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

Efeito do aditivo químico a base de ácido propiônico e ácido fórmico em silagens
de milho: perfil fermentativo e desempenho de vacas leiteiras

Bruno Augusto Valverde Arthur

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

Piracicaba
2019

Bruno Augusto Valverde Arthur
Engenheiro Agrônomo

Efeito do aditivo químico a base de ácido propiônico e ácido fórmico em silagens de milho:
perfil fermentativo e desempenho de vacas leiteiras
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2019

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

Arthur, Bruno Augusto Valverde

Efeito do aditivo químico a base de ácido propiônico e ácido fórmico em silagens de milho: perfil fermentativo e desempenho de vacas leiteiras / Bruno Augusto Valverde Arthur. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

40 p.

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

1. Estabilidade aeróbia 2. Ácidos orgânicos. 3. Etanol 4. Conservação 5. Fermentação 6. Combo químico I. Título

*Aos meus pais João Arthur e Rubenita Valverde, por todos os ensinamentos,
valores, incentivos e paciência.*

À Daiane, Lucas e Lorena por todo amor, cumplicidade e companheirismo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela dádiva da vida, por tudo concedido e conquistado, por minha família e amigos.

A minha família, minha fonte de amor, dedicação e forças. Especialmente aos meus pais João e Rubenita e minha esposa Daiane, sem vocês não teria alcançado esse objetivo. Obrigado por todo ensinamento, exemplo e companheirismo. E, sobretudo, por nossa linda filha Lorena. Amo vocês com todas as minhas forças.

Ao Professor Dr. Luiz Gustavo Nussio pela oportunidade, confiança e auxílio nas etapas de dificuldade e principalmente pela amizade. Obrigado professor!

Aos Drs. Gustavo Salvati e William Santos por toda ajuda na reta final, direcionando e dando forças para o término do trabalho. Também à mestra Jessica Mariane Silveira por toda colaboração e dicas ao final do trabalho.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, por proporcionar condições para realização do trabalho. Ao CNPq pela bolsa ao longo do projeto.

À toda equipe do grupo de Qualidade e Conservação de Forragens (QCF), sem exceções, todos foram fundamentais na minha caminhada, e tenho certeza que continuaram sendo na minha e na de muitos que virão.

Aos funcionários do departamento, que auxiliaram tanto na condução do trabalho a campo quanto ao laboratório, meu muito obrigado.

E por fim, a todos que por ventura colaboraram de qualquer forma com o processo.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. A cultura do milho para produção de silagens	11
2.2. Silagens de milho e o risco de deterioração aeróbia.....	12
2.3. O processo de reensilagem	14
2.4. Ácidos orgânicos como precursores de qualidade da silagem	15
2.5. Efeitos dos ácidos propiônico e fórmico em silagens com elevada matéria seca.....	16
3. OBJETIVOS	17
4. MATERIAL E MÉTODOS'	19
4.1. Experimento 1	19
4.1.1. Ensilagem e tratamentos	19
4.1.2. Abertura dos silos experimentais.....	19
4.1.3. Perda total de material seca durante o armazenamento	20
4.1.4. Análise dos silos experimentais.....	20
4.1.5. Análise estatística	21
4.2. Experimento 2	22
4.2.1. Local, ensilagem e tratamentos	22
4.2.2. Abertura e manejo dos silos.....	22
4.2.3. Ensaio de lactação	22
4.2.4. Análise estatística	24
5. RESULTADOS DOS EXPERIMENTO 1 E 2	25
6. DISCUSSÃO	29
6.1. Experimento 1	29
6.2. Experimento 2	30
7. CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS	35

RESUMO

Efeito do aditivo químico a base de ácido propiônico e ácido fórmico em silagens de milho: perfil fermentativo e desempenho de vacas leiteiras

Ácidos orgânicos tem grande impacto na fermentação de silagens e sua estabilidade aeróbia, atuando com muita efetividade sobre fungos e leveduras. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os benefícios da adição de ácidos orgânicos no processo de ensilagem, tanto para a forragem ensilada quanto no consumo voluntário dos animais. O estudo foi dividido em duas etapas: Exp. 1) Foi testado o aditivo químico Lupro-Mix® NA (35% ácido propiônico, 21% de formato de sódio, 20% de ácido fórmico, 4% propionato de sódio e 20% de água) em silos experimentais de milho planta inteira. Os tratamentos foram os seguintes: (i) sem aditivo (controle); (ii) Lupro-Mix® NA (4L por tonelada de matéria natural). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. O aditivo foi significativamente eficiente em reduzir o teor de etanol, 1.2 propanodiol, lactato de etila, acetato de etila da silagem, assim como as perdas de MS. Houve também expressivo aumento de ácido propiônico em relação ao tratamento controle, refletindo assim em maior estabilidade aeróbia da massa tratada. A silagem com Lupro-Mix® NA, apresentou resultado satisfatório quanto a manutenção da estabilidade aeróbia e redução de perdas da silagem. Exp. 2) O mesmo aditivo testado em silos laboratoriais foi testado em silagens com escala comercial em silos tipo bag para alimentar vacas em lactação. Em um delineamento de reversão simples, as vacas foram distribuídas em blocos casualizados em 10 pares de dois animais, aleatoriamente distribuídas, dentro de cada bloco, em dois tratamentos (i) silagem sem aditivo (controle); (ii) silagem com Lupro-Mix® NA (4L por tonelada de matéria natural). Os resultados apontaram para redução numérica no tempo de ingestão dos animais alimentados com silagens tratadas. Da mesma forma, numericamente houve aumento do consumo de matéria seca, da produção de leite, leite corrigido para 4% de gordura, e energia do leite, além de uma tendência no incremento de proteína no leite. O uso do aditivo químico Lupro-Mix® NA se mostrou eficiente no controle de perdas, estabilidade aeróbia, além de indícios de melhoria no desempenho de vacas leiteiras.

Palavras-chave: Estabilidade aeróbia, Ácidos orgânicos, Etanol, Conservação, Fermentação, Combo químico

ABSTRACT

Effect of propionic acid and formic acid-based chemical additives on corn silages: fermentative profile and performance of dairy vaccines

Organic acids have a great impact on silage fermentation and aerobic stability, acting very effectively against fungi and yeast. The objective of the present study was to evaluate the impact of a chemical additive in the fermentation profile of whole plant corn silage (WPCS) with high dry matter content and the dairy cows' performance fed with re-ensiled WPCS. The study was divided into two trials: Trial 1) The chemical additive Lupro-Mix® NA (35% propionic acid, 21% sodium formate, 20% formic acid, 4% sodium propionate and 20% water) was added in whole plant corn with high dry matter (~40%) and ensiled in experimental silos. The treatments were as follows: (i) without additive (control); (ii) Lupro-Mix® NA (4L per ton of natural matter). A completely randomized design with four replications per treatment was used. The additive was significantly efficient in reducing ethanol content, 1,2 propanediol, ethyl lactate, ethyl acetate, as well as DM losses. There was also a significant increase of propionic acid in relation to the control treatment, thus reflecting in greater aerobic stability of the treated mass. The silage with Lupro-Mix® NA showed a satisfactory result in the maintenance of the aerobic stability and reduction of the silage losses. Trial 2) The same additive tested in laboratory silos was tested on commercial scale silages in bag silos to feed lactating. In a cross over design, the cows were distributed in randomized blocks in 10 pairs of two animals, randomly distributed, within each block, in two treatments (i) silage without additive (control); (ii) silage with Lupro-Mix® NA (4L per ton of natural matter). The results pointed to a numerical reduction in the ingestion time of the animals fed treated silages. Similarly, numerically there was an increase in dry matter intake, milk yield, 4% fat corrected milk, and milk energy, as well as a trend towards increased protein content and yield. The use of Lupro-Mix® NA chemical additive reduces DM losses, improves aerobic stability and dairy cow performance.

Keywords: Aerobic stability, Organic acids, Ethanol, Conservation, Fermentation, Chemical additive

1. INTRODUÇÃO

A silagem de milho (SM) planta inteira é a principal fonte de forragem utilizada em sistemas intensivos de produção de leite no Brasil (Bernardes et al., 2018), no Estados Unidos (Martin et al., 2017) e no mundo (Ferraretto et al., 2018). A expressiva adoção dessa forragem pelos produtores está relacionada à sua versatilidade em fornecer alta energia (principalmente amido que está presente nos grãos) e fibra fisicamente efetiva (oriunda da fração vegetativa, Ferraretto et al., 2018). Adicionalmente a essa característica a SM apresenta riscos reduzidos para sua produção, opção de colher como fonte de forragem ou grãos, alta produção de matéria seca (MS; Allen et al., 2003) e amido de baixo custo por área (Wilkinson e Rinne, 2017), colheita rápida e facilidade de ensilar (Nigon et al., 2016).

A baixa estabilidade aeróbia em SM com alto teor de MS tem sido associada ao crescimento de fungos que ocorrem frequentemente em condições de campo (Auerbach e Nadeau, 2013). O uso de inoculantes microbianos heterofermentativos do tipo *Lactobacillus buchneri* demonstrou melhorar a estabilidade aeróbia de silagens expostas ao ar (Kleinschmidt e Kung 2006), mas não possui resultados significativos quando a silagem é armazenada por tempo inferior a 8 semanas e nem para o tratamento das camadas superiores, que são particularmente mais propensas a deterioração devido à menor compactação e, conseqüentemente, maior concentração de oxigênio. Nesse cenário, onde inoculantes microbianos são expostos à condições desfavoráveis, o uso de aditivos químicos antifúngicos como os ácidos sórbico, benzoico, propiônico e acético tem se mostrado mais eficiente no controle de fungos e leveduras (Auerbach, 2012). Outros aditivos químicos, como o ácido fórmico, dependendo da dose de aplicação podem auxiliar na acidificação da massa e inibir bactérias deterioradoras indesejáveis (*Clostridium*, Muck et al., 2018).

A comercialização de silagem no mercado brasileiro vem crescendo ao longo dos anos exigindo a necessidade de reensilagem da SM (Coelho et al., 2018). Alguns fatores têm contribuído para estimular o mercado de venda de silagem, tais como: área limitada para o cultivo da cultura do milho, perdas excessivas durante o armazenamento, limitações climáticas e topografia (de Lima et al., 2016). Em fazendas de porte menor a escassez de mão de obra e recursos financeiros limitados para aquisição dos equipamentos necessários para o cultivo e colheita da cultura, contribuem para a decisão de compra de forragem (dos Anjos et al., 2018). Desta forma, a aquisição de silagem e sua reensilagem se tornou prática comum realizada no Brasil (de Lima et al., 2016). As transferências demandam tempos longos (1 a 2 dias), durante os quais as silagens são inevitavelmente expostas ao ar (Chen e Weinberg

2014), e isso pode causar deterioração da silagem devido à estimulação de microorganismos aeróbios.

A literatura existente sobre o processo de reensilagem é muito escassa e, geralmente, não leva em conta as características do clima tropical. Como resultado, os agricultores e técnicos enfrentam incertezas quanto aos possíveis efeitos prejudiciais do transporte da silagem. A estabilidade da silagem na presença de oxigênio é um fator crucial que determina a qualidade e o valor nutricional desse material (Filya et al. , 2004), pois o aumento da temperatura e do pH causam perda indesejável de carboidratos solúveis de alta digestibilidade e aumento da proporção de componentes de fibra (Tabacco et al., 2011; Wilkinson e Davies, 2012). Nesse cenário o uso de aditivos químicos pode se configurar como ferramenta de controle da deterioração aeróbia especificamente em SM oriunda de reensilagem devido ao seu modo de ação imediato.

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⁻¹), 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 depleção de nutrientes e reduz o estoque de matéria orgânica (Allen; Coors; Roth, 2003). Além disso, em glebas com declive acentuado, a dificuldade para estabelecimento, manejo agrônomo 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 colheita 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 indicada a colheita quando a linha de leite 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 colhidos para ensilagem variaram de 90 a 269 g kg⁻¹. Por fim, o poder tampão da planta de milho é baixo, especialmente se comparado 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 caracterizado como planta facilmente fermentável.

A partição da planta de milho traz informações importantes sobre a qualidade da silagem dessa cultura. 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 (Borreanti 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⁻¹, respectivamente. As silagens apresentaram perdas fermentativas na ordem de 13% 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⁻¹ até os 56 dias, diminuindo para 6.2 log ufc g⁻¹ aos 120 dias. A contagem de leveduras decresceu ao longo do tempo até 6.2 log ufc g⁻¹ 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 $5 \log \text{ufc g}^{-1}$ são altamente propensas à deterioração após abertura dos silos (Woolford et al., 1990). As leveduras compõem 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 O_2 . 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 os ácidos acético e propiônico exercem controle sobre o crescimento de leveduras por mecanismos relacionados ao poder de dissociação dos ácidos. Em pH inferior ao seu pK_a 4,75 e 4,87, respectivamente, como no caso de silagens bem preservadas, esses ácidos permanecem sob a forma não dissociada, passível de penetrar a membrana de fungos e leveduras. Dentro da levedura (pH neutro) os ácidos acético e propiônico se dissociam 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. O processo de reensilagem

A comercialização de silagens tem crescido rápida e consideravelmente no Brasil e no mundo, muitas das vezes por conta da variação climática, principalmente em épocas chuvosas, gerando insegurança ao produtor com relação ao potencial produtivo das plantas, outros fatores são a não mecanização ou mão de obra de pequenas propriedades, além de regiões com topografia desfavoráveis, o que dificulta o plantio em grande escala (dos Anjos et al., 2018). Do outro lado estão as propriedades com elevado potencial produtivo com sistemas de irrigação que proporcionam alta produção gerando ofertas de vendas de silagens (Coelho et al., 2018). A reensilagem consiste no processo de transportar de uma fazenda para outra a silagem já pronta, a qual será novamente ensilada ao chegar em seu local de destino. Em alguns casos esses transportes podem chegar a durar até 2 dias (Chen & Weinberg 2014), expondo a silagem ao ambiente aeróbio por muitas horas, podendo então prejudicar a qualidade da mesma (Michel et al., 2017). Geralmente os produtores que realizam a compra de silagem armazenam o material reensilado por períodos curtos, geralmente 60 dias. Mas, já existem alguns produtores aproveitando o preço baixo em algumas épocas do ano e comprando para estocar até o ano seguinte (dos Anjos et al., 2018). O estudo conduzido por dos Anjos et al., 2018 revelou não ter alteração significativa na qualidade de silagens de sorgo reensilada, indicando não haver problemas com a extensão do período de armazenamento. Poucos são os estudos sobre reensilagem na literatura. Além disso, a maioria dos trabalhos publicados não leva em consideração o clima tropical, gerando incertezas e inseguranças aos produtores e técnicos que atuam na área. A estabilidade da silagem na presença de oxigênio é um fator crucial que determina a qualidade e o valor nutricional desse material (Filya et al., 2004), pois o aumento da temperatura e do pH, oriundos do desenvolvimento de microrganismos indesejáveis como levedura (Pahlow et al., 2003), causam uma perda indesejável de carboidratos solúveis de alta digestibilidade e aumento da proporção de componentes de fibra (Tabacco et al., 2011; Wilkinson e Davies, 2012). Dessa maneira, aditivos químicos podem ser uma importante ferramenta ao combate desses microrganismos indesejáveis, preservando assim a estabilidade aeróbia de silagens, principalmente na atividade de reensilagem, que tende a se tornar mais usual.

2.4. Ácidos orgânicos como precursores de qualidade da silagem

Aditivos químicos são alternativas para melhorar a estabilidade aeróbia das silagens. A aplicação destes resulta na rápida acidificação da cultura e por consequência, inibição parcial do crescimento microbiano (Woelford, 1984).

Goeser, Heuer, e Crump (2015), delinearam evidências, a partir de uma ampla gama de relatórios publicados em uma meta-análise, de que aditivos (incluindo ácido fórmico e propiônico), inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis e perdas de matéria seca. Portanto, esses ácidos têm grande impacto na fermentação de silagens e na estabilidade aeróbia das mesmas, com grande atuação no controle de fungos e leveduras. A maior parte dos ácidos orgânicos com atividade antimicrobiana são os de cadeia curta, de um a sete carbonos em sua estrutura, e com pKa de 3 a 5. A forma não dissociada desses ácidos atravessa as membranas celulares de fungos e leveduras, liberando seus prótons no citoplasma, acidificando assim a região intracelular (Buxton et al., 2003). A acidificação do citoplasma pode prevenir o crescimento de microrganismos de três formas distintas, por inibição da glicólise (Krebs et al., 1983), por evitar o transporte ativo (Freese et al., 1973), ou até mesmo por interferência na transdução de sinais. Em relação aos ácidos láctico, acético e propiônico, o ácido propiônico tem a maior atividade antifúngica (Moon, 1983). O seu uso reduziu o número de fungos em 85% em silagens de milho (Selwet, 2008).

Dessa forma estudos evidenciaram que o ácido propiônico tem sido utilizado para o controle da deterioração aeróbica de silagem de milho planta inteira e de milho grão úmido (McDonald et al., 1981; McDonald et al., 1991). Ou seja, auxiliam na preservação de grãos e volumosos (Kung et al., 2003), uma vez que inibem as leveduras, as quais são grandes assimiladoras de ácido láctico quando a forragem é exposta ao ar, melhorando assim a estabilidade aeróbia. (Woelford, 1975; Kung et al., 1998, 2000).

Espécies heteroláticas de bactérias produzem ácido láctico e outros ácidos graxos voláteis, como os ácidos acético e propiônico, que podem inibir o crescimento de levedura (Moon, 1983). Porém, o efeito inverso na inoculação de ácido propiônico em silagens pode acontecer, ou seja, redução de ácido láctico encontrado na massa, isso pode ser explicado pela restrição a fermentação da silagem causada pelo ácido propiônico (McDonald 1981).

O ácido fórmico também se destaca como um importante aditivo químico utilizado para conservação, pode causar uma acidificação direta e suprimir a esporulação indesejada de bactérias, incluindo bactérias ácido lácticas. Além de restringir a fermentação de carboidratos solúveis, reduzir ácido acético e proteólise, suprimindo bactérias proteolíticas e enzimas da

planta (e.g., Saarisalo et al., 2006; Conaghan et al., 2001; Sppälä et al., 2016), o que pode ter um efeito positivo sobre o desempenho animal (Winters et al., 2001), por meio de uma melhora no balanço de aminoácidos.

A aplicação de ácido fórmico na silagem resulta em limitação da fermentação e redução de ácidos orgânicos da massa ensilada, além de melhorar sua estabilidade aeróbia (Driehuis e Van Wikselaar, 1996; Salawu et al., 2001). Por conta disso é comumente utilizado como aditivo de silagens de plantas com baixo teor de matéria seca e baixa concentração de açúcares, que reduzem o potencial fermentativo da planta (Koivunen et al., 2015).

2.5. Efeitos dos ácidos propiônico e fórmico em silagens com elevada matéria seca

Silagens com teores elevados de matéria seca tendem a apresentar pH mais elevado, além de teores menores de ácido lático e acético. Owens (1968), atribui esses efeitos à fermentação mais ativa em silagens com maior umidade.

Huber & Soejono (1976), estudaram a adição de ácido propiônico e ácido fórmico em silagens de matéria seca média (36%) e alta (44%). Esse trabalho mostrou maior efeito dos ácidos, principalmente propiônico, sobre silagens de matéria seca elevada, resultando em menor temperatura durante a fermentação, pico de temperatura mais tardio e, silagem mais estável. Quando comparada a silagens de matéria seca intermediária, o mesmo efeito foi observado, porém, em menores proporções. O mesmo estudo ainda apontou o ácido propiônico como mais efetivo em gerar estabilidade à forragem de maior matéria seca, por seu poder antifúngico. Já o ácido fórmico for atrelado à melhor manutenção da composição química da silagem com elevado teor de matéria seca (Castle & Watson, 1970; Huber 1971).

3. OBJETIVOS

Avaliar os benefícios da adição de ácidos orgânicos ao processo de ensilagem da planta inteira de milho, assim como para o consumo voluntário e desempenho de vacas leiteiras.

4. MATERIAL E MÉTODOS'

4.1. Experimento 1

4.1.1. Ensilagem e tratamentos

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ). O híbrido utilizado foi o AG 1051 da empresa Agrocere, o mesmo foi colhido no dia 17/03/2017, com 41.7% de matéria seca, aproximadamente 130 dias após a emergência. A colheita do material foi realizada mecanicamente pela colhedora de forragem JF 1600 AT S2, regulada para picagem com tamanho médio de partículas de 5 mm.

Foram utilizados baldes plásticos de 20 L com tampas próprias à vedação, como silos experimentais. Durante a ensilagem foram colocadas camadas de 10 a 15 cm do material a ser ensilado e compactados com pisoteio humano até atingir densidade média de 600 kg/m³. Após o enchimento os silos foram fechados com as tampas, identificados e pesados. Após a pesagem os baldes foram vedados com fitas adesivas, para impedimento da entrada de ar, os silos experimentais foram mantidos em local protegido, sob temperatura ambiente até o momento da abertura.

O aditivo químico utilizado foi o Lupro-Mix® NA (35% ácido propiônico, 21% de formato de sódio, 20% de ácido fórmico, 4% propionato de sódio e 20% de água), produzido pela empresa BASF®. Foram destinados 120kg de matéria natural da massa a ser ensilada, 60 kg para o tratamento controle, e 60 kg para o tratamento químico, totalizando 4 baldes para cada tratamento. O aditivo químico foi aplicado respeitando a dosagem de 4 L por tonelada (0,4%), com metas de aplicação de 1.560 mL de ácido propiônico mais propionato de sódio (39% da mistura) e, 1640 mL de ácido fórmico mais formato de sódio (41% da mistura), por tonelada de matéria natural.

4.1.2. Abertura dos silos experimentais

Os silos experimentais foram abertos no dia 18/05/2017, 90 dias após a ensilagem. Primeiramente foram removidas as fitas dos baldes para pesagem e determinação de perdas durante o armazenamento. Após a pesagem, amostras foram retiradas do centro do silo para determinação do perfil fermentativo, contagem de microrganismos e valor nutritivo das

silagens. Após a fase de pesagem e amostragem deu-se início à montagem do ensaio de estabilidade aeróbia. A seguir é apresentada descrição detalhada dessas avaliações.

Durante a ensilagem, a forragem foi amostrada e dividida em duas sub amostras. A primeira sub amostra foi pesada e seca em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 h (AOAC, 1990).

4.1.3. Perda total de material seca durante o armazenamento

Os baldes foram pesados no momento da ensilagem e antes de sua abertura, para quantificação das perdas por matéria seca.

4.1.4. Análise dos silos experimentais

Amostras da forragem após abertura dos baldes foram coletadas para determinação da composição químico-bromatológica. A massa das amostras foi quantificada e essas foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 h para determinação da MS. Após a etapa de secagem o material foi processado em moinho de peneira do tipo Willey com peneira de malha 1.0 mm. A determinação do teor de MS total foi realizada por secagem em estufa a 105°C durante 12 h (AOAC, 2000). As cinzas foram obtidas por combustão das amostras a 600°C durante 4h (AOAC, 1997). A análise de proteína bruta (PB) foi realizada pelo método de combustão de Dumas (Leco 2000, Leco Instruments Inc). O extrato etéreo (EE), determinado pelo método de extração Soxhlet segundo AOAC (1997). Os teores de FDN e 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 oficial descrito pela AOAC International (Mertens 2002).

Para avaliação do perfil microbiano das amostras da forragem ensilada foram realizadas diluições de 1:10, por meio da adição de 225 g de água deionizada estéril em 25 g de amostra fresca, a qual foi homogeneizada durante 4 minutos em homogeneizador de alimentos (Nova Ética®, Vargem Grande Paulista, Brasil). Foram realizadas diluições decimais sequenciais (10^{-1} a 10^{-6}), procedendo o plaqueamento em duplicata. Como meio de cultura utilizou-se: Ágar Malt para contagem de leveduras e bolores; MRS Ágar para contagem de BAL (JONSSON, 1990). Nesse mesmo extrato aquoso procedeu-se também a leitura do pH, em equipamento digital marca Digimed DM-22®, previamente calibrado.

Os teores de ácido acético, propiônico, butírico e demais produtos de fermentação foram determinados no extrato aquoso após filtragem em gaze e centrifugação, por meio de cromatografia gasosa com detector de massas (GC-MS) (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), utilizando coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, USA; 60 m, 0,25 mm Ø, 0,25 µm crossbond carbowax polyethylene glycol). O teor de ácido láctico foi determinado por método colorimétrico (PRYCE, 1969).

Para cálculo de matéria seca em estufa 55 °C, corrigida para produtos voláteis, utilizou-se a fórmula proposta por Weissbach (2009) (1), onde ácidos graxos voláteis incluem: ácido acético, propiônico, butírico, isso-valérico e valérico.

MS corrigida (%MV) = MS estufa (%MV) + 0,08 × ácido láctico (%MV) + 0,07 × 1,2-propanodiol (%MV) + 0,87 × 2,3-butanodiol (%MV) + 0,95 × ácidos graxos voláteis* (%MV) + lactato de etila (%MV) + 1-propanol (%MV) + 2-butanol (%MV) + acetato de propila (%MV) + etanol (%MV) + ácido isso-propílico (%MV) + acetato de etila (%MV) + acetona (%MV).

Para avaliação de estabilidade aeróbia, foram tomadas amostras de 2,0 kg das silagens de cada unidade experimental, dispostas sem compactação em baldes plásticos abertos, mantidos em sala climatizada a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ por 240 h. As temperaturas foram mensuradas a cada 30 min., com o uso de data loggers (modelo: *Novus tagtemp*®) inseridos no centro geométrico da massa. A estabilidade foi definida como o tempo (h) necessário para elevação da temperatura da massa em 2°C em relação à temperatura ambiente. Adicionalmente avaliou-se a temperatura máxima alcançada pela massa (TMax), tempo necessário para a massa atingir a temperatura máxima (HTmax), acúmulo de temperatura em 5d (AC5d) e 10d (AC10d) de exposição aeróbia.

4.1.5. Análise estatística

O ensaio de baldes foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. Os dados foram analisados pelo seguinte modelo $Y_i = \mu + T_i + e_i$, onde μ = média geral, T_i = efeito de tratamento e e_i = erro residual. A diferença estatística foi considerada significativa quando o valor de $P < 0.05$ e tendência quando o valor de $P > 0.5$ e $P \leq 0.10$.

4.2. Experimento 2

4.2.1. Local, ensilagem e tratamentos

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ). A cultura de milho foi estabelecida na USP Campus Fernando Costa em Pirassununga, SP, onde foi colhido e ensilado por 90 dias. Após esses 90 dias a silagem de milho foi trazida para Piracicaba, onde foi reensilada, no dia 02/10/2017 utilizando-se de embutidora de forragens Silo Press da marca Menta®, a qual foi revestida em sua boca de saída com uma lona do tipo bag da marca Pacifil® de dimensões 1.5 m de diâmetro e 45 m de Comprimento, com capacidade para 35 toneladas de forragem. A composição do material ensilado foi a seguinte: 35.7% de matéria seca, 7.9% de proteína bruta, 44.6% de FDN, 26.4% de FDA, 35.5% de amido, 2.9% de extrato etéreo e 3.9% de matéria mineral. Em um dos silos foi adicionado o tratamento químico (LP), na dose de 4 L por tonelada de matéria natural, sem diluição em água, Lupro-Mix® NA (35% ácido propiônico, 21% de formato de sódio, 20% de ácido fórmico, 4% propionato de sódio e 20% de água), produzido pela empresa BASF®. O aditivo foi pulverizado sobre a forragem na esteira alimentadora da embutidora, a partir de um sistema de pulverização acoplado ao implemento. O outro silo utilizado como testemunha (C) apresentou apenas adição de água destilada afim de conservar com a mesma umidade do silo contendo aditivo químico.

4.2.2. Abertura e manejo dos silos

Os silos foram abertos no dia 02/01/2018, totalizando 90 dias de armazenamento. O teor de matéria seca da massa ensilada no momento da abertura era de 35%. O desabastecimento dos silos foi realizado duas vezes ao dia (6:00 h e 16:00 h), retirando-se uma camada de aproximadamente 40 cm do painel de cada silo, para confecção das rações.

4.2.3. Ensaio de lactação

O ensaio de desempenho foi realizado com 20 vacas da raça Holandês, ambas multíparas, com peso vivo médio de 652 ± 74 kg, produção média de 22 ± 7 kg de leite por dia e média de 230 ± 90 dias de lactação. Os animais foram distribuídos em blocos em 10 pares de dois animais com base na produção de leite, dias em lactação e peso vivo. Dentro de

cada bloco os animais foram aleatoriamente distribuídos a uma sequência de dois tratamentos (Controle ou LUPRO), em delineamento de reversão simples, recebendo as dietas experimentais por 21 dias em cada período experimental. Os animais foram alojados em confinamento do tipo *free-stall*, com sistema de ventilação, bebedouro e cochos individuais com controle eletrônico de acesso (Intergado®, Contagem MG, Brasil), o qual permitiu o controle do consumo individual. A ordenha e o manejo alimentar dos animais foram realizados duas vezes ao dia (6:00 h e 16:00 h). Após cada ordenha, os animais eram conduzidos até a instalação para alimentação.

As vacas foram alocadas aos tratamentos e receberam a seguinte composição dietética (%MS): 41,6% silagem de milho planta inteira; 11,9 % pré-secado de Tifton 85 (*Cynodon spp.*); 17,8% farelo de soja; 15% milho moído fino; 12,1% polpa cítrica; 1% núcleo mineral; 0,7% gordura protegida. Assim foram constituídos os tratamentos: (i) reensilagem de milho planta inteira sem aditivo (C); (ii) reensilagem de milho planta inteira com Lupro-Mix® NA, composto por 35% ácido propiônico, 21% de formato de sódio, 20% de ácido fórmico, 4% propionato de sódio e 20% de água (LP), sendo aplicado respeitando a dosagem de 4 L por tonelada (0,4%).

Duas vezes ao dia as dietas, para cada tratamento, foram misturadas por 5 minutos em vagão vertical tracionado ao trator, equipado com conjunto de facas para corte (modelo: VM4 DeLaval®). A dieta foi quantificada e oferecida individualmente em cada cocho. As rações foram fornecidas *ad libitum*, durante cada período de ordenha (6:00 h e 16:00 h), permitindo-se sobras de 10% do oferecido.

Entre os dias 15 e 20 de cada período foram registrados o consumo de matéria seca (CMS) e a produção de leite. O CMS foi calculado pela diferença entre a quantidade de MS fornecida e as sobras. Duas amostras de leite de quatro ordenhas consecutivas foram coletadas (16º e 17º dia), conservadas em bromopol e enviadas para a Clínica do Leite do Departamento de Zootecnia da USP/ESALQ em Piracicaba – SP, onde foram analisados os teores de proteína, gordura, lactose e nitrogênio uréico. A produção de leite corrigida para 4 % de gordura (1), foi calculada a partir da fórmula proposta pelo NRC (1989). O teor (2) e a excreção (3) de energia no leite foram calculadas segundo as equações do NRC (2001). para energia (2) e, excreção de energia diária no leite (3).

$$(1). LC\ 4\% \ G = (0,4 * \text{kg de leite}) + (15 * \text{kg de gordura do leite});$$

$$(2). \text{Energia Liq. Leite (Mcal/kg)} = 0,0929 * \% \text{gordura} + 0,0547 * \% \text{proteína} + 0,0395 * \% \text{lactose};$$

$$(3). \text{Energia Líq. Leite (kg/d)} = \text{Prod. Leite (kg/d)} * EL_L \text{ (Mcal/kg)}.$$

Os animais foram observados por 24 horas no 19º dia, foram avaliados quanto ao tempo de ruminação, ingestão, mastigação e ócio, em intervalos de 10 minutos (Maekawa et al., 2002).

No 21º dia de cada período amostras de glicose plasmática foram coletadas por meio de punção dos vasos coccígeos medianos, as coletas foram realizadas 6 e 12 h após a primeira refeição, em tubos contendo EDTA e fluoreto de sódio. Elas foram analisadas a partir de um kit laboratorial (Glicose Enzimática Líquida. Doles Reagentes para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brasil).

Também foram coletadas amostras de líquido ruminal no 20º dia de cada período, para avaliação do pH. Em cada lote haviam duas vacas portadoras de cânulas ruminais, não lactantes. A primeira coleta do dia foi realizada antes do animal acessar o cocho, posteriormente mais coletas foram realizadas em intervalos de 3 horas até completar o período de 12 horas. O líquido ruminal foi obtido a partir do bolo alimentar do rúmen, filtrado e levado para leitura de pH em aparelho digital marca Digimed DM-22®, previamente calibrado.

4.2.4. Análise estatística

Os dados oriundos do experimento com animais foram analisados pelo seguinte modelo $Y_{ijk} = \mu + B_i + P_j + T_k + e_{ijk}$ onde μ = média geral, B_i = efeito aleatório de bloco ($i = 1$ a 10), P_j = efeito fixo de período ($j = 1$ ou 2), T_k = efeito fixo de tratamento ($j =$ Controle ou LUPRO), e e_{ijk} = erro experimental. A variável pH ruminal foi analisada como medida repetida no tempo, pelo mesmo modelo adicionado do efeito de tempo e sua interação com o efeito de tratamento. O quadrado médio da interação entre bloco e tratamento foi utilizada como medida de erro para testar o efeito de tratamento. A melhor estrutura de covariância foi baseada no critério de informação de Akaike. Foi considerado efeito significativo quando o valor de $P \leq 0.05$ e tendência quando o valor de $P > 0.05$ e $P \leq 0.10$.

5. RESULTADOS DOS EXPERIMENTO 1 E 2

Tabela 1. Composição das silagens de milho tratadas ou não com aditivo químico

Item	Tratamentos ¹		EPM	P valor
	CON	LUPRO		
MS, % MN	43,9	43,6	0,19	0,22
PB, % MS	6,2	6,1	0,15	0,87
FDN, % MS	43,2	45,2	1,14	0,22
FDA, % MS	19,8	20,7	0,74	0,41
EE, % MS	2,2	2,0	0,07	0,11
Cinzas, % MS	2,9	3,1	0,29	0,58
CNF, % MS	45,5	43,7	2,05	0,76

¹ LUPRO - Silagens de milho tratadas com Lupro-Mix® (35% ácido propiônico; 21% formato de sódio; 20% ácido fórmico; 4% propionato de sódio; 20% água) na concentração de 4 L/ton de matéria natural. CON - Silagens de milho sem adição de aditivos.

Tabela 2. Valores de pH e concentração de voláteis em silagens de milho tratadas ou não com aditivo químico (experimento 1).

Item	Tratamentos ¹		EPM	P valor
	CON	LUPRO		
MScorr, % MN	44,50	44,20	0,22	0,32
pH	3,62	3,52	0,068	0,33
Ácido láctico, % MScorr	2,29	2,44	0,54	0,84
Ácido acético, % MScorr	0,72	0,70	0,04	0,71
Etanol, % MScorr	0,43	0,09	0,03	<0,01
Ácido propiônico, mg/kg MScorr	38	2865	136	<0,01
Ácido butirico, mg/kg MScorr	9	14	2,7	0,23
1,2 propanodiol, mg/kg MScorr	257	28	34	<0,01
Lactato de etila, mg/kg MScorr	148	31	6,6	<0,01
Acetato de etila, mg/kg MScorr	37	7	3,1	<0,01
1-propanol, mg/kg MScorr	6	5	2,5	0,69
BAL, ufc/g forragem	6,14	5,50	0,145	0,03
Leveduras, ufc/g forragem	3,78	3,73	0,023	0,27
Perda de MS, %	4,33	3,89	0,069	<0,01

¹ LUPRO - Silagens de milho tratadas com Lupro-Mix® (35% ácido propiônico; 21% formato de sódio; 20% ácido fórmico; 4% propionato de sódio; 20% água) na concentração de 4 L/ton de matéria natural. CON - Silagens de milho sem adição de aditivos.

Tabela 3. Estabilidade aeróbia em silagens de milho tratadas ou não com aditivo químico.

Item	Tratamentos ¹		EPM	P valor
	CON	LUPRO		
Estabilidade aeróbia, h	78	144	10,3	<0,01
Temperatura máxima, °C	38	29	1,79	0,03
Tempo para atingir temperatura máxima, h	153	228	14,8	0,01
Temperatura acumulada 5 dias, °C	12	1	3,5	0,06
Temperatura acumulada 10 dias, °C	69	23	5,7	<0,01

¹ LUPRO - Silagens de milho tratadas com Lupro-Mix® (35% ácido propiônico; 21% formato de sódio; 20% ácido fórmico; 4% propionato de sódio; 20% água) na concentração de 4 L/ton de matéria natural. CON - Silagens de milho sem adição de aditivos.

Tabela 4. Comportamento alimentar e desempenho de vacas leiteiras da raça Holandês, alimentadas com silagens de milho tratadas ou não com aditivo químico.

Item	Tratamentos ¹		EPM	P valor
	CON	LUPRO		
Ingestão, min.	219,5	198,0	8,4	0,09
Ruminação, min.	511,5	495,5	14,62	0,44
Mastigação, min.	736,0	693,5	18,18	0,12
Nº Refeições, n.	9,2	9,0	0,33	0,67
Tempo de refeição, min.	24,7	22,8	1,05	0,23
CMS, kg/d	19,2	19,5	0,41	0,68
Leite, kg/d	20,1	20,4	0,37	0,53
Leite/CMS	1,05	1,07	0,023	0,60
Gordura, %	3,78	3,83	0,066	0,56
Proteína, %	3,29	3,38	0,033	0,09
Lactose, %	4,25	4,3	0,026	0,15
Gordura, kg	0,752	0,782	0,0154	0,19
Proteína, kg	0,655	0,685	0,011	0,08
Lactose, kg	0,857	0,882	0,182	0,35
NUL md/dL	17,7	17,4	0,32	0,48
Glicose 6h, mg/dL	56,9	58,1	0,84	0,34
Energia Líq. ^{Leite} (kg/d)	14,0	14,5	0,24	0,14
Leite Corrigido 4% G	19,3	19,9	0,33	0,23

¹ LUPRO - Silagens de milho tratadas com Lupro-Mix® (35% ácido propiônico; 21% formato de sódio; 20% ácido fórmico; 4% propionato de sódio; 20% água) na concentração de 4 L/ton de matéria natural. CON - Silagens de milho sem adição de aditivos.

Figura 1. pH líquido ruminal, período de 12 horas após primeira refeição. LUPRO - Silagens de milho tratadas com Lupro-Mix® (35% ácido propiônico; 21% formato de sódio; 20% ácido fórmico; 4% propionato de sódio; 20% água) na concentração de 4 L/ton de matéria natural. CON - Silagens de milho sem adição de aditivos. (Ptrat = 0.10; Ptempo = <0.01; Ptrat*tempo = 0.37; EPM = 1.11).

A composição química das silagens de milho não sofreu alterações em função da aplicação do aditivo químico no experimento 1. O teor de matéria seca das silagens foi de 43.75% em média e não diferiu entre os tratamentos ($P = 0.22$). Os teores de PB, FDN, FDA, EE, Cinzas e CNF foram em média de 6.15, 44.20, 20.25, 2.10, 2.95 e 44.60 % da MS respectivamente, e não diferiu entre tratamentos ($P > 0.10$; Tabela 1).

O teor de matéria seca corrigida para voláteis (MScorr) foi de 44.35% em média, com ausência de diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 2). Entretanto, o teor de MScorr resultou em 0.6 unidades percentuais acima do teor de matéria seca não corrigido para voláteis (Tabelas 1 e 2). Apesar de não haver diferença estatística, o valor de pH foi numericamente menor nas silagens que receberam o tratamento com aditivo químico (CON = 3.62 vs. LUPRO = 3.52; $P = 0.33$). As concentrações médias de ácido lático e acético foram de 2.37 e 0.71 % da MScorr respectivamente. Não houve diferença estatística para estas variáveis (Tabela 2). A concentração de etanol foi reduzida em aproximadamente 5 vezes com o uso do químico nas silagens (CON = 0.43 vs. LUPRO = 0.09; $P < 0.01$). O uso do aditivo químico elevou a concentração de ácido propiônico de 38 mg/kg de MScorr no tratamento CON para 2865 mg/kg de MScorr no tratamento LUPRO ($P = < 0.01$). As concentrações de 1,2 propanodiol (CON = 257 vs. LUPRO = 28 mg/kg MScorr), lactato de etila (CON = 148 vs. LUPRO = 31 mg/kg MScorr) e acetato de etila (CON = 37 vs. LUPRO = 7 mg/kg MScorr) foram maiores no tratamento CON comparado ao tratamento LUPRO ($P < 0.01$;

Tabela 2). A concentração de acetona foi aumentada ($P < 0.01$) em função do tratamento LUPRO (CON = 14 vs. LUPRO = 31 mg/kg MScorr). Houve tendência ($P = 0.06$) em redução (CON = 71 vs. LUPRO = 56 mg/kg MScorr), na concentração de metanol no tratamento LUPRO comparado ao tratamento CON. As concentrações de ácido butírico e 1-propanol não diferiram entre tratamentos ($P > 0.10$; Tabela 2).

A estabilidade aeróbia foi significativamente superior para a silagem tratada com o aditivo químico, sendo o tempo para quebra da estabilidade aeróbia aumentado em aproximadamente duas vezes com o uso do aditivo químico (CON = 78 vs. LUPRO = 144 h; $P < 0.01$; Tabela 3). Também houve diferença estatística para as outras variáveis ligadas à estabilidade aeróbia, como temperatura máxima, tempo para atingir temperatura máxima, temperatura acumulada em cinco dias ($P < 0.05$; Tabela 3), e temperatura acumulada em 10 dias ($P < 0.01$; Tabela 3).

O comportamento ingestivo dos animais não sofreu alteração com a aplicação do aditivo químico à silagem. O tempo de ingestão (CON = 219.5 vs. LUPRO = 198 h; $P > 0.05$; Tabela 4). Já os tempos de ruminação, mastigação e o número de refeições foram em média respectivamente, 503 h; 715 h; 9,1, e não diferiram entre tratamentos ($P > 0.10$; Tabela 4).

Os animais não apresentaram diferenças estatísticas em seus desempenhos e composição do leite. Apesar da não diferença estatística, o teor de proteína no leite de vacas alimentadas com a silagem tratada apresentou tendência ao aumento (CON = 3.29 vs. LUPRO = 3.38; $P > 0.05$; Tabela 4), assim como a quantidade de proteína em quilos no leite (CON = 0.655 vs. LUPRO = 0.685; $P > 0.05$; Tabela 4). As demais variáveis de desempenho e composição do leite, como: CMS, Leite, Leite/CMS, Gordura, Lactose e NUL, Glicose sanguínea, Energia, Leite E, Leite Gordura 4%, não apresentaram diferenças estatísticas ($P > 0.10$; Tabela 4), com as respectivas médias, 19.3 kg/d; 20.2 kg/d; 1.6; 3.8%; 4.27%; 17.5 mg/dL; 57.5 mg/dL; 14.2 mcal/d; 20.3; 19.6.

O pH ruminal não apresentou diferença estatística entre tratamentos ($P = 0.10$; Figura 1), assim como a interação entre tratamento e tempo ($P > 0.10$; Figura 1). Entretanto, para o tempo de coleta houve diferença estatística ($P < 0.01$; Figura 1).

6. DISCUSSÃO

6.1. Experimento 1

O perfil de ácidos da silagem é um indicador de qualidade da fermentação, e de como ela contribuirá para o pós-abertura do silo. Parâmetros como etanol e 1,2-propanodiol podem ser tomados como medidas para entendimento da dinâmica de populações de microrganismos durante o processo de armazenamento, até o momento da abertura do silo. A redução no teor de etanol da silagem tratada em relação à não tratada (Tabela 2), também foi observada nos estudos de Driehuis (1995), Kung (2004) e Selwet (2006), esse efeito pode ser explicado pelo controle de enterobactérias e leveduras, as quais são capazes de converter glicose em etanol. Seppälä et al., (2016) aponta o ácido fórmico como principal contribuinte ao controle de enterobactérias, uma vez que esse ácido não controla leveduras, ressaltando a importância do ácido propiônico agregado ao combo químico, atuando sobre leveduras. Outro componente que gera indícios do controle de enterobactérias, é o ácido acético, como apresentado por Nadeau et al., (2000), que observou redução de 62% em silagem de alfafa tratada com ácido fórmico. Porém, no presente estudo, não foi observada a redução de ácido acético (Tabela 2), assim como nos estudos conduzidos por Kung et al., 2004 e Filya e Sucu (2007), o que poderia ser considerado como não controle de enterobactérias, isso caso não houvesse controle de bactérias ácido lácticas, também não tolerantes ao pH baixo. Portanto, outro fator se torna protagonista, o elevado teor de matéria seca. Owens (1968), estudou o comportamento da fermentação de silagens de milho em dois cenários: matéria seca média (38%) e matéria seca elevada (62%), em seus resultados foram observadas reduções nos teores de ácido láctico e acético em silagens de maior matéria seca (7,26 vs 4,83%; 1,67 vs 0,64%, respectivamente), além de maior pH (3,88 vs 4,83), o autor atribui esse efeito à fermentação mais ativa em silagens de menor matéria seca, reforçando o menor teor dos ácidos láctico e acético na forragem do presente trabalho. Outro experimento conduzido por Huber (1971), observou a falta de efeito dos ácidos fórmico e propiônico sobre o teor de ácido láctico em silagens com matéria seca elevada, o mesmo foi observado no estudo atual.

O menor teor de 1,2-propanodiol presente na silagem tratada com o combo químico (Tabela 2), pode ser explicada também como efeito do ácido fórmico, inibindo o metabolismo de bactérias em pH baixo, o que é reforçado por uma menor contagem de bactérias ácido lácticas no material tratado com aditivo químico, o mesmo foi observado nos estudos de Partanen e Jalava (2005) e Lindgvist (2011). Já o estudo conduzido por Adesogan e Salawu

(2004), mostrou preservação do 1,2-propanodiol, porém, esse estudo foi conduzido apenas com adição de ácido propiônico, ressaltando mais uma vez a ação do ácido fórmico sobre bactérias que não toleram pH baixo.

O pH das silagens tratadas com o combo químico apresentou apenas diferença numérica, sendo a silagem tratada com o menor pH, reflexo da acidificação imposta pelo aditivo químico, o mesmo foi apresentado por Kleinschmit et al., 2005. Já os estudos de Driehuis et al., 1995, Nadeau et al., 2000, Kung et al., 2004 e Selwet (2006), mostraram redução do pH nos materiais tratados com o aditivo químico.

Aditivos que melhoram as características fermentativas do material ensilado tendem a reduzir a perda de matéria seca. Assim, foi o efeito do combo químico testado sobre a perda de matéria seca, revelando sua eficiência inibitória sobre o metabolismo de microrganismos que utilizam compostos da planta para seu desenvolvimento, como por exemplo, carboidratos solúveis. Prolongando sua qualidade em ambientes aeróbios. O mesmo foi observado nos trabalhos conduzidos por Driehuis e Oude-Elfering (2000) e Kung et al., 2000.

A deterioração aeróbia das silagens, prejudica seu valor nutritivo e sua qualidade higiênica, colocando em risco não só os animais que as consomem, mas também as pessoas que trabalham com esses animais e também aquelas que consumiram os produtos provenientes desses animais, como por exemplo, o leite, como visto por Wollford (1990), Lindgren (1991) e Wilkison (1999).

Níveis reduzidos de etanol são indicadores de melhoria na estabilidade aeróbia, pois revelam controle no crescimento de leveduras, principais agentes de deterioração das silagens. Concentrações suficientes de acetato e propionato inibem o crescimento de fungos e leveduras (Moon, 1983). Como o nível de ácido acético não foi alterado pelo tratamento, atribui-se a melhoria na estabilidade aeróbia ao ácido propiônico que apresentou expressivo aumento no tratamento químico quando comparado ao controle. Além disso, deve se levar em consideração a ação do ácido fórmico, que com o efeito de redução abrupta de pH, possivelmente mantém esse pH baixo no momento de abertura e exposição do material ao ar, inibindo microrganismos indesejáveis de metabolismo aeróbio.

6.2. Experimento 2

O tempo de ingestão tendeu a reduzir em 21,5 min para a vacas alimentadas com silagem aditivada, contudo, não houve impacto no CMS, no número médio de refeições e no

tempo médio por refeição. O aditivo químico em questão foi capaz de proporcionar ingestão diária estimada de ácido propiônico de 23,2 g. Allen et al. (2009) propôs a teoria da regulação química do consumo pela teoria da oxidação hepática do propionato. Em diversos experimentos a infusão intra-ruminal de ácido propiônico ruminal levou a queda no consumo, aumento do número de refeições e redução no tempo total de ingestão. É possível que o ácido propiônico contido na silagem aditivada possa ter contribuído para um maior aporte desse ácido para o fígado e que a redução no tempo de ingestão tenha sido desencadeada por essa teoria.

Os animais expostos às dietas que continham a silagem tratada com o combo químico apresentaram em sua composição do leite, tendência ao aumento de proteína excretada no leite, o que pode ser explicado pela preservação de proteína das silagens contendo aditivo químico. Woolford (1984) relatou que a aplicação de ácido fórmico, resulta em rápida acidificação do meio, e por consequência a inibição do crescimento microbiano. Portanto, os benefícios do ácido fórmico podem ser provenientes da inibição da respiração celular das plantas, podendo reduzir assim a ação enzimática de suas enzimas, além de reduzir proteólise microbiana (Polan et al., 1998), uma vez que proteases são inibidas em pH baixo (Jones et al., 1995).

Oliveira (2011) observou em seu estudo a queda do pH do líquido ruminal, a medida que se aumentava a concentração de ácido propiônico no rúmen, explicando assim a redução do pH ruminal dos animais alimentados com a silagem tratada. Embora o pH ruminal tenha apresentado redução ao longo do dia após a ingestão de ambas as dietas, sendo a dieta tratada com o combo químico a de maior impacto na redução do pH, não houve indícios de acidose, pois o pH não chegou a valores abaixo de 5.8 como proposto por Krause et al., 2002b, Krause e Combs 2003, muito menos pelo proposto por Owens et al., 1998, que é o pH abaixo de 5.6.

7. CONCLUSÕES

O tratamento contendo aditivo químico reduziu teor de etanol e 1,2-propanodiol, elevou teor de ácido propiônico, mostrando-se eficiente em preservar a massa ensilada no período de estocagem e após abertura dos silos, reduzindo assim as perdas no processo.

Vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo silagem com aditivo químico tenderam a apresentar menor tempo de ingestão, porém o consumo de matéria seca não foi afetado. Na composição do leite desses animais houve tendência no aumento do teor de proteína do leite, ponto favorável aos produtores de leite.

REFERÊNCIAS

- Afuakwa, J.J.; Crookston, R.K. 1984. Using the kernel milk line to visually monitor grain maturity in maize. *Journal of Crop Science*. Madison, v. 24, p. 687-691.
- Allen, M.S.; Coors, J.G.; Roth, G.W. Corn silage. In: Buxton D.; Muck R.; Harrison J. *Silage Science and Technology*. eds. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison. 2003.
- Auerbach, H., and E. Nadeau. 2013. Effects of chemical additives on whole crop maize silage traits. Pages 736–737 in *Proc. 22nd Int. Grassl. Congr.* Sept. 15–19, Sydney, New South Wales, Australia. D. L. Michalk, G. D. Millar, W. B. Badgery, and K. M. Broadfoot, ed. New South Wales Department of Primary Industry, Orange, New South Wales, Australia.
- Auerbach, H., K. Weiss, and E. Nadeau. 2012. Benefits of using silage additives. Pages 75–144 in *Proc. 1st Int. Silage Summit*, Leipzig, Saxony, Germany. H. Auerbach, C. Luckstadt, and F. Weissbach, ed. Anytime Publishing Services, Worthington, UK.
- Bernardes, T. F., J. L. P. Daniel, A. T. Adesogan, T. A. McAllister, P. Drouin, L. G. Nussio, P. Huhtanen, G. F. Tremblay, G. Bélanger, and Y. Cai. 2018. Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. *J. Dairy Sci.* 101:4001–4019.
- 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>>. Acessado em novembro de 2016.
- Borreani, G., Tabacco, E. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. *Journal of Dairy Science*, v.93, p.2620-2629, 2010.
- Buxton, D. R., R. E. Muck, and J. H. Harrison. 2003. *Silage Science and Technology*. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc. Publications, Madison, WI.
- Castle, M. E., and J. N. Watson. 1970. Silage and milk production, a comparison between wilted and unwilted grass silages with and without formic acid. *J. Brit. Grassl. Soc.* 25:65.
- Chen, Y., and Weinberg, Z.G. 2014. The effect of relocation of whole-crop wheat and corn silages on their quality. *J. Dairy Sci.* 97: 406–410.

- Coelho, M. M., Gonçalves, L. C., Rodrigues, J. A. S., Keller, K. M., Anjos, G. V. D. S. D., Ottoni, D., and Jayme, D. G. 2018. Chemical characteristics, aerobic stability, and microbiological counts in corn silage re-ensiled with bacterial inoculant. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 53:1045-1052.
- Conaghan, P., P. O’Kiely and F. P. O’Mara. 2011. Possibilities of increasing the residual water-soluble carbohydrate concentration and aerobic stability of low dry-matter perennial ryegrass silage through additive and cultivar use. *Grass Forage Sci.* 67:177-198.
- Correa, C.E.S.; Shaver, R.D.; Pereira, M.N.; Lauer, J.G.; Kohn, K. Relationship between corn vetreousness an ruminal in situ starch degradability. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, v. 85, p. 3008-3012, 2002.
- Daniel, J.L.P.; Junges, D.; Nussio, L.G. Alterações na qualidade de silagens de milho durante o armazenamento 2014. In: Jobim, C.C.; Cecato, U.; Canto, M.W.
- de Lima, E. M., L. C. Gonçalves, K. M. Keller, J. A. dos Santos Rodrigues, F. P. C. Santos, P. H. F. Michel, V. S. Raposo, and D. G. Jayme. 2016. Re-ensiling and its effects on chemical composition, in vitro digestibility, and quality of corn silage after different lengths of exposure to air. *Can. J. Anim. Sci.* 97:250–257.
- dos Anjos, G. V. S., Gonçalves, L. C., Rodrigues, J. A. S., Keller, K. M., Coelho, M. M., Michel, P. H. F., and Jayme, D. G. 2018. Effect of re-ensiling on the quality of sorghum silage. *J. Dairy Sci.* 101:6047-6054.
- Driehuis, F. and P. G. Van Wikselaar. 1996. Effects of formic, acetic or propionic acid to maize silage and low dry matter grass silage on the microbial flora and aerobic stability. In: *Proceedings of the 11th International Silage Conference*. University of Wales, Aberystwyth, Wales. pp. 256-257.
- Driehuis, F.; Oude Elferink, S.J.W.H.; Spolestra, S.F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *Journal of Applied Microbiology*, Malden, v.87, p.583–594, 1999.
- Driehuis, F. Occurrence of mycotoxins in silage In: *International symposium on forage quality and conservation: 2.*, 2011 São Pedro, Proceedings... Piracicaba: FEALQ, 2011. p. 85-103.
- Ferraretto, L. F., R. D. Shaver, and B. D. Luck. 2018. Silage review: Recent advances and future technologies for whole-plant and fractionated corn silage harvesting. *J. Dairy Sci.* 101:3937–3951.

- Filya, I., E. Sucu, and A. Karabulut. 2004. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. *J. Appl. Microbiol.* 97:818–826.
- Freese, E., Sheu, C. W. and Galliers, E. (1973) Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature* 241, 321-325.
- Goeser, J. P., Heuer, C. R., & Crump, P. M. (2015). Forage fermentation product measures are related to dry matter loss through meta-analysis. *The Professional Animal Scientist*, 31, 137-145.
- Huber, J. T. 1971. The nutritive value for dairy cows of corn silage harvested at different maturities and treated with urea. *Proc. 6th Intern. Zootechnic. Syrup., Milan, Italy.*
- Huber, J. T., Soejono, M. Organic acid treatment of high dry matter corn silage fed lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 59:2063-2070.
- Kleinschmidt, D. H., Kung L. Jr. 2006. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and the aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. *J. Dairy Sci.* 89:4005-4013.
- Koivunen, E., Jaakkola, S., Heikkilä, T., Lampi, A. M., Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Lee, M. R. F., ... Vanhatalo, A. (2015). Effects of plant species, stage of maturity, and level of formic acid addition on lipolysis, lipid content, and fatty acid composition during ensiling. *Journal of animal science*, 84, 1149-1155.
- Krebs, H.A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A. and Bedoya, F. (1983) Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochemical Journal* 214, 657-663.
- Kristensen, N.B.; Sloth, K.H.; Hojberg, O.; Spliid, N.H.; Jensen, C.; Thøgersen, R. Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 93, p. 3764–3774, 2010.
- Kung Jr. L., Sheperd, A.C., Smagala, A.M., Endres, K.M., Besset, C.A., Ranjit, N.K., Glancey, J.L. The effect of preservatives based on propionic acid on the fermentation and aerobic stability of corn silage and a total mixed ration *J. Dairy Sci.*, 81 (1998), pp. 1322-1330
- Kung JrL, Robinson JR, Ranjit NK, Chen JH, Golt CM (2000) Microbial populations, fermentation end products, and aerobic stability of barley silage. *J Dairy Sci* 83: 1479-1486.

- Kung, L. Jr., Stokes, M. R., & Lin, C. (2003). Silage additives. In D. R. Buxton, R. E. Muck, & J. H. Harrison (Eds.), *Silage science and technology* (pp. 305–360). Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy.
- Lambert, R.J., Stratford, M. Weak-acid preservatives: modeling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 86, n. 1, p. 157-164, jan. 1999.
- Li, Y. and Nishino, N. (2011c) Effects of inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability and microbial communities in whole crop corn silage. *Grassl Sci* 57, 184– 191.
- Lindgren, S. 1991. Hygienic problems in conserved forage. In: *Forage conservation towards 2000*. Landbauforschung Völkenrode, sonderheft 123: 177-190.
- Maekawa, M.; Beauchemin, K.A.; Christensen, D.A. Chewing activity, saliva production and ruminal pH of primiparous and multiparous lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 85, p. 1176-1182, 2002.
- Martin, N. P., M. P. Russelle, J. M. Powell, C. J. Sniffen, S. I. Smith, J. M. Tricarico, and R. J. Grant. 2017. Invited review: Sustainable forage and grain crop production for the US dairy industry. *J. Dairy Sci.* 100:9479–9494.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC International*, v.85, p.1217-1240, 2002.
- McDonald, P. *The biochemistry of silage*. New York: John Willey & Sons, 1981. 226p.
- McDonald P, Henderson N and Heron S, *The Biochemistry of Silage*, 2nd edn. Chalcombe Publ, Marlow (1991).
- Michel, P.H.F., Gonçalves, L.C., Rodrigues, J.A.S., Keller, K.M., Raposo, V.S., Lima, E.M., Santos, F.P.C., Jayme, D.G. Re-ensiling and inoculant application with *Lactobacillus plantarum* and *Propionobacterium acidipropionicum* on sorghum silages. *Grass Forage Sci.*, 72 (2017), pp. 432-440
- Moon N.J., Ely L.O., Sudwechs E.M., McCullough M.E. Effect of inoculation of *Lactobacillus acidophilus* in wheat, alfalfa and corn silage on microbial populations and pH during fermentation. *J. Dairy Sci.*, 62 (1979), pp. 183-184.
- Moon, N.J. 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *J. Appl. Bacterio.*, 55: 454-460.
- National Research Council. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 6.ed. Washington, National Academy of Science, 1989. 158p.

- National Research Council. Nutrients Requirement of Dairy Cattle. 7th rev. Washington, National Academy Press, 2001. 381p.
- Nigon, B. J., K. J. Shinnars, and D. E. Cook. 2016. Harvester modifications to alter composition and dry matter of corn-silage. *Appl. Eng. Agric.* 32:157–167.
- Owens, M.J., Jorgensen, N.A., Voelker, H.H. Feeding value of high dry matter corn silage of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 51:1942-1945.
- Pahlow, G., R. E. Muck, F. Driehuis, S. J. W. H. Oude Elferink, and S. F. Spoelstra. 2003. Microbiology. Pages 31–93 in *Silage Science and Technology*, Agronomy Monograph 42. D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, ed. American Society of Agronomy, Madison, WI.
- Reis, R.A.; Jobim, C.C. 2001. Profile of the carbohydrate fraction of the plant and suitability of additives in the silage process = Perfil da fração de carboidratos da planta e adequação de aditivos no processo de ensilagem. In: *Workshop sobre milho para silagem, 2.*, Piracicaba, SP, Brazil. *Anais...* Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz,. p.27-52.
- Saarisalo, E., T. Jalava, E. Skyttä, A. Haikara, and S. Jaakkola. 2006. Effect of lactic acid bacteria inoculants, formic acid, potassium sorbate and sodium benzoate on fermentation quality and aerobic stability of wilted grass silage. *Agric. Food Sci.* 14:185-199.
- Salawu MB, Warren EH and Adesogan AT, Fermentation characteristics, aerobic stability and ruminal degradation of ensiled pea/wheat bi-crop forages treated with two microbial inoculants, formic acid or quebracho tannins. *J Sci Food Agric* 81:1263–1268 (2001).
- Selwet, M., 2008b. Effect of organic acids on numbers of yeasts and mould fungi and aerobic stability in the silage of corn. *Pol. J. Vet. Sci.* 2, 119–123.
- Seppälä, A., T. Heikkilä, M. Mäki, and M. Rinne. 2016. Effects of additives on the fermentation and aerobic stability of grass silages and total mixed rations. *Grass Forage sci.* 71:458-471.
- Shockey, W.L.; Dehoriry, B.A.; Conrad, H.R. 1985. Effects of microbial inoculant on fermentation of alfalfa and corn. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.68, n.11, p.3076-3080.
- 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*, v.111, p.127-132, 1988.
- Tabacco E., Righi F., Quarantelli A., and Borreani G. 2011. Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages asinfluenced by different lactic acid bacteria inocula. *J. Dairy Sci.* 94:1409–1419.

- Wilkinson, J.M. 1999. Silage and health. In: Pauly, T. (ed.). Proceedings of the 12th International Silage Conference, 5-7 July, Uppsala, Sweden. p. 67-81.
- Wilkinson J. M. and Davies D. R. 2012. The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. *Grass and Forage Science*, 68:1–19.
- Wilkinson, J. M., and Rinne, M. 2017. Review: Highlights of progress in silage conservation and future perspectives. *Grass and Forage Science* 73:40–52.
- Winters, A. L., R. Fychan, and R. Jones. 2001. Effect of formic acid and bacterial inoculant on the amino acid composition of grass silage and on animal performance. *Grass Forage Sci.* 56:181-2.
- Woolford, M.K. 1975. Microbial screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 26: 229-237.
- Woolford, M.K. 1984. *The ensilage fermentation*. Marcel Dekker, New York.
- Woolfor, M.K. 1990. The detrimental of air on silage. *Journal of Applied Bacteriology* 68: 101-116.