são os primeiros microrganismos a atuar na deterioração aeróbia da silagem. A degradação do ácido láctico resulta em aumento de pH da silagem, que por sua vez, desencadeia o crescimento de outros microrganismos indesejáveis (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Investigações feitas por Spoelstra; Courtin e Van Beers (1988), em silagens de planta inteira de milho, indicam que bactérias ácido acéticas também podem iniciar a deterioração aeróbia, oxidando o etanol a ácido acético. Além disso, o gênero *Acetobacter* pode oxidar acetato e lactato a dióxido de carbono e água. Leveduras e bactérias ácido acéticas são usualmente encontradas em silagens de milho, porém o grupo das leveduras é predominante, o que lhe confere maior importância como agente inicial de deterioração (PAHLOW et al. 2003).

Após o início da deterioração aeróbia, os bacilos são, provavelmente, o primeiro grupo de microrganismos a se desenvolver. Embora sejam anaeróbios estritos, clostrídeos podem crescer durante a deterioração aeróbia devido à coexistência de nichos aeróbicos e anaeróbicos nas silagens, estes advindos do consumo de oxigênio pelos microrganismos aeróbios atuantes nos processos de

oxidação, que resultam em pontos de anaerobiose na massa aerada, propiciando o crescimento de clostrídeos. (PAHLOW et al. 2003).

Os fungos filamentosos se desenvolvem durante os estágios avançados da deterioração aeróbia em silagens (WOOLFORD, 1990). As espécies de fungos regularmente isoladas de silagens pertencem aos gêneros: *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Byssoschlamys*, *Absidia*, *Arthrimum*, *Geotrichum*, *Monascus*, *Scopulariopsis* e *Trichoderma* (PELHATE, 1977; WOOLFORD, 1984; FREVEL; ENGEL; TEUBER, 1985; JONSSON et al. 1990; NOUT et al. 1993). Spadaro et al. (2015) identificaram 11 espécies de leveduras no momento da colheita e apenas 8 após a fermentação do silo, pertencentes, principalmente, aos gêneros *Galactomyces*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Na exposição aeróbia da silagem, as espécies dominantes foram reduzidas para o número de 4 (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*), com grande prevalência de *Aspergillus fumigatus*. A população de leveduras associadas com a deterioração de silagens pode ser dividida em dois grupos. O primeiro grupo é formado por leveduras com alta afinidade por açúcares e com capacidade variável de assimilar o ácido láctico. Neste grupo estão inclusos espécies como *Saccharomyces cerevisiae* e espécies de *Torulopsis*. O segundo grupo têm alta afinidade respiratória por ácido láctico. Estes organismos incluem espécies do gênero *Candida*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Hansenula* e *Endomycopsis* (MOON; ELY, 1979; JONSSON; PAHLOW, 1984; MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Woolford (1990) relatou que o último grupo determina a susceptibilidade da silagem à deterioração aeróbia. Segundo esse autor, a rápida deterioração aeróbia ocorre quando a população desses microrganismos é maior que 10^5 ufc por grama de silagem fresca, independentemente da composição química da silagem. O número de leveduras nas silagens é variável e pode ser afetado por diferentes fatores de manejo, incluindo o acondicionamento, densidade, matéria seca, produtos de fermentação e o tipo de filme plástico utilizado para vedar os silos (BORREANI; TABACCO, 2014). Pahlow et al. (2003) relataram que leveduras do gênero *Candida* e *Hansenula* (*Pichia*) são particularmente abundantes durante a fase aeróbia devido à sua capacidade de assimilação do lactato e alta afinidade por glicose. De acordo com a revisão feita por Middelhoven (1998), as principais espécies encontradas em silagens de milho são: *Candida famata*, *Candida holmii*, *Candida krusei*, *Candida lambica*, *Candida milleri*,

Geotrichum candidum, *Pichia anomala*, *Saccharomyces dairensis*, *Sacharomyces exiguus*.

No Brasil, existem poucos dados de quantificação e de diversidade de espécies de leveduras presentes em silagens. Ávila et al. (2010) encontraram, em silagens de cana, principalmente as espécies: *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia anomala*, *S. cerevisiae* e *Candida glabrata*, sendo a presença destas espécies influenciadas pelo tipo de cultivar e pelo tempo de fermentação. Em outro estudo mais recente, Carvalho et al. (2014) identificaram, em silagens de cana, as espécies: *C. ethanolica*, *C. diversa*, *Z. bailii*, *S. pombe*, *Pichia sp* and *Schizosaccharomyces sp*, sendo as quatro primeiras encontradas pela primeira vez em silagens, de acordo com a literatura.

Um aspecto contraditório da presença de leveduras em silagens seria seu possível papel antagônico frente a microrganismos patogênicos. O uso de bactérias antagônicas para inibir bactérias patogênicas tem sido estudado extensivamente durante anos, enquanto a mínima atenção tem sido dada as leveduras com uma função similar (HATOUM; LABRIE; FLISS, 2012). Segundo Bajaj et al. (2013), a espécie *Pichia kudriavzevii* RY55 produz uma toxina que apresenta uma excelente atividade antibacteriana contra patógenos como por exemplo: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas alcaligene*. Outras espécies de leveduras como a *Pichia norvengensis* WSYC 592 cultivadas em *red smear cheese*, reduziram a contagem de *Listeria monocytogenes* em 7 log de unidade (GOERGES, et al. 2011). No entanto, diante da relevância desses microorganismos como agentes de deterioração aeróbia, o conhecimento das características fisiológicas e morfológicas das espécies de leveduras envolvidas na deterioração das silagens é preponderante para o entendimento das modificações que ocorrem durante a deterioração e também por constituir a base dos métodos tradicionais de identificação de leveduras (ÁVILA BRAVO MARTINS; SCHWAN, 2010).

2.5 Efeitos de silagens deterioradas sobre o desempenho animal

Quando silagens de milho deterioradas são incorporadas a rações totais a estabilidade aeróbia da ração total pode ser comprometida no cocho, afetando também o desempenho animal. Além disso, alguns microrganismos

encontrados em silagens deterioradas e seus produtos metabólicos podem comprometer a saúde dos animais (CAI et al., 1999). No estudo de Hoffman e Ocker (1997), 18 vacas em lactação foram alimentadas com ração total contendo silagem de grão úmido fresca ou deteriorada. O material fresco foi retirado do silo diariamente enquanto que a silagem deteriorada foi removida do silo e armazenada em piso de concreto no início de cada período experimental, que era composto por 14 dias. Os autores observaram redução de 3,2 kg de leite por vaca por dia quando silagem deteriorada foi fornecida aos animais.

Em um experimento sobre preferência de forragens por vacas, Wichert; Kienzle e Bauer (1998) concluíram que silagens expostas ao ar com baixa qualidade higiênica reduziram o consumo de forragem entre 10 a 20%, em comparação com a silagem fresca. Em estudo semelhante com cabras alimentadas com silagem de milho, Gerlach et al. (2013) relataram que houve um forte impacto da deterioração, após 4 dias de exposição, no consumo e na preferência pelas cabras. No estudo de Whitlock et al. (2000), observou-se que o fornecimento de silagens deterioradas teve um impacto negativo sobre o valor nutritivo da ração total. Os autores relataram depressão no consumo de matéria seca quando a silagem deteriorada foi incorporada na dieta de novilhos providos de cânulas ruminais. Além disso, quando os animais foram alimentados com uma proporção de 3:1 da silagem normal em relação à silagem deteriorada foi observado redução na digestibilidade da matéria orgânica, proteína bruta, fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) de 5,0, 4,1, 7,2 e 9,9 unidades percentuais, respectivamente. Estes pesquisadores ainda relataram que o fornecimento de 25% de silagem deteriorada desestruturou parcialmente ou totalmente a fase sólida do rúmen. Nadeau et al. (2011), avaliando diferentes estádios de maturação e tempos de fermentação, com a adição ou não de aditivos, relataram que silagens de milho sem a adição de ativos diminuíram a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica durante a exposição aeróbia, assim como as silagens colhidas com menor teor de matéria seca (28 % de matéria seca) contendo aditivos.

Santos et al. (2014) utilizando a espécie de levedura *Issatchenkia orientalis*, isolada de silagem de milho, em concentrações crescentes (0; 4,4; 6,4; 8,4 log₁₀ ufc), incubadas juntamente com ração total *in vitro*, observaram que leveduras em altas concentrações podem alterar a fermentação do fluído ruminal, reduzindo a digestibilidade da fibra e também aumentando as concentrações de propionato e

acetato. Segundo estes autores, observações do campo tem sugerido que problemas como baixo consumo de alimentos ou baixa gordura no leite são frequentemente reportados quando vacas ingerem silagens com altas contagens de leveduras. Estudos mostram que vacas consumindo dietas à base de silagem de milho como volumoso único ou principal são mais suscetíveis à depressão da gordura do leite quando gorduras insaturadas são suplementadas. Ruppert et al. (2003) e Onetti et al. (2004) verificaram que a substituição de silagem de milho por silagem de alfafa minimiza o efeito negativo que a suplementação com lipídios de origem animal pode exercer sobre o teor de gordura do leite. Onetti et al. (2004) relataram que a adição de silagem de alfafa à dieta reduziu a formação do ácido graxo *trans*-10 C18:1 no rúmen. O'Kiely e Muck (1992) mostraram que silagens de alfafa são mais estáveis que silagens de milho e este fator pode explicar a atenuação da depressão da gordura do leite quando silagens de milho foram substituídas por silagens de alfafa. Apesar do *trans*-10 C18:1 não estar diretamente envolvido com a síntese de gordura do leite na glândula mamária (Lock et al., 2007), este ácido graxo pode servir como marcador para o tipo de alterações das rotas metabólicas que ocorrem no rúmen e que caracterizam o processo de depressão da gordura do leite induzida pela dieta. O *trans*-10 C18:1 é um intermediário na via de biohidrogenação que produz *trans*-10, *cis*-12 ácido linoléico conjugado (CLA). Dentre os possíveis mecanismos que explicam a síndrome da baixa gordura do leite, Baumgard et al. (2000) relataram que o *trans*-10 *cis*-12 CLA é o principal ácido graxo inibidor da síntese de gordura do leite em vacas leiteiras. Em outra vertente, Santos e Kung (2011) afirmam que o tipo de levedura e seu metabolismo na silagem não têm sido bem estudados, assim como a causa exata da redução de consumo e/ou desempenho dos animais consumindo silagens deterioradas por estes microrganismos.

Os fungos encontrados nas silagens também podem estar associados com problemas reprodutivos em vacas leiteiras. De acordo com Sassahara et al. (2003), inadequações no manejo da cultura, no processo de ensilagem e no desabastecimento do silo podem resultar em uma silagem de baixa qualidade, com desenvolvimento de fungos e micotoxinas. Nesse contexto, as aflatoxinas e zearalenonas merecem ser mencionadas devido ao seu efeito estrogênico em animais domésticos, levando à menor produção de leite, repetição de estro, baixa taxa de concepção e aborto.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragens de silagens de milho para quantificação e isolamento de leveduras

A fase inicial do trabalho foi dedicada à caracterização da composição química e da população de leveduras presentes em amostras de silagens de milho produzidas em fazendas comerciais. Para isto, 13 amostras de silagens de milho produzidas em fazendas comerciais nos seguintes estados: São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Goiás foram coletadas e encaminhadas ao Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia da USP/ESALQ, Piracicaba/SP. Para amostragem do painel do silo, foi respeitada bordadura de 0,5 m em cada aresta (topo, base, lateral esquerda e lateral direita), gerando área útil para a coleta das amostras. Dentro da área útil foram traçadas 3 linhas horizontais e 3 linhas verticais equidistantes e na intersecção dessas foi medida a temperatura e realizada a coleta de amostra em formato cilíndrico com 5 cm de diâmetro e 20 cm de profundidade (Figura 1). Um total de nove amostras individuais foram agrupadas gerando uma amostra única composta de 900 g que foi embalada à vácuo em saco plástico, alocada em caixa isotérmica com gelo e enviada ao laboratório para as análises. As medidas de temperaturas das intersecções também foram agrupadas, gerando a temperatura média da face dos silos.

Figura 1 – Esquema de amostragem do painel do silo

No laboratório, uma alíquota de 25 g foi diluída em 225 mL de solução salina ($0,105\text{g KCl} + 2,25\text{g NaCl} + 0,08\text{g CaCl dihidrado} + 0,043\text{g NaHCO}_3$, para cada litro de solução) e homogeneizada em um agitador por 4 minutos a 152 rpm para obtenção de extrato aquoso (KUNG Jr. et al., 1984). O extrato aquoso foi

utilizado para determinação de pH e outra alíquota do mesmo extrato aquoso foi utilizada para determinação da população de leveduras por plaqueamento. Após a quantificação, as colônias presentes na placa de petri foram colhidas e isoladas para identificação posterior.

O pH foi determinado com o auxílio de potenciômetro digital, modelo DM 20® (Digimed Analítica, São Paulo).

Para a quantificação da população de mofos e leveduras, foi realizada diluição em série (10^{-3} a 10^{-7}) do extrato aquoso em solução salina pré-esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121°C . Após a diluição, alíquotas de 1 mL do extrato aquoso foram transferidas para placas de petri de 90mm x 15mm (Kasvi, China) para o plaqueamento em profundidade (pour plate) e homogeneizadas com meio ágar a base de extrato de malte (Himedia M137, Mumbai, India). Após a solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubadas em BOD (Marconi, Piracicaba, São Paulo) a 32°C por 48-72 horas. Finalizado o período de crescimento, a população de leveduras e mofos foi determinada e seis colônias de leveduras foram colhidas de forma aleatória e isoladas para identificação. A Tabela 1 contém os valores de pH e de contagem de leveduras e mofos. O isolamento foi realizado por estrias de esgotamento, com auxílio de alça de platina, feitas em ágar Sabouraud Dextrose (Himedia, M063, Mumbai, India) previamente solidificado. Após realizar este procedimento por 3 vezes, as colônias da terceira estria foram consideradas puras e foram utilizadas para identificação das espécies. Essas culturas puras também foram armazenadas em tubos criogênicos de 2mL, em temperatura de -80°C em solução de glicerol à 15% para posterior utilização na criação de um inóculo para utilizar na fase de estabilidade aeróbia e desempenho de animais.

Tabela 1 – Origem, pH, matéria seca, temperatura e contagem de leveduras e mofo em silagens de milho colhidas em diferentes fazendas

número da amostra	Cidade/Estado	pH	MS %	Temperatura °C	Levedura log10 ufc/g	Mofo MV
1	Descalvado/SP	4,02	30,90	36,67	3,32	6,15
2	Descalvado/SP	3,85	34,86	31,22	5,68	2,30
3	Araras/SP	3,92	32,03	31,22	3,77	1,60
4	Araras/SP	3,76	33,37	34,61	4,85	2,30
5	Castro/PR	4,53	32,07	26,44	5,65	1,30
6	Passo Fundo/RS	4,36	36,68	28,47	5,93	2,78
7	Coxilha/RS	4,47	35,16	28,87	5,57	2,00
8	São Pedro/SP	4,61	32,06	31,78	2,78	0,00
9	São Pedro/SP	3,98	29,15	20,83	3,08	0,00
10	São Pedro/SP	3,95	29,47	21,67	3,67	0,00
11	São Pedro/SP	3,97	31,83	25,17	3,23	0,00
12	São Pedro/SP	4,19	25,88	30,83	3,52	0,00
13	Mineiros/GO	3,79	30,43	-	3,32	0,00

3.2 Identificação de espécies de leveduras por utilização de substrato seletivo

Para a identificação dos substratos utilizados como fonte de energia e das espécies de leveduras, será utilizado kit comercial de identificação de leveduras conhecido como ID 32C (bioMerieux, Marcy l'Etoile, França). Este sistema consiste de uma placa com 32 orifícios que foram utilizados para os testes de assimilação de 29 substratos (carboidratos, ácidos orgânicos, e aminoácidos), um teste de susceptibilidade à cicloheximida, um teste colorimétrico com esculina e um controle negativo que consiste de um orifício sem a presença de substratos (RAMANI et al., 1998). O procedimento para identificação de leveduras e utilização de substratos foi feito de acordo com as recomendações do fabricante. Este procedimento consiste em transferir as células de leveduras das culturas puras para um tubo contendo água estéril e a turbidez final dessa solução foi ajustada para valores próximos ao de uma solução referência McFarland número 2. Subsequentemente, 250 µL dessa suspensão foram dispensados em solução de meio ID 32C fornecido junto com o kit e homogeneizado para preparação de solução uniforme do inóculo. Finalizada esta

etapa, o inóculo foi transferido para os orifícios da placa, sendo posteriormente coberto com tampa plástica e incubado a 30°C por 48 horas. As placas foram examinadas visualmente e o crescimento foi determinado de acordo com a turbidez de cada orifício. Os resultados foram convertidos em códigos binários (0 ou 1) e as culturas puras foram identificadas com o auxílio do software api-web™ 2006 (AB bioMerieux).

Na Figura 2 são apresentadas as principais espécies de leveduras identificadas nas amostras de silagens de milho. Dentre as espécies identificadas, *Candida norvegensis* foi a predominante (correspondendo à 29% do total de isolados), seguida por *Candida valida*, *Candida inconspicua* e *Candida krusei* (12% para cada uma das espécies). As demais espécies (*Candida holmii*, *Candida rugosa*, *Cryptococcus capitatum*, *Kloeckera japonica* e *Saccharomyces cerevisiae*) foram detectadas em menor frequência e corresponderam a 6% do total de isolados. A espécie de levedura identificada pelo Kit ID 32C (bioMerieux, Marcy l'Etoile, França), *Candida novergensis*, segundo a classificação atual do National Center for Biotechnology Information (Rockville Pike, Bethesda MD, USA) o nome da espécie encontrada é *Pichia norvegensis*. Os substratos do Kit ID 32C principalmente utilizados para crescimento foram: lactato, glicerol, glicose e glucosamina.

Figura 2 - Distribuição das espécies de leveduras identificadas nas amostras de silagens de milho

3.3 Preparo do inóculo

Para compor um dos tratamentos da ensilagem, um inóculo foi gerado a partir de uma das amostras que foram identificadas com a espécie *Candida norvegensis* pelo kit ID 32C. Esta espécie de levedura foi multiplicada utilizando melaço de cana-de-açúcar líquido, que continha 58% de açúcares redutores totais, 26,1 g/kg de potássio, 4,3 g/kg de magnésio, 26,0 mg/kg de manganês e 6,2 mg/kg de zinco. O melaço de cana foi autoclavado a 120° C por 15 minutos. Inicialmente, as células de leveduras foram multiplicadas em meio Difco™ YPD Broth (BD, Le Point de Claix, França). Com o intuito de aumentar a concentração de açúcares, o melaço de cana foi adicionado em concentrações aumentadas progressivamente, até atingir a concentração final de 8 % de açúcares. A incubação do mosto com as leveduras foi a 30° C em estufa BOD (Marconi, Piracicaba, São Paulo). A dose escolhida para inocular a silagem de milho foi de 1×10^5 ufc/g de forragem, pois segundo Woolford (1990), populações acima deste valor são particularmente mais propensas a deteriorar a silagem e reduzir sua qualidade. Sendo assim, para inocular 80 t de silagem de milho foi considerado que era necessário 480g de leveduras, considerando que a massa de uma célula de levedura fosse 60×10^{-12} (MILO, 2010) g. Considerando a densidade das células de leveduras de 1,3, o volume total de mosto a ser inoculado em 80 toneladas foi de 9, 25 L. Com isso, a massa de leveduras em relação volume total correspondeu à aproximadamente 4%.

3.4 Ensilagem

A ensilagem foi conduzida no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, Piracicaba/SP. O híbrido de milho cultivado para ensilagem foi o 2B877PW (Dow Agrosiences, Santo Amaro, São Paulo) e a colheita foi realizada quando as plantas atingiram em média 34% de matéria seca. As plantas foram colhidas com uma colhedora forrageira de duas linhas (Nogueira, Itapira, São Paulo), acoplada ao trator e ajustada para o tamanho médio de partículas teórico de 8 mm.

Para o ensaio de desempenho de vacas leiteiras e estabilidade aeróbia foram produzidas dois tipos de silagens, sendo uma controle, com apenas a adição de água deionizada e melaço de cana-de-açúcar autoclavado para igualar a

concentração de açúcar na massa (tratamento controle) e outra composta pelo o inóculo composto com leveduras na concentração de 1×10^5 ufc/g de forragem (tratamento levedura). O inóculo foi diluído em água deionizada e aplicado na esteira da embutidora de forragem na proporção de 2 L/t. A ensilagem ocorreu em silos tipo bolsa (Pacifilbag, Sapiranga, Rio Grande do Sul) com as dimensões de 1,52 m de diâmetro por 60,96 m de comprimento e composto por lona de polietileno dupla face com 200 micrômetros de espessura. Para a ensilagem foi utilizada uma embutidora de forragens (Mentamit, Cajuru, São Paulo) acoplada ao trator, com uma capacidade operacional de 40 toneladas por hora. Para cada tratamento foram criados dois silos com aproximadamente 40 toneladas cada. Ao atingir a quantidade esperada de forragem, as extremidades foram fechadas com cordas e cobertas com terra para evitar a entrada de ar. As datas da confecção das silagens foram: tratamento controle - 17 e 18 de março de 2014; tratamento levedura – 19 e 20 de março de 2014. Durante cada ensilagem foram coletadas amostras para determinar o pH, bactérias ácido lácticas (BAL), leveduras e fungos (Tabela 2). O pH, as leveduras e os fungos foram quantificados de acordo com procedimentos descritos anteriormente. A contagem de BAL obtida por diluições de 10^{-4} a 10^{-7} e em meio Lactobacilli MRS ágar (Acumedia, Michigan, EUA) contendo natamicina (0,25 g/L). Após a solidificação, as placas de petri foram invertidas e incubadas a 32°C por 48 horas.

3.5 Ensaio de avaliação de aditivos em silos experimentais

Além das silagens para avaliar o desempenho de vacas, também foram confeccionados silos experimentais para a avaliação de aditivos sobre o efeito das leveduras inoculadas na concentração de 1×10^5 ufc/g forragem. Os tratamentos e os aditivos utilizados estão na tabela 2. O aditivo contendo *Lactobacillus buchneri* foi inoculado de acordo com as especificações do fabricante. A aplicação do inóculo com leveduras e dos aditivos na forragem foi realizada com auxílio de um spray e, em seguida, a silagem foi homogeneizada manualmente. Os silos experimentais foram confeccionados em baldes com a capacidade de 20 L, compactados com os pés revestidos por botas descartáveis e fechados tampa e fita adesiva para evitar a entrada de ar. A quantidade de forragem em cada balde foi de aproximadamente 15 kg.

Tabela 2 – Tratamentos impostos para os silos experimentais*

Sigla do Tratamento	Inoculação com levedura	Aditivo	Tipo de aditivo
C	-	-	-
LEV	+	-	-
LB	+	+	<i>L. buchneri</i>
BS	+	+	0,1% Benzoato de sódio

- ausência de aditivo e/ou levedura;

+ presença do aditivo e/ou levedura;

* Foram utilizadas 4 repetições por tratamento

Os silos experimentais foram produzidos no dia 21 de março de 2014 com o mesmo híbrido de milho utilizado para os silos do tipo bolsa. Durante a confecção dos silos experimentais, foram coletadas amostras da massa para quantificação de bactérias ácido lácticas, leveduras, fungos e pH. A quantificação se deu conforme os procedimentos descritos anteriormente. Estes silos foram abertos no dia 24 de junho, após 94 dias de armazenamento. Após a abertura foram realizadas amostragens para pH, contagem de microrganismos, ensaio de estabilidade aeróbia e perdas de MS.

3.6 Abertura e amostragens dos silos de larga escala

Os silos do tipo bolsa foram abertos no dia 20 de agosto de 2014, após 123 dias de ensilagem. No momento da abertura foi montado um pré-ensaio de estabilidade aeróbia para os dois tratamentos (controle e levedura) utilizando quatro repetições, utilizando o método descrito por Ranjit e Kung (2000). Neste ensaio foi observado que o tratamento com leveduras não manteve a estabilidade e apresentou as maiores temperaturas entre 48 e 72 horas, após a exposição ao ar, sugerindo que a atividade da levedura ocorria após as 48 horas. Sendo assim, este ensaio permitiu criar os fatores silagem fresca e silagem exposta, onde: silagem fresca – fornecida imediatamente após a retirada do silo; silagem exposta – fornecida após 48 horas de exposição ao ar, que compuseram os tratamentos do ensaio de desempenho.

Estas silagens foram amostradas para serem analisadas quanto as contagens de microrganismos, estabilidade aeróbia, perfil fermentativo, tamanho médio de partículas (TMP) e composição bromatológica.

3.7 Ensaio de estabilidade aeróbia e contagem de microrganismos

Após a abertura dos silos tipo bolsa, a cada 21 dias foram realizados ensaios de estabilidade aeróbia e contagens de bactérias ácido-láticas (BAL), leveduras e fungos. A estabilidade aeróbia foi obtida segundo o método descrito por Ranjit e Kung (2000). Para a estabilidade aeróbia foram coletadas amostras que representavam todo o painel dos silos. Para cada tratamento havia duas repetições, sendo que cada repetição continha aproximadamente 3,5 kg de silagem. A silagem foi acondicionada sem compactação em baldes plásticos, que foram distribuídos aleatoriamente em sala com temperatura controlada ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 10 dias. As temperaturas das silagens e do ambiente foram coletadas a cada 30 minutos por meio de *dataloggers* modelo Novus Tagtemp (Novus, Porto Alegre, Rio Grande do Sul) que foram inseridos no centro geométrico da massa de cada balde. Nos dias 0 e 10 de cada ensaio foram colhidas amostras para determinação do teores de matéria seca, colocadas em estufa de ventilação forçada à 60°C por 72 horas, para determinação das perdas de matéria seca. No dia 0 foram coletadas amostras para quantificação de pH, BAL, leveduras e fungos, de acordo com procedimentos descritos anteriormente.

Para os ensaios de estabilidade aeróbia as variáveis foram: estabilidade aeróbia, definida como o tempo necessário para a temperatura da silagem elevar 2°C acima da temperatura do ambiente (KUNG; STOKES; LIN, 2003); temperatura máxima alcançada pela massa, tempo; para atingir a temperatura máxima, acúmulo de temperatura em 5 dias de exposição aeróbia, acúmulo de temperatura em 10 dias de exposição aeróbia; e perda de matéria seca.

3.8 Perfil fermentativo

Os extratos aquosos das amostras de silagens dos silos bolsas foram obtidos por meio da adição de 25 g de amostra fresca diluída em 225 mL de água deionizada (KUNG et al., 1984). Após serem centrifugados a $10.000\times g$ por 20

minutos, os sobrenadantes destes extratos foram filtrados em papel filtro qualitativo com diâmetro de 12,5 cm e armazenados. Os produtos de fermentação analisados foram determinados utilizando-se cromatógrafo gasoso com detector de massas GCMS QP 2010 plus (Shimadzu, Kyoto, Japão), com coluna capilar Stabilwax (crossbond carbomax polietilenoglicol) de 60 m com 0,25 mm de diâmetro (Restek, Bellfonte, EUA). Sendo os produtos de fermentação: acetona, acetato de etila, metanol, álcool isopropílico, etanol, acetato de propila, 2-butanol, 1-propanol, lactato de etila, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiônico, 2,3-butanodiol, ácido isobutírico, 1,2 propanodiol, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido valérico. A concentração de ácido láctico foi determinada por método colorimétrico descrito por Pryce (1969) utilizando um espectrofotômetro Janway 6305 (Marconi, Piracicaba, São Paulo), ajustado para o comprimento de onda de 565 nm.

Com a quantificação dos produtos de fermentação, os valores de matéria seca da silagem foram corrigidos para compostos voláteis de acordo com a equação de Weissbach (2009), eq. (1).

$$\begin{aligned} \text{MSc (\%MV)} = & \text{MS estufa (\%MV)} + 0,08 \times \text{ácido láctico (\%MV)} + 0,77 \times \\ & 1,2\text{-propanodiol (\%MV)} + 0,87 \times 2,3\text{-butanodiol (\%MV)} + 0,95 \times \text{ácido graxos voláteis} \\ & (\text{acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico}) (\%MV) + \\ & \text{lactato de etila (\%MV)} + 1\text{-propanol (\%MV)} + 2\text{-butanol (\%MV)} + \\ & \text{acetato de propila (\%MV)} + \text{etanol (\%MV)} + \text{álcool isopropílico (\%MV)} + \\ & \text{acetato de etila (\%MV)} + \text{acetona (\%MV)} \end{aligned} \quad (1)$$

3.9 Animais e instalações

O ensaio de desempenho aconteceu entre os meses de agosto e outubro de 2014. Para o ensaio foram utilizadas 20 vacas da raça Holandesa com a média de 28 ± 9 litros de leite no terço final da lactação e com o peso médio de 661 ± 116 , no início do experimento. Os animais foram mantidos em sistema de confinamento “free stall” equipados com bebedouros e cochos com sistema de identificação individual e portão eletrônico (Intergado, Contagem, Minas Gerais), sistema de ventiladores e cama de areia. Foi realizada a limpeza das camas de areia

diariamente para remoção de fezes e urina e a reposição da areia foi feita semanalmente.

A ordenha foi realizada duas vezes ao dia, no período da manhã (06h00) e no período da tarde (17h00). Após estes períodos os animais permaneciam em descanso em uma área sombreada por aproximadamente uma hora antes de retornar as instalações experimentais. O peso corporal dos animais foi determinado no início e no final de cada período experimental, com avaliações realizadas em dois dias consecutivos.

3.10 Dietas experimentais e manejo alimentar

O delineamento experimental foi um quadrado latino 4 × 4, onde os animais foram agrupados de acordo com a ordem de lactação (primípara e múltipara) e a produção de leite. Foram compostos 5 quadrados latinos. Os períodos experimentais tiveram a duração de 21 dias, sendo 15 dias para adaptação e 6 dias para coleta de amostras e dados.

Para compor os tratamentos foi utilizado o arranjo fatorial 2 x 2, considerando: a silagem controle ou inoculada com levedura; a silagem fresca ou exposta ao ar por 48h. A silagem fresca foi fornecida imediatamente após ser retirada do silo e a silagem exposta ao ar foi acondicionada em sacos de ráfia e fornecida aos animais após 48 horas. Portanto, os quatros tratamentos fornecidos aos animais foram:

Controle fresca (CF) – dieta composta de silagem de milho sem inoculação e fornecida imediatamente após a sua retirada do silo;

Controle exposta (CE) – dieta composta de silagem de milho sem inoculação e fornecida após 48h de exposição ao ar;

Levedura fresca (LF) – dieta composta de silagem de milho inoculada com levedura e fornecida imediatamente após a sua retirada do silo;

Levedura exposta (LE) – dieta composta por silagem de milho inoculada com levedura e fornecida após 48h de exposição ao ar.

As rações experimentais eram compostas de 53% de silagem de milho, 8% de caroço de algodão, 9,5% de polpa cítrica, 18% de farelo de soja, 9% de milho moído seco e 2,5% de premix mineral. Estas rações foram formuladas para serem isoproteicas de acordo com o NRC (2001).

Durante o ensaio de desempenho, o alimento foi fornecido à vontade, duas vezes ao dia e foi calculado para que permitisse sobras de 10%, em relação à quantidade ofertada. As silagens e os ingredientes do concentrado foram pesados individualmente em balança eletrônica e a distribuição das rações foi realizada durante os períodos de ordenha na forma de ração completa, utilizando vagão forrageiro autopropelido Calan Super Data Ranger (American Calan, New Hampshire, EUA). A quantidade de alimento fornecido e as sobras foram quantificados diariamente para determinação do consumo de matéria seca. Durante o período de coleta, amostras dos ingredientes, do ofertado e das sobras de cada cocho foram coletadas e compostas por vaca em cada período e analisadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia da USP/ESALQ.

3.11 Análises bromatológicas

As análises bromatológicas foram realizadas para as amostras silagem coletadas na ensilagem, na abertura dos silos e durante o ensaio de desempenho. Também foram analisados os ingredientes e as sobras de cada vaca nos períodos de coleta. Aproximadamente 250g de cada amostra foi pesada e desidratada em estufa de ventilação forçada, com temperatura de 65 °C por 72 horas. Posteriormente, estas amostras foram moídas em moinho de facas tipo Willey equipados com peneiras com orifícios de 1,0 mm. Após a moagem as concentrações da matéria seca a 105°C foram determinadas de acordo com ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY - AOAC (2000). As cinzas foram feitas em sequência, por queima das amostras a 660°C durante 4 horas (AOAC, 1997). A concentração da proteína bruta foi realizada pelo método de combustão de Dumas, em aparelho LECO 2000, modelo FP-528 (LECO, Michigan, EUA), conforme Wiles, Gray e Kissling (1998). O extrato etéreo foi determinado por extração a quente com éter de petróleo em extrator Soxhlet, por 6 horas (AOAC, 1997). As concentrações de fibra em detergente neutro (FDN) foram determinadas conforme o método de Van Soest, Robertson e Lewis (1991), utilizando 15 g de sulfito de sódio e 5 mL de α – amilase com base no método sequencial descrito pela ANKON Fiber Analyser (ANKON Technology, New York, EUA). A concentração de carboidratos solúveis foi determinada em extrato alcoólico, pelo método fenol-sulfúrico (HALL, 2000). As concentrações foram determinadas através de espectrofotômetro Janway 6305

(Marconi, Piracicaba, Brasil), ajustado com o comprimento de onda de 490 nm. A glicose foi o açúcar utilizado como padrão. A matéria orgânica foi estimada através da eq. (2) e os carboidratos não fibrosos foram estimados pela eq. (3): (NRC, 2001).

$$\text{MO (\%)} = 100 - \text{cinzas} \quad (2)$$

$$\text{CNF (\%)} = 100 - (\text{cinzas} + \text{PB} + \text{EE} + \text{FDN}) \quad (3)$$

3.12 Controle leiteiro e análises do leite

A produção de leite foi registrada diariamente durante todos os períodos de coletas, na ordenha da manhã (06h00) e da tarde (17h00), por meio de medidor mecânico DeLaval (DeLaval Brasil, Jaguariúna, São Paulo). Foi realizada a coleta individual de leite dos animais referentes as ordenhas da manhã e as ordenhas da tarde que foram compostas em frascos contendo bronopol, durante dois dias consecutivos, e enviadas imediatamente para o Laboratório de Análise de Leite, da Clínica do Leite do Departamento de Zootecnia da USP/ESALQ, para determinações de proteína, gordura, lactose, sólidos totais, caseína, ácidos graxos livres e N-uréico e contagem de células somáticas. A contagem de células somáticas foi realizada através de citometria fluxométrica, utilizando-se o equipamento Somacount 300 (Bentley Instruments, Minnesota, EUA). A concentração de N-uréico do leite (NUL) foi determinada com base no uso de equipamento de leitura de absorção infravermelha (FOSS, Hillerød, Dinamarca). A concentração de ácidos graxos livres no leite foi determinada pelo método de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), onde foi utilizado o equipamento *MilkoScan FT+* (FOSS, Hillerød, Dinamarca). As demais concentrações foram realizadas utilizando o equipamento Bentley 2000 (Bentley Instruments, Minnesota, EUA). A produção de leite corrigida para 3,5% de gordura foi calculada de acordo com Tyrrell e Reid (1965), eq. (4).

$$\text{Leite 3,5\% G} = (0,4324 \times \text{kg de leite}) + (16,216 \times \text{kg de gordura}) \quad (4)$$

3.13 Temperatura dos painéis

A temperatura da superfície exposta do painel dos silos também foi mensurada a cada 21 dias. As temperaturas foram medidas após a retirada de silagem para alimentar os animais no período da manhã (06h00), com auxílio de termômetros de bulbo inseridos perpendicularmente a 20 cm de profundidade na face dos silos. Para obter a temperatura média do painel, foram utilizados 4 pontos equidistantes de forma que representassem toda a face exposta do silo.

3.14 Tamanho médio de partículas e índice de seleção

O tamanho médio de partículas foi determinado tomando-se 250 g de amostras de silagem, ração total e sobras, que foram estratificadas utilizando o conjunto de peneiras *Penn State Particle Size Separator* (LAMMERS; BUCKMASTER; HEINRICHS, 1996). Foram utilizadas as peneiras de 38mm 19mm, 8mm e fundo para obtenção da estratificação das amostras de acordo com Mari e Nussio (2002). Para estimar o tamanho médio de partículas (TMP) inicialmente foi pesado as peneiras vazias e depois da agitação com as retenções das amostras. O cálculo do TMP das amostras feito de acordo com Jobim et al. (2007).

Com as amostras de ração total e sobras foi calculado o índice de seleção de partículas, a partir do consumo predito e observado de frações retidas maiores que 19 mm, entre 19 mm e 8 mm e menores que 8 mm (LAMMERS; BUCKMASTER; HEINRICHS, 1996). De acordo com Leonardi e Armentano (2003), os valores menores que 100% indicam recusa daquela fração, valores iguais a 100% indicam ausência de seleção pela fração e maiores do que 100% indicam preferência por aquela fração.

3.15 Digestibilidade *in vivo*

Durante o ensaio de desempenho, também foram coletadas amostras de fezes para estimar a digestibilidade aparente no trato total das vacas. Nos períodos de coletas, as fezes foram coletadas em três dias, sendo no primeiro dia a coleta realizada as 05h00, no segundo dia as 11h00 e no terceiro dia as 19h00. Estas amostras eram coletadas diretamente do reto do animal e congeladas a –

20°C imediatamente. Ao término do experimento as amostras de fezes foram descongeladas e cada animal teve amostra agrupada por período, formando assim uma amostra composta por animal, por período. Esta amostra composta foi seca e moída e analisada para concentrações de matéria seca a 105°C, cinzas, proteína bruta, extrato etéreo e fibra insolúvel em detergente neutro, de acordo com os mesmos métodos descritos para as análises bromatológicas.

Para estimar a digestibilidade foi utilizado o marcador interno FDNi, segundo a metodologia descrita por Huhtanen; Kaustell e Jaakkola (1994). Para isso foram confeccionados mini-sacos que foram utilizados para incubação ruminal. Para cada amostra de silagem e fezes, foram utilizados 0,5g de amostra em duplicata, para as amostras de ingredientes foram pesados 2,5g de amostra em triplicata. Os sacos utilizados eram específicos para ANKON Fiber Analyser (ANKON Technology, New York, EUA) e foram fechados com seladora. Para a incubação dos sacos foi utilizado uma vaca fistulada, alimentada com silagem de milho e concentrado. O tempo de incubação foi de 288 horas. Após o término da incubação, os mini-sacos foram colocados em água com gelo e lavados manualmente até que água se tornasse transparente. O excesso de água foi retirado gentilmente utilizando-se de compressão com os dedos. Para obtenção do FDNi, foi realizado a lavagem dos sacos em solução de detergente neutro conforme o método sequencial descrito por ANKON ANKON Technology, New York, EUA). Por fim, os mini-sacos foram colocados em estufa 105°C, para obtenção do peso seco e calculo do FDNi.

A produção fecal foi calculada por meio da metodologia de Merchen (1993), eq. (5), sendo: PF – produção fecal de matéria seca (kg/dia); IM – ingestão do marcador (kg/dia); CFM – concentração fecal do marcador (g/kg). Segundo este mesmo autor, o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (CDA MS) é calculado pela eq. (6), onde: IMS – ingestão de MS (kg/dia); PF – produção fecal de MS (kg/dia). O coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes (D) é dado pela eq. (7), sendo: CMS – consumo de matéria seca (kg/dia); PF - produção fecal de matéria seca (kg/dia); Nr – concentração do nutriente na ração (%); NrF – concentração fecal do nutriente (%).

$$PF \text{ (g/kg)} = IM / CFM \quad (5)$$

$$CDA \text{ MS (\%)} = ((IMS - PF) / (IMS)) \times 100 \quad (6)$$

$$D (\%) = 100 \times ((CMS \times Nr) - (PF \times NrF)) / (CMS \times Nr) \quad (7)$$

Foram calculados os nutrientes digestíveis totais (eq. (8)), as concentrações de energia digestível (eq. (9)), energia metabolizável (eq. (10)), energia líquida de lactação da dieta (eq. (11)), energia líquida de lactação para manutenção (eq. (12)), energia líquida de lactação para leite (eq. (13)), (NRC, 2001). Também foi calculado o balanço de energia líquida de lactação (eq. (14)).

$$NDT (\%) = PBD + FDND + CNFD + EED \times 2,25 \quad (8)$$

$$ED (\text{Mcal/kg}) = 5,6 \times PBD + 4,2 \times FDND + 4,2 \times CNFD + 9,4 \times EED - 0,3 \quad (9)$$

$$EM (\text{Mcal/kg}) = (ED \times 1,01) - 0,45 \quad (10)$$

$$EL_L (\text{Mcal/kg}) = (EM \times 0,703) - 0,19 \quad (11)$$

$$EL_L \text{ manutenção } (\text{Mcal/d}) = 0,080/PV^{0,75} \quad (12)$$

$$EL_L \text{ leite } (\text{Mcal/d}) = (0,0929 \times \% \text{ Gordura} + 0,0547 \times \% \text{ Proteína} + 0,0395 \times \% \text{ Lactose}) \times \text{Produção de leite} \quad (13)$$

$$\text{Balanço } EL_L (\text{Mcal/dia}) = \text{Consumo } EL_L - (EL_L \text{ manutenção} + EL_L \text{ leite}) \quad (14)$$

3.16 Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados pelo pacote de análises estatísticas MIXED do SAS (SAS INSTITUTE, 2001). O delineamento estatístico do experimento realizado com silos experimentais e inoculação de aditivos para avaliar o efeito sobre as leveduras foi o inteiramente aleatorizado. O teste utilizado para este experimento foi o Tukey. O modelo estatístico para as análises deste ensaio está descrito abaixo:

$$y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij};$$

onde:

μ : média geral;

T_i : efeito fixo do tratamento ($i = C; LEV; LB; BS$);

ε_{ij} : resíduo.

Para os dados de composição das silagens utilizadas no ensaio de desempenho das vacas leiteiras e seus produtos de fermentação, o modelo estatístico utilizado foi:

$$y_{ijk} = \mu + P_i + S_j + E_k + S \times E_{jk} + \varepsilon_{ijk};$$

onde:

μ : média geral;

P_i : efeito aleatório de período ($i = 1$ a 4);

S_j : efeito fixo de silagem ($j =$ controle ou levedura);

E_k : efeito fixo de exposição ($k =$ fresca ou exposta por 48h);

$S \times E_{jk}$: interação entre silagem e exposição ($jk =$ controle fresca; controle exposta; levedura fresca; levedura exposta);

ε_{ijk} : resíduo.

O delineamento utilizado no ensaio de desempenho foi o quadrado latino 4x4, com arranjo fatorial 2x2. Os dados de desempenho, índice de seleção de partículas, digestibilidade e partição de energia foram analisados utilizando o modelo estatístico a seguir:

$$y_{ijkl} = \mu + Q_i + P_k + V(Q)_{j(i)} + S_l + E_m + S \times E_{lm} + \varepsilon_{ijkl};$$

onde:

μ : média geral;

Q_i : efeito fixo de quadrado latino ($i = 1$ a 5);

P_k : efeito fixo de período ($k = 1$ a 4);

$V(Q)_{j(i)}$: efeito aleatório de vaca dentro de quadrado latino ($j = 1$ a 20);

S_l : efeito fixo de silagem ($k =$ controle ou levedura);

E_m : efeito fixo de exposição ($l =$ fresca ou exposta por 48h);

$S \times E_{lm}$: interação entre silagem e exposição ($lm =$ controle fresca; controle exposta; levedura fresca; levedura exposta);

ε_{ijkl} : resíduo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Composição microbiológica e nutricional da planta de milho

A caracterização da planta de milho no momento da ensilagem quanto ao pH e as contagens de BAL, leveduras e fungos estão apresentados na tabela 3. Apesar de não ter sido analisado estatisticamente, é possível observar aumento na contagem de BAL e de LEV quando o inóculo com leveduras é adicionado.

Tabela 3 – Contagem de microrganismos e pH da planta de milho na ensilagem com ou sem a adição de melaço de cana e do inóculo com leveduras nos silos

Tratamentos		pH	BAL	Leveduras	Fungos
			(log10 ufc/g MV)		
Controle 1	-	5,81	6,28	5,29	4,6
	+	5,7	6,49	5,70	3,8
Controle 2	-	4,55	8,04	6,45	5,32
	+	4,85	8,17	6,89	5,23
Levedura 1	-	5,75	5,73	5,20	4,45
	+	5,43	8,15	7,26	5,60
Levedura 2	-	5,99	6,00	5,18	5,78
	+	5,45	8,62	7,52	4,48

- : ausência de melaço e/ou levedura;

+ : inoculação com melaço e/ou levedura

As características bromatológicas da planta de milho que foi utilizada para a ensilagem dos silos tipo bolsa estão na tabela 4. A colheita da planta foi realizada quando o teor de matéria seca da planta atingiu 34%, estando dentro do intervalo ideal (32 – 35%), segundo Bal; Coors e Shaver (1997). Os teores de matéria seca apresentados na tabela são aqueles obtidos após a inoculação do melaço de cana (para igualar as concentrações de açúcares) na silagem controle e após a inoculação de leveduras na silagem levedura. Ambos, o melaço de cana e o inóculo com levedura foram diluídos em água deionizada.

Tabela 4 – Composição nutricional média da planta de milho na ensilagem imediatamente após a adição de melaço de cana e do inóculo com leveduras na forragem

Item ¹	Tratamento	
	Controle	Levedura
MO, %MS	93,97	95,83
PB, %MS	8,27	7,91
FDN, %MS	51,14	51,48
EE, %MS	2,34	1,86
MM, %MS	6,02	4,17
CNF, %MS	32,22	35,65
CS, %MS	8,05	8,69

¹MS: Matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral; CNF: carboidratos não fibrosos; CS: carboidratos solúveis

Os teores de proteína bruta foram 8,27 e 7,91, para a silagem controle e levedura, respectivamente. Paziani; Duarte e Nussio (2014), avaliando híbridos de milho nas safras 2012/2013 e 2013/2014 no estado de São Paulo, relataram valores para proteína bruta variando de 7,4% a 8,1%. Os mesmos autores também mostraram valores de FDN oscilando entre 51,0% e 57,9%, sendo estes valores próximos aos encontrados no presente estudo, 51,14% para silagem controle e 51,48% para silagem levedura. Com relação aos valores de carboidratos solúveis, estes foram maiores (8,05% controle; 8,69% levedura) em comparação dos valores reportados na planta por Kleinshmitt (2015) e por Winckler (2015).

Após a abertura dos silos tipo bolsa foi realizado um pré-ensaio de estabilidade aeróbia com os tratamentos controle e levedura. As curvas de temperatura durante o ensaio estão apresentadas na figura 3. De acordo com as curvas, o tratamento controle (CON) acompanhou a temperatura do ambiente e não alterou a estabilidade aeróbia. Por outro lado, o tratamento com levedura (LEV) modificou a estabilidade e apresentou o maior pico de temperatura entre 48 e 72 horas. Este pré-ensaio levou ao estabelecimento de outros dois fatores, a silagem fresca e a silagem exposta ao ar por 48 horas. A decisão da criação do fator de exposição ao ar por 48 horas foi baseada na condição de fornecer um ambiente mais favorável para a levedura inoculada (*Pichia norvegensis*) se desenvolver. No experimento subsequente a silagem exposta ao ar por 48 horas também permitiu

que o maior pico de temperatura pudesse ocorrer no cocho de alimentação das vacas.

CON: temperatura do tratamento controle; LEV: temperatura do tratamento levedura; AMB: temperatura do ambiente

Figura 3 – Pré-ensaio para avaliação da estabilidade aeróbia das silagens de milho sob o efeito de inoculação com leveduras

4.2 Ensaio de avaliação de aditivos sobre efeito das leveduras em silos experimentais

No momento da ensilagem da forrageira nos silos experimentais foram coletadas amostras para medir o pH e realizar a contagem de bactérias ácido lácticas, leveduras e fungos (Tabela 5). Embora não tenha sido realizada análise estatística para estes dados, é possível notar que a inoculação com levedura aumentou a contagem de leveduras e fungos e a aplicação do benzoato de sódio reduziu as contagens de BAL, leveduras e fungos, indicando que estes dois tratamentos

apresentaram efeitos imediatamente após a sua adição na massa a ser ensilada. Entretanto, a adição de *L. buchneri* não provocou modificações nas contagens de microrganismos neste momento na forragem.

Tabela 5 – Características microbiológicas da forragem adicionada aos silos experimentais com a inoculação de leveduras e aditivos.

Tratamentos	pH	BAL	Leveduras	Fungos
		(log10 ufc/g MV)		
Controle	5,93	7,17	6,33	5,5
Leveduras	5,95	7,26	7,45	6,9
<i>Lactobacillus buchneri</i>	5,81	7,24	6,10	6,0
Benzoato de sódio	5,87	6,36	5,34	4,5

De acordo com a Tabela 6 a adição de leveduras e os aditivos alteraram as contagens de BAL, leveduras e fungos no dia 0, e também alteraram no ensaio de exposição ao ar por 10 dias a estabilidade aeróbia, a temperatura acumulada em 5 e 10 dias e as perdas de MS.

Tabela 6 - Características da silagem de milho inoculada com levedura e aditivos após 10 dias de exposição ao ar

Item ¹	Tratamentos ²				EPM	P
	C	LEV	LB	BS		
pH d0	3,60	3,56	3,56	3,66	0,05	0,45
BAL d0, log ufc/g	5,13 ^b	5,20 ^b	8,34 ^a	4,73 ^c	0,08	<0,01
Leveduras d0, log ufc/g	4,35 ^a	4,76 ^a	2,71 ^b	2,50 ^b	0,11	<0,01
Fungos d0, log ufc/g	3,90 ^a	3,35 ^{ab}	2,99 ^b	2,21 ^c	0,16	<0,01
Estabilidade aeróbia, h	61,3 ^{bc}	51,0 ^c	73,5 ^b	99,4 ^a	3,42	<0,01
Σ5d, °C	29,8 ^{ab}	34,6 ^a	24,8 ^b	6,9 ^c	1,43	<0,01
Σ10d, °C	64,1 ^b	72,6 ^{ab}	77,1 ^a	53,3 ^c	2,26	<0,01
Perda de MS 10d, %	3,06 ^{xy}	5,46 ^x	3,58 ^{xy}	2,93 ^y	0,68	0,07

¹ BAL: bactéria ácido lácticas; Σ5d: temperatura acumulada em 5 dias; Σ10d: temperatura acumulada em 10 dias

² C: controle, LEV: *P. norvegensis* 1×10^5 ufc/g, LB: *L. buchneri* 1×10^5 ufc/g, BS: benzoato de sódio 0,1%.

^{a-c} Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

^{x,y} Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo Teste de Tukey ($\alpha = 0,10$).

Após 94 dias do início da ensilagem, os silos experimentais foram abertos. No dia zero após a abertura observou-se que o tratamento LB favoreceu o aumento da população de bactérias ácido lácticas, beneficiando a produção de ácido láctico para o processo de fermentação, mesmo que o pH não tenha sido afetado. Por outro lado, em comparação do tratamento LB com o tratamento BS, observou-se que a população de bactérias ácido lácticas foi menor. Ao quantificar as leveduras no dia zero, observou-se que ambos os tratamentos contendo os aditivos não diferiram entre si e que estes reduziram a população de leveduras em relação ao tratamento controle e com leveduras. Em relação à contagem de fungos filamentosos, o tratamento BS, foi o que apresentou menor população e o tratamento LB não diferiu do tratamento LEV, sendo que o tratamento controle (C) apresentou a maior população destes microrganismos, favorecendo a possível deterioração da silagem, devido a substituição de fungos por leveduras em estágios mais avançados da deterioração aeróbia. Contrariando a expectativa, quando comparados os valores de acúmulo de temperatura no dia 5, o tratamento LB não diferiu em relação ao tratamento controle (C). O tratamento LEV, apresentou os maiores valores de

temperatura acumulada no dia 5 após a abertura dos silos, demonstrando que a levedura *Pichia norvegensis* causou deterioração na massa de silagem quando não se fez o uso de aditivos. O tratamento BS apresentou a melhor estabilidade aeróbia, seguido do tratamento LB. O tratamento BS, apresentou melhor eficiência durante todo o ensaio, apresentando menores valores de acúmulo de temperatura no dia 5 e no dia 10. Com isso, houve menores perdas de matéria seca após os 10 dias de exposição aeróbia. Kleinshmitt (2015), avaliando doses crescentes de *L. buchneri* em silagens de milho, também observou o aumento na contagem de BAL e redução de leveduras. Este mesmo autor também relatou o aumento da estabilidade aeróbia com o uso do aditivo, porém a dose 1×10^5 ufc/g, que foi a mesma utilizada neste experimento, também resultou em perdas de matéria seca semelhantes a da silagem controle. De acordo com Bernardes et al. (2014), a inoculação com benzoato de sódio na dose padrão de 0,1% aumentou em 92% o tempo que a massa permaneceu estável para silagens milho fermentadas por 88 dias e quando a dose foi de 0,2% a estabilidade foi aumentada em 321%.

4.3 Caracterização das silagens de milho e das dietas utilizadas no ensaio de desempenho de animais

As características nutricionais da silagem de milho e o tamanho médio de partículas estão apresentados na Tabela 7. A inoculação com leveduras e a exposição ao ar por 48h não alteraram a composição bromatológica das silagens, com exceção ao teor de carboidratos solúveis (CS) que foi menor para as silagens expostas ao ar ($P = 0,01$) e da contagem de leveduras, que foi maior para as silagens expostas ($P = 0,002$).

De acordo com Zopollatto, Daniel e Nussio (2009), revisando 8 trabalhos brasileiros, estes encontraram os valores médios para as variáveis MS, MM, PB, FDN, CNF e EE de: 34,6%; 3,0%; 7,9%; 55,3%; 30,5%; 2,5%, respectivamente. Em um amplo estudo, Schmidt et al. (2015) avaliaram 327 amostras de silagem de milho de fazendas de 5 regiões produtoras de leite no Brasil, e relataram que as médias da composição bromatológica destas amostras foram: MS – 32,4%; PB – 7,1%; FDN – 52,5%; EE – 2,8%; MM – 3,3%, sendo estes valores próximos aos encontrados no presente estudo.

Tabela 7 – Caracterização bromatológica, contagem de leveduras e tamanho médio de partículas das silagens de milho inoculadas com leveduras e/ou expostas por 48 horas, utilizadas no ensaio de desempenho de vacas leiteiras

Item ¹	Controle		Levedura		EPM	P-valor ²		
	Fresca	Exposta	Fresca	Exposta		S	E	SxE
MS, %MV	30,29	32,46	30,21	31,53	0,97	0,60	0,16	0,66
MO, %MS	95,09	95,19	95,27	94,88	0,18	0,71	0,48	0,22
PB, %MS	8,15	7,99	8,20	8,18	0,48	0,81	0,86	0,89
FDN, %MS	49,73	50,00	49,80	51,37	1,30	0,58	0,55	0,62
FDNi, %MS	17,85	16,64	18,04	17,16	0,94	0,71	0,36	0,86
EE, %MS	2,36	2,47	2,23	2,28	0,10	0,15	0,51	0,75
MM, %MS	4,90	4,81	4,73	5,11	0,18	0,70	0,48	0,22
CNF, %MS	34,85	34,73	35,03	32,68	1,03	0,38	0,32	0,31
CS, %MS	2,38	1,62	2,11	1,22	0,31	0,18	0,01	0,79
LEV, log ufc/g	5,32	5,90	5,35	6,19	0,29	0,68	0,002	0,16
TMP, mm	10,75	10,68	11,32	11,36	0,45	0,21	0,98	0,91

¹MS: Matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; FDNi: fibra insolúvel em detergente neutro indigestível; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral; CNF: carboidratos não fibrosos; CS: carboidratos solúveis; LEV: leveduras; TMP: tamanho médio de partícula

²Efeitos inoculação da silagem com *P. norvegensis* (S), exposição ao ar (E) e suas interações (SxE).

Com a exposição ao ar por 48h o teor de carboidratos solúveis (CS) foi reduzido em 68% para a silagem controle e 58% para silagem inoculada com levedura. Em estudo feito por Gerlach (2013), o teor de carboidratos solúveis da silagem de milho exposta ao ar por 8 dias sofreu redução de 53%, porém esta redução somente a partir do sexto dia de exposição, sendo que nos dias anteriores o teor permaneceu inalterado. A alta redução de carboidratos solúveis em apenas 48 horas pode estar associada à estação do ano em que foi conduzido o experimento (agosto – outubro), onde a média da temperatura do galpão em que a silagem foi armazenada era de $23 \pm 0,20$ °C, que favoreceu o desenvolvimento de microrganismos. Além disso, a contagem de leveduras aumentou para silagens expostas ao ar, o que explica a redução do teor de carboidratos solúveis nestas silagens.

O tamanho médio de partículas (TMP) também não diferiu entre as silagens, onde os valores encontrados variaram de 10,68 mm a 11,36 mm. Estes

valores permitiram manter a saúde ruminal dos animais, já que tamanhos muito reduzidos de partículas podem diminuir a secreção de saliva, abaixar o pH e o teor de gordura no leite (MERTENS, 1997). Kleinshmitt (2015), trabalhando com amostras de silagens de milho com teores de matéria seca, variando de 30,7% a 31,5%, reportou tamanho médio de partículas (11,4 mm a 12,5 mm) semelhantes ao do presente estudo.

Para composição das dietas experimentais as silagens de milho foram misturadas com farelo de soja, milho moído, caroço de algodão, polpa cítrica e premix mineral, e foram fornecidas em forma de ração total. A caracterização das dietas experimentais, em relação à MS, MO, PB, FDN, FDNi, EE, MM, CNF e TMP, está presente na Tabela 8. As dietas experimentais foram formuladas de modo a serem isoproteicas.

Tabela 8 – Caracterização bromatológica e tamanho médio de partículas das dietas experimentais inoculadas com leveduras e/ou expostas ao ar por 48 horas

Item ¹	Controle		Levedura	
	Fresca	Exposta	Fresca	Exposta
MS, %MV	46,19	46,13	46,03	46,20
MO, %MS	92,23	92,18	92,13	92,02
PB, % MS	15,95	15,97	16,16	16,03
FDN, %MS	37,50	37,74	37,41	38,33
FDNi, %MS	10,59	10,79	10,61	10,97
EE, %MS	3,15	3,16	3,17	3,15
MM, %MS	7,77	7,82	7,87	7,98
CNF, %MS	35,63	35,31	35,40	34,51
TMP, mm	8,46	8,32	8,49	8,42

¹MS: Matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; FDNi: fibra insolúvel em detergente neutro indigestível; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral; CNF: carboidratos não fibrosos; CS: carboidratos solúveis; TMP: tamanho médio de partícula

4.4 Perfil fermentativo e ensaio de estabilidade aeróbia das silagens inoculadas com leveduras

Na Tabela 9 estão os valores de pH, matéria seca corrigida para produtos voláteis e as concentrações dos produtos de fermentação. O pH não foi afetado pela inoculação da levedura nas silagens, porém quando estas silagens

foram expostas ao ar houve um aumento ($P=0,004$) devido a utilização do ácido láctico, que foi reduzido durante a exposição ($P=0,001$), por microrganismos assimiladores de ácido láctico. Os valores de matéria seca corrigida (MSc) foram maiores para a silagem controle ($P=0,008$). Possivelmente, isto ocorreu por causa da tendência de maiores valores encontrados na silagem controle para 2-butanol, acetato de propila, etanol, álcool isopropílico e acetato de etila, que são usados na formula de correção.

No perfil fermentativo das silagens, o efeito da exposição ao ar por 48 horas causou modificações mais importantes do que a inoculação com leveduras. Com relação aos ácidos graxos voláteis, os ácidos propiônico, isobutírico e isovalérico aumentaram. Mesmo não tendo sido realizado a contagem, este aumento pode estar associado à presença de clostrídeos. Embora estritamente anaeróbios, estudos tem mostrado que durante a deterioração aeróbia o crescimento de clostrídeos pode acontecer, devido a heterogeneidade das silagens, onde nichos anaeróbios podem ocorrer (PAHLOW et al., 2003). Contudo, os ácidos acético e valérico diminuíram na exposição ao ar. Bolt (2002), estudando efeito da exposição ao ar em silagens de milho também observou redução na concentração de ácido acético e aumento do ácido propiônico, porém não observou alterações para isobutírico, isovalérico e valérico. As concentrações dos alcoóis metanol, isopropílico, etanol e 1-propanol foram menores quando as silagens foram expostas ao ar. Isto ocorreu, possivelmente, por causa da volatilidade dos alcoóis que podem ter evaporado durante as 48 horas de exposição ao ar e também devido a oxidação realizada por microrganismos aeróbios, como por exemplo leveduras. Resultante da junção de um ácido orgânico e um álcool, os ésteres, como: acetato de etila, acetato de propila e lactato de etila, formados no ambiente do silo, também foram menores quando as silagens foram expostas, devido provavelmente a oxidação destes por microrganismos. As concentrações de ácido fórmico e de 2,3-butanodiol foram maiores para as silagens foram expostas ao ar. O aumento concomitante na produção destes dois compostos, também pode estar relacionado com o crescimento de clostrídeos (PAHLOW et al., 2003). De acordo com Spoelstra; Courtin e Van Beers (1988), os produtos de fermentação também são oxidados por microrganismos aeróbios, como bactérias ácido-acéticas, que oxidam alcoóis à ácido acético e após o esgotamento destes alcoóis, oxidam rapidamente os ácidos láctico e acético.

Tabela 9 – Produtos de fermentação de silagens de milho inoculadas com leveduras e/ou expostas ao ar por 48 horas

Item ¹	Controle		Levedura		EPM	P-valor ²		
	Fresco	Exposto	Fresco	Exposto		S	E	SxE
pH	3,79	4,35	3,55	4,29	0,17	0,27	0,004	0,48
MSc, % MS	33,82	33,50	31,90	31,85	0,92	0,008	0,71	0,76
Ácido láctico, % MS	4,33	1,71	4,67	2,05	0,51	0,52	0,001	0,99
Ácido acético, % MS	1,82	1,59	1,99	1,38	0,28	0,92	0,05	0,33
Etanol, %MS	1,12	0,22	0,35	0,05	0,26	0,06	0,03	0,22
1,2 Propanodiol, %MS	0,63	0,71	0,65	0,60	0,23	0,76	0,92	0,67
Ácido propiônico, %MS	0,04	0,23	0,04	0,20	0,07	0,75	0,01	0,85
2,3-Butanodiol, %MS	0,04	0,52	0,03	0,55	0,15	0,92	0,003	0,88
1-Propanol, mg/kg	402	23	235	39	108	0,45	0,01	0,36
Metanol, mg/kg	168	87	153	82	13	0,29	<0,001	0,58
Lactato de etila, mg/kg	148	10	117	14	16,27	0,36	<0,001	0,23
Ácido fórmico, mg/kg	126	1811	89	1750	601	0,93	0,01	0,98
Ácido butírico, mg/kg	122	84	124	119	33	0,52	0,44	0,56
Ácido isobutírico, mg/kg	32	197	41	215	35	0,71	0,001	0,90
Ácido isovalérico, mg/kg	53	150	71	140	29	0,91	0,03	0,65
Acetato de etila, mg/kg	70	4	31	6	11	0,07	<0,001	0,04
Ácido valérico, mg/kg	54	15	62	16	16,86	0,79	0,02	0,82
Acetona, mg/kg	15	15	16	14	3,13	0,83	0,62	0,44
Álcool isopropílico, mg/kg	4	1	2	0,75	0,73	0,08	0,003	0,26
Acetato de propila, mg/kg	5	1	2	0	1,26	0,14	0,02	0,47
2-Butanol, mg/kg	3	4	0	2	1,68	0,12	0,31	0,81

¹MSc: matéria seca corrigida.

²Efeitos inoculação da silagem com *P. norvegensis* (S), exposição ao ar (E) e suas interações (SxE).

As variáveis obtidas pelo ensaio de estabilidade aeróbia das silagens controle e inoculadas com leveduras estão descritas na Tabela 10. As características que foram analisadas no dia 0 do ensaio não sofreram alterações, com exceção do pH. Ao contrário do que era esperado, o pH da silagem levedura (LEV) foi menor

($P=0,06$). As contagens de BAL, leveduras e fungos filamentosos não foram modificadas pela inoculação. A temperatura média dos painéis do silo foram 24,75 °C (controle) e 25,37 °C (levedura), demonstrando que a face de ambos os silos permaneceu estável devido à alta taxa de retirada da silagem por dia, que era de 53 ± 2 cm por dia.

Tabela 10 – Características microbiológicas e estabilidade das silagens de milho inoculadas com levedura após exposição ao ar por 10 dias

Item	Tratamentos ¹		EPM	P-valor
	C	LEV		
pH d0	3,75	3,59	0,13	0,06
Bactérias lácticas d0, log ufc/g	7,02	6,77	0,80	0,19
Leveduras d0, log ufc/g	5,07	4,68	0,60	0,59
Fungos filamentosos d0, log ufc/g	4,17	4,19	0,50	0,96
Temperatura média do painel do silo, °C	24,75	25,37	1,73	0,34
Estabilidade aeróbia, h	21,08	17,25	7,20	0,03
Temperatura acumulada 5d, °C	50,77	45,42	4,82	0,14
Temperatura acumulada 10d, °C	54,78	60,23	7,28	0,21
Temperatura máxima, °C	43,75	44,60	1,31	0,09
Horas para temperatura máxima	43,33	40,00	7,05	0,44
Perda de MS 10d, %	14,17	25,12	1,82	<0,001

¹ C: controle, LEV: *P. norvegensis* 1×10^9 ufc/g.

A inoculação com levedura afetou estabilidade aeróbia e a perda de matéria seca durante a exposição ao ar. A estabilidade aeróbia da silagem levedura foi reduzida ($P=0,03$) em aproximadamente 4 horas. Mesmo as contagens iniciais de leveduras sendo iguais para ambas as silagens, a predominância da espécie de levedura *Pichia norvegensis* na silagem inoculada reduziu a estabilidade aeróbia e o aumentou a perda de MS. Estes efeitos negativos estão mais evidentes pelo aumento da perda de matéria seca ($P<0,001$) em aproximadamente 11 pontos percentuais, causado pela inoculação com leveduras. Em ensaio de estabilidade aeróbia, Tabacco et al. (2011) também observaram perdas de matéria seca em silagens de milho da ordem de 15%, para o tratamento controle.

4.5 Avaliação de desempenho, digestibilidade e partição energética de vacas leiteiras alimentadas com as dietas experimentais

Na Tabela 11, estão apresentados os dados referentes ao desempenho das vacas leiteiras. Ao contrário da expectativa, a inoculação com leveduras e a exposição ao ar não afetaram o consumo voluntário de matéria seca (CMS) pelos animais. Entretanto, ambas a inoculação com levedura e a exposição ao ar diminuíram a produção de leite corrigido para 3,5% de gordura em 1,27 kg/d ($P=0,03$) e 1,38 kg/d ($P=0,02$) respectivamente. Sendo assim, a eficiência alimentar (EL leite : CMS) apresentou tendência de redução pela exposição ao ar (4,6%) ($P=0,10$) e pela inoculação com leveduras (7,9%) ($P<0,01$). Ao contrário das observações a campo, o teor de gordura do leite não foi afetado pelos tratamentos, porém a produção diária de gordura diminuiu com a inoculação em 5,8% ($P=0,03$) e com a exposição das silagens ao ar em 6,2% ($P=0,02$). As dietas contendo silagens expostas ao ar aumentaram as concentrações de nitrogênio uréico (6,1%) ($P=0,05$) e de ácidos graxos livres do leite (19,1%) ($P=0,03$). O aumento de NUL é reflexo do excesso de proteína degradável no rúmen devido à redução da energia da dieta (BRODERICK; CLAYTON, 1997). Esta menor energia proveniente da dieta causou o aumento de ácidos graxos livres no leite, quando os animais foram alimentados com silagens expostas ao ar, onde possivelmente houve utilização da molécula de glicerol dos triglicerídeos para conversão de glicose através da gliconeogênese, liberando os ácidos graxos na corrente sanguínea.

Ao contrário do que foi observado neste estudo, os autores Whitlock et al. (2000) e Gerlach (2013) relataram que quando silagens deterioradas foram fornecidas aos animais, houve redução de consumo. Whitlock et al. (2000), reportaram que quando novilhos foram alimentados com porções crescentes (0%, 25%, 50%, 75%) de silagem de milho deteriorada, o consumo foi reduzido linearmente. A redução de consumo entre a dieta composta por silagem normal e a dieta com silagem 75% deteriorada foi de 1,27 kg MS/d. Entretanto, naquele trabalho a inclusão de silagem nas dietas era de 90% na matéria seca.

Avaliando o consumo e a preferência de cabras alimentadas com silagens de milho expostas ao ar por 8 dias, Gerlach (2013) observou que houve também redução no consumo, porém a partir do quarto dia de exposição. Após o oitavo dia, a média da redução do consumo foi de 53%. Por outro lado, Hoffman e Ocker (1997)

também não observaram redução e Bolt (2002), curiosamente relatou aumento no consumo de matéria seca.

Tabela 11 – Desempenho de vacas leiteiras alimentadas com silagens inoculadas com levedura e/ou expostas ao ar por 48 horas

Item ¹	Controle		Levedura		EPM	P-valor ²		
	Fresca	Exposta	Fresca	Exposta		S	E	S×E
CMS, kg/d	20,67	20,72	21,27	21,17	0,51	0,21	0,95	0,86
Leite, kg/d	25,85	25,79	25,82	24,13	1,20	0,12	0,10	0,13
Leite 3,5% G, kg/d	27,28	26,45	26,55	24,62	1,17	0,03	0,02	0,34
Gordura, %	3,82	3,67	3,69	3,68	0,13	0,48	0,36	0,43
Proteína, %	3,51	3,55	3,53	3,51	0,07	0,75	0,67	0,38
Lactose, %	4,39	4,34	4,34	4,35	0,07	0,43	0,43	0,24
Caseína, %	2,71	2,74	2,72	2,71	0,07	0,87	0,71	0,48
NUL, mg/dL	11,21	11,81	11,12	11,97	0,40	0,92	0,05	0,74
CCS, ×1000/mL	135,73	181,68	163,01	168,90				
Log CCS	2,03	2,11	2,10	2,11	0,07	0,35	0,19	0,26
Gordura, kg	0,99	0,94	0,95	0,88	0,05	0,03	0,02	0,63
Proteína, kg	0,88	0,89	0,89	0,83	0,04	0,13	0,12	0,10
AGL, mmol/10 kg de leite	1,08	1,38	1,12	1,34	0,19	0,99	0,03	0,71
EL _L leite, Mcal/kg	0,72	0,71	0,71	0,71	0,01	0,42	0,43	0,53
EL _L leite/CMS, Mcal/kg	0,89	0,87	0,84	0,79	0,03	<0,01	0,10	0,53

¹CMS: consumo de matéria seca; LCE: leite corrigido para energia; NUL: nitrogênio uréico no leite; CCS: contagem de células somáticas; AGL: ácidos graxos livres; EL: energia líquida.

²Efeitos inoculação da silagem com *C. norvegensis* (S), exposição ao ar (E) e suas interações (S×E).

Com relação à produção de leite, os autores Hoffman e Ocker (1997) também observaram redução na produção de leite, quando vacas foram alimentadas com silagem de grão úmido de milho exposta ao ar por 14 dias. A redução na produção de leite foi de 3,2 kg/dia. Entretanto, Bolt (2002) fornecendo silagem de milho expostas ao ar por 5 dias, não relatou diferenças na produção de leite. Além disso, Bolt (2002) também não encontrou diferenças para o teor de gordura no leite e para eficiência alimentar.

A Tabela a seguir (Tabela 12) apresenta o índice de seleção de partículas das dietas experimentais. Não houve diferenças entre os tratamentos, porém de uma forma geral os animais do ensaio de desempenho selecionaram contra as frações de partículas maiores do que 19mm. Para as frações entre 19mm e 8mm e menores do que 8mm não houve seleção a favor, tampouco contra. Estes resultados estão condizentes com outros estudos (Leonardi; Armentano, 2003; Daniel, 2011, Kleinshmitt, 2015) que observaram que vacas selecionaram contra partículas maiores nas dietas.

Tabela 12 – Índice de seleção das dietas experimentais inoculadas com leveduras e/ou expostas ao ar por 48 horas

Item ¹	Controle		Levedura		EPM	P-valor ²		
	Fresca	Exposta	Fresca	Exposta		S	E	S×E
> 19, mm	80,09	87,35	86,47	82,91	4,64	0,83	0,68	0,24
19 - 8, mm	100,64	99,66	100,88	101,65	0,76	0,15	0,89	0,25
< 8, mm	100,8	101,37	100,27	100,53	0,58	0,24	0,48	0,79

¹> 19: partículas maiores do que 19 mm; 19 – 8: partículas entre 19 e 8 mm; < 8: partículas menores do 8 mm

²Efeitos inoculação da silagem com *P. norvegensis* (S), exposição ao ar (E) e suas interações (S×E).

Com relação a digestibilidade das dietas experimentais, a inoculação com leveduras não promoveu alterações importantes (Tabela 13). Entretanto, a exposição ao ar por 48 horas apresentou tendência em diminuir a digestibilidade da MS ($P=0,07$) e FDN ($P=0,08$), além de reduzir também os nutrientes digestíveis totais (NDT), em cerca de um ponto percentual ($P=0,09$). Apesar de não haver diferenças significativas, as silagens expostas ao ar também apresentaram tendência fraca de redução da EL_L dieta ($P=0,11$). Para a dose teórica de inoculação de leveduras semelhante ao deste estudo ($4,40 \log_{10}$ ufc/mL), Santos et al. (2014) não observaram redução na digestibilidade do FDN, porém para doses mais elevadas ($8,40 \log_{10}$ ufc/mL), a redução da digestibilidade ruminal *in vitro* foi de 23% em comparação ao tratamento controle. Apesar de não ter sido apresentado modificações sobre o valor nutritivo da silagem com a inoculação da espécie *P. norvegensis*, a redução na produção de leite em 1,27 kg/d é um indicativo de que o valor nutritivo foi reduzido. Considerando o consumo de NDT e a redução na produção de leite, as vacas alimentadas com as silagens inoculadas com leveduras

consumiram aproximadamente 3,8% a menos de NDT em relação as alimentadas com a silagem controle.

De acordo com Tabacco et al. (2011), alguns estudos sobre deterioração aeróbia em silagens enfatizam que grandes perdas ocorrem durante a exposição aeróbia na fase de retirada, porém poucos estudos conectam as perdas de MS às perdas nutricionais. Os trabalhos encontrados que corroboram com as tendências encontradas neste estudo estão citados a seguir. Whitlock et al. (2000), forneceram silagem deterioradas provenientes da superfície do silo e reportaram que a inclusão destas silagens na dieta reduziu significativamente as digestibilidades da MS, PB, FDN e FDA. Em estudo realizado *in vitro* por Tabacco et al. (2011), avaliando inoculantes microbianos em silagens de milho sobre a exposição ao ar, a digestibilidade da matéria seca também foi reduzida após 14 dias de exposição. Semelhantemente, após o mesmo tempo de exposição ao ar, Nadeau et al. (2011) observaram redução na digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica em 7% silagens de milho sem aditivos. Observando mudanças durante a exposição aeróbia de silagens de trigo, Chen e Weinberg (2009) observaram reduções na digestibilidade da matéria seca e do FDN e atribuíram supostamente estas reduções a reações de Maillard ocorridas com o aumento de temperatura, causado pela respiração dos microrganismos. As reações de Maillard ocorrem particularmente se a temperatura da silagem exceder 35 a 40°C (MUCK; MOSER; PITT, 2003). Sendo assim, o mesmo pode ter ocorrido no presente estudo, já que a média da temperatura máxima das silagens expostas foi de $47 \pm 0,46$ °C. De acordo com Coblentz e Hoffman (2009), o aquecimento espontâneo das forragens pode fazer com que a hemicelulose participe das reações de Maillard, reduzindo a digestibilidade do FDN. Estas reduções nas digestibilidades podem estar associadas à reduções observadas também na produção de leite (leite 3,5% G) e na eficiência alimentar (Tabela 11).

Tabela 13 – Digestibilidade das dietas experimentais inoculadas com leveduras e/ou expostas ao ar por 48 horas

Item ¹	Controle		Levedura		EPM	P-valor ²		
	Fresca	Exposta	Fresca	Exposta		S	E	SxE
Dig MS, %	71,57	70,49	71,16	69,97	0,67	0,45	0,07	0,93
Dig MO, %	74,23	72,99	73,97	72,70	0,85	0,73	0,12	0,98
Dig PB, %	76,37	76,55	76,81	75,81	0,82	0,85	0,61	0,46
Dig FDN, %	55,07	53,17	54,41	53,90	0,83	0,96	0,08	0,31
Dig EE, %	90,95	91,05	90,70	89,96	0,45	0,11	0,44	0,31
Dig CNF, %	88,44	87,92	87,86	86,77	0,71	0,23	0,26	0,69
NDT, %	70,73	69,81	70,11	69,13	0,60	0,25	0,09	0,96
EL _L dieta, Mcal/kg	1,51	1,48	1,49	1,46	0,02	0,31	0,11	0,89

¹ MS: Matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; EE: extrato etéreo; CNF: carboidratos não fibrosos; NDT: nutrientes digestíveis totais

²Efeitos inoculação da silagem com *P. norvegensis* (S), exposição ao ar (E) e suas interações (SxE).

As variáveis correspondentes a partição energética das vacas leiteiras alimentadas com das silagens de milho inoculadas com leveduras e/ou expostas ao ar por 48 estão apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 – Partição energética de vacas alimentadas com dietas contendo silagens inoculadas com leveduras e/ou expostas ao ar por 48 horas

Item ¹	Controle		Levedura		EPM	P-valor ²		
	Fresca	Exposta	Fresca	Exposta		S	E	SxE
Peso vivo, kg	696	695	697	700	12,62	0,60	0,90	0,72
Variação PV, kg/d	0,63	0,71	0,41	0,65	0,12	0,27	0,21	0,50
EL _L manutenção, Mcal/d	10,82	10,80	10,83	10,86	0,15	0,60	0,86	0,70
EL _L leite, Mcal/d	18,40	18,15	18,20	17,10	0,81	0,10	0,08	0,26
Consumo EL _L , Mcal/d	31,17	30,63	31,62	30,76	0,80	0,66	0,31	0,81
Balanco EL _L , Mcal/d	1,90	1,68	3,53	2,56	0,99	0,12	0,63	0,45

¹EL_L: energia líquida de lactação; PV: peso vivo

²Efeitos inoculação da silagem com *P. norvegensis* (S), exposição ao ar (E) e suas interações (SxE).

Na partição energética, a única variável afetada pelos tratamentos foi a excreção diária de energia do leite (EL_L leite), onde houve tendência de redução de 3,45% para a inoculação com leveduras ($P=0,10$) e de 3,71% para a exposição ao ar por 48 horas ($P=0,08$). Esta redução pode ser explicada pela menor produção de leite causada pelos tratamentos. Por outro lado, mesmo não havendo diferenças estatísticas entre os tratamentos, de uma maneira geral a variação do peso vivo se

mantteve positiva durante o período experimental. Isto pode ter ocorrido devido à condição dos animais que estavam no terço final de lactação.

5 CONCLUSÕES

A inoculação com a espécie de levedura *Pichia norvegensis* reduz a estabilidade aeróbia e aumenta as perdas de matéria seca das silagens de milho. Vacas alimentadas com estas silagens, não reduzem o consumo e o teor de gordura no leite, porém reduzem em 1,27 kg/d a produção de leite corrigido para 3,5% gordura e também a eficiência alimentar.

Expor as silagens ao ar por 48 horas causa aumento no pH e na população de leveduras, e redução no teor de carboidratos solúveis, ácido láctico e outros produtos de fermentação das silagens. Fornecer estas silagens expostas incorporadas às dietas dos animais resulta na redução da digestibilidade, em um ponto percentual, e do conteúdo energético das dietas que, por consequência, resulta em menor produção de leite corrigido para 3,5% de gordura (1,38 Kg/d) e menor eficiência alimentar.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, M.S.; COORS, J.G.; ROTH, G.W. Corn silage. In: BUXTON, D.; MUCK, R.; HARRISON, J. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. p. 547- 608.
- ALVES, A.C.N.; MATTOS, W.R.S.; SANTOS, F.A.P.; LIMA, M.L.P.; PAZ, C.C.P.; PEDROSO, A.M. Substituição parcial de silagem de milho por farelo de glúten de milho desidratado na alimentação de vacas holandesas em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 1590-1596, 2007.
- ASHBELL, G.; LISKER, N. Aerobic deterioration in maize silage stored in a bunker silos under farm conditions in a subtropical climate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 45, p. 307–315, 1988.
- 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**, Fairfax, v. 28, p. 261–263, May 2002.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International**. 16th ed. Washington, 1997. 1117 p.
- _____. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International** 17th ed. Gaithersburg, 2000. 1015 p.
- ÁVILA, C.L.S.; BRAVO MARTINS, C.E.C.; SCHWAN, R.F. Identification and characterization of yeasts in sugarcane silages. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 109, p. 1677-1686, 2010.
- BAJAJ, B.K.; RAINA, S.; SINGH, S. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 53, p. 645-656, 2013.
- BAL, M.A.; COORS, J.G.; SHAVER, R.D. Impact of maturity of corn for use as silage in the diets of dairy cows on intake, digestion and milk production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 2497-2503, 1997.
- BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; SAEBO, A.; BAUMAN, D.E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 278, p. 179–184, 2000.
- BELL, A.W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 2804–2819, 1995.
- BERNARDES, T.F.; DE OLIVEIRA, I.L.; LARA, M.A.S.; CASAGRANDE, D.R.; AVILA, C.L.S.; PEREIRA, O.G. Effects of potassium sorbate and sodium benzoate at

two application rates on fermentation and aerobic stability of maize silage. **Grass and Forage Science**, Malden, v. 70, p. 491–498, 2014.

BERNARDES, T.F.; REGO, A.C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p.1852-1861, 2014.

BOLT, S.M. **The effects of feeding corn silage that was exposed to air for five days with or without yeast cell walls on production parameters in early lactation Holstein cows**. 2002. 71 p. Thesis (Master in Sciences) - North Carolina State University, Raleigh, 2002.

BORREANI, G.; TABACCO, E. Improving corn silage quality in the top layer of farm bunker silos through the use of a nextgeneration barrier film with high impermeability to oxygen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 2415–2426, 2014.

BRODERICK, G.A.; CLAYTON, M.K. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 2964–2971, 1997.

CAI, Y.; BENNO, Y.; OGAWA, M.; KUMAI, S. Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 520-526, 1999.

CARVALHO, B.F.; AVILA, C.L.S.; MIGUEL, M.G.C.P.; PINTO, J.C.; SANTOS, M.C.; SCHWAN, R.F. Aerobic stability of sugar-cane silage inoculated with tropical strains of lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, Malden, v. 70, p. 308-323, 2014.

CHEN, Y.; WEINBERG, Z.G. Changes during aerobic exposure of wheat silages. **Animal Feed Science and Technology**, Philadelphia, v. 154, p. 76–82, 2009.

COBLENTZ, W. K.; HOFFMAN P. C. Effects of spontaneous heating on fiber composition, fiber digestibility, and in situ disappearance kinetics of neutraldetergent fiber for alfalfa-orchardgrass hays. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, p. 2875–2895, 2009.

COPPOCK, C.E. Problems associated with all corn silage feeding. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 52, p. 848-858, 1969.

DANIEL, J.L.P. **Contribuição da fração volátil no valor nutricional de silagens**. 2011. 162 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

EVANGELISTA. A.R.; LIMA. A.J. **Silagens do cultivo ao silo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2002. 210 p.

FILYA, I.; SUCU, E.; KARABULUT, A. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 97, p. 818–826, 2004.

FREVEL, H.J.; ENGEL, G.; TEUBER, M. Schimmelpilze in Silage und Rohmilch. **Milchwissenschaft**, Kempten, v. 40, p. 129-132, 1985.

GERLACH, K. **The aerobic deterioration of silages as estimated from chemical composition and dietary choice by goats**. 2013. 97 p. Dissertation (Doctor in Agricultural Sciences) - Institute of Animal Science, University of Bonn, Bonn, 2013.

GOERGES, S.; KOSLOWSKY, M.; VELAGIC, S.; BORST, N.; BOCKELMANN, W.; HELLER, K.J.; SCHERER, S. Anti-listerial potential of food-borne yeasts in red smear cheese. **International Dairy Journal**, Pennsylvania, v. 21, p. 83-89, 2011.

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

HATOUM, R.; LABRIE, S.; FLISS, I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 3, p. 421, 2012.

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, suppl. 1, p. 234, 1997.

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.

JOBIM, C.C.; NUSSIO, L.G.; REIS, R.A.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 101-119, 2007.

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

JONSSON, A.; LINDBERG H.; SUNDÅS, S.; LINGVALL, P.; LINDGREN, S. Effect of additives on quality of big-bale silage. **Animal Feed Science and Technology**, Philadelphia, v. 31, p. 139-155, 1990.

KLEINSHMITT, C. **Taxas de inoculação com *Lactobacillus buchneri* no valor nutritivo de silagem de milho como volumoso exclusivo para vacas leiteiras**. 2015. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

KONONOFF, P.J.; HEINRICHS, A.J.; BUCKMASTER, D.A. Modification of the Penn State forage and TMR separator and the effects of moisture content on its measurements. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 1858–1863, 2003.

KUNG, L. Jr.; ROBINSON, J.R.; RANJIT, N.K. Microbial populations, fermentation end-products, 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.

KUNG, L. Jr.; 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; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. p. 305-360.

KUNG, L. Jr.; GRIEVE, D.B.; THOMAS, J.W.; HUBER, J.T. Added ammonia or microbial inocula 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.

LAMMERS, B.P.; BUCKMASTER, 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.

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.

LOCK, A.L.; TYBURCZY, C.; DWYER, D.A.; HARVATINE, K.J.; DESTAILLATS, F.; MOULOUNGUI, Z.; CANDY, L.; BAUMAN, D.E. Trans-10 octadecenoic acid does not reduce milk fat synthesis in dairy cows. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 137, p. 71-76, 2007.

LOUCKA, R.; HAKL, J.; JIRMANOVÁ, J.; TYROLOVÁ, Y. Yearly variation in maize silage fermentation and nutritive quality. **Grass and Forage Science**. Malden, v. 70, p. 674-681, 2014.

MARI, L.J.; NUSSIO, L.G. **O método Penn State Particle Size Separator para a predição do tamanho de partículas de silagens**. 2002. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/conservacao-de-forragens/o-metodo-penn-state-particle-size-separator-para-a-predicao-do-tamanho-de-particulas-de-silagens-6531/>>. Acesso em: 23 ago. 2015.

McDONALD, P. **The biochemistry of silage**. Chichester; New York: John Wiley, 1981. 226 p.

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

MERCHEN, N.R. Digestion, absorption and excretion in ruminants. In: CHURCH, D.C. (Ed.). **The ruminant animal digestive physiology and nutrition**. Propect Heights: Waveland Press, 1993. p. 172-201.

MERTENS, D.R. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 1463-1482, 1997.

MIDDELHOVEN, W.J. The yeast flora of maize silage. **Food technology and biotechnology**, Zagreb, v. 36, p. 7-11, 1998.

MILO, R. **How big is a yeast cell?**. 2010. Disponível em: <<http://www.weizmann.ac.il/plants/Milo/images/YeastSize-Feb2010.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

MOE, A.J.; CARR, S.B. Laboratory assays and Near-infrared reflectance spectroscopy for estimates of feeding value of corn silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, p. 2220 – 2226, 1985.

MOON, N.J.; ELY, L.O. Identification and properties of yeasts associated with the aerobic deterioration of wheat and alfalfa silages. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 69, p. 153-156, 1979.

MUCK, R.E.; MOSER, L.E.; PITT, R.E. Postharvest factors affecting ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. chap. 6, p. 251–304. (Agronomy Monograph, 42).

NADEAU, E.; SVENSSON, E.; ZARALIS, K.; HELANDER, C.; PAULY, T.; ARNESSON, A. Effects of additive on aerobic stability and nutritive value of maize silage stored during different time periods when harvested at advancing maturity stages. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE NUTRITION OF HERBIVORES, 8., 2011, Cambridge. **Advances in animal biosciences: proceedings...** Cambridge: Cambridge University Press, 2011. v. 2, pt. 2, p. 393.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 6th ed. Washington: National Academy Press, 1989. 168 p.

_____. **Nutrients requirement of dairy cattle**. 7th ed. Washington: National Academy Press, 2001. 381 p.

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

OHYAMA Y.; MASAKI, S.; HARA, S. Factors influencing aerobic deterioration of silages and changes in chemical composition after opening silos. **Journal of Science of Food and Agriculture**, London, v. 26, p. 1137–1147, 1975.

O'KIELY, P.; MUCK, R.E. Aerobic deterioration of lucerne (*Medicago sativa*) and maize (*Zea mays*) silages: effects of yeasts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 59, p. 139-144, 1992.

ONETTI, S.G.; REYNAL, S.M.; GRUMMER, R.R. Effect of alfalfa forage preservation method and particle length on performance of dairy cows fed corn silage-based diets and tallow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, p. 652-664, 2004.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. p. 31-94.

PAZIANI, S.F.; DUARTE, A.P.; NUSSIO, L.G. Avaliação de cultivares de milho para silagem. **Revista Grandes Culturas Cultivar**, Pelotas, v 186, p. 20-23, 2014.

PELHATE, J. Maize silage, Incidence of moulds during conservation. **Folia Veterinaria Latina**, Milano, v. 7, p. 1-16, 1997.

PRYCE, J.D. A modification of Barker-Summerson method for determination of lactic acid. **Analyst**, Cambridge, v. 94, p. 1151-1152, 1969.

RAMANI, R.; GROMADZKI, S.; PINCUS, D.H.; SALKIN, I.F.; CHATURVEDI, V. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 3396-3398, 1998.

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

REYNOLDS, C.K.; AIKMAN, P.C.; LUPOLI, B.; HUMPHRIES, D.J.; BEEVER, D.E. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 1201–1217, 2003.

ROOKE, J.A.; HATFIELD, R.D. Biochemistry of ensiling. In: BUXTON, D.R., MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. p. 95-139.

RUPPERT, L.D.; DRACKLEY, J.K.; BREMMER, D.R.; CLARK, J.H. Effects of tallow in diets based on corn silage or alfalfa silage on digestion and nutrient use by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 593-609, 2003.

SANTOS, M.C.; KUNG, L. Jr. Effects of spoilage silages on animal performance. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011, São Pedro. **Proceedings...** São Pedro, 2011. p. 307-318.

SANTOS, M.C.; LOCK, A.L.; MECHOR, G.D.; KUNG, L. Jr. Effects of a spoilage yeast from silage on in vitro ruminal fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, p. 2603-2610, 2014.

SASSAHARA, M.; YANAKA, E.K.; PONTES NETTO, D. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na Região Norte do Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, p. 63-72, 2003.

SCHMIDT, P.; NOVINSKI, C.O.; JUNGES, D.; ALMEIDA, R.; DE SOUZA, C.M. Concentration of mycotoxins and chemical composition of corn silage: a farm survey using infrared thermography. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, p. 6609–6619, 2015.

SPADARO, D.; BUSTO-LOPEZ, M. P.; GULLINO, M. L.; PIANO, S.; TABACCO, E.; BORREANI, G. Evolution of fungal populations in corn silage conserved under polyethylene or biodegradable films. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 119, p. 510–520, 2015.

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

TABACCO, E.; RIGHI, F.; QUARANTELLI, A.; BORREANI, G. Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by different lactic acid bacteria inocula. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 1409–1419, 2011.

TINE, M.A.; McLEOD, K.R.; ERDMAN, R.A.; BALDWIN, R.L. Effects of brown midrib corn silage on the energy balance of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 885–895, 2001.

TYRRELL, H.F.; REID, J.T. Prediction of the energy value of cow's milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 48, p. 1215–1223, 1965.

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

WEINBERG, Z.G.; MUCK, R.E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. Federation of European Microbiological Societies: **Microbiology**, London, v. 19, p. 53-68, 1996.

WEINBERG, Z.G.; KHANAL, P.; YLDIZ, C.; CHEN, Y.; ARIELI, A. Ensiling fermentation products and aerobic stability of corn and sorghum silages. **Grassland science**, Tochigi, v. 57, p. 46–50, 2011.

WEISS, W.P. Estimation of digestibility of forages by laboratory methods. In: FAHEY, G.C. Jr. (Ed.). **Forage quality, evaluation, and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p. 644-681.

WEISSBACH, F. Correction of dry matter content of silages used as substrate for biogas production. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15., 2009, Madison. **Proceedings...** Madison: U.S. Dairy Forage Research Center, USDA Agricultural Research Service, 2009. p. 483-484.

WHITLOCK, L.A.; WISTUBA, T.J.; SEIFERS, M.K.; POPE, R.V.; BOLSEN, K.K. Effect of level of surface-spoiled silage on the nutritive value of corn silage diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, suppl. 1, p. 110, 2000.

WICHERT, B.; KIENZLE, E.; BAUER, J. Palatability and intake of silage in dairy cows, in relation to hygienic quality. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 80, p. 253–259, 1998.

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**, Washington, v. 81, p. 620-632, 1998.

WILKINSON, J.M.; TOIVONEN, M.I. **World silage**: a survey of forage conservation around the world. Lincoln: Chalcombe Publ., 2003. 204 p.

WINCKLER, J.P.P. **Estratégias de vedação e adição de benzoato de sódio no controle de perdas em silagens de milho e desempenho de vacas leiteiras**. 2015. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

WOOLFORD, M.K. **The silage fermentation**. New York: Marcel Dekker, 1984. 350 p.

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

ZOPOLLATTO, M.; SARTURI, J.O. Optimization of the animal production system based on the selection of corn cultivars for silage. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 1, 2009, São Pedro **Proceedings...** São Pedro, 2009. p. 73-90.

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