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

**Taxas de inoculação com *Lactobacillus buchneri* no valor
nutritivo de silagem de milho como volumoso exclusivo para vacas
leiteiras**

Cristiano Kleinshmitt

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

**Piracicaba
2015**

Cristiano Kleinshmitt
Zootecnista

Taxas de inoculação com *Lactobacillus buchneri* no valor nutritivo de silagem de milho como volumoso exclusivo para vacas leiteiras

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

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

**Piracicaba
2015**

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

Kleinshmitt, Cristiano

Taxas de inoculação com *Lactobacillus buchneri* no valor nutritivo de silagem de milho como volumoso exclusivo para vacas leiteiras / Cristiano Kleinshmitt. - - Piracicaba, 2015.
84 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2015.

1. Fermentação heterolática 2. Compostos voláteis 3. Estabilidade aeróbia
4. Desempenho animal I. Título

CDD 636.09552
K64e

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

Para minha amada, Greice. Por todo amor e carinho para comigo e por ser tão especial. Com todo amor do mundo. Dedico

Para nossa filha, Maria Cecília. Por iluminar nossas vidas e nos mostrar uma nova razão de viver a cada amanhecer.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo privilégio da vida, por minha família e amigos e por todas as bênçãos que tenho recebido. Obrigado meu Deus.

À minha família, fonte de todo amor e apoio em cada uma das etapas. Em especial a meus pais Elton e Salete e ao irmão Adriano, aos quais amo. Eternos exemplos de vida e dedicação.

Em especial à minha amada Greice, por todo amor e dedicação, pelo profissionalismo, correções e ajuda do início ao fim do trabalho. E, sobretudo, por nossa linda filha Maria Cecília. AMO VOCÊS COM TODO MEU CORAÇÃO.

Ao Professor Luiz Gustavo Nussio pela oportunidade e apoio em todas as etapas e principalmente pela amizade. Agradeço imensamente pela oportunidade de crescimento profissional e, principalmente, pessoal.

Ao Dr. João Luiz Pratti Daniel, pela imensurável ajuda durante todo o processo, pelo profissionalismo e amizade, agradeço.

Ao Dr. Daniel Junges, pela acolhida e imensa ajuda em todas as situações imagináveis, meu muito obrigado.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, por propiciar condições para tanto.

Aos integrantes e ex integrantes do QCF-ESALQ/USP: Álvaro, Edward, Juliana, Janaina, Maity, Adir, Letícia, Paula, Max, João Pedro, Pedro, Janielen, Evandro, 100-Kina, Soldadiño, Fernando, Bleine, Atílio, Bilau, Poka, Menóti e a tantos outros. Agradeço pelo convívio e apoio nas atividades experimentais e acadêmicas.

Aos amigos e irmãos da época da graduação, grandes incentivadores. Paulo, Rodrigo, Tarciso, Rafael, Douglas (*in memoriam*), Marcelo, Valmir, Elvis e Ana, pela mais pura amizade, agradeço.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia: Juscelino, Emerson, Seu Lauriano, Néco e Vagner pela colaboração no decorrer do experimento de campo.

Especialmente ao César e à Tânia pela amizade e paciência durante o processo laboratorial.

À CAPES pela bolsa de estudos.

A todos que por ventura tenham colaborado com o processo.

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 A cultura do milho para produção de silagens.....	21
2.2 Silagens de milho e o risco de deterioração aeróbia	22
2.3 <i>L. buchneri</i> como promotor de estabilidade aeróbia em silagens.....	24
2.4 Respostas produtivas de ruminantes alimentados com silagens inoculadas com <i>L. buchneri</i>	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Ensilagem.....	33
3.2 Abertura dos silos e amostragens	34
3.3 Análises químico-bromatológicas	35
3.4 Perfil fermentativo e quantificação de microrganismos	36
3.5 Ensaio de estabilidade aeróbia	37
3.6 Temperatura dos painéis.....	38
3.7 Animais e instalações.....	38
3.8 Dietas experimentais e manejo alimentar.....	39
3.9 Tamanho médio de partículas e índice de seleção de partículas	40
3.10 Controle leiteiro e análises do leite.....	41
3.11 Digestibilidade <i>in vivo</i>	41
3.12 Comportamento ingestivo.....	43
3.13 Consumo de matéria seca ao longo do tempo	43
3.14 Análise estatística	44

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Características da forragem fresca	47
4.2 CAracterização das silagens experimentais	49
4.3 Estabilidade aeróbia das silagens.....	55
4.4 Caracterização das dietas experimentais	58
4.5 Comportamento ingestivo e consumo de alimentos	59
4.6 Parâmetros digestivos, energéticos e produtivos dos animais	68
5 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS	75

RESUMO

Efeito do nível de inoculação com *Lactobacillus buchneri* no valor nutritivo de silagem de milho como volumoso exclusivo para vacas leiteiras

Silagens de milho inoculadas com *Lactobacillus buchneri* são mais estáveis quando expostas ao ar. No entanto, os benefícios dessa inoculação são dose-dependentes e o incremento de ácido acético nas silagens pode culminar em menor consumo de ração. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de doses de inoculação com *L. buchneri* nas características de silagens de milho e elucidar as implicações do seu fornecimento como volumoso exclusivo para vacas leiteiras. Foram confeccionadas silagens em silos tipo 'bags', sendo empregados como tratamentos as seguintes doses de inoculação com *L. buchneri*: 0, 1×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6 ufc/g de forragem fresca. O perfil fermentativo das silagens foi modificado pela inoculação, havendo redução nos teores de ácido láctico e etanol e incremento nos teores de ácido acético, propiônico e 1-Propanol. As contagens de bactérias ácido lácticas foram aumentadas pela inoculação, enquanto as de leveduras foram reduzidas, o que contribuiu para a obtenção de silagens mais estáveis em aerobiose. A composição bromatológica das silagens foi semelhante entre os tratamentos e os desdobramentos do fornecimento das silagens inoculadas para vacas leiras foram: tendência de redução no consumo de matéria seca (CMS); modificação no padrão de consumo de alimentos e redução na produção de leite corrigido para 3,5% de gordura. Neste estudo, a alteração no CMS foi correlacionada com os incrementos de ácido acético, ácido propiônico e 1-propanol nas silagens.

Palavras-chave: Fermentação heterolática; Compostos voláteis; Estabilidade aeróbia; Desempenho animal

ABSTRACT

Inoculation level effect of *Lactobacillus buchneri* on the nutritional value of corn silage as exclusive roughage for dairy cows

The inoculation with *Lactobacillus buchneri* in corn silage provides high quality and stabler roughages, when it is exposed to air. However, the inoculation benefits are dose-dependents and the increase of acetic acid in silages could start an intake reduction of this feed. The studies, which evaluated intake and animal performance, are rare e doubtful due to the roughage range variety for dairy cows diets. In this way, the objective of this study was to evaluate the dose effect of *L. buchneri* inoculation on corn silage characteristics and elucidate the implications of its inclusion as exclusive roughage for dairy cows. The silages were stored in bag silos, which the treatments were composed based on the *L. buchneri* doses: 0; 1×10^5 ; 5×10^5 and 1×10^6 ufc/g FM of forage. The silages fermentative profiles were modified by inoculation, occurring reduction of latic acid and ethanol levels and increasing in the acetic acid levels. The LABs counting were increased by the inoculation, meanwhile the yeasts counting were reduced, which contributed to obtain a stabler silage in aerobic environment. The silage chemical composition was alike comparing the treatments, and the results of inoculated silages offered to dairy cows were: tendency of a reduction on DM and NDF intakes; modification on feed intake standards, with lower DMI in the morning period with no changes in ingestion times; and reduction on milk yield corrected for fat content, following the daily milk energy secretion reduction. In this study, the change on DMI was correlated with the increase of acetic acid, propionic acid and 1-propanol in silages.

Keywords: Heterolactic fermentation; Volatile compounds; Aerobic stability; Animal performance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Abastecimento dos silos bag com detalhe para o reservatório de inoculante e sistema de pulverização.	34
Figura 2 - Representação esquemática dos pontos de mensuração de temperatura nos painéis dos silos.....	38
Figura 3 - Valores de pH de silagens inoculadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> durante o ensaio de estabilidade aeróbia	57
Figura 4 - Caracterização do consumo de matéria seca de dietas contendo silagens inculadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> , durante 24 horas	62
Figura 5 - Caracterização dos tempos gastos com a ingestão de dietas contendo silagens inculadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> , nos intervalos pós-alimentação em 24 horas	63
Figura 6 - Taxas de ingestão de dietas contendo silagens inculadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> , nos intervalos pós-alimentação em 24 horas	64
Figura 7 - Seleção de partículas das dietas contendo silagens inculadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i>	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição bromatológica dos ingredientes concentrados utilizados nas dietas experimentais.....	40
Tabela 2 – Composição química e microbiana da forragem fresca de planta de milho no momento da inoculação com doses crescentes de <i>L. buchneri</i>	47
Tabela 3 - Caracterização das silagens de milho inoculadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i>	50
Tabela 4 – Produtos de fermentação de silagens de milho inoculadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i>	53
Tabela 5 - Silagens de milho inoculadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> sob exposição aeróbia.....	55
Tabela 6 - Caracterização das dietas experimentais contendo silagens inoculadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i>	58
Tabela 7 - Comportamento ingestivo de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo silagens de milho inoculadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i>	60
Tabela 8 – Coeficientes obtidos por correlação de pearson entre cms, mscorr e produtos e fermentação das silagens experimentais.....	66
Tabela 9 - Digestibilidade das rações totais contendo silagens inoculadas com doses de <i>L. buchneri</i>	69
Tabela 10 - Produção e composição do leite de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo silagens inoculadas com doses de <i>L. buchneri</i>	70
Tabela 11 - Partição energética em vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo silagens inoculadas com doses de <i>L. buchneri</i>	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL – bactérias ácido lácticas

CEL – celulose

DVIVMO – digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica

DVIVMS – digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca

EE – extrato etéreo

ENN – extrativo não nitrogenado

FB – fibra bruta

FDA – fibra em detergente ácido

FDN – fibra em detergente neutro

HEMI – hemicelulose

LEV – leveduras

LIG – lignina

MM – matéria mineral

MS – matéria seca

MV – massa verde

PB – proteína bruta

UFC – unidade formadora de colônia

1 INTRODUÇÃO

A ensilagem de plantas de milho resulta em queda rápida de pH, uma vez que o ácido láctico é o produto de fermentação predominante. Com a sucessão de microrganismos dentro do silo ocorre o desenvolvimento de microrganismos heterofermentadores e a estabilidade aeróbia da massa é significativamente melhorada, especialmente quando as silagens são estocadas por tempo mínimo de aproximadamente cem dias (LI e NISHINO, 2011; DANIEL; JUNGES e NUSSIO, 2014).

Uma maneira de reduzir o tempo de fermentação e a dependência da população epífita da forragem para o alcance de silagens mais estáveis seria a inoculação com *Labctobacillus buchneri*. Essa bactéria heterofermentativa modifica a perfil fermentativo, resultando em níveis aumentados de ácido acético (KLEISCHMIT e KUNG JR., 2006). A produção de etanol por este microrganismo é mínima e o 1,2-propanodiol gerado em proporção equimolar ao ácido acético é precursor da produção do ácido propiônico por outras bactérias. Desse modo, silagens inoculadas com *L. buchneri* geralmente alcançam níveis maiores de ácido acético, resultando em ganhos em estabilidade aeróbia, em função do efeito antifúngico dos produtos de fermentação (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK e SPOELSTRA, 1999).

As leveduras são os principais microrganismos associados ao início da deterioração aeróbia, sendo capazes de fermentar açúcares em anaerobiose e oxidar nutrientes, principalmente o ácido láctico, após a exposição da silagem ao oxigênio. O poder antifúngico do ácido acético, produzido pelo metabolismo de *L. buchneri* pode controlar a atividade de leveduras tanto na fase fermentativa como no pós-abertura das silagens (McDONALD; HENDERSON e HERON, 1991).

No entanto, os produtos de fermentação típicos de silagens heterofermentadas podem causar diminuição no consumo de matéria seca (MS) pelos animais. Em ruminantes, acetato e propionato parecem exercer função importante no controle do tamanho das refeições. Infusões intrarruminais destes metabólitos deprimem a ingestão de alimentos em bovinos (SHEPERD e COMBS, 1998) e a adição de ácido acético às dietas promove modificações no comportamento ingestivo dos animais (DANIEL et al., 2013).

O enriquecimento de silagens com ácido acético foi mais efetivo em deprimir o consumo quando comparado às mesmas doses adicionadas a forragem frescas

(DINIUS; HILL e NOLLER, 1968). Isso reforça o fato de que em silagens, sobretudo naquelas fermentadas sob padrão heterolático, uma gama de produtos de fermentação estarão presentes, além do ácido acético, de modo que a avaliação do consumo voluntário desses alimentos pelos animais deve considerar o efeito conjunto de todos os produtos formados.

Os dados referentes ao fornecimento de silagens de milho inoculadas com *L. buchneri* e seus possíveis efeitos no consumo são escassos (ARRIOLA et al., 2011) ou provenientes de experimentos com inclusão parcial desse volumoso na dieta (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK e van WIKSELAAR, 1999). Considerando-se a ampla utilização de silagens de milho no Brasil e os dados inconclusivos sobre a inoculação de silagens com *L. buchneri* e seus desdobramentos sobre o desempenho animal, fica clara a necessidade de se estabelecer nível ótimo de inoculação que propicie silagens mais estáveis em aerobiose e assegurem consumo de alimentos e desempenho animal satisfatórios.

Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da inoculação com doses crescentes de *Lactobacillus buchneri* no valor nutritivo de silagens de milho fornecidas como volumoso exclusivo para vacas leiteiras em lactação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do milho para produção de silagens

O milho é a planta mais utilizada para produção de silagens em fazendas leiteiras no Brasil (BERNARDES, 2012). Dentre as vantagens que justificam a adoção preferencial dessa cultura no país e em todas as regiões do mundo onde o clima propicie seu cultivo estão: alta produtividade (13 a 20 t MS/ha), facilidade de colheita mecanizada, flexibilidade de decisão sobre o corte para ensilagem ou a colheita de grãos (conforme interesses econômicos) e a consistência no valor nutritivo da forragem ensilada, desde que colhida em curto período de tempo. Uma desvantagem seria o seu efeito negativo sobre o solo, uma vez que a remoção completa da cultura para ensilagem torna o solo propenso à erosão e reduz o estoque de matéria orgânica (ALLEN; COORS; ROTH, 2003). Além disso, em terrenos com declive acentuado, a dificuldade para implantação, manejo agrônomico e colheita pode tornar a cultura do milho menos competitiva que forragens perenes ou semi-perenes.

Quanto ao seu potencial de fermentação, o milho é considerado uma cultura ideal para ensilagem. A época de corte coincide com teores de MS na planta inteira entre 30 e 38% de MS. Tecnicamente, o momento de corte é definido em função da linha do leite (AFUAKWA e CROOKSTON, 1984), sendo indicado o corte quando a demarcação estiver entre 50 e 70% do grão. O milho é rico em carboidratos solúveis e, portanto em substratos para os microrganismos. Na compilação de Reis e Jobim (2001) os teores de carboidratos solúveis de 14 cultivares colhidas para ensilagem variaram de 90 a 269 g kg⁻¹. Por fim, o poder tampão do milho é baixo e isso fica nítido se o compararmos a uma leguminosa. No estudo de Shockey; Dehority e Conrad (1985) os valores médios de poder tampão para milho e alfafa foram, respectivamente 20,3 e 43,6 (miligramas de ácido láctico para baixar o pH de 1 g de forragem para 4,0). Desse modo, o somatório das características de MS, carboidratos solúveis e poder tampão faz com que o milho seja uma planta facilmente fermentável.

A partição da planta de milho traz informações importantes sobre a qualidade da silagem dessa cultura. A “Avaliação de Cultivares de Milho para Produção de Silagem, Safra 2012/2013”, realizada pela APTA, regional Centro Norte utilizou 18

cultivares produzidos em cinco locais do estado de São Paulo. A partir desses dados, observou-se uma participação média de espigas na planta de 56,9%. A porcentagem média de grãos na espiga foi de 67%, gerando produção média de grãos na ensilagem de 7.620 kg/ha. Isso ilustra a importância energética da silagem de milho frente às demais culturas. Sobre o fato da maioria dos cultivares de milho produzidos no Brasil ser de endosperma duro e, portanto, com amido de difícil digestão (CORREA et al., 2002), Daniel; Junges e Nussio (2014) demonstraram por meta-análise que a digestibilidade do amido de silagens de milho aumenta ao longo do armazenamento, o que confere mais um benefício da opção pelo uso da ensilagem.

2.2 Silagens de milho e o risco de deterioração aeróbia

Silagens de milho não aditivadas apresentam fermentação predominantemente homolática, evidenciada por níveis elevados de ácido láctico e abaixamento rápido de pH da massa. Nestas silagens, bactérias heteroláticas crescem progressivamente ao longo do tempo de armazenamento, porém, as populações desses microrganismos e seus produtos de fermentação são geralmente pouco expressivos (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK e SPOELSTRA, 1999). Após abertura do silo para fornecimento aos animais e o consequente contato da silagem com o oxigênio, o crescimento de microrganismos aeróbios, ácido-tolerantes como leveduras (MOON e ELY, 1979) e, ocasionalmente, bactérias ácido-acéticas (SPOELSTRA; COURTIN e VAN BEERS, 1988) é favorecido, dando início ao processo de deterioração aeróbia da silagem. Na maioria dos casos as leveduras são os primeiros agentes deterioradores (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK e SPOELSTRA, 1999) e as modificações na forragem incluem a oxidação de ácido láctico, com consequente aumento no pH. A intensa atividade desses microrganismos é detectada pelo aumento de temperatura da silagem e aparecimento de fungos, especialmente nas zonas periféricas dos silos (BORREANI e TABACCO, 2010).

Para exemplificar o padrão de fermentação homolático típico de silagens de milho fermentadas naturalmente, no estudo de Driehuis, Oude Elferink e Spoelstra, (1999) foram realizados experimentos diversos gerando dados de oito observações sobre silagens controle, avaliadas dos 7 aos 218 dias de abertura. Os valores de pH sofreram pouca variação apesar dessa variedade de tempos de abertura, estando

entre 3,6 e 3,79 (n=5). Os valores médios de ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico, etanol e 1-propanol foram, respectivamente, 587; 236,8; 4,0; 167,6 e 5,2 mmol kg⁻¹ MS (n=5). As contagens médias de BAL e leveduras foram 8,6 e 5,7 log ufc/g, respectivamente. As silagens apresentaram perdas fermentativas na ordem de 13,3% e, em média, a estabilidade aeróbia foi rompida após 38 horas de exposição das silagens ao oxigênio.

As silagens controle avaliadas por Li e Nishino (2011) apresentaram baixo pH (próximo a 3,7) e níveis de ácido láctico predominantes (média de 76,4 g kg⁻¹ MS) ao longo de todo o tempo de avaliação. Aos 14 e 56 dias, o nível médio de ácido acético era de 10 g kg⁻¹ MS, sendo elevado a 21,9 g kg⁻¹ MS aos 120 dias. A contagem de BAL foi próxima a 8,0 log ufc/g até os 56 dias, diminuindo para 6,2 log ufc/g aos 120 dias. A contagem de leveduras decresceu ao longo do tempo até 6,2 log ufc/g na última avaliação. Após exposição aeróbia, somente as silagens abertas aos 120 dias e, portanto, mais ricas em ácido acético não apresentaram deterioração.

Nos trabalhos de McDonald; Henderson e Heron (1991) e de Li e Nishino (2011) as contagens de leveduras podem ser consideradas elevadas, uma vez que silagens com contagem superior a 5 log ufc/g são altamente propensas à deterioração após abertura dos silos (WOOLFORD et al., 1990). As leveduras compõe um grupo de microrganismos aeróbios, unicelulares, dividido em espécies capazes de fermentar açúcares em anaerobiose e outras capazes de respirar ácidos orgânicos na presença de O₂. Crescem em ambientes com baixo pH, como no caso de silagens, havendo sucessão de espécies ao longo da fermentação e pós-abertura dos silos (McDONALD; HENDERSON e HERON, 1991). Como as leveduras associadas à deterioração utilizam o ácido láctico como fonte de energia (MOON e ELI, 1979) ocorre elevação no pH das silagens deterioradas permitindo o crescimento de outros microrganismos deterioradores. Por serem ricas em ácido láctico, silagens de milho são problemáticas quanto à estabilidade aeróbia e, no caso de silagens inoculadas com aditivos homoláticos esse problema pode ser ainda maior (KRISTENSEN et al., 2010)

Alguns ácidos orgânicos, como o ácido acético exercem controle sobre o crescimento de leveduras por mecanismos relacionados ao poder de dissociação dos ácidos. Em pH inferior ao seu pka (4,75), como no caso de silagens bem preservadas, o ácido acético permanece sob a forma não dissociada, passível de

penetrar a membrana de fungos e leveduras. Dentro da levedura (pH neutro) o ácido acético se dissocia e o microrganismo, na tentativa de controlar o pH intracelular, gasta energia para expulsar íons H^+ , resultando em redução do crescimento microbiano e possível morte celular (LAMBERT e STRATFORD, 1999).

Acompanhando o crescimento de leveduras, aparecem os fungos, microrganismos aeróbios, multicelulares e filamentosos, pertencentes ao mesmo reino das leveduras, porém capazes de quebrar açúcares e ácido láctico por vias bioquímicas respiratórias, bem como hidrolisar e metabolizar polissacarídeos da parede celular (McDONALD; HENDERSON e HERON, 1991). Algumas espécies de fungos produzem micotoxinas, as quais estão associadas a problemas de saúde principalmente nos animais que consomem a silagem. *Aspergillus fumigatus*, por exemplo, é tolerante ao calor, encontrado em áreas emboloradas das silagens e capaz de produzir vários metabólitos tóxicos (DRIEHUIS, 2011).

2.3 *Lactobacillus buchneri* como promotor de estabilidade aeróbia em silagens

A menos de vinte anos a aplicação de aditivos em silagens era pautada na utilização de cepas homofermentativas, com a finalidade de se elevar a produção de ácido láctico e garantir abaixamento rápido de pH das silagens. A bactéria heterolática *L. buchneri* foi apresentada na revisão de Weinberg e Muck (1996) como uma nova abordagem em inoculação, uma vez que os aditivos utilizados até então não focavam o controle de microrganismos indesejáveis e a estabilidade aeróbia das silagens.

O controle exercido por *L. buchneri* sobre leveduras é função do seu metabolismo, cujo principal produto formado é o ácido acético. Por tratar-se de uma bactéria heterolática obrigatória, fermenta hexoses a ácido láctico, acético, etanol e dióxido de carbono. Também fermenta pentoses a ácido láctico e acético. A gama de substratos utilizados por cepas de *L. buchneri* incluem as hexoses glicose e frutose, as pentoses arabinose e os dissacarídeos maltose e melibiose. Eventualmente, algumas cepas podem fermentar galactose, lactose, rafinose, sacarose e xilose (McDONALD, HENDERSON e HERON, 1991). Uma particularidade da bactéria *L. buchneri* é a incapacidade em fermentar glicose até etanol, devido à ausência da enzima acetaldéido desidrogenase (BRYAN-JONES citado por McDONALD,

HENDERSON e HERON, 1991), fazendo com que a via de produção do ácido acético seja preferencial.

Além da fermentação de açúcares, Driehuis, Oude Elferink e Spoelstra (1999) demonstraram que *L. buchneri* realiza degradação anaeróbica do ácido láctico e esse estudo permitiu as primeiras considerações sobre doses e tempo de armazenamento mínimo de silagens inoculadas com esse microrganismo. Acréscimos significativos na concentração de ácido acético e 1-propanol e decréscimo na concentração de ácido láctico foram obtidos a partir da inoculação com 1×10^4 ufc/g. Aumentos na concentração de ácido propiônico, no pH e nas perdas de MS foram obtidos a partir da inoculação com 1×10^5 ufc/g e, neste nível de inclusão e na dose 1×10^6 ufc/g, o ácido acético passou predominar dentre os produtos de fermentação. Avaliando a inoculação com *L. buchneri*, na dose 5×10^5 ufc/g os teores máximos de ácido láctico foram obtidos aos 14 dias, declinando a partir daí até os 85 dias, ao passo que o teor de ácido acético e, em menor extensão propiônico e etanol, além do pH, aumentaram. De modo diferente, silagens tratadas na dose 4×10^4 ufc/g apresentaram composição idêntica até os 14 dias. Aos 98 dias de abertura, após 4 dias de exposição aeróbia, a contagem de leveduras na silagem controle foi próxima a 10^9 ufc/g, enquanto na silagem tratada após 11 dias de exposição, era inferior a 10^3 ufc/g.

Oude Elferink et al. (2001) descreveram a degradação anaeróbica do ácido láctico desencadeada por cepas de *L. buchneri*, segundo a equação estequiométrica: $1 \text{ ácido láctico} = 0,48 \text{ ácido acético} + 0,48 \text{ 1,2-propanodiol} + 0,04 \text{ etanol} + 0,52 \text{ CO}_2$, demonstrando novamente que a síntese de etanol por *L. buchneri* é mínima. O processo de degradação do ácido láctico ocorreu em faixas de temperatura de 15 a 35°C, com faixa ótima entre 20 e 30°C e mostrou-se altamente influenciado pelo pH do meio, com taxas acentuadas de degradação sob pH 3,8, valor típico de pH de silagens.

A observação de Driehuis, Oude Elferink e Spoelstra (1999) sobre a presença de compostos como 1-propanol e ácido propiônico nas silagens inoculadas com *L. buchneri*, diferente do que foi constatado para culturas puras, levantou a possibilidade de que outra bactéria estaria envolvida na quebra do 1,2-propanodiol (Oude Elferink et al., 2001). De fato, Krooneman et al. (2002) isolaram a partir de silagens de milho duas cepas de *Lactobacillus diolivorans* capazes de degradar o 1,2-propanodiol, conforme a equação estequiométrica: $1,2\text{-propanodiol} = 0,53 \text{ 1-}$

propanol + 0,45 ácido propiônico. Seguindo o mesmo princípio de controle ácido sobre leveduras (LAMBERT e STRATFORD, 1999), o ácido propiônico atua juntamente com o ácido acético na promoção de estabilidade aeróbia em silagens inoculadas com *L. buchneri*.

Comprovando o padrão de respostas dose-dependente da inoculação com *L. buchneri*, Kleinschmit e Kung Jr. (2006) realizaram meta-análise avaliando experimentos com silagem de milho estratificados por doses: 0, ≤ 100.000 e > 100.000 ufc/g de forragem. O aumento da dose inoculada resultou em redução nos teores de ácido láctico (6,59; 5,87 e 4,79 % da MS), aumento nos valores de pH (3,7; 3,75 e 3,88) e decréscimo nas contagens de leveduras (4,18; 3,10 e 1,88 ufc/g; respectivamente). Os teores de ácido acético foram maiores (2,18; 2,63 e 3,89 % da MS), resultando em maior estabilidade aeróbia (25, 35 e 503 horas). As silagens inoculadas diferiram das silagens controle em todos os parâmetros avaliados, assim como as silagens tratadas com menor e maior dose diferiram entre si.

Sobre a relação entre tempo de armazenamento de silagens e o metabolismo tardio de bactérias heterofermentativas, Li e Nishino, (2011) observaram que tanto silagens controle quanto aquelas tratadas com *L. buchneri* na dose 1×10^6 ufc/g apresentaram deterioração aeróbia quando abertas aos 14 dias de fermentação. Silagens tratadas não deterioraram aos 56 dias e, ambas as silagens não sofreram deterioração quando armazenadas por até 120 dias. Na silagem inoculada, o teor de ácido láctico foi numericamente diminuído ao longo do tempo e, do contrário, o ácido acético foi aumentado de modo que aos 120 dias o valor observado era mais que o dobro ($50,6 \text{ g kg}^{-1}$ MS) daquele encontrado aos 56 dias ($20,0 \text{ g kg}^{-1}$ MS). O fato da silagem controle também ser estável aos 120 dias demonstra a importância do tempo de armazenamento nos ganhos em concentrações de produtos de fermentação de bactérias heterofermentativas, associados à queda nas contagens de leveduras e na proteção do painel do silo após a abertura. A análise de dados de estabilidade feita por Daniel; Junges; Nussio (2014) por meio de meta-análise demonstrou acréscimos de 0,4 hora por dia em estabilidade aeróbia até os 110 dias de armazenamento de silagens de milho, confirmando que tempos maiores de armazenamento são vantajosos para o alcance de silagens mais estáveis em aerobiose.

Observações feitas acerca do efeito de *L. buchneri* em escala de fazenda (MARI et al., 2009; KRISTENSEN et al., 2010; TABACCO et al., 2011; ARRIOLA et

al., 2011) mostraram variações quanto ao padrão fermentativo das silagens inoculadas, tendo como base os resultados de silos experimentais discutidos até então, porém, foram unânimes em constatar incrementos em estabilidade aeróbia. A partir da análise de amostras (n=60) de silagens tratadas com *L. buchneri* (4×10^5 ufc/g) ou *L. buchneri* nesta dose, associado a *Pediococcus pentosaceus* (10^5 ufc/g), Mari et al. (2009) não encontraram alterações nos valores de pH e nos teores de ácido lático, ácido acético, ácido propiônico e etanol em relação às amostras de silagens não tratadas (n=50). As contagens de BAL e leveduras foram semelhantes e, a eficácia do aditivo foi revelada através da maior contagem de *L. buchneri*, isolado por técnicas moleculares, menor contagem de fungos em placas, estabilidade aeróbia aumentada 1,6 vezes em relação às silagens controle e teor de 1,2-propanodiol 4,3 vezes maior que nas silagens não tratadas. Os autores cogitaram o fato da maior exposição do painel dos silos, utilizados para a alimentação de animais, ter favorecido a volatilização do ácido acético nesse estudo.

Kristensen et al. (2010), por sua vez, observaram menores valores de ácido lático para as silagens tratadas, cuja dose de inoculação foi de 3×10^5 ufc/g de forragem fresca. Os valores de pH foram maiores, assim como o teor de ácido acético. Ácido propiônico e 1-propanol foram maiores em duas das três épocas do ano analisadas, assim como a estabilidade aeróbia das silagens. Esta foi 2,5 vezes maior que as silagens controle, em média. Os autores ressaltam que as fazendas avaliadas nesse estudo não apresentaram silagens controle com padrão heterolático como observado por Mari et al. (2009). O teor de ácido acético de silagens controle e tratada nos dois trabalhos foram, respectivamente 1,6 vs 3,2 e 2,24 vs 2,41, demonstrando o quanto o controle de Mari et al. (2009) foi semelhante às silagens tratadas.

Tabacco et al. (2011) avaliaram as cepas de *L. buchneri* LN4637 e LN40177 (Pioneer Hi-Bred International) em fazendas italianas, observando maiores valores de pH e redução do ácido lático em silagens tratadas. Todavia, para ambas as cepas, os marcadores de fermentação ácido acético e 1,2-propanodiol foram semelhantes entre silagens tratadas e controle. Apesar disso, a população de leveduras foi reduzida nas silagens inoculadas, o que favoreceu a obtenção de silagens mais estáveis em aerobiose. A estabilidade aeróbia para as cepas LN4637 e LN40177 foi de 107 e 121hs, respectivamente, em comparação às médias de 64 e 74 horas das silagens controle.

Arriola et al. (2011) avaliaram silagens de milho inoculadas com *L. buchneri* na dose 4×10^5 , isoladamente, ou associado à bactéria homofermentativa *Pediococcus pentosaceus*. Os valores de pH, a concentração dos produtos de fermentação e as contagens microbianas foram semelhantes entre as silagens, mas a estabilidade aeróbia das silagens contendo *L. buchneri* isoladamente foi aumentada em 51% (177,8 h) em relação média de 85,9 horas das demais silagens.

2.4 Respostas produtivas de ruminantes alimentados com silagens inoculadas com *L. buchneri*

Partindo-se do princípio de aumento nos níveis de ácido acético como principal característica esperada em silagens que receberam inoculação com *L. buchneri*, observam-se respostas variadas na literatura quanto a uma possível redução no consumo desses alimentos pelos animais. A produção de ácido acético em moles por dia é constante em ruminantes, mesmo quando submetidos a dietas contrastantes na relação volumoso:concentrado. Isso foi demonstrado desde o estudo de Davis (1967), em que vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo 15 ou 42% de feno de alfafa apresentaram uma variação na relação acetato:propionato de 1,3 a 3,3, porém, a produção total de acetato variou, no máximo, em 1,2 mol/d, com médias de 28,1 a 29,3 mol/d, para dietas de baixa e alta forragem, respectivamente. Diante dessa constância em produção de ácido acético resultante da fermentação de matéria orgânica dietética, adições extras desse AGV no ambiente ruminal poderiam sinalizar sobre a parada de consumo.

De fato, nos experimentos com infusão ruminal de acetato de sódio ou ácido acético observou-se efeito depressor de consumo deste AGV, porém sem esclarecimentos precisos sobre os mecanismos fisiológicos que geravam tais resultados (BAILE e MAIER, 1968; FORBES; MBANYA e ANIL, 1992; ANIL et al. 1993; SHEPERD e COMBS, 1998). No entanto, ao considerar dietas enriquecidas com ácido acético ou dietas a base de silagens inoculadas com *L. buchneri* os dados disponíveis não permitem uma clara interpretação dos desdobramentos sobre consumo, nem tampouco possibilitam inferências sobre a dose mais adequada do inoculante para assegurar o desempenho animal.

Dinius; Hill e Noller (1968) adicionaram ácido acético à forragem e à silagem de milho, nas doses 0; 1,5; 3,0; 4,5 e 6% da MS. Os autores observaram redução linear no consumo de matéria seca, de modo mais severo na inclusão de 6%. Os animais suplementados com esta dose consumiram cerca de metade do alimento fornecido logo na primeira hora após alimentação, totalizando uma ingestão de 28,2 g de acetato/100 kg de PV. As dietas a base de silagem tiveram consumo sempre inferior à forragem fresca, fato atribuído a outros produtos de fermentação presentes na silagem e à perda de compostos voláteis durante a secagem das amostras em estufa (subestimativa do consumo). O consumo de energia não foi alterado e, quanto aos parâmetros sanguíneos, não houve alteração nos níveis de glicose e o acetato foi maior somente na primeira hora após alimentação, em dietas a base de silagem. Seis horas após a alimentação os níveis sanguíneos de acetato foram menores que os registrados após a primeira hora.

Hutchinson e Wilkins (1971) realizaram adições de ácido acético entre 2,0 e 8,8% da MS de silagens de azevém perene, sem observar alterações no consumo diário de ovelhas. Entretanto, o tempo de ingestão de alimentos foi reduzido nas primeiras 4 horas e aumentado entre 16 e 20 horas após o fornecimento das rações. Krizsan; Randby e Westad (2006) adicionaram 6% de ácido acético, base na MS, em silagens de gramíneas temperadas para novilhos em crescimento. O CMS foi reduzido quando considerado o teor de MS determinado em estufa, mas esse efeito deixou de existir quando o ácido acético ingerido foi computado.

No estudo realizado por Daniel et al. (2013), vacas leiteiras foram alimentadas com dietas a base de feno de Tifton e a inclusão de ácido acético realizada na dose de 5% da MS. Descontadas as perdas durante a aplicação, a concentração do composto foi de 4,26 % da MS. Na primeira semana experimental foi fornecida a metade da dose de ácido acético. A partir da 2ª semana de avaliação, início do fornecimento de 4,26%, o ácido acético deprimiu o consumo de ração, em relação ao tratamento controle. O tempo de ingestão durante as primeiras 4 horas após alimentação matinal foi diminuído, enquanto no período de alimentação da tarde a ingestão foi semelhante à dieta controle. Como a taxa de desaparecimento do ácido acético foi maior no período matinal, a rejeição olfativa por parte dos animais foi associada à volatilização desse composto. O consumo de matéria seca foi recuperado após a terceira semana de suplementação, indicando adaptação por

parte dos animais. Os parâmetros sanguíneos glicose, insulina e NEFA não foram alterados, assim como a qualidade sensorial do leite.

De modo semelhante, os trabalhos citados com adição de ácido acético às dietas (Dinius; Hill e Noller, 1968; Hutchinson e Wilkins, 1971; Daniel et al., 2013) trouxeram contribuições em torno do comportamento ingestivo dos animais, o qual é modificado na presença de ácido acético. Extrapolando esse conhecimento para silagens heterofermentadas deve-se considerar que, além do ácido acético, outros produtos de fermentação estarão presentes, podendo impactar sobre a ingestão desses alimentos pelos ruminantes. Kristensen et al. (2010) avaliaram silagens comerciais provenientes de treze fazendas dinamarquesas, inoculadas com *L. buchneri*, na dose 3×10^5 ufc/g e observaram altas correlações entre os teores do éster acetato de propila ($r = 0.86$, $r = 0.93$, e $r = 0.98$; $P < 0.01$) e os conteúdos de ácido acético, ácido propiônico e propanol, sendo esperado que este éster contribua com o *flavour* típico das silagens heterofermentadas. Previamente a isso, relatos de extensionistas e fazendeiros dinamarqueses associavam certos odores nas silagens com problemas em desempenho e saúde de vacas leiteiras (KRISTENSEN et al., 2007). Essas observações demonstram a importância de se avaliar o impacto que o alimento e sua forma de apresentação têm sobre o consumo animal, em vez de apenas considerar o saldo entre alimento fornecido e restante no cocho.

Com relação aos estudos com ácido acético proveniente da inoculação com *L. buchneri* em silagens de milho para vacas leiteiras, Driehuis; Oude Elferink e van Wikselaar (1999) trabalharam com dietas contendo silagem de milho representando 33% da energia líquida consumida e inoculada na dose 10^5 ufc/g, além de silagem de capins temperados (30%). Os animais foram alojados em grupos e as avaliações feitas ao longo de seis semanas, sendo as três primeiras de adaptação à silagem de milho não tratada. O consumo de matéria seca (20,4 vs. 20,8 kg/d), a produção de leite (38,8 vs. 38,8 kg/d), e as produções de gordura e proteína do leite não variaram em relação à dieta controle. A dieta experimental empregada por Arriola et al. (2011) consistia em 44% de silagem de milho, 6% de feno de alfafa e 50% de concentrados e a inoculação com *L. buchneri* feita na dose 4×10^5 . A composição química das silagens não variou e não foram observados efeitos da inoculação sobre o consumo alimentar e de nutrientes, nem sobre a produção e composição do leite.

Taylor et al. (2002) trabalharam com silagem de cevada inoculada segundo a dose comercial americana (4×10^5 ufc/g) para vacas leiteiras. As dietas

experimentais continham 35% de silagem de cevada (controle ou inoculada), 15% de silagem de milho e 50% de concentrados. O consumo de alimentos e a produção de leite foram semelhantes, com médias de 18,6 e 18,5 kg/dia; 25,6 e 25,7 kg/dia, respectivamente, para as dietas controle e aquela contendo o inoculante. Kung et al. (2003) incluíram a mesma dose de *L. buchneri* em silagens de alfafa. A dieta para vacas em lactação era composta por 32% da silagem de alfafa, tratada ou não, 11% de silagem de milho e 5% de feno de alfafa. As avaliações foram feitas ao longo de seis semanas e o consumo e produção de leite não foram alterados pelos tratamentos.

No trabalho de Salvo et al. (2013), com três novilhas mestiças leiteiras canuladas no rúmen, a comparação entre a dieta controle e aquela contendo silagem de milho (80% da MS dietética, mais concentrados) inoculada com *L. buchneri* na dose 10^5 ufc/g, gerou similaridade de consumo, maior produção de AGV e maiores concentrações ruminais de ácido acético e butírico. Cordeiros alimentados com dieta semelhante (80% de silagem de milho e *L. buchneri* na dose 10^5 ufc/g) apresentaram maior consumo de MS e de nutrientes, ganho de peso semelhante e concentração de produtos de fermentação ruminal inalterada em relação à dieta controle (BASSO et al., 2014). Em estudo de desempenho com ovinos alimentados com dieta composta por 85% de silagem de milho, base MS, inoculada ou não com *L. buchneri* na dose 4×10^5 ufc/g, não houve redução em consumo e os animais alimentados com dieta inoculada apresentaram maior ganho de peso (RANJIT; TAYLOR e KUNG Jr., 2002).

É importante destacar que, além de escassos, os trabalhos com *L. buchneri* avaliando respostas no animal, utilizaram sempre uma única dose versus o tratamento controle. Possíveis confundimentos nos resultados podem ocorrer nos casos em que a silagem inoculada não foi fornecida como volumoso exclusivo, principalmente quando outros volumosos conservados integravam as dietas. Além disso, a ausência de informações acerca do comportamento ingestivo dos animais impede uma análise mais ampla sobre a utilização das silagens.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ensilagem

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ), em Piracicaba- SP e o híbrido de milho cultivado para ensilagem foi o Dow AgroSciences 2B688HR. O corte foi realizado quando as plantas atingiram média de 34% de MS, utilizando-se colhedora de forragens de duas linhas (Nogueira[®]), acoplada ao trator e ajustada para tamanho teórico de corte de 12 mm.

O aditivo utilizado era composto por cepa comercial de *Lactobacillus buchneri* (CNCM I – 4323) com concentração de 1×10^{11} ufc/g de produto. Este foi diluído em água destilada e pulverizado sobre a forragem na esteira alimentadora da embutidora (Figura 1) utilizada para confecção das silagens. Para todos os tratamentos, inclusive na silagem controle, foi realizada a adição de água destilada na proporção de 4 litros por tonelada de forragem. Os tratamentos consistiram em quatro níveis de inoculação com *Lactobacillus buchneri*:

Controle - Silagem de milho sem adição de inoculante;

Lb1 - Silagem de milho inoculada com *L.buchneri* a 100.000 ufc/g de forragem fresca;

Lb5 - Silagem de milho inoculada com *L.buchneri* a 500.000 ufc/g de forragem fresca;

Lb10 - Silagem de milho inoculada com *L.buchneri* a 1.000.000 ufc/g de forragem fresca.

Os silos experimentais utilizados foram do tipo “bag” (Pacifil[®], Sapiiranga, Brasil) de 1,5 m de diâmetro e 45 m de comprimento, composto por lona de polietileno dupla face (preta no interior e branca na parte externa) com 200 micrômetros de espessura e capacidade aproximada de 35 toneladas de forragem fresca. Estes foram cheios entre os dias 02 e 06 de Março de 2012, um por vez, sendo o tratamento controle o primeiro, seguido por Lb1, Lb5 e finalmente Lb10. O enchimento se deu com auxílio de uma embutidora de forragens (Mentamit[®], Cajuro, Brasil) com capacidade operacional de 40 toneladas por hora, acoplada ao trator (Figura 1). Quando atingida a quantidade desejada de forragem dentro do bag, os

silos eram vedados com corda de nylon e a amarra, coberta com terra para garantir a vedação.

Figura 1 - Abastecimento dos silos bag com detalhe para o reservatório de inoculante e sistema de pulverização

3.2 Abertura dos silos e amostragens

Os silos foram abertos no dia 20 de maio de 2012, após 80 dias de armazenamento. As silagens foram amostradas e analisadas quanto à sua composição bromatológica, produtos de fermentação, microbiota, estabilidade aeróbia e tamanho médio de partículas (TMP).

Juntamente com as avaliações das silagens realizou-se experimento de desempenho com vacas leiteiras da raça Holandês. Cada período experimental teve duração de 21 dias, sendo 15 dias destinados à adaptação dos animais às dietas experimentais e 6 dias destinados à realização de mensurações e coletas de amostras.

O desabastecimento dos silos foi realizado duas vezes ao dia (6:00 h e 17:00 h), retirando-se uma camada de aproximadamente 40 cm do painel de cada silo, para confecção das rações. As coletas de amostras para avaliação das silagens foram feitas concomitantemente aos períodos de coletas do ensaio de lactação.

3.3 Análises químico-bromatológicas

As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ) sendo avaliadas amostras de forragem fresca de milho, coletadas durante o processo de ensilagem, bem como as amostras das respectivas silagens produzidas.

Uma alíquota de 300 g de cada amostra foi desidratada em estufa de ventilação forçada, com temperatura de 55 °C por período de 72 horas. As amostras secas foram moídas em moinho de facas tipo Wiley com peneiras de 1,0 mm. A partir das amostras secas e moídas foram determinadas as concentrações de matéria seca a 105°C (MS) segundo (AOAC 2000) e de cinzas, por incineração das amostras a 660°C durante 4 h (AOAC, 1997). O teor de matéria orgânica (MO) foi calculado por meio da equação: $MO (\%) = 100 - \text{cinzas}$. A concentração de proteína bruta (PB) foi realizada pelo método de combustão de Dumas, em aparelho marca LECO 2000, modelo FP-528 (Leco Instruments Inc,) conforme (WILES; GRAY e KISSLING, 1998) O extrato etéreo (EE) foi determinado com base em extração a quente com éter de petróleo em extrator Soxhlet, por 6 horas (AOAC, 1997). As concentrações de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados conforme o método de Van Soest; Robertson e Lewis (1991) utilizando-se sulfito de sódio e α -amilase com base no método sequencial proposto pela ANKON[®] Fiber Analyser. Os valores de carboidratos não fibrosos (CNF) foram computados conforme descrito pelo NRC (2001) onde $CNF (\%) = 100 - (\text{cinza} + PB + EE + FDN)$. O teor de carboidratos solúveis (CS) foi determinado em extrato alcoólico, pelo método Fenol-Sulfúrico (HALL, 2000). O extrato foi obtido pesando-se 0,5 g de amostra seca e moída a 1,0 mm em balões tipo *erlenmeyer* e adicionando 100 mL de solução alcoólica (etanol 80%). As bocas dos balões foram vedadas e em seguida os mesmos foram agitados durante 4h. Após a agitação, os extratos foram filtrados e armazenados em tubos tipo *Eppendorf*[®] de 2,0 mL a – 20°C. As leituras foram feitas em espectrofotômetro da marca (MARCONI[®] Janway 6305), com comprimento de onda (λ) ajustado para 490 e o açúcar utilizado como padrão foi a glicose.

3.4 Perfil fermentativo e quantificação de microrganismos

Uma alíquota de cada amostra de silagem foi utilizada para preparo de extratos aquosos por meio da adição de 25 g de amostra fresca em 225 mL de água destilada estéril (KUNG et al, 1984). A partir desses extratos foram mensurados os valores de pH, utilizando-se um pHmetro digital Digimed[®] DM-20.

Para as avaliações microbiológicas, foram preparados extratos aquosos adicionando-se 25 g de amostra fresca em 225 mL de solução salina (0,105g KCl + 2,25g NaCl + 0,05g NaHCO₃ e 0,9g CaCl₂ dihidrato), com posterior agitação em aparelho homogeneizador da marca Marconi. Os extratos foram filtrados em gazes de algodão e a seguir foram realizadas as diluições sequenciais (10^{-2} a 10^{-8}) para contagem de bactérias ácido lácticas (BAL), leveduras (LEV) e fungos (FUNG). Para contagem das BAL, foram utilizadas placas com meio seletivo (Petrifilm 3M[®] AC), incubadas em jarras de 2,5 L com gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac do Brasil[®]) e mantidas em estufa de incubação Biochemical Oxygen Demand (BOD) TE – 391 TECNAL[®]), com temperatura de 33°C por 48 horas. Para contagem de LEV e FUNG, foram utilizadas placas com meio seletivo (Petrifilm 3M[®] YM,) mantidas em BOD com temperatura de 25 °C por 72 horas. Passados os tempos de incubação, foram realizadas as contagens dos microrganismos nas placas contendo mais de 20 e menos de 300 unidades formadoras de colônia (ufc), sendo os resultados expressos em logaritmo na base 10.

Os produtos de fermentação avaliados foram: ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico, etanol, 1-propanol, 1,2-propanodiol, ácido butírico, álcool iso-propílico, 2,3-butanodiol, lactato de etila, acetato de etila, acetato de propila, ácido iso-valérico, acetona e 2-butanol. Para tanto, foram pesados 50 g de amostras de silagens e, sob capela de fluxo laminar foram adicionadas às amostras 200 mL de água destilada e 1 mL de tolueno. Os recipientes contendo a mistura foram selados com parafilme e mantidos resfriados (4 °C) durando a noite. Na manhã seguinte, as soluções foram homogeneizadas cuidadosamente e filtradas em papel filtro (Whatman N°. 54). Sequencialmente os extratos foram filtrados em microfiltro (Minisart RC25 0,45µm, Sartorius[®]) e analisados por cromatografia líquida (HPLC) (WEIB e KAISER, 1995) e cromatografia gasosa (WEIB e SOMMER, 2012) no laboratório Common Laboratory for Analytics, em Berlin na Alemanha.

A partir dos produtos de fermentação quantificados, os valores de MS das silagens foram corrigidos para compostos voláteis, de acordo com a equação proposta por Weissbach (2009), onde $MS \text{ corrigida (\%MV)} = MS \text{ estufa (\%MV)} + 0,08 \times \text{ácido láctico (\%MV)} + 0,77 \times 1,2\text{-propanodiol (\%MV)} + 0,87 \times 2,3\text{-butanodiol (\%MV)} + 0,95 \times \text{ácidos graxos voláteis (ácido acético + ácido propiônico + ácido iso-butírico + ácido butírico + ácido iso-valérico + ácido valérico) (\%MV)} + \text{lactato de etila (\%MV)} + 1\text{-propanol (\%MV)} + 2\text{-butanol (\%MV)} + \text{acetato de propila (\%MV)} + \text{etanol (\%MV)} + \text{álcool iso-propílico (\%MV)} + \text{acetato de etila (\%MV)} + \text{acetona (\%MV)}$.

3.5 Ensaio de estabilidade aeróbia

Na ocasião das coletas, amostras representativas de todo o painel dos silos, pesando aproximadamente 30 kg, foram coletadas e destinadas aos ensaios de estabilidade aeróbia.

A estabilidade aeróbia foi obtida segundo método descrito por Kung; Robinson e Ranjit (2000). Três porções de 3,5 kg das silagens de cada tratamento foram colocadas sem compactação em baldes plásticos distribuídos aleatoriamente em sala com temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) por 10 dias. As temperaturas das silagens foram mensuradas a cada 15 minutos por meio de sistema eletrônico de aquisição de dados modelo Novus Tagtemp, inseridos no centro geométrico da massa de cada balde. Foram colhidas amostras das silagens nos dias 0, 5 e 10 de cada ensaio de estabilidade aeróbia, para determinação do teor de MS conforme descrito acima e para obtenção de extratos destinados a cultura de microrganismos.

As variáveis analisadas neste ensaio foram: estabilidade aeróbia (EA), definida como o tempo em horas necessário para a elevação da temperatura em 2°C em relação ao ambiente; temperatura máxima alcançada pela massa (T_{max}), em $^\circ\text{C}$; tempo em horas para atingir a temperatura máxima (HT_{max}); acúmulo de temperatura em 5 dias de exposição aeróbia ($\Sigma 5d$); acúmulo de temperatura em 10 dias de exposição aeróbia ($\Sigma 10d$) (O'KIEL; CLANCY e DOYLE, 2001); e recuperação de matéria seca (RCMS) aos 5 e 10 dias de exposição aeróbia.

3.6 Temperatura dos painéis

A temperatura da superfície exposta do painel dos silos também foi mensurada nos períodos de coletas. Foram tomadas as temperaturas de sete pontos em cada painel, com auxílio de termômetros de bulbo inseridos perpendicularmente a 20 cm de profundidade nas silagens. As leituras foram feitas aproximadamente 12 horas após a última descarga, no período da manhã (06:00 h).

Os pontos de tomada de temperatura foram distribuídos de modo que representassem a face exposta do silo. Ao todo, foram feitas 7 leituras equidistantes,, como pode ser visto na Figura 2.

Figura 2 - Representação esquemática dos pontos de mensuração de temperatura nos painéis dos silos

3.7 Animais e instalações

O ensaio de desempenho foi realizado com 20 vacas da raça Holandês (16 multíparas e 4 primíparas) com peso vivo (PV) médio de 662 ± 80 kg, produção média de 35 ± 15 litros de leite por dia e média de 200 ± 100 DEL (dias em lactação) no início do experimento. Os animais permaneceram confinados em instalação do tipo *tie stall* com cocho individual, bebedouro comum a cada dois animais e cama de areia. O confinamento era equipado com sistema de arrefecimento composto de micro aspersores e ventiladores. Os manejos de remoção de fezes, retirada da cama

contaminada e reposição de cama eram realizados enquanto os animais estavam sendo ordenhados.

Duas vezes ao dia, era realizado o manejo de ordenha dos animais (07:00 h e 19:00 h). Após a ordenha, os animais permaneciam em uma área de descanso com sombra e bebedouros por aproximadamente uma hora.

Foi utilizado o delineamento experimental em quadrado latino (QL) 4x4, com quatro tratamentos e quatro períodos. Cada QL era composto por cinco animais, cujos critérios para agrupamento foram: o número de parições (primíparas ou múltiparas) e a produção de leite (kg/dia) de cada animal. Os períodos experimentais foram de 21 dias, totalizando 84 dias de duração do experimento.

3.8 Dietas experimentais e manejo alimentar

As rações experimentais eram compostas por 53% de silagem de milho (Controle, LB1, LB5 ou LB10) e 47% de concentrados e foram formuladas para serem isoproteicas de acordo com o NRC (2001) considerando uma produção média do rebanho de 35 kg de leite/dia. Os concentrados utilizados nas dietas foram: farelo de soja (18,0%); caroço de algodão (8,0%); polpa cítrica (9,5%); milho grão moído (9,0%) e um premix mineral (2,5%) - Tabela 1. Os tratamentos experimentais foram:

C - Dieta a base de silagem de milho sem adição de inoculante;

Lb1 – Dieta a base de silagem de milho inoculada com *L.buchneri* a 100.000 ufc/g de forragem fresca;

Lb5 - Dieta a base de silagem de milho inoculada com *L.buchneri* a 500.000 ufc/g de forragem fresca;

Lb10 - Dieta a base de silagem de milho inoculada com *L.buchneri* a 1.000.000 ufc/g de forragem fresca.

Os ingredientes concentrados das dietas eram pesados previamente em balança eletrônica e os volumosos de cada tratamento pesados em vagão misturador auto-propelido (Super Callan, American callan, USA). Após adição dos concentrados às respectivas silagens, realizava-se a mistura das rações por período de 10 minutos no vagão misturador e, a seguir, a dieta era pesada e distribuída nos cochos individuais. As rações foram fornecidas *ad libitum*, na forma de ração total, duas vezes ao dia (07:00 h e 19:00 h) durante os períodos de ordenha dos animais. As sobras foram monitoradas e mantidas em aproximadamente 10% do fornecido.

As quantidades de ração ofertadas e as sobras foram quantificadas diariamente. Os ingredientes das dietas foram ajustados semanalmente quanto aos teores de MS.

O consumo de MS foi mensurado através da diferença entre a quantidade de matéria seca fornecida e a das sobras. As amostragens dos volumosos e dos ingredientes concentrados oferecidos em cada tratamento foram coletadas diariamente nos dias 16, 18 e 20 de cada período formando uma composta para cada tratamento, por período. As amostras de sobras de cada animal foram coletadas nos dias 17; 19 e 21 de cada período e congeladas a -20°C para serem processadas ao final do experimento, quando eram descongeladas e compostas por animal, por período.

Tabela 1- Composição bromatológica dos ingredientes concentrados utilizados nas dietas experimentais

Ingrediente	Componente, % MS							
	MS	PB	FDN	FDNi	FDA	EE	Cinzas	CNF
Polpa cítrica	83,1	6,48	30,9	2,80	3,14	2,82	9,2	50,8
Farelo de soja	85,2	51,8	13,0	0,66	8,23	2,43	6,14	26,5
Milho grão moído	85,7	8,96	11,3	0,70	3,42	4,55	1,33	73,9
Carroço de algodão	84,0	26,4	47,4	31,0	30,1	18,1	3,72	4,39
Núcleo mineral *	90,0	-	-	-	-	-	100	-

MS – matéria seca; PB – proteína bruta; FDN – fibra em detergente neutro; EE – estrato etéreo; FDA – fibra em detergente ácido; CNF – carboidratos não fibrosos; FDNi – FDN indigestível.

Amostras de volumosos, concentrados e sobras das dietas fornecidas aos animais foram analisadas no laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ), em Piracicaba - SP, conforme descrito anteriormente no item 3.3: análise químico-bromatológica.

3.9 Tamanho médio de partículas e índice de seleção de partículas

Para a determinação do tamanho médio de partículas, foram pesados 250 g de amostras de silagens, ração fornecida e sobras e submetidas à estratificação em conjunto de peneiras *Penn State Particle Size Separator* (LAMMERS; BUCKMASTER e HEINRICHS, 1996), obtendo-se partículas com tamanhos maiores

que 19 mm, entre 19 e 8 mm e inferiores a 8 mm. O tamanho médio de partículas foi estimado por meio da ponderação das proporções de retenção do material em cada peneira nas diferentes amostras.

A proporção do material retido em cada peneira para ração fornecida e sobras foi utilizada para determinar o índice de seleção (IS) de partículas, calculado como o consumo observado para cada fração do alimento retida em cada peneira (LAMMERS; BUCKMASTER e HEINRICHS, 1996) e expresso como porcentagem do consumo predito daquela fração. Portanto, valores menores que 100% indicam recusa, valores maiores indicam ingestão preferencial e valores iguais a 100% ausência de seleção (LEONARDI e ARMENTANO, 2003).

3.10 Controle leiteiro e análises do leite

A produção de leite foi registrada diariamente entre os dias 16 e 21 de cada período, de manhã e à tarde, por meio de medidor mecânico. Amostras compostas (ordenha da manhã e da tarde) de cada vaca foram feitas em 3 dos 6 dias de coletas de cada período. As amostras foram conservadas em bromopol para posterior quantificação dos constituintes do leite na Clínica do Leite do Departamento de Zootecnia da USP/ESALQ, onde foram analisadas: proteína, gordura, lactose e caseína por leitura de absorção de infravermelho próximo utilizando-se equipamento Bentley 2000[®]. A contagem de células somáticas (CCS) foi realizada por citometria fluxométrica utilizando-se equipamento Somacount 300[®]. A concentração de nitrogênio ureico do leite (NUL) das amostras foi determinada por leitura de absorção infravermelha utilizando-se equipamento de marca FOSS[®].

A produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (LC 3,5% G) foi calculada a partir da fórmula proposta por Tyrrell e Reid (1965), onde $LC\ 3,5\% \ G = (0,4324 \times \text{kg de leite}) + (16,216 \times \text{kg de gordura})$. O teor e a excreção de energia no leite, em Mcal/kg, foram calculadas segundo as equações do NRC (2001) onde, $EL_L \text{ (Mcal/kg)} = (0,0929 \times \% \text{ gordura}) + (0,0547 \times \% \text{ proteína}) + (0,0395 \times \% \text{ lactose})$ e $\text{Excreção de } EL_L \text{ (kg/d)} = \text{Prod. Leite (Mcal/d)} \times EL_L \text{ (Mcal/kg)}$.

3.11 Digestibilidade *in vivo*

A digestibilidade aparente no trato total das rações foi avaliada por meio do marcador interno (FDNi), segundo metodologia descrita por Huhtanen; Kaustell e Jaakkola, (1994) . Nos dias 17, 19 e 21 de cada período foram coletadas amostras de fezes após 4, 8 e 12 horas o fornecimento das dietas experimentais. As amostras de fezes foram coletadas diretamente do reto dos animais e congeladas, totalizando 9 sub-amostras por animal, congeladas imediatamente a -20°C para conservação. Ao final do experimento estas foram descongeladas e compostas por animal, por período. As amostras compostas foram desidratadas em estufa de ventilação forçada, com temperatura de 55 °C por um período de 72 horas e após secas foram moídas em moinho de facas tipo Wiley com peneiras de 1,0 mm. A partir das amostras secas e moídas foram realizadas as avaliações bromatológicas conforme descrito anteriormente no item 3.3: análise químico-bromatológica.

Para confecção dos mini-bags utilizados para incubação ruminal, foram pesados 0,7 g de amostras secas de fezes e de silagens, em duplicata e 3,0 g de amostras de ingredientes concentrados, em triplicata. Foram utilizados sacos ANKOM® Fiber Analyser (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY), fechados com seladora e incubados no rumem de um animal fistulado por 288 horas. A dieta do animal continha as mesmas proporções de ingredientes da dieta experimental empregada no experimento de lactação.

Após o tempo total de incubação, os sacos foram removidos do rúmen e imediatamente submersos em água com gelo (0°C). A seguir, os sacos foram lavados em máquina de lavar roupas, por quatro ciclos, até que a água se tornasse transparente. O excesso de água foi retirado manualmente por meio de compressão leve dos sacos, que posteriormente foram secos em estufa a 55° C por 72 horas para posterior pesagem e determinação do FDN, sendo o resíduo obtido chamado de FDNi. A produção fecal foi calculada seguindo metodologia sugerida por Merchen (1993) onde: $Pf = Im / Cfm$. Sendo: Pf = produção fecal de matéria seca, em kg/dia; Im = Ingestão do marcador, em kg/dia; Cfm = concentração fecal do marcador, em g/kg de fezes.

O coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (CDA MS) foi calculado segundo Merchen (1993) onde: $CDA\ MS\ (\%) = ((IMS - PF) / (IMS)) \times 100$. Nesta equação, IMS =Ingestão de MS em kg/dia; PF = Produção fecal de MS, em kg/dia. O coeficiente de digestibilidade aparente (D) dos nutrientes foi calculado também segundo equação de Merchen (1993); onde: $D(\%) = 100 \times ((CMS \times \% Nr) -$

$(Pf \times \%NrF) / (CMS \times \%Nr)$. Nesta equação, D = coeficiente de digestibilidade aparente do nutriente; CMS = consumo de matéria seca em kg/dia; Pf = produção fecal de matéria seca em kg/dia; %Nr = concentração do nutriente na ração; %NrF = concentração fecal do nutriente.

A partir das digestibilidades aparentes dos nutrientes foi calculado o NDT e estimadas as concentrações de energia das rações conforme (NRC, 2001):

$$\text{NDT (\%)} = \%PB \text{ digestível} + \% \text{ ENN digestível} + \%FB \text{ digestível} + (\%EE \text{ digestível} \times 2,25)$$

$$\text{Energia digestível (Mcal/kg)} = (\%CNF \text{ digestível}/100) \times 4,2 + (\%FDN \text{ digestível}/100) \times 4,2 + (\%PB \text{ digestível}/100) \times 5,6 + (\%EE \text{ digestível}/100) \times 9,4 - 0,3$$

$$\text{Energia metabolizável (Mcal/kg)} = 1,01 \times ED \text{ (Mcal/kg)} - 0,45$$

$$\text{Energia líquida de lactação (Mcal/kg)} = 0,703 \times EM \text{ (Mcal/kg)} - 0,19$$

3.12 Comportamento ingestivo

No dia 19 de cada período foi avaliado o comportamento ingestivo dos animais. As avaliações foram feitas individualmente durante 24 horas, com observações visuais em intervalos de dez minutos. Foram obtidos os tempos gastos com ingestão e ruminação. O tempo de ingestão foi calculado para os intervalos de 2, 4, 12, 14, 16 e 24 horas a partir do fornecimento da dieta da manhã. A eficiência de consumo para cada horário foi calculada dividindo-se a quantidade de MS consumida em cada tempo pelos respectivos minutos gastos com a ingestão, sendo o resultado expresso em kg de MS/minuto. A atividade de mastigação foi obtida por meio do somatório das atividades de ingestão e ruminação. A mastigação foi ainda expressa em minutos/kg MS e minutos/kg FDN consumida.

3.13 Consumo de matéria seca ao longo do tempo

Nos dias 20 e 21 de cada período de coletas, os animais tiveram o consumo de MS monitorado em intervalos de 2, 4 e 12 horas após o fornecimento das dietas. Nestes dois dias os animais tiveram acesso aos cochos de alimentação rigorosamente às 08:00 h e às 20:00 h. Após 2 horas (10:00 h ou 22:00 h), 4 horas (12:00 h ou 00:00 h) e imediatamente antes do fornecimento da próxima refeição as quantidades de ração restantes de cada animal foram pesadas, amostradas para determinação de MS e devolvidas aos cochos. Desta forma foi obtida a taxa de consumo em 24 horas de consumo.

3.14 Análise estatística

Os dados de desempenho foram analisados pelo procedimento MIXED do SAS (SAS Institute, 2001), de acordo com o seguinte modelo:

$$y_{ijkl} = \mu + Q_i + V(Q)_{ij} + P_k + T_l + \varepsilon_{ijkl};$$

onde:

μ : média geral;

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

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

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

T_l : efeito fixo de tratamento ($l = C, LB1, LB5$ ou $LB10$);

ε_{ijkl} : resíduo.

Os graus de liberdade para efeito de tratamento foram decompostos em contrastes ortogonais com 1 grau de liberdade, para avaliar: 1) efeito de inoculação (C vs. LB1+LB5+LB10), 2) efeito linear de dose de inoculante e 3) efeito quadrático de dose de inoculante. Como as doses de inoculante não eram igualmente espaçadas (1×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6), coeficientes polinomiais foram gerados pelo procedimento IML do SAS.

O índice de seleção de partículas foi analisado como medidas repetidas, incluindo-se os efeitos fixos de peneira e da interação tratamento $\times$ peneira, no modelo descrito anteriormente. O efeito de vaca(tratamento) foi adotado como termo de erro para testar o efeito de tratamento. Foram testadas as seguintes estruturas de covariância: componentes de variância, simetria composta, auto-regressiva de primeira ordem e não estruturada (LITTELL; HENRY e AMMERMAN, 1998). Adotou-

se a estrutura com menor valor para o Critério de Informação de Akaike (AIC). O tempo de ingestão e o consumo de alimentos ao longo do dia também foram analisados como medidas repetidas, seguindo o mesmo modelo descrito para o índice de seleção de partículas substituindo-se o efeito fixo de “peneira” pelo efeito fixo de “hora”.

A composição das silagens e a estabilidade aeróbia foram comparadas usando o procedimento MIXED do SAS, com modelo que incluiu efeito fixo de tratamento e efeito aleatório de período. O pH das silagens ao longo da exposição aeróbia foi analisado como medidas repetidas, usando modelo que incluiu o efeito aleatório de período e os efeitos fixos de tratamento, dia e interação tratamento x dia. O efeito da interação tratamentoxperíodo foi adotado como termo de erro para testar o efeito de tratamento. O AIC foi utilizado para escolha da melhor estrutura de covariância (LITTELL; HENRY e AMMERMAN, 1998).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características da forragem fresca

Os valores referentes às composições bromatológica e microbiana da forragem fresca estão listados na Tabela 2. A planta de milho foi colhida com teor de MS de 35%, ideal segundo Bal; Coors e Shaver (1997). No início, são encontrados baixos teores de MS e alto conteúdo de carboidratos solúveis nas plantas de milho. Com o avançar da maturação e formação da linha negra na base do grão, o teor de MS se eleva e em contrapartida ocorre queda acentuada nos teor de açúcares, motivado pelo acúmulo de amido (JOHNSON et al. 2002).

Tabela 2 – Composição química e microbiana da forragem fresca de planta de milho no momento da inoculação com doses crescentes de *L. buchneri*

Item	Tratamentos			
	C	LB1	LB5	LB10
MS, % MV	35,0	35,0	35,6	34,3
Matéria orgânica, % MS	96,4	96,0	96,7	96,2
Proteína bruta, %MS	7,56	7,46	7,6	7,54
FDN, % MS	51,3	51,5	50,3	50,7
FDA, % MS	29,0	28,1	27,3	27,7
Extrato etéreo, % MS	2,42	1,89	1,75	2,40
Cinzas, %MS	3,6	4,0	3,3	3,8
CS, % MS	4,79	4,95	4,55	5,12
CNF, % MS	35,2	35,1	37,0	35,4
Microbiologia ³				
BAL, log ₁₀ ufc/g	7,35	7,49	7,23	7,43
LEV, log ₁₀ ufc/g	6,59	6,97	6,34	6,58
Fungos, log ₁₀ ufc/g	5,07	5,18	4,98	5,04

MS – matéria seca; FDN – fibra em detergente neutro; CNF – carboidrato não fibroso; CS – Carboidratos solúveis em etanol; FDA – fibra em detergente ácido; C – tratamento controle; LB1 – tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g; LB5 - tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 5×10^5 ufc/g; LB10 - tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^6 ufc/g; BAL – bactérias ácido láticas; LEV – leveduras; Fungos – fungos filamentosos.

De acordo com Nussio; Simas e Lima (2001), o ponto ideal de colheita do milho corresponde àquele em que a produção de MS digestível por hectare for

otimizada em concordância com teores de umidade que propiciem processo fermentativo satisfatório. Segundo os autores, forragens colhidas com baixo teor de MS (inferior a 28%) estão mais propensas ao desenvolvimento de bactérias do gênero *Clostridium*. Por outro lado, altos teores de MS impõem dificuldades ao processo de compactação, resultando em silagens mais porosas, o que favorece o crescimento de microrganismos indesejáveis e perdas qualitativas.

O valor de proteína bruta observado neste ensaio foi de 7,54%, valor maior, porém próximo ao encontrado (7,1%) por Bal, Coors e Shaver (1997). Paziani et al (2009) analisando um banco de dados de cultivares de milho para silagem no estado de São Paulo, obtidos entre as safras de 1998/1999 a 2004/2005, observaram valores de proteína bruta variando de 4,5 à 8,2 % da MS.

Neste estudo foram encontrados valores médios de 51,0% e 28,0% para FDN e FDA, respectivamente, próximos aos observados por Filya (2004) que obteve dados médios de 48,4% e 28,8% para FDN e FDA, respectivamente.

Nussio, Simas e Lima (2000) relacionaram os teores de CS com o teor de matéria seca das plantas de milho. Isso é explicado pela grande demanda metabólica durante a formação e enchimento dos grãos. Logo, maiores teores de MS implicam em menores teores de CS. Nesse estudo foi observado valor médio de CS de 4,85%, estando este abaixo do encontrado por Filya; Sucu e Karabulut (2006), de 6,2% de CS para forragem colhida com 35,5% de MS. Entretanto, Johnson et al. (2002) apontaram valores de CS variando entre 3 e 10% da matéria seca quando da colheita do milho no estágio de 2/3 da linha do leite. Os valores de carboidratos não fibrosos (CNF) na forragem fresca, neste estudo, foram de 36,7%, dados estes compatíveis com os observados por Mello et al. (2005) que em experimento avaliando características produtivas e qualitativas de seis híbridos de milho para produção de silagem, obtiveram concentrações médias de CNF entre 24,9 e 36,5 %. Estes autores observaram valores de extrato etéreo (EE) entre 2,22 e 4,18 %. No presente estudo o valor médio de EE foi de 2,12 %.

Com base na comparação de valores apresentados, sugere-se que as plantas colhidas para o presente estudo estejam dentro do padrão normal de composição conforme relatado na literatura.

A forragem utilizada no experimento apresentou contagens de BAL de 7,35 log ufc/g para a forragem do tratamento controle e de 7,39 log ufc/g para as forragens inoculadas, não havendo diferença entre os valores e mostrando não

haver impacto imediato da inoculação sobre a contagem desses microrganismos. As contagens médias de leveduras e fungos foram de 6,6 e 5,1 log ufc/g respectivamente. De Sá Neto (2012) obteve contagens de leveduras e fungos iguais a 6,65 e 5,76 log ufc/g respectivamente e também não obteve diferenças entre as contagens de BAL oriundas das forragens controle e inoculadas com *Lactobacillus buchneri*, sendo a média de 7,31 log ufg/g.

4.2 Caracterização das silagens experimentais

Na Tabela 3 estão apresentados os dados referentes às características bromatológicas, físicas e microbiológicas das silagens. A inoculação não influenciou os teores de MS, MS corrigida para voláteis, pH, FDN, FDA, FDNi, extrato etéreo, CNF, CS e cinzas das silagens. De modo diferente, na meta-análise de Kleinschmit e Kung Jr. (2006) os valores de pH foram aumentados com a inoculação em doses crescentes, mas os autores também não observarão efeito da inoculação sobre os teores de MS e CS.

Os valores de MS não diferiram entre si e o mesmo aconteceu com a MS corrigida, sendo que esta foi, em média, 2,3 pontos percentuais superior à MS determinada em estufa. Esse aumento ocorre porque, além do ácido láctico, outros compostos orgânicos compõe a matéria-seca de silagens de milho, os quais apresentam concentrações e volatilidades diferentes. Weissbach (2009) avaliou um total de 117 amostras de silagens de milho provenientes de diferentes fazendas observando as seguintes concentrações médias para os ácidos láctico, acético, propiônico e butírico: 15,20; 9,98; 0,28 e 0,09 g/kg MN. As respectivas taxas de volatilidade desses ácidos orgânicos em estufa a 105°C foram de 8, 95, 97 e 100%. Outros compostos foram identificados nas silagens, como os álcoois etanol, 1-propanol e 1,2-propanodiol, cujas concentrações foram, respectivamente, 5,8; 0,25 e 0,70 g/kg MN, com respectivas taxas de volatilidade de 100, 100 e 77%.

Tabela 3 - Caracterização das silagens de milho inoculadas com doses crescentes de *L. buchneri*

Item	Tratamentos					P-contraste		
	C	LB1	LB5	LB10	EPM	Aditivo	L	Q
MS, % MV	30,7	30,7	30,8	31,5	0,58	0,56	0,33	0,74
MScorr, % MS	32,7	33,2	33,4	34,1	0,63	0,22	0,28	0,79
pH, %	3,74	3,81	3,78	3,82	0,04	0,19	0,80	0,49
PB, % MS	8,16	8,41	8,14	8,07	0,14	0,70	0,05	0,39
FDN, % MS	47,1	48,3	47,4	47,6	1,00	0,53	0,61	0,57
FDNi, % MS	15,4	15,2	14,9	15,4	0,38	0,70	0,69	0,40
FDA, % MS	28,1	28,5	28,1	27,7	0,60	0,94	0,13	0,88
EE, % MS	2,97	2,57	2,77	2,81	0,20	0,24	0,38	0,66
Cinzas, % MS	3,61	3,88	3,65	3,65	0,14	0,47	0,32	0,46
CNF, % MS	38,1	36,7	38,0	37,8	0,94	0,56	0,40	0,45
CS, % MS	1,82	1,83	1,72	1,63	0,12	0,52	0,29	0,92
Estratificação de Partículas								
> 19 mm, %	8,37	9,42	7,35	7,35	1,26	0,82	0,29	0,48
> 8 < 19 mm, %	55,3	55,4	52,9	52,3	2,04	0,38	0,25	0,61
< 8 mm, %	36,3	35,2	39,8	40,4	2,46	0,45	0,17	0,46
TMP, mm	12,1	12,5	11,8	11,4	0,57	0,80	0,24	0,74
Microbiologia								
BAL, log ufc/g	5,20	7,81	7,05	7,18	0,36	<0,01	0,29	0,31
LEV, log ufc/g	6,25	3,42	1,30	1,15	0,89	<0,01	0,07	0,20
Fungos, log ufc/g	3,60	3,25	2,79	1,39	0,82	0,17	0,09	0,62
Temperatura do painel, °C	26,1	24,8	24,5	24,6	2,17	0,08	0,79	0,76

MS – matéria seca; MScorr – MS corrigida para compostos voláteis; pH; FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido; FDNi – FDN indigestível; CNF – carboidratos não fibrosos; CS – carboidrato solúvel em álcool; TMP – tamanho médio de partícula; BAL – bactérias ácido láticas; LEV – leveduras; C – tratamento controle; LB1 – tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g; LB5 - tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 5×10^5 ufc/g; LB10 - tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^6 ufc/g; EPM - erro padrão da média; Aditivo - efeito de inoculação (C vs. LB1+LB5+LB10); L - efeito linear de dose; Q - efeito quadrático de dose.

Quanto à ausência de diferença no conteúdo de FDN e FDA das silagens, Ranjit e Kung, (2000), também não observaram efeito da inoculação com *L. buchneri* nos teores destes componentes em silagens de milho. Esse tipo de efeito não era esperado nesse estudo pelo fato de não ter sido adicionado enzimas e da cepa

utilizada não produzir enzimas fibrolíticas, capazes de alterar a fração fibrosa das silagens (KUNG, 2009).

A temperatura média do painel dos silos apresentou tendência de diminuição ($P=0,08$) para as silagens inoculadas ($24,6^{\circ}\text{C}$), quando comparadas à silagem controle ($26,1^{\circ}\text{C}$). Segundo McDonald; Henderson e Heron, (1991) após a abertura do silo o ambiente anaeróbio é modificado para uma condição de aerobiose. Nessas condições, microrganismos aeróbios que estavam dormentes se multiplicam resultando na deterioração das silagens. Esta deterioração geralmente se manifesta por aumentos de temperatura e aparecimento de bolores. Borreani e Tabacco, (2010) classificam as silagens como deterioradas nos casos em que no mínimo 10% da superfície do painel apresentar temperatura superior a 10°C em relação à temperatura da região central do silo, ou ainda quando apresentarem fungos visíveis nas camadas periféricas. No presente estudo, como o painel do silo tem área frontal de exposição reduzida por tratar-se de um bag de 1,5 m de diâmetro, adotou-se a temperatura média de todo o painel e, diante da taxa de retirada significativa (40 cm/d) e, da ausência de bolores visíveis em todas as silagens pode-se esperar que a menor temperatura nas silagens tratadas é consequência do controle de leveduras. Segundo Driehuis; Oude Elferink e Spoelstra, (1999) a atuação do *L. buchneri* se manifesta de duas maneiras: reduzindo a sobrevivência de leveduras durante o processo fermentativo e inibindo seu crescimento na fase aeróbia. Isso se confirmou no presente estudo, em que, além das silagens apresentarem tendência de menor temperatura, a contagem de leveduras foi menor ($P<0,01$), com efeito linear de dose do aditivo. Outra constatação importante é que a população de leveduras da silagem controle foi superior a 5 log UFC/g, limite a partir do qual as silagens são consideradas com alta propensão à deterioração aeróbia (WOOLFORD, 1990).

A contagem de BAL ($P<0,01$) foi superior nas silagens inoculadas e, integrando esse fato à menor população de leveduras, houve tendência de menor temperatura do painel e maior teor de ácido acético nas silagens tratadas (Tabela 4). Embora não tenha sido feita identificação microbiana em nível de espécie, a maior contagem de BAL observada nas silagens tratadas deve ser atribuída a sobrevivência e metabolismo de *L. buchneri* em condições de pH baixo (Oude Elferink et al., 2001).

O crescimento de fungos apresentou redução numérica ($P=0,17$) nas silagens inoculadas em comparação ao tratamento controle. Na comparação entre as

silagens inoculadas, a população de fungos apresentou tendência linear de redução ($P=0,09$) à medida que aumentaram as doses de inoculante. Isso é observado em função do efeito antifúngico do ácido acético, que controla fungos da mesma forma como descrito para leveduras (McDONALD; HENDERSON e HERON, 1991; LAMBERT e STRATFORD, 1999).

As estratificações de partículas das silagens foram similares entre os tratamentos. Foram observadas retenções entre 7,35 e 9,42% das partículas na peneira de 19 mm, 52,3 e 55,4% na peneira de 8 mm e entre 35,2 e 40,4% no fundo do conjunto. Os valores de estratificação se enquadram aos apontados por Neumann et al. (2011) como parâmetros para ajustes na regulagem da ensiladora. Segundo os autores, deve-se obter, com base no peso *in natura*, distribuição de 3 a 8% das partículas retidas na peneira superior, de 45 a 65% na peneira mediana e de 30 a 40 % na parte inferior.

O tamanho médio de partículas (TMP) não diferiu entre os tratamentos, variando entre 11,4 e 12,5 mm. A picagem correta da forragem é um ponto importante no processo de obtenção de silagens de qualidade, por facilitar a compactação do material dentro do silo e expor carboidratos solúveis à fermentação microbiana (MCDONALD, HENDERSON e HERON, 1991). A picagem aplicada neste experimento contribuiu para a obtenção de silagens de qualidade e pode ser considerada adequada sob o ponto de vista de saúde ruminal de vacas leiteiras. Por tratar-se de uma forragem que não sofreu picagem extremamente fina, pode-se considerar que a forma física das silagens tenha contribuído para a prevenção de efeitos negativos como a redução na intensidade de salivação, com dificuldade de tamponamento do rúmen, típico de forragens muito processadas e que, em casos mais severos, pode levar à ocorrência de acidose e queda no teor de gordura do leite (MERTENS, 1997).

Na Tabela 4 estão apresentados os produtos de fermentação das silagens experimentais. As silagens inoculadas apresentaram tendência de redução ($P=0,06$) nas concentrações de ácido láctico. A inoculação foi efetiva em aumentar ($P<0,01$) a concentração de ácido acético e reduzir ($P=0,01$) a produção de etanol. A produção de ácido propiônico não apresentou diferença estatística, mas foi numericamente maior para as silagens inoculadas com *L. buchneri*.

As modificações observadas nos produtos de fermentação das silagens tratadas evidenciam o padrão de fermentação heterolático do *L. buchneri*,

corroborando respostas clássicas dessa inoculação (DRIEHUIS, OUDE ELFERINK e SPOELSTRA, 1999; LI e NISHINO, 2011). A redução numérica no teor de ácido láctico foi acompanhada do incremento significativo nos teores de ácido acético das silagens inoculadas, o que confirma a ocorrência de degradação do ácido láctico OUDE ELFERINK et al, (2001), apesar dos valores de pH não terem sido modificados.

Tabela 4 – Produtos de fermentação de silagens de milho inoculadas com doses crescentes de *L. buchneri*

Produto	Tratamento					P-contraste		
	C	LB1	LB5	LB10	EPM	Aditivo	L	Q
Ácido láctico, % MS	4,70	3,54	3,18	3,99	0,45	0,06	0,46	0,34
Ácido acético, % MS	3,33	4,67	4,41	5,14	0,30	< 0,01	0,27	0,24
1,2-Propanodiol, %MS	1,27	0,93	1,00	1,28	0,34	0,62	0,47	0,85
Etanol, %MS	0,94	0,93	0,82	0,68	0,06	0,01	<0,01	0,98
1-Propanol, %MS	0,27	0,53	0,54	0,41	0,07	0,02	0,24	0,43
Ácido propiônico, %MS	0,25	0,43	0,37	0,63	0,12	0,12	0,24	0,32
Álcool iso-propílico, mg/kg	1584	26	1301	572	623	0,12	0,51	0,11
2,3-Butanodiol, mg/kg	791	543	381	337	101	0,01	0,19	0,58
Lactato de etila, mg/kg	195	120	80	66	25,6	< 0,01	0,13	0,58
Acetato de etila, mg/kg	107	104	116	113	8,94	0,57	0,39	0,37
Ácido butírico, mg/kg	104	90	57	72	22,3	0,28	0,62	0,41
Acetato de propila, mg/kg	66	76	101	78	26,9	0,12	0,99	0,07
Ácido iso-valérico, mg/kg	2	23	23	26	5,89	0,73	0,69	0,88
Ácido valérico, mg/kg	23	16	14	13	4,40	0,08	0,58	0,83
Acetona, mg/kg	19	13	15	13	2,81	0,13	0,87	0,49
2-Butanol, mg/kg	9	23	16	15	5,19	0,17	0,30	0,64

C – tratamento controle; LB1 – tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g; LB5 - tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 5×10^5 ufc/g; LB10 - tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^6 ufc/g; EPM - erro padrão da média; Aditivo - efeito de inoculação (C vs. LB1+LB5+LB10); L - efeito linear de dose; Q - efeito quadrático de dose.

Os teores de 1,2-propanodiol foram semelhantes, porém a sua provável degradação por bactérias *L. diolivorans* (Krooneman et al., 2002) deve ter ocorrido e pode ser evidenciada pelo aumento constatado nos teores de 1-propanol e de ácido propiônico em relação à silagem controle. Da mesma forma, Kristensen et al. (2010)

observaram aumentos nas concentrações de 1-propanol e ácido propiônico em amostras de silagens colhidas em fazendas dinamarquesas.

A redução na concentração de etanol teve comportamento linear, acompanhando a redução na população de leveduras da silagem. Além de prejudicar o metabolismo de leveduras para a produção desse álcool, a própria rota bioquímica utilizada por *L. buchneri*, cuja via de produção do ácido acético é priorizada, contribuiu para a redução no teor de etanol das silagens.

A concentração do éster lactato de etila foi significativamente diminuída com a inoculação, acompanhando a redução dos teores de ácido láctico e etanol, que são os compostos básicos para sua formação. A produção natural deste éster está associada ao aumento da acidez do meio (PEREIRA; SILVA e RODRIGUES, 2011). Dessa forma, em silagens inoculadas com *L. buchneri* é esperado que sua concentração seja diminuída, em função do aumento do pH e do decréscimo nas concentrações dos produtos de fermentação que originam o mesmo.

Foi observada ainda redução significativa no teor do álcool 2,3-butanodiol. Kristensen et al. (2010) encontraram aumentos consistentes no teor de 2-butanol com a inoculação, explicando que este composto poderia ser proveniente da degradação do 2,3-butanodiol. Porém, o 2-butanol foi fracamente correlacionado com outros produtos de fermentação que caracterizam a via heterolática do *L. buchneri*. Weissbach (2009) realizou a caracterização dos produtos de fermentação em silagens de milho, a partir de 117 amostras de silagens, encontrando o 2,3-butanodiol em 52% das amostras, em uma concentração que variava de 0 a 0,49 g/kg MN.

Os níveis de acetona e ácido butírico, das silagens inoculadas foram numericamente menores quando comparados com a silagem controle evidenciando a boa qualidade higiênica das silagens. A acetona é um produto secundário da rota fermentativa de clostrídios que tem como produto principal o ácido butírico. A condensação de duas moléculas de acetil-CoA gera o acetoacetil-CoA, que pode ser descarboxilado para produzir acetona (Rooke e Hatfield, 2003).

4.3 Estabilidade aeróbia das silagens

Na Tabela 5 estão apresentados os parâmetros de estabilidade aeróbia das silagens. As silagens inoculadas tiveram maior ($P<0,01$) estabilidade aeróbia em comparação à silagem controle, com aumento linear ($P<0,01$) nos tempos necessários para a quebra da estabilidade, que foram de 25,6; 67,6 e 93,9 horas para LB1, LB5 e LB10, respectivamente. Essa observação está de acordo com Kleinschmit e Kung Jr. (2006) uma vez que a adição de *L. buchneri* melhorou a estabilidade aeróbia por inibir o crescimento de leveduras, sendo o efeito maior em níveis mais elevados de inoculação. Corroborando a explicação de Driehuis, Oude Elferink e Spoelstra (1999) sobre a atuação do *L. buchneri* no controle de leveduras tanto na fase de fermentação quanto no pós-abertura dos silos, no presente estudo, a inoculação foi eficiente em reduzir a contagem de leveduras durante a fermentação, além de proteger o painel do silo após sua abertura, uma vez que houve tendência de menores temperaturas para os painéis que receberam a inoculação, o que foi confirmado no ensaio de estabilidade aeróbia.

Tabela 5 - Silagens de milho inoculadas com doses crescentes de *L. buchneri* sob exposição aeróbia

Item	Tratamento					P-contraste		
	C	LB1	LB5	LB10	EPM	Aditivo	L	Q
EA, h	21,5	25,6	67,6	93,9	14,7	<0,01	<0,01	0,16
Tmáx., °C	43,3	44,1	44,1	41,6	1,99	0,99	0,07	0,36
TMPmáx., h	119	132	162	196	15,4	0,01	<0,01	0,92
Σ5d, °C	50,9	53,8	26,9	16,2	8,67	<0,01	<0,01	0,07
Σ10d, °C	107	116	93,1	73,1	14,7	0,13	<0,01	0,71
PMS 5d, %	6,40	8,70	3,63	6,18	1,53	0,81	0,17	<0,01
PMS 10d, %	17,3	19,0	12,6	10,7	2,36	0,17	<0,01	0,29

EA – estabilidade aeróbia; Tmáx. – temperatura máxima observada; TMPmáx. – tempo para atingir a temperatura máxima; Σ5d – temperatura acumulada em 5 dias; Σ10d – temperatura acumulada em 10 dias; PMS 5d – perda de matéria seca aos 5 dias de exposição; PMS 10d; perda de matéria seca aos 10 dias de exposição aeróbia; C – tratamento controle; LB1 – tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g; LB5 - tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 5×10^5 ufc/g; LB10 - tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^6 ufc/g; Aditivo - efeito de inoculação (C vs. LB1+LB5+LB10); L - efeito linear de dose; Q - efeito quadrático de dose; EPM - erro padrão da média.

Kristensen et al. (2010) analisando amostras de silagens provenientes de fazendas comerciais inoculadas na dose 3×10^5 ufc/g obtiveram média de 94 horas de estabilidade aeróbia para silagens tratadas e 38 horas para a silagem controle. Essa média é relativa a duas épocas do ano. Na terceira não houve efeito da inoculação e as médias para a silagem controle e tratada foram, respectivamente, 36 e 53 horas. No estudo de Mari et al. (2009), para a taxa de inoculação de 4×10^5 ufc/g, silagens controle tiveram estabilidade de 46 horas e as tratadas de 76 horas. Esses dados chamam atenção pela variedade de resposta da inoculação em condições de campo. Provavelmente, esta variabilidade está relacionada à infiltração de ar no painel dos silos, em momentos e intensidades diferentes, anteriormente à coleta das amostras para o ensaio de estabilidade aeróbia.

No trabalho de Kristensen et al. (2010), quando houve efeito da inoculação, a resposta foi mais pronunciada do que neste experimento, uma vez que a dose do inoculante era menor (3×10^5 ufc/g) e alcançou o mesmo desempenho da dose máxima aplicada neste trabalho, que foi de 10^6 ufc/g. No trabalho de Mari et al. (2009) houve a confirmação do padrão heterolático das silagens controle uma vez que o tempo de estabilidade delas foi superior ao encontrado na literatura e neste experimento. O mesmo foi observado para fazendas italianas no estudo de Tabacco et al. (2011). A inoculação com *L. buchneri* promoveu estabilidade significativa, de 107 e 121 h para duas cepas de *L. buchneri* testadas em comparação às médias de 64 e 74 h das silagens controle. Um dos fatores que deve ser atribuído às diferenças entre o presente experimento e os estudos citados acima é a temperatura ambiente. Climas quentes têm sido associados à aceleração do processo de deterioração aeróbia em silagens (Weinberg et al. 2001; Ashbell et al., 2002).

As doses de inoculação não alteraram a temperatura máxima das silagens sob exposição aeróbia, contudo, o tempo necessário para atingir a temperatura máxima foi afetado ($P=0,01$) sendo maior nas silagens inoculadas. O efeito linear para tempo necessário para o aquecimento máximo, está de acordo com um maior efeito protetor do silo em função da inoculação em doses maiores (Kleinschmit e Kung Jr., 2006) e essa informação é reforçada pelo fato das silagens tratadas acumularem menos calor ao longo de 5 ou 10 dias de exposição aeróbia. As perdas em aerobiose não mostraram efeitos consistentes em função da inoculação. Possivelmente, dificuldades inerentes à técnica, como a desidratação da forragem ao longo do ensaio dificultaram a visualização clara do efeito da inoculação.

No estudo de Tabacco et al. (2011) silagens controle e tratadas também apresentaram picos de temperatura semelhantes, com médias de 52,6 e 48,9°C para as cepas de *L. buchneri* LN4637 e LN40177, respectivamente. Silagens tratadas com a segunda cepa levaram mais tempo para alcançar a temperatura máxima, com intervalos de 156 e 252 horas, entre silagens controle e tratada, respectivamente.

Avaliando o pH das silagens durante o processo de deterioração (Figura 3), no dia 0 as silagens controle partiram de um pH numericamente mais baixo, o que se deve à maior concentração de ácido láctico em silagens não inoculadas. No dia 5 a eficiência da inoculação em doses mais elevadas ($\geq 5 \times 10^5$) ficou nítida, uma vez que estas silagens apresentaram valores de pH inferiores aos demais tratamentos, porém superiores a 4,5, não podendo mais serem consideradas como bem preservadas. Por fim, no dia 10 de exposição aeróbia a maior taxa de inoculação demonstrou o melhor controle sobre leveduras, porém, nesse momento todas as silagens apresentavam pH superior a 6,0 e, portanto, estavam altamente deterioradas.

Figura 3 – Valores de pH de silagens inoculadas com doses crescentes de *L. buchneri* durante o ensaio de estabilidade aeróbia. $P < 0,01$ para efeito fixo de tratamento; $P < 0,01$ para efeito fixo de dia e $P < 0,01$ para interação tratamento $\times$ dia

Segundo Pahlow et al. (2003) as mudanças no pH durante a exposição aeróbia se devem principalmente aos teores de ácidos antifúngicos (acético e propiônico) e às contagens de leveduras e fungos nas silagens. O metabolismo de leveduras pressupõem a oxidação de substratos diversos, incluindo ácidos orgânicos como o ácido láctico, o que faz com que o pH da massa aumente. Isto pode ser visto no presente trabalho, onde as silagens C e LB1 com os menores teores de ácido acético e maiores contagens de leveduras e fungos tiveram altos valores de pH aos 5 dias de exposição aeróbia quando comparadas às silagens LB5 e LB10.

4.4 Caracterização das dietas experimentais

As dietas experimentais foram formuladas para serem iso-proteicas e semelhantes quanto aos demais componentes, como pode ser observado na Tabela 6. A similaridade nas dietas foi fundamental para que se pudessem avaliar os efeitos das doses crescentes de *L. buchneri* sobre o valor nutritivo do componente silagem de milho nas dietas para as vacas leiteiras.

Tabela 6 - Caracterização das dietas experimentais contendo silagens inoculadas com doses crescentes de *L. buchneri*

Ingrediente	Tratamentos			
	C	LB1	LB5	LB10
Silagem, % MS	51,9	51,9	51,7	52,4
Polpa Cítrica, % MS	9,59	9,55	9,68	9,48
Farelo de sola, % MS	18,6	18,6	18,5	18,3
Milho grão moído, % MS	9,21	9,22	9,40	9,05
Caroço de algodão, % MS	8,15	8,14	8,23	8,07
Núcleo mineral, % MS	2,74	2,76	2,73	2,69
Nutrientes				
MS, % MN	44,3	44,3	44,8	44,8
Matéria orgânica, % MS	93,1	92,8	93,1	93,1
Proteína bruta, % MS	17,4	17,5	17,3	17,2
FDN, % MS	34,3	35,6	34,4	34,7
FDNi, % MS	10,9	10,6	10,7	11,0

Tabela 6 - Caracterização das dietas experimentais contendo silagens inoculadas com doses crescentes de *L. buchneri* (continuação)

Nutrientes	Tratamentos			
	C	LB1	LB5	LB10
FDA, % MS	19,1	19,9	19,0	19,1
Extrato etéreo, % MS	3,95	3,65	3,86	3,85
Cinzas	6,9	7,2	6,9	6,9
CNF, % MS	37,5	36,1	37,5	37,4
Produtos de fermentação				
Ácido láctico, % MS	2,44	1,84	1,64	2,09
Ácido acético, % MS	1,73	2,42	2,28	2,69
1,2-Propanodiol, %MS	0,66	0,48	0,52	0,67
Etanol, %MS	0,48	0,48	0,42	0,36
1-Propanol, %MS	0,14	0,27	0,28	0,21
Ácido propiônico, %MS	0,13	0,22	0,19	0,33
Estratificação de partículas				
> 19 mm, %	6,84	8,36	7,59	5,00
> 8 a < 19 mm, %	33,5	33,8	32,0	34,3
< 8 mm, %	59,6	57,8	60,4	60,7
Tamanho médio, mm	9,63	10,6	9,95	9,24

C – tratamento controle; LB1 – tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g; LB5 - tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 5×10^5 ufc/g; LB10 - tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^6 ufc/g; MS – matéria seca; MN - matéria natural; FDN – fibra em detergente neutro; CNF – carboidrato não fibroso; FDNi – FDN indigestível; FDA – fibra em detergente ácido; mm – milímetros.

4.5 Comportamento ingestivo e consumo de alimentos

Na Tabela 7 estão apresentadas as variáveis relacionadas a atividade mastigatória dos animais. O tempo total de ingestão de alimentos, ruminação e mastigação (ingestão+ruminação) não foi afetado pelos tratamentos, assim como o tempo de mastigação por unidade de consumo de MS ou consumo de FDN. Por outro lado o CMS apresentou tendência ($P=0,07$) de queda para as silagens inoculadas e CFDN foi menor ($P=0,03$) para as silagens tratadas com *L. buchneri*, refletindo a diminuição no CMS, desde que o teor de FDN foi similar entre as dietas.

Essa redução no consumo em função da inoculação ainda não havia sido documentada na literatura. No estudo de Driehuis; Oude Elferink e van Wikselaar (1999) em que a silagem de milho inoculada com *L. buchenri* (10^5 ufc/g) representava 33% da energia líquida da dieta, o consumo de matéria seca, a produção de leite e as produções de gordura e proteína do leite não variaram em relação à dieta controle. Vale ressaltar que naquele estudo, as vacas não foram alimentadas individualmente e o consumo foi avaliado em grupo. Além disso, a silagem de milho inoculada compreendeu apenas uma parte das forragens incluídas nas rações. Kristensen et al. (2010) avaliando fazendas comerciais que faziam uso da inoculação em silagens de milho, não mensuram a variável CMS e, da mesma forma, não observaram efeito da inoculação com *L. buchneri* (3×10^5 ufg/g) sobre a produção leite. No estudo publicado por Arriola et al. (2011), a inclusão de silagem de milho tratada com *L. buchneri* na dose 4×10^5 não foi suficiente para promover alterações na composição química das silagens e não resultou em variações no consumo alimentar e de nutrientes, nem na produção e composição do leite. Cabe ressaltar que neste estudo as concentrações dos produtos de fermentação foram semelhantes entre as silagens.

Tabela 7 - Comportamento ingestivo de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo silagens de milho inoculadas com doses crescentes de *L. buchneri*

Parâmetro	Tratamento					P- contraste		
	C	LB1	LB5	LB10	EPM	Aditivo	L	Q
Ingestão, min/dia	209	215	212	208	11,8	0,75	0,57	0,99
Ruminação, min/dia	570	549	579	554	16,9	0,52	0,85	0,08
Mastigação, min/dia	795	765	791	763	18,8	0,11	0,77	0,05
Consumo de MS, kg	23,6	23,1	23,2	22,5	0,56	0,07	0,18	0,25
Consumo de FDN, kg	8,24	8,01	8,08	7,80	0,20	0,03	0,15	0,21
Mastigação/CMS, min/kg	33,5	33,8	34,8	34,3	1,10	0,26	0,64	0,34
Mastigação/CFDN, min/kg	96,0	97,8	100	98,9	3,42	0,16	0,70	0,39

MS – matéria seca FDN – fibra em detergente neutro; CMS – consumo de matéria seca; CFDN – consumo de fibra em detergente neutro; C – tratamento controle; LB1 – tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g; LB5 - tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 5×10^5 ufc/g; LB10 - tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^6 ufc/g; Aditivo - efeito de inoculação (C vs. LB1+LB5+LB10); L - efeito linear de dose; Q - efeito quadrático de dose; EPM - erro padrão da média.

Na Figura 5 estão apresentados os padrões de CMS durante 24 horas. Foi observado efeito de tratamento ($P<0,01$) e tempo ($P<0,01$) sendo que as maiores diferenças no CMS entre os tratamentos ocorreram nas primeiras duas horas após o fornecimento das dietas. Os animais que receberam a dieta controle apresentaram maior consumo nos períodos de 2 e 4 horas após o fornecimento das dietas. Ao contrário, os animais recebendo dietas com silagens inoculadas apresentaram consumos menores durante as 2 e 4 primeiras horas com recuperação parcial do déficit de consumo acontecendo no período entre 4 e 12 horas após o fornecimento.

A atividade de ingestão de alimentos ao longo dos períodos após o fornecimento das dietas (Figura 6) foi influenciada somente pelo tempo ($P<0,01$). Logo, os tratamentos não alteraram os tempos dedicados à ingestão pelos animais. Como o CMS foi menor para as silagens inoculadas nos tempos de 2 e 4 horas, e os tempos gastos com a ingestão não diferiram, observou-se interação tratamento $\times$ tempo ($P=0,04$) para a variável taxa de ingestão (kg/min) (Figura 7).

As alterações observadas na taxa de ingestão de alimentos pelos animais foram visivelmente condicionadas ao padrão de consumo no período, ocorrendo menor eficiência de ingestão para as dietas contendo silagens inoculadas (Figura 7). O perfil fermentativo induzido por *L. buchneri* deve ter alterado a aceitação das rações pelos animais. O tratamento LB10 apresentou a menor taxa de consumo no período até 2 horas após o fornecimento da dieta no período matutino. Para o período de 4 horas matutino, o controle manteve maior taxa de consumo, contudo, os três tratamentos aditivados equivaleram-se, eliminando a diferença existente no período de duas horas para o LB10. Já no período noturno (12 – 24 horas) as taxas de consumo foram semelhantes para todos os horários e tratamentos.

Figura 5 - Caracterização do consumo de matéria seca de dietas contendo silagens inculadas com doses crescentes de *L. buchneri*, durante 24 horas ($P<0,01$ para efeito fixo de tratamento; $P<0,01$ para efeito fixo de tempo e $P=0,30$ para interação tratamento $\times$ tempo) ↓ Indica o momento em que os animais tiveram acesso as dietas

Dinius; Hill e Noller, (1968) adicionaram ácido acético em níveis crescentes (0; 1,5; 3,0; 4,5 e 6,0% MS) em forragem fresca de milho e, posteriormente, em silagem de milho oriunda da mesma forragem. Nos dois experimentos, o consumo de matéria seca apresentou tendência linear de redução, especialmente no tratamento com 6% de ácido acético. Contudo, quando foi computada a energia advinda do ácido acético, não houve diferença no consumo de calorias entre os tratamentos. Quando comparadas as médias de consumo entre forragem fresca e silagem, observou-se consumo 11% menor para as silagens, que foi atribuído pelos autores aos produtos de fermentação presentes nas silagens.

Daniel et al (2013) conduziram trabalho com trinta vacas de raça holandês agrupadas em dez blocos e submetidas à umas de três possíveis dietas: controle (33% feno de tifton-85 + 67% concentrados), etanol (dieta controle = 5% de etanol) e ácido acético (dieta controle + 5% de ácido acético). O ácido e o etanol foram diluídos em água (1:2) e aspergidos na ração total durante a mistura da mesma. Ao computar as taxas de desaparecimento dos compostos no cocho, os autores

observaram que estas estiveram associadas ao horário de alimentação. A ração oferecida no período matinal apresentou maior taxa de perda de etanol e tendeu a apresentar maior taxa de perda de ácido acético do que aquela oferecida no final da tarde, possivelmente pelas diferenças de temperatura ambiente. O comportamento ingestivo (ingestão, ruminação e mastigação) não foi afetado pelos aditivos porém o padrão de ingestão foi alterado pela adição do ácido acético (DANIEL et al 2013).

Figura 6 - Caracterização dos tempos gastos com a ingestão de dietas contendo silagens inculadas com doses crescentes de *L. buchneri*, nos intervalos pós alimentação em 24 horas ($P < 0,83$ para efeito fixo de tratamento; $P < 0,01$ para efeito fixo de tempo e $P = 0,78$ para interação tratamento $\times$ tempo) ↓ Indica o momento em que os animais tiveram acesso às dietas

Figura 7 - Taxas de ingestão de dietas contendo silagens inculadas com doses crescentes de *L. buchneri*, nos intervalos pós alimentação em 24 horas ($P=0,03$ para efeito fixo de tratamento; $P<0,01$ para efeito fixo de tempo e $P=0,04$ para interação tratamento $\times$ tempo). $\Downarrow$ Indica o momento em que os animais tiveram acesso às dietas

As observações de comportamento ingestivo dos animais realizadas por Daniel et al (2013) foram semelhantes às do presente estudo. Nos animais suplementados com ácido acético o tempo de ingestão nas primeiras 4 h após a alimentação matinal foi menor em todas as avaliações. Tal fato foi atribuído pelos autores às maiores taxas de desaparecimento e, provavelmente, de maior volatilização de ácido acético da ração matinal, sendo o ácido acético relacionado à rejeição ofativa temporária da dieta (Forbes, 2007).

Além do efeito sobre os aspectos sensoriais da ração, a inoculação com *L. buchneri* pode ter aumentado o aporte de nutrientes no rúmen. Considerando produção típica de acetato no rúmen de 3 mol/kg de MS (BERGMAN, 1990; RESENDE JÚNIOR et al., 2006) e os consumos de MS observados; os tratamentos C, LB1, LB5 e LB10 resultariam em absorção diária de 71, 69, 70 e 68 mols/d. Como a dieta inoculada na dose máxima (1×10^6) apresentou 2,69% de ácido acético na MS, o consumo de ácido acético seria de 605 g/d ou 10 mols/d (massa molar do ácido acético = 60 g/mol), o que representaria 14,7% do ácido acético produzido no rúmen. Para as silagens controle e inoculadas nas doses 1×10^5 e 5×10^5 o ácido

acético oriundo das silagens representariam 9,6%, 13,4% e 12,7% deste AGV formado pela fermentação ruminal.

Extrapolando este raciocínio para o ácido propiônico, assumindo produção ruminal de 1,3 mol/kg MS, o suprimento de ácido propiônico via dieta representaria 1,34%; 2,28%; 1,95% e 3,42% da absorção diária. Além disso, casos assumam-se a oxidação parcial de 1,2-propanodiol e 1-propanol à propionato no rúmen, os suprimentos de propionato oriundo das silagens seriam aumentados para 9,7; 10,1; 10,3 e 12,6 % da absorção diária para as dietas C, LB1, LB5 e LB10, respectivamente.

Os possíveis efeitos deletérios do ácido propiônico no consumo voluntário de silagens de milho foram testados por Anill et al. (1993) que infundiram doses de propionato de sódio, de 2 a 8 mol diluídos em 4,5 litros de água, no rúmen de vacas em lactação. Os autores observaram redução no consumo de matéria seca de 140 g/mol de propionato infundido ($P < 0,01$).

Quanto ao efeito do 1-propanol, Raun e Kristensen, (2011) trabalharam com vacas leiteiras no período imediatamente após o parto, fornecendo dietas enriquecidas com 24 g/kg de MS de etanol ou propanol e não observaram efeito no consumo e na produção de leite. Em outro experimento, Raun e Kristensen (2012) utilizaram dose de propanol de 5% MS, que não é usual em silagens, para desafiar vacas leiteiras multíparas ($n=3$) e também não obtiveram alterações em CMS, produção e composição do leite com exceção da gordura, que foi menor para o tratamento propanol. Silva (2014) conduziu experimento com 20 vacas de raça Holandês alimentadas com dietas contendo 53% de silagem de milho. Os tratamentos foram: silagens controle, aditivada com *L. buchneri* na dose de 1×10^5 ufc/g e controle + 1% de 1-propanol. As silagens experimentais foram feitas em silos tipo “bag”, abertos após 247 dias de fermentação e não apresentaram diferença nos parâmetros fermentativos e estabilidade aeróbia. O CMS, produção e composição do leite também não diferiram entre os tratamentos.

Na Tabela 8 estão apresentados os coeficientes de correlação entre produtos de fermentação e CMS obtidos no presente experimento. Os produtos de fermentação que se correlacionaram negativamente com o CMS foram: ácido acético ($r = -0,51$), ácido propiônico ($r = -0,45$), 1,2-propanodiol ($r = -0,39$) e 1-propanol ($r = -0,29$).

Tabela 8 – Coeficientes obtidos por correlação de Pearson entre CMS, MSCorr e produtos e fermentação das silagens experimentais

	CMS	MSCorr	Ác. Lático	Ác. Acét.	1,2-Prop.	Etanol	1-Prop.	Ác. Prop.	Lact. Etila
MSCorr (r)	0,11								
(P)	0,67								
Ác. Lático (r)	0,13	0,06							
(P)	0,62	0,81							
Ác. Acét. (r)	-0,51	0,16	-0,34						
(P)	0,06	0,58	0,23						
1,2-Prop. (r)	-0,39	0,18	0,34	0,17					
(P)	0,15	0,52	0,20	0,56					
Etanol (r)	0,23	-0,48	0,14	-0,56	-0,09				
(P)	0,41	0,07	0,63	0,04	0,75				
1-Prop. (r)	-0,28	-0,34	-0,53	0,37	-0,47	-0,01			
(P)	0,28	0,18	0,03	0,20	0,08	0,97			
Ác. Prop. (r)	-0,45	-0,35	-0,17	0,45	-0,28	-0,44	0,61		
(P)	0,08	0,18	0,53	0,10	0,30	0,10	0,01		
Lac. Etila (r)	0,13	-0,04	0,40	-0,76	-0,03	0,67	-0,48	-0,52	
(P)	0,62	0,88	0,12	<0,01	0,90	<0,01	0,06	0,03	
Ace. Prop. (r)	0,17	0,23	-0,17	0,27	-0,13	-0,48	0,31	0,07	-0,32
(P)	0,52	0,39	0,54	0,35	0,64	0,06	0,25	0,78	0,22

CMS – consumo de matéria seca; MSCorr – MS corrigida; Ác. Lático – ácido lático; Ác. Acét – ácido acético; 1,2-Prop – 1,2 – propanodiol; 1-Prop – 1- propanol; Ác. Prop. Ácido propiônico; Lac. Etila – lactato de etila; Ace. Prop. – acetato de propila. *P* – significância estatística.

Trabalhos correlacionando consumo com os níveis de ácido acético, propiônico ou 1-propanol provenientes de silagens são escassos. Brown e Radcliffe (1971) testaram as possíveis relações entre consumo, composição química e digestibilidade *in vitro* de vinte silagens provenientes de sete forragens (gramíneas e leguminosas) em diferentes pontos de maturação, fornecidas para cordeiros Merinos. O consumo de matéria seca foi negativamente correlacionado com as concentrações dos ácidos acético ($r = -0,57$) e propiônico ($r = -0,55$) nas silagens. Jackson e Forbes (1970) conduziram experimento semelhante e também

observaram que a concentração de ácido acético nas silagens foi linear e negativamente correlacionada com o consumo voluntário ($r = -0,56$).

Huhtanen et al. (2002); Huhtanen; Rinne e Nousiainen (2007); Krizsan e Randby (2007) embora tenham observado correlação negativa entre teor de ácido propiônico e CMS de silagens, consideram ser improvável que as baixas concentrações de ácido propiônico encontradas nas silagens possam influenciar diretamente o consumo. Para os autores, melhores correlações são obtidas quando comparados os teores totais de ácidos graxos voláteis ou ainda de ácidos totais com o consumo voluntário, evidenciando que este é afetado mais pela carga de produtos de fermentação presentes do que pelo efeito individual dos mesmos. No presente estudo é possível considerar que a tendência de redução observada no consumo de matéria seca foi resultado da ação conjunta dos produtos de fermentação característicos da ação do *L.buchneri*, em vez do efeito isolado do ácido acético ou ácido propiônico.

Analizando-se as correlações entre os produtos de fermentação, tem-se a confirmação da eficácia da inoculação neste experimento, uma vez que o etanol foi negativamente correlacionado ao ácido acético ($P=0,04$), demonstrando o efeito antifúngico deste AGV sobre o crescimento de leveduras na fase fermentativa (DRIEHUIS, OUDE ELFERINK e SPOELSTRA, 1999).

O álcool 1-propanol foi correlacionado negativamente ao ácido láctico ($P=0,03$) e ao 1,2-propanodiol ($P=0,08$), uma vez que o aparecimento do 1-propanol está condicionado, em um primeiro momento, à degradação anaeróbica do ácido láctico até ácido acético e 1,2-propanodiol (OUDE ELFERINK et al., 2001), e, a seguir, à metabolização do 1,2-propanodiol por bactérias *L. diolivorans*, resultando na geração do 1-propanol (KROONEMAN et al., 2002). Como a sua produção é concomitante à do ácido propiônico, esses dois compostos correlacionaram-se positivamente ($P=0,01$) conforme esperado.

O éster lactato de etila apresentou correlação negativa com o ácido acético ($P<0,01$) e o ácido propiônico ($P=0,03$), dois ácidos orgânicos com ação antifúngica comprovada sobre o metabolismo de leveduras (McDONALD; HENDERSON e HERON, 1991), prevenindo, portanto a produção de etanol, que é o composto básico para sua produção, além do ácido láctico (PEREIRA; SILVA e RODRIGUES, 2011). Como esperado, a correlação entre lactato de etila e etanol foi positiva ($P<0,01$).

Os índices de seleção de partículas pelos animais estão apresentados na Figura 8. A seleção de partículas da ração diferiu somente entre peneiras ($P<0,01$), havendo maior consumo proporcional de partículas pequenas em detrimento das partículas maiores. A observação de maiores proporções de partículas grosseiras nas sobras permitiu visualizar tal preferência dos animais pelas menores partículas, conforme documentado por Leonardi e Armentano (2003).

Figura 8 - Seleção de partículas das dietas contendo silagens inoculadas com doses crescentes de *L. buchneri*, ($P=0,83$ para efeito fixo de tratamento; $P<0,01$ para efeito fixo de peneira e $P=0,06$ para interação tratamento $\times$ peneira)

4.6 Parâmetros digestivos, energéticos e produtivos dos animais

Conforme os dados apresentados na Tabela 9, não foram observados efeitos dos tratamentos sobre a digestibilidade dos nutrientes das dietas. As digestibilidades aparentes são coerentes com o observado por Bispo (2013) e da Silva (2014) em experimentos com dietas semelhantes.

Fylia, Karabulut e Sucu (2002) e Filya; Sucu e Krabulut (2006) avaliaram silagens com e sem inoculação com *L. buchneri* e não observaram diferenças nas digestibilidades das silagens. Segundo Huhtanen et al. (2002) e Huhtanen; Rinne e Nousiainen (2007), quando se compara silagens com digestibilidades semelhantes,

os produtos de fermentação passam a exercer maior importância no consumo. Isso reforça o fato das correlações negativas entre produtos de fermentação e CMS serem os melhores descritores para as respostas em decréscimo de consumo de MS e FDN observadas no presente trabalho.

Tabela 9 - Digestibilidade das rações totais contendo silagens inoculadas com doses de *L. buchneri*

Digestibilidade, %	Tratamento					P-contraste		
	C	LB1	LB5	LB10	EPM	Aditivo	L	Q
MS	68,9	70,2	69,0	68,9	0,62	0,47	0,11	0,40
MO	71,7	72,9	71,2	71,5	0,75	0,85	0,13	0,17
PB	77,1	76,7	75,9	76,3	0,80	0,37	0,78	0,43
FDN	48,1	52,2	47,1	47,7	1,42	0,57	0,02	0,05
EE	91,6	91,6	90,6	91,5	0,58	0,57	0,96	0,11
CNF	88,8	89,4	89,0	89,0	0,70	0,60	0,74	0,82
NDT	71,3	71,9	70,7	70,9	0,72	0,85	0,30	0,29

MS – matéria seca; MO – matéria orgânica; PB – proteína bruta; FDN - fibra em detergente neutro; EE – estrato etéreo; CNF - carboidrato não fibroso; NDT – nutrientes digestíveis totais; C – tratamento controle; LB1 – tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g; LB5 - tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 5×10^5 ufc/g; LB10 - tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^6 ufc/g; Aditivo - efeito de inoculação (C vs. LB1+LB5+LB10); L - efeito linear de dose; Q - efeito quadrático de dose; EPM - erro padrão da média.

Para os componentes do leite, apresentados na Tabela 10 também não foram observados efeitos da inoculação. Contudo, a produção diária de leite corrigido para 3,5% de gordura foi em média 2,3 kg menor ($P=0,05$) para as dietas contendo silagens inoculadas.

O teor de gordura do leite foi similar entre os tratamentos. Os produtos de fermentação ruminal precursores da gordura do leite são o acetato e o butirato e, apesar da inoculação das silagens com *L. buchneri* resultar em maior aporte dietético de ácido acético, este montante não influenciou o percentual desse componente no leite. É provável que a absorção diária de acetato e outros substratos cetogênicos tenham excedido as exigências de nutrientes para síntese de gordura do leite em todos os tratamentos dietéticos.

Tabela 10 - Produção e composição do leite de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo silagens inoculadas com doses de *L. buchneri*

Item	Tratamento					P-contraste		
	C	LB1	LB5	LB10	EPM	Aditivo	L	Q
Leite, kg/d	35,6	34,1	34,4	33,6	2,43	0,13	0,71	0,67
Leite corrigido 3,5% G, kg/d	36,4	33,9	34,8	33,7	2,51	0,05	0,82	0,43
EL _L por kg de leite, Mcal/kg	0,71	0,69	0,70	0,70	0,01	0,28	0,34	0,32
Gordura, %	3,64	3,50	3,58	3,53	1,19	0,25	0,80	0,50
Proteína, %	3,49	3,39	3,48	3,51	0,73	0,46	0,02	0,29
Caseína, %	26,8	26,0	26,8	27,3	0,64	0,85	0,02	0,61
Caseína, % da proteína	76,8	76,9	76,9	77,2	0,24	0,26	0,28	0,57
Lactose, %	4,55	4,59	4,58	4,54	0,60	0,72	0,39	0,81
Sólidos Totais, %	12,7	12,4	12,6	12,6	1,80	0,24	0,45	0,48
ESD, %	8,98	8,95	9,02	9,03	0,66	0,82	0,33	0,69
AGL, mmol/ 10 L	1,59	1,41	1,42	1,41	0,17	0,29	0,98	0,96
N-uréico, mg/dL	13,2	13,1	13,5	13,3	0,39	0,75	0,56	0,36
SCC, x1000/mL	190	182	149	143	37,2	-	-	-
Log SCC	2,15	2,14	2,06	2,04	0,09	0,43	0,32	0,66

G – gordura; ELI – energia líquida; ESD – extrato seco desengordurado; AGL – ácidos graxos livres; N – nitrogênio; CCS – contagem de células somáticas; C – tratamento controle; LB1 – tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g; LB5 – tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 5×10^5 ufc/g; LB10 – tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^6 ufc/g; Aditivo – efeito de inoculação (C vs. LB1+LB5+LB10); L – efeito linear de dose; Q – efeito quadrático de dose; EPM – erro padrão da média

Os teores de proteína e de caseína, que é a principal proteína do leite, foram linearmente aumentados dentro das doses de *L. buchneri*. Provavelmente, essa resposta deveu-se a um efeito de diluição em função da menor produção de leite observada para as silagens tratadas. Os teores semelhantes de nitrogênio uréico no leite são indicativo de que, tanto a dieta controle, quanto as dietas contendo silagens aditivadas culminaram em produção eficiente de proteína microbiana no rúmen. Valores altos de N-uréico podem indicar excessos de PB na dieta, tanto da fração PDR (proteína degradável no rumem) como da fração PNDR (proteína não-degradável no rúmen), baixa taxa de fermentação ruminal da fração CNF, ou ainda, relação proteína:energia aumentada. Do contrário, valores baixos de N-uréico são indício de deficiência de PB, limitadas quantidades de PDR e PNDR, ou ainda, alta taxa de fermentação de CNF no rúmen (JONKER; KOHN e ERDMAN, 1999).

Segundo Almeida (2012), níveis de N-uréico variando entre 8 e 16 mg/dL são considerados adequados, indicando que as dietas foram bem balanceadas (ALMEIDA, 2012).

Os teores de lactose foram semelhantes entre os tratamentos, e este representa o principal soluto associado ao volume do leite. Segundo Jenkins e McGuire, (2006), são poucos os estudos onde houve variação no teor desse componente do leite.

Na Tabela 11 estão apresentados os dados referentes à partição energética calculada com base nos dados de desempenho e consumo observados.

Tabela 11 - Partição energética em vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo silagens inoculadas com doses de *L. buchneri*

Item	Tratamento					P-contraste		
	C	LB1	LB5	LB10	EPM	Aditivo	L	Q
Peso vivo, kg	686	687	692	694	18,8	0,83	0,79	0,94
Variação do PV, kg/dia	0,59	0,43	0,58	0,42	0,14	0,50	0,91	0,35
EL _L manutenção, Mcal/d	10,7	10,7	10,8	10,8	0,22	0,85	0,79	0,94
EL _L leite, Mcal/d	25,2	23,4	24,2	23,5	1,02	0,06	0,99	0,35
EL _L leite/CMS, Mcal/kg	1,08	1,02	1,03	1,03	0,03	0,17	0,67	0,79
Consumo de EL _L , Mcal/dia	36,1	35,9	35,4	34,2	0,88	0,26	0,08	0,81
EL _L leite/Consumo de EL, %	66,1	65,2	69,2	68,5	2,14	0,38	0,12	0,13
Balanço de EL _L , Mcal/dia	1,2	1,5	-0,3	0,3	0,75	0,35	0,20	0,11

EL_L – energia líquida; PV – peso vivo; C – tratamento controle; LB1 – tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^5 ufc/g; LB5 - tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 5×10^5 ufc/g; LB10 - tratamento inoculado com *L. buchneri* na dose 1×10^6 ufc/g; Aditivo - efeito de inoculação (C vs. LB1+LB5+LB10); L - efeito linear de dose; Q - efeito quadrático de dose; EPM - erro padrão da média.

O único parâmetro que apresentou tendência de queda para efeito de aditivo ($P=0,06$) foi a excreção diária de energia no leite. Tal diferença se deveu à menor quantidade de leite produzida pelos animais recebendo as silagens inoculadas. A propósito, as dietas com silagem não tratada e inoculada na menor dose foram aquelas que apresentaram balanço energético numericamente melhor. Assim, o aumento da dose de inoculação com *L. buchneri* tendeu a diminuir o aporte de energia líquida da dieta ($P=0,08$).

A variação no peso vivo dos animais foi positiva, embora não tenha sido afetada pelos tratamentos. Considerando o DEL médio, o ganho de peso observado para os animais, no presente experimento, esta de acordo com Walter; McNamara e Hillers (1993), que observaram ganho de peso a partir do terceiro mês de lactação, com animais podendo passar de escore corporal 2,0 para 3,3 no intervalo entre 3 e 12 meses após o parto.

5 CONCLUSÕES

A inoculação com *L. buchneri* eleva os teores de ácido acético, propiônico, 1-propanol e 1,2-propanodiol e reduz a contagem de leveduras, melhorando a estabilidade aeróbia das silagens tratadas.

Vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo silagens inoculadas com *L. buchneri* tenderam a apresentar menor consumo de MS. O padrão de consumo de alimentos ao longo do dia é afetado pelas silagens tratadas, sendo as alterações em consumo e comportamento ingestivo atribuíveis ao efeito conjunto dos produtos de fermentação (ácido acético, ácido propiônico e 1-propanol) formados pela atividade de *L. buchneri* nas silagens.

Animais alimentados com silagens de milho inoculadas com *L. buchneri* produzem menos leite corrigido para 3,5% de gordura.

REFERÊNCIAS

AFUAKWA, J.J.; CROOKSTON, R.K. Using the kernel milk line to visually monitor grain maturity in maize. **Journal of Crop Science**, Madison, v. 24, p. 687-691, 1984.

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS. APTA, Regional Centro Norte. **Avaliação de cultivares de milho para produção de silagem, Safra 2012/2013**. DUARTE, A.P.; NUSSIO, L.G.; PAZIANI, S.F. (Ed.), 2014. Disponível em:

<<http://www.zeamays.com.br/wp-content/uploads/2012/11/Milho-Ver%C3%A3o-2012-13-Avalia%C3%A7%C3%A3o-de-Cultivares-de-Milho-para-Produ%C3%A7%C3%A3o-de-Silagem.pdf>>. Acesso em: dez. 2014.

ALLEN, M.S.; COORS, J.G.; ROTH, G.W. Corn silage. In: BUXTON D.; MUCK R.; HARRISON J. **Silage Science and Technology**. Madson: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, 2003. 897p.

ALMEIDA, R. Nitrogênio uréico no leite como ferramenta para ajuste de dietas. In: PEREIRA, M.N.; PEREIRA, R.A.N.; LOPES, N.M. (Ed.). SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM FORMULAÇÃO DE DIETAS PARA GADO DE LEITE, 2., 2012. Lavras, **Anais...** Lavras: UFLA 2012. 158p.

ANIL, M.H.; MBANYA, J.N.; SYMONDS H.W.; FORBES J.M. Responses in the voluntary intake of hay or silage by lactating cows to intraruminal infusions of sodium acetate or sodium propionate, the tonicity of rumen fluid or rumen distension. **British Journal of Nutrition**, Great Britain, v. 69, p. 699-712, 1993.

ARRIOLA, K.G.; KIM, S.C.; STAPLES, C.R.; ADESOGAN, A.T. Effect of applying bacterial inoculants containing different types of bacteria to corn silage on the performance of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 3973–3979, 2011.

ASHBEL, G.; WEINBERG, Z.G.; HEN, Y.; FILYA I. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 28, p. 261-263, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International** 16. ed. Washington, USA. 1997. 1117p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International**. 17th. ed. Gaithersburg, USA. 2000. 1015p.

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**, Savoy, v.80, n.10, p.2497-3503, 1997.

BAILE, C.A.; MAYER, J. Effects of intravenous versus intraruminal injections of acetate on feed intake of goats. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.51, p.1490-1494, 1968.

BASSO, F.C.; ADESOGAN, A.T.; LARA, E.C.; RABELO, C.H.S.; BERCHIELLI, T.T.; TEIXEIRA, I.A.M.A.; SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A. Effects of feeding corn silage inoculated with microbial additives on the ruminal fermentation, microbial protein yield, and growth performance of lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.92, p.5640–5650, 2014.

BERGMAN, E.N. Energy contribution of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 70, p. 567-590, 1990.

BERNARDES, T.F. **Levantamento das práticas de produção e uso de silagens em fazendas leiteiras no Brasil**. 2012. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/pdf/EBOOK-SILAGEM.pdf>>. Acesso em: dez. 2014.

BISPO, A.B. **Qualidade de silagens de milho confeccionadas com diferentes filmes de vedação e desempenho produtivo de vacas em lactação**. 2013. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

BORREANI, G.; TABACCO, E. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.93, p.2620-2629, 2010.

BROWN, D.C.; RADCLIFFE, J.C. Relationship between intake of silage and its chemical composition and *in vitro* digestibility. **Australian Journal of Agricultural Research**, Sydney, v.23, p.25-33, 1972.

CORREA, C.E.S.; SHAVER, R.D.; PEREIRA, M.N.; LAUER, J.G.; KOHN, K. Relationship between corn vitreousness and ruminal *in situ* degradability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, p.3008-3012, 2002.

DANIEL, J.L.P.; AMARAL, R.C.; SÁ NETO, A.; CABEZAS-GARCIA, E.H.; BISPO, A.W.; ZOPOLLATTO, M.; CARDOSO, T.L.; SPOTO, M.H.F.; SANTOS, F.A.P.; NUSSIO, L.G. Performance of dairy cows fed high levels of acetic acid or ethanol. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.96, p.398–406, 2013.

DANIEL, J.L.P.; JUNGES, D.; NUSSIO, L.G. Alterações na qualidade de silagens de milho durante o armazenamento. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 5., 2014. Maringá, **Anais...** Maringá, 2014. p. 23-36.

DAVIS, C.L. Acetate production in the rumen of cows fed either control or low-fiber, high-grain diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 50, p. 1621, 1967.

DE SÁ NETO, A. **Caracterização microbiológica, parâmetros fermentativos e estabilidade aeróbia em silagens de forragens tropicais com aditivos microbianos**. 2012. 115 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

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

DRIEHUIS, F. Occurrence of mycotoxins in silage. In: DANIEL, J.L.; ZOPOLLATTO, M.; NUSSIO, L.G. (Ed.). INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011. São Pedro. **Proceedings...** São Pedro:FEALQ, 2011. p. 85-104.

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

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; VAN WIKSELAAR, P.G. *Lactobacillus buchneri* improves the aerobic stability of laboratory and farm scale whole crop maize but does not affect feed intake and milk production of dairy cows. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE PROCEEDINGS, 12., 1999. Uppsala. **Proceedings...** Uppsala, 1999. p. 264–265.

FILYA, I. Nutritive value and aerobic stability of whole crop silage harvested at four stages of maturity. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.116, p.141-150, 2004.

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

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

FORBES, J.M.; MBANYA J.N.; ANIL, M.H. Effects of Intraruminal infusions of sodium acetate and sodium chloride on silage intake by lactating cows. **Appetite**, London, v.19, p.293-301, 1992.

FORBES, J.M. **Voluntary food intake and diet selection in farm animals**. 2nd ed. Wallingford, UK: CABI, 2007. 453p.

JACKSON, N.; FORBES, T.J. The voluntary intake by cattle of four silages differing in dry matter content. **Animal Production**, Edinburgh, v.12, p.591-599, 1970.

JENKINS T.C.; McGUIRE M.A. Major advances in nutrition: Impact on milk composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, p.1302-1310, 2006.

JOHNSON L.M.; HARRISON, J.H.; DAVIDSON, D.; MAHANNA, W.C.; SHINNERS, K.; LINDER D. Corn Silage Management: Effects of Maturity, Inoculation, and Mechanical Processing on Pack Density and Aerobic Stability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, p.434–444, 2002.

JONKER, J.S.; KOHN, R.A.; ERDMAN, R.A. Milk urea nitrogen target concentrations for lactating dairy cows fed according to national Research Council recommendations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, p.1261-1273, 1999.

JUNGES, D. **Tempo de armazenamento e manejo do painel no valor nutritivo de silagens de milho**. 2014. 149p. Tese (Doutorado na area de Ciência Animal e Pastagens - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

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

HOLDEN, L.A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for tem feeds. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.82, p.1791-1794, 1999.

- 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.
- HUHTANEN, P.; KHALILI, H.; NOUSIAINEN, J.I.; RINNE, M.; JAAKKOLA, S.; HEIKKILA, T.; NOUSIAINEN, J. Prediction of the relative intake potential of grass silage by dairy cows. **Livestock Science**, Amsterdam, v.73, p.111-130, 2002.
- HUHTANEN, P.; RINNE, M.; NOUSIAINEN, J. Evaluation of the factors affecting silage intake of dairy cows: a revision of the relative silage dry-matter intake index. **Animal**, Cambridge, v. 1, p. 758-770, 2007.
- HUTCHINSON, K.J.; WILKINS, R.J. The voluntary intake of silage by sheep. 2. The effects of acetate on silage intake. **Journal of Agricultural Science**. Cambridge, v.77, p.539-543, 1971.
- KLEINSCHMIDT, D.H.; KUNG JR, L.. A meta-analysis of the effects of lactobacillus buchneri on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 10, p. 4005-4013, 2006.
- KRISTENSEN, N.B.; SLOTH, K.H.; HOJBERG, O.; SPLIID, N.H.; JENSEN, C.; THOGERSEN, R. Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 3764–3774, 2010.
- KRISTENSEN, N.B.; STORM, A.; RAUN, B.M.L.; ROJEN, B.A.; HARMON, D.L. Metabolism of silage alcohols in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 1364–1377, 2007.
- KROONEMAN, J.; FABER, F.; ALDERKAMP, A.C.; OUDE ELFERINK, S.J.H.W.; DRIEHUIS, F.; CLEENWERCK, I.; SWINGS, J.; GOTTSCHAL, J.C.; VANCANNEY, M. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, London, v. 52, p. 639-646, 2002.
- KRIZSAN, S.J.; RANDBY, A.T.; WESTAD, F. The effect of acetic acid, caproic acid and tryptamine on voluntary intake of grass silage by growing cattle. In: In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM FORAGE CONSERVATION, 2006. Brno, **Proceedings...** Brno:2006. p. 143-145.
- KUNG Jr., L.; GRIEVE, D.B.; THOMAS, L.W.; HUBER, J.T. Added ammonia or microbial inoculant for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 67, p. 299-306, 1984.

KUNG, Jr. L.; 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, JR. L.; TAYLOR, C.C.; LYNCH, M. P.; NEYLON, J.M. The Effect of Treating Alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on Silage Fermentation, Aerobic Stability, and Nutritive Value for Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 336-343, 2003.

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

LAMBERT, R.J.; STRATFORD, M. Weak acid preservatives: modeling microbial inhibition and response. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, p. 157-164, 1999.

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**, Savoy, v. 79, n. 5, 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**, Savoy, v. 86, p. 557-564, 2003.

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

LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 76, p. 1216-1231, 1998.

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

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

MELLO, R.; NÖRNBERG, J.L.; ROCHA M.G.D.; DAVID, D.B.D. Características produtivas e qualitativas de híbridos de milho para produção de silagem. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.4, p.79-94, 2005.

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 fiber requirements of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 1463-1482, 1997.

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

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients Requirement of Dairy Cattle**. 7th rev. ed. Washington: National Academy Press, 2001. 381p.

NEUMANN, M.; OLIVEIRA, M.R.; ZANETTE, P.M.; UENO, R.K.; MARAFON, F.; SOUZA, M.P. Aplicação de procedimentos técnicos na ensilagem do milho visando maior desempenho animal. In: SIMPÓSIO: PRODUÇÃO E TILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 4., 2011, Maringá. **Anais...** Maringá. 2011. p. 95-130.

NUSSIO, L.G.; SIMAS, J.E.C.; LIMA, M.L.M. Determinação do ponto de maturidade ideal para colheita do milho para silagem. In: NUSSIO, L.G.; ZOPOLLATO, M.; MOURA, J.C (Ed). **Milho para silagem**. Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 11-26.

O'KIEL, P.O.; CLANCY, M.; DOYLE, E.M. Aerobic stability of grass silage mixed with a range of concentrate feedstuffs at feed-out. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 1., 2001, São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 794-795.

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

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. Microbiology of ensiling. In: Buxton, D.R.; Muck, R.E.; Harrison, J.H. eds. Silage science and technology. **American Society of Agronomy**, Madison, WI, USA. 2003, p. 31–93.

PAZIANI, S.F.; DUARTE, A.P.; NUSSIO, L.G.; GALLO, P.B.; BITTAR, C.M.M.; ZOPOLLATTO, M.; RECO, P.C. Características agronômicas e bromatológicas de híbridos de milho para produção de silagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p. 411-417, 2009.

PEREIRA, C.S.M.; SILVA, V.M.T.M.; RODRIGUES, A.E. Ethyl Lactate as a Solvent: Properties, Applications and Production Processes - A Review. **Green Chemistry**, London, v. 13, p. 2658-2671, 2011.

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

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

RAUN, B.M.L.; KRISTENSEN, N.B. Metabolic effects of feeding ethanol or propanol to postpartum transition Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 2566–2580, 2011.

RAUN, B.M.L.; KRISTENSEN, N.B. Metabolic effects of feeding high doses of propanol and propylacetate to lactating Holstein cows. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 144, p. 37–47, 2012.

REIS, R.A.; JOBIM, C.C. Perfil da fração de carboidratos da planta e adequação de aditivos no processo de ensilagem. In: WORKSHOP SOBRE MILHO PAR SILAGEM, 2., 2001. Piracicaba, **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 27-52.

RESENDE JÚNIOR, J.C.; PEREIRA, M.N.; BÔER, H.; TAMMINGA, S. Comparison of techniques to determine the clearance of ruminal volatile fatty acids. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 89, p. 3096-3106, 2006.

ROOKE, J.A.; HATFIELD, R.D. Biochemistry of Ensiling. In: Buxton, D.R.; Muck, R.E.; Harrison, J.H. eds. Silage science and technology. **American Society of Agronomy**, Madison, WI, USA. p. 95-140, 2003.

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

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**. Version 8.2. 5th ed. Cary: Statistical Analysis System Institute, 2001. 846p.

SHEPERD, A.C.; COMBS, D.K. Long-term effects of acetate and propionate on voluntary feed intake by midlactation cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, p. 2240-2250, 1998.

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

SILVA, J. **Efeitos de *L. buchneri* e 1-propanol no valor nutritivo de silagens de milho para vacas leiteiras**. 2015. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

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

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

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

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.

WALTNER, S.S.; McNAMARA, J.P.; HILLERS, J.K. Relationships of body condition score to production variables in high producing Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 3410-3419. 1993.

WEIB, K.; KAISER, E. Milchsäurebestimmung in silageextrakten mit Hilfe der HPLC. **Das Wirtschaftseigene Futter**, Berlin, v. 41, p. 69-80, 1995.

WEIB, K.; SOMMER, G. Bestimmung von Estern und anderen flüchtigen organischen Substanzen (VOC) in Silageextrakten mit Hilfe der Gaschromatographie. In: VERBAND DEUTSCHER LANDWIRTSCHAFTLICHER UNTERSUCHUNGS UND FORSCHUNGSANSTALTEN KONGRESS, 2012, Passau. **Proceedings...** Passau: VDLUFA-Schriftenreihe, 2012. v. 68, p. 561-569.

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

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

WEINBERG, Z.; SZAKACS, G.; ASHBELL, G.; HEN, Y. The effect of temperature on the ensiling process of corn and wheat. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, p. 561–566, 2001.

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.

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