



**WILLIAN PEREIRA DOS SANTOS**

**RESPOSTA DE VACAS LEITEIRAS À SILAGEM DE  
CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADA COM  
*Lactobacillus hilgardii***

**LAVRAS – MG**

**2015**

**WILLIAN PEREIRA DOS SANTOS**

**RESPOSTA DE VACAS LEITEIRAS À SILAGEM DE CANA-DE-  
AÇÚCAR INOCULADA COM *Lactobacillus hilgardii***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. José Cardoso Pinto

Coorientador

Dr. Marcos Neves Pereira

**LAVRAS – MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Santos, Willian Pereira dos.

Resposta de vacas leiteiras à silagem de cana-de-açúcar inoculada com *Lactobacillus hilgardii*/ Willian Pereira dos Santos. – Lavras : UFLA, 2015.

94 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: José Cardoso Pinto.

Bibliografia.

1. Tifton 85. 2. Efetividade física. 3. *Lactobacillus hilgardii*. 4. Silagem de cana. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**WILLIAN PEREIRA DOS SANTOS**

**RESPOSTA DE VACAS LEITEIRAS À SILAGEM DE CANA-DE-  
AÇÚCAR INOCULADA COM *Lactobacillus hilgardii***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2015.

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila	UFLA
Dr. Marcos Neves Pereira	UFLA
Dr. João Luiz Pratti Daniel	ESALQ-USP

Dr. José Cardoso Pinto  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2015**

Em especial, aos meus pais, Maria Hilda dos Santos e Geraldo Pereira dos Santos.

Aos meus irmãos, Gilson, Gildécio, Gilda, Gilvânio, Gilmácio e Gilvair.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela existência nesse mundo como ser pensante.

À minha família, pelo apoio.

Aos meus primos, pelos momentos de descontração.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Zootecnia (DZO), pela ótima condição a mim concedida para realização do mestrado.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Paulo Emílio (IFMG), por me ensinar a gostar de vacas.

Ao professor Marcos Neves e sua esposa Renata, por me ensinar sobre as vacas.

À professora Carla e à Doutora Beatriz, pela orientação e amizade desde a Iniciação Científica.

Ao professor e orientador José Cardoso Pinto, pelo acolhimento, ensinamentos e motivação.

Ao Grupo do Leite, pelas grandes amizades e conhecimento proporcionado.

A todos os integrantes do Grupo do Leite, pela ajuda na condução do trabalho; em especial, aos amigos Gilson, Gustavo, Gil, Naína, Ronaldo, Nilson, Xandy, Dalua, Bruno, Bocão, Juan, Fabiana, Aninha, Paulão, Buiú e Betão.

Aos amigos de república, Pandão, Douglas, Pavão, Tadeu, Talles e Baiano.

À minha amiga Carol, pela amizade e apoio em alguns duros momentos.

Muito obrigado!

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que  
melhor se adapta às mudanças”

Charles Darwin

“A felicidade só é verdadeira quando compartilhada”

Christopher McCandless

## RESUMO GERAL

A ensilagem da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) resulta em perda de sacarose, concentrando a fração fibrosa do alimento, que possui alta efetividade física. O uso de bactérias heterofermentativas em silagens de cana pode reduzir a concentração de álcool e aumentar a concentração de ácido acético. Neste estudo, objetivou-se avaliar, em dois experimentos independentes, o efeito do fornecimento de silagens de cana-de-açúcar inoculadas com a cepa UFLA SIL52 (CCMA 0170) de *Lactobacillus hilgardii*, isolada da microbiota epífita da cana-de-açúcar, sobre o desempenho e o comportamento ingestivo de vacas leiteiras e a substituição de Tifton 85 (*Cynodon* spp.) por silagem de cana-de-açúcar em baixa inclusão como fonte de fibra fisicamente efetiva. No experimento um, 15 vacas holandesas ( $336 \pm 175$  DEL) foram utilizadas em quadrados latinos replicados 3x3 com períodos de 21 dias. Os tratamentos foram dietas, contendo silagem de cana sem inóculo (**Ctrl**), inoculadas com *Lactobacillus hilgardii* UFLA SIL52 (**LHI**) ou com *L. buchneri* NCIMB 40788 (**LBU**). O tratamento LHI aumentou a produção de sólidos (2,34 vs. 2,17 kg d<sup>-1</sup>), tendeu a aumentar a produção de leite (18,8 vs. 18,0 kg d<sup>-1</sup>) e o teor de lactose (4,47 vs. 4,42%) comparado ao Ctrl. Propionato e butirato, como proporção dos ácidos orgânicos ruminais, tenderam a aumentar no tratamento LHI, enquanto o acetato e a razão acetato:propionato foram menores. Não foram observadas diferenças para LHI vs. LBU. No Experimento Dois, 28 vacas holandesas ( $188 \pm 91$ , DEL) receberam dieta de padronização por uma semana, em seguida, receberam os tratamentos por quatro semanas em delineamento tipo blocos ao acaso. Os tratamentos foram dietas contendo silagem de cana-de-açúcar ou Tifton 85. Houve depressão na ingestão de MS (22,1 vs. 21,2 kg d<sup>-1</sup>), na digestibilidade da FDN (54,1 vs. 48,4%) e redução no tempo de mastigação (833 vs. 735 min) causada pela silagem de cana. Silagem de cana inoculada com *L. hilgardii* melhorou a produção de leite, provavelmente por efeito na mudança do perfil de ácidos ruminais. A substituição de Tifton 85 longo por silagem de cana picada fina reduz o tempo de mastigação, sugerindo que o tamanho longo de partícula do Tifton 85 possui maior efeito na efetividade física da fibra do que a baixa digestibilidade da FDN da cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Silagem de cana. *Lactobacillus hilgardii*. Tifton 85. Efetividade física.



## GENERAL ABSTRACT

Ensiling sugarcane (*Saccharum* spp.) results in the loss of sucrose, increasing the concentration of the fiber fraction in the feed, which presents high physical effectiveness. The use of heterofermentative bacteria in sugarcane silages can reduce the concentration of alcohol and increase that of acetic acid. In this work, we aimed at evaluating, in two independent experiments, the effect of providing sugarcane silages inoculated with the strain of *Lactobacillus hilgardii* UFLA SIL 52 (CCMA 0170), isolated from the epiphytic microbiota of sugarcane over the development and ingestive behavior of dairy cows and the substitution of Tifton 85 (*Cynodon* spp.) for sugarcane silages, with low inclusion as source of physically effective fiber. In experiment one, 15 Holstein cows ( $336 \pm 175$  DIM) were used in Latin square replicated in 3x3, with a period of 21 days. The treatments were diets containing sugarcane silages without inoculum (**Ctrl**), inoculated with *Lactobacillus hilgardii* UFLA SIL 52 (**LHI**) or with *L. buchneri* NCIMB 40788 (**LBU**). The LHI treatment increased the production of solids (2.34 vs. 2.17 kg d<sup>-1</sup>), tended to increase milk production (18.8 vs. 18.0 kg d<sup>-1</sup>) and the content of lactose (4.47 vs. 4.42%) when compared to the Ctrl treatment. Propionate and butyrate, as proportion of ruminal organic acids, tended to increase in the LHI treatment, whereas acetate and acetate: propionate ratio were lower. We observed no difference for LHI vs. LBU. In experiment two, 28 Holstein cows ( $188 \pm 91$ , DIM) received a standardization diet for a week, followed by treatment for four weeks in a randomized blocks design. The treatments were diets containing sugarcane silage or Tifton 85. There was depression on intake of DM (22.1 vs. 21.2 kg d<sup>-1</sup>), NDF digestibility (54.1 vs. 48.4%) and reduction of chewing time (833 vs. 735 min) caused by the sugarcane silage. Sugarcane silages inoculated with *L. hilgardii* improved milk production, probably due to the effect on the ruminal acids profile change. The substitution of long Tifton 85 by fine chopped sugarcane reduces chewing time, suggesting that the long particle size of the Tifton 85 has a greater effect on physical effectiveness of fiber than the low digestibility of sugarcane NDF.

Keywords: Sugarcane silage. *Lactobacillus hilgardii*. Tifton 85. Physical effectiveness.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b>		
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Caracterização química da cana-de-açúcar</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Caracterização microbiológica da cana-de-açúcar</b> .....	<b>14</b>
<b>2.3</b>	<b>Identificação e seleção de <i>Lactobacillus hilgardii</i> UFLA SIL 52 (CCMA 0170)</b> .....	<b>16</b>
<b>2.4</b>	<b>Perfil de fermentação em silagem de cana-de-açúcar</b> .....	<b>18</b>
<b>2.5</b>	<b>Estabilidade aeróbia em silagem de cana</b> .....	<b>21</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Aditivos microbiológicos</b> .....	<b>23</b>
<b>2.6</b>	<b>Cana-de-açúcar <i>in natura</i> ou ensilada para vacas leiteiras</b> .....	<b>23</b>
<b>2.7</b>	<b>Desempenho animal com silagem inoculada</b> .....	<b>28</b>
<b>2.8</b>	<b>Atributos físicos da cana-de-açúcar</b> .....	<b>31</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>34</b>
	<b>SEGUNDA PARTE- ARTIGOS</b> .....	<b>42</b>
	<b>ARTIGO 1 Performance of late-lactation dairy cows fed sugarcane silages inoculated with epiphytic bacteria of <i>Lactobacillus hilgardii</i> CCMA 0170</b> .....	<b>42</b>
	<b>ARTIGO 2 Response of dairy cows to tifton or sugarcane silage as sources of physically effective fiber</b> .....	<b>68</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), apesar de apresentar características desejáveis no que se refere aos atributos químicos, como baixa capacidade tampão, teores adequados de carboidratos solúveis (CS) e matéria seca (MS), que impactam diretamente na fermentação, a sua ensilagem resulta em altas perdas de MS (PEDROSO; NUSSIO; PAZIANI, 2005).

As populações de microrganismos epifíticos e endofíticos da cana-de-açúcar são bastante diversificadas (MEHNAZ, 2013). Porém, quando um estado de anaerobiose ou baixa concentração de oxigênio se estabelece, como no caso da ensilagem, microrganismos aeróbios estritos morrem, com consequente aumento da população dos adaptados à ausência de oxigênio. Em silagens de cana-de-açúcar ocorre produção elevada de etanol (KUNG; STANLEY, 1982), por causa da ação de leveduras de ocorrência natural na cultura. As reações metabólicas que envolvem a produção de etanol geram calor e perda de MS na forma de CO<sub>2</sub>.

Leveduras encontradas em silagens de cana-de-açúcar toleram bem o pH baixo (ÁVILA et al., 2010) e, ainda, possuem capacidade de utilizar ácido láctico como substrato. Dos produtos de fermentação encontrados em maiores concentrações em silagens de cana-de-açúcar, o ácido acético é o que possui maior impacto no controle de leveduras (MOON, 1983), resultando em silagens com maior estabilidade aeróbia (DANNER et al., 2002) e com potencial em reduzir as perdas de MS (CARVALHO et al., 2014).

Elevar a população inicial de microrganismos capazes de produzir compostos com ação antifúngica, através do uso de inóculos microbianos, pode ser uma alternativa plausível para o controle do crescimento de leveduras em

silagens de cana-de-açúcar. Entretanto, é necessário que o microrganismo utilizado seja, realmente, eficiente na função proposta. O uso de inóculos não apropriados em silagens de cana-de-açúcar, como as bactérias homoláticas, pode aumentar a perda de MS (PEDROSO; NUSSIO; LOURES, 2007), além de elevação nos custos de produção. Bactérias isoladas e selecionadas de silagens de cana-de-açúcar têm mostrado resultados promissores quanto à redução das perdas de MS e mudanças no perfil dos compostos produzidos durante a fermentação (ÁVILA et al., 2014; CARVALHO et al., 2014).

O efeito no desempenho de vacas leiteiras provocado pelo uso de silagem inoculada é controverso. Os dados da literatura sugerem que existe elevação na produção de leite sem aumento no consumo de MS, porém a resposta parece ser dependente da cepa utilizada (KUNG JUNIOR; MUCK, 1997), não havendo resposta positiva somente pelo fato de se usar inóculo microbiano. Em virtude do fato de não ocorrer aumento no consumo de MS, o possível efeito causador do melhor desempenho foi atribuído a possíveis mudanças no comportamento alimentar dos animais, refletindo positivamente no perfil de fermentação ruminal (KUNG JUNIOR; STOKES; LIN, 2003).

A cana-de-açúcar, seja na forma ensilada ou in natura, causa depressão no consumo de MS quando comparada com silagem de milho (CORRÊA et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2004). Atribui-se a depressão de consumo à baixa digestibilidade da fibra existente na cana-de-açúcar. A fração indigestível da fibra, em detergente neutro (FDN) da cana-de-açúcar, situa-se em torno de 30%, enquanto em silagens de milho esta fica ao redor de 20% (SÁ NETO et al., 2014). Provavelmente, em razão da menor digestibilidade da fibra da cana-de-açúcar, a sua capacidade em promover mastigação é maior do que a da silagem de milho (GOULART et al., 2010).

Dois experimentos foram conduzidos, sendo que o primeiro objetivou avaliar o efeito do fornecimento de silagem de cana-de-açúcar inoculada com

cepa epifítica de *L. hilgardii* UFLA SIL 52 (CCMA 0170) no desempenho, comportamento alimentar e no perfil de fermentação ruminal de vacas leiteiras. Já, no segundo experimento, objetivou-se avaliar o efeito da substituição de Tifton 85 (*Cynodon* spp.) verde colhido longo, por silagem de cana picada fina, como fonte de fibra fisicamente efetiva em dietas de vacas leiteiras.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Caracterização química da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma planta tropical, pertencente à família *Poaceae*, nome alternativo Graminae, com alto potencial produtivo de MS e energia por unidade de área. O componente de maior interesse da cultura é a sacarose formada pela ligação de uma molécula de  $\beta$  – frutose com uma molécula de  $\alpha$  – glicose.

A deposição da sacarose ocorre nos colmos que são os tecidos de reservada cana-de-açúcar, caracterizados de forma bem definida por nós e entrenós, possuindo elevado teor de fibra. O colmo é formado pelo córtex, epiderme, feixes fibrovasculares e pelo tecido parenquimático. Em razão da alta rigidez de suas fibras e ao grau de lignificação, o córtex fornece proteção contra injúrias mecânicas e permite a sustentação da planta.

A fração fibrosa da cana-de-açúcar é constituída por celulose, lignina, hemicelulose, pectina e outros componentes em menor grau de ocorrência. A parede celular primária é formada por 90% de carboidratos (ligações entre unidades de pentoses e hexoses). A reorganização da parede celular com inserção de lignina em sua matriz, durante o crescimento, causa um espessamento da parede, originando a parede celular secundária que apresenta arranjos estruturais, totalmente diferentes da parede primária, por causa da inserção da lignina (HATFIELD, 1989). A parede celular secundária possui cerca de 40 a 80% de celulose, 10 a 40 % de hemicelulose e 5 a 25% de lignina, resultando em uma estrutura rígida e compacta ocasionada, provavelmente, pela inclusão de lignina na estrutura (BIDLACK; BUXTON, 1992).

A celulose é o componente encontrado em maior concentração no bagaço de cana-de-açúcar, 40% da fibra, sendo formada por ligações

glicosídicas do tipo  $\beta$  1-4, mantidas por forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio em arranjo linear, cuja unidade formada é a celobiose (BIDLACK; BUXTON, 1992). Nas ligações formadas por pontes de hidrogênio, ocorre formação das estruturas cristalinas que são bastante organizadas. As regiões menos organizadas são chamadas de amorfas e estão presentes em maior frequência nas cadeias da superfície (LARSSON; WICKHOLM; IVERSEN, 1997).

A lignina é o composto que confere rigidez à parede das células e está localizada em maior concentração na parede secundária. A estrutura química da lignina ainda não é completamente entendida e é variável entre diferentes plantas. Os compostos que formam as ligninas em cana-de-açúcar apresentam grupos p-cumaril, siringil e guaiacil, sendo os mesmos grupos encontrados em espécies arbóreas de madeira dura (FAIX, 1992).

A técnica pela qual se determina a fração fibrosa de um alimento destinado à nutrição animal consiste na lavagem em solução de detergente neutro (FDN) (SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991). A solução lava todos os demais componentes, restando apenas fibras e pequenas quantidades de nitrogênio (N) e cinzas inseridas no interior das células, sendo constituída por celulose, hemicelulose e lignina. A lavagem da amostra em solução de detergente ácido (FDA) permite quantificar a hemicelulose por diferença entre a FDN e a FDA, sendo esse composto removido pela solução ácida.

## **2.2 Caracterização microbiológica da cana-de-açúcar**

Microrganismos epifíticos e endofíticos dos mais diversos grupos estão presentes na cana-de-açúcar, podendo alguns deles ser benéficos à planta, convivendo em mutualismo, ou maléficos, parasitando-a e causando doenças. Os microrganismos sendo fíticos, aqueles que habitam o interior da planta, podem atuar realizando fixação de N, solubilização do fósforo (P) presente no solo,

produção de fito-hormônios e antibióticos que podem atuar inibindo o crescimento de outros microrganismos patogênicos, tanto endofíticos como epifíticos (MEHNAZ, 2013). Dentre eles, pode-se destacar os dos gêneros *Azotobacter* e *Burkholderia* e algumas espécies da família das enterobactérias, como as do gênero *Klebsiella*, isolados de cana-de-açúcar em áreas cultivadas no Brasil (PISA et al., 2011), além de fungos micorrizicos.

Os microrganismos de maior importância envolvidos no processo de conservação de forragens na forma de ensilagem são os epifíticos. Eles estão distribuídos em toda a estrutura da planta, mas em maior população nas partes inferiores onde há maior umidade e proteção contra radiação solar. Muitas das espécies epifíticas encontradas nas culturas usadas para ensilagem são aeróbicas obrigatórias e seu crescimento é inibido logo após estabelecido o estado de anaerobiose (PHALOW, 2003).

O grupo de microrganismos com maior importância no processo de conservação é o das bactérias do ácido lático (BAL). A população total de bactérias em cana-de-açúcar fresca situa-se em torno de  $9,0 \log \text{ufc g}^{-1}$  de forragem (CABRAL JUNIOR et al., 2009), sendo, aproximadamente,  $7,5 \log \text{ufc g}^{-1}$  de forragem de BAL (CARVALHO et al., 2014). Entre as BAL, pode-se destacar os grupos dos gêneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (LIN et al., 1991) encontrados em ampla diversidade de morfotipos em cana-de-açúcar (ÁVILA et al., 2009).

As leveduras são fungos unicelulares e estão presentes na cultura da cana-de-açúcar com população em torno de  $5,7 \log \text{ufc g}^{-1}$  de forragem (CARVALHO et al., 2014). Mesmo apresentando população menor do que a das BAL, as leveduras podem consumir grande parte dos açúcares presentes na planta. Em algumas situações, como queimada do canavial, por exemplo, a população desse grupo de microrganismos pode elevar as taxas de crescimento, por causa do extravasamento de açúcares do interior dos colmos para fora,



ocasionado pela sua ruptura em razão do calor excessivo (BERNADES et al., 2007). As espécies de leveduras encontradas com maior frequência em cana-de-açúcar foram: *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia anomala*, *Sacharomices cerevisiae*, *Candida glabrata* e, em menores ocorrências, *S. bayanus*, *P. guilliermondii*, *C. membranifaciens*, *P. jadinii* e *Kluyveromyces lactis* (ÁVILA et al., 2010).

### **2.3 Identificação e seleção de *Lactobacillus hilgardii* UFLA SIL 52 (CCMA 0170)**

A especificidade entre as espécies forrageiras e a microbiota epífita indica a necessidade de estudos relacionados como isolamento e a identificação dos principais grupos de microrganismos presentes na forragem utilizada para silagem, como ferramenta auxiliar no melhor entendimento do que ocorre no processo. Técnicas laboratoriais que permitem quantificar, isolar e identificar com qual grupo, gênero, espécie e, até mesmo, cepa de microrganismos e está trabalhando são de grande aplicabilidade em estudos relacionados à conservação de forragens por meio da ensilagem.

Encontrar uma cepa de BAL epífita de determinada cultura que possui potencial para melhorar o processo fermentativo e que seja capaz de ser cultivada em escala comercial para utilização como inóculo é um trabalho que exige tempo e aplicação de muitos recursos, existindo, ainda, a possibilidade de insucesso. A confecção de silagens em silos de grande porte exige alto investimento em mão de obra, estruturação física e aquisição de insumos, no que se refere ao plantio, tratamentos culturais, colheita e período de estocagem, justificando a seleção em nível laboratorial.

Ávila et al. (2014) conduziram um estudo com o objetivo de selecionar BAL oriundas de silagens de cana-de-açúcar e avaliar a resposta dos isolados. Silagens de cana-de-açúcar foram confeccionadas em baldes plásticos com

capacidade para 15 litros e armazenadas, por 90 dias, em ambiente protegido. No momento da abertura, amostras de 80 g de silagem foram coletadas e adicionadas de 750 mL de água peptonada a 0,1% e misturadas por 20 minutos. Diluições seriadas foram preparadas para contagem de BAL em meio de Agar Man, Rogosa e Sharpe (MRS). As colônias foram contadas e selecionadas com base no tamanho, cor, formato e morfologia e, posteriormente, isoladas por plaqueamento em forma de estrias. Os isolados foram submetidos aos testes de Gram, catalase, motilidade e produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose. Segundo essas metodologias, os isolados foram classificados como sendo pertencentes ao gênero *Lactobacillus*.

Na primeira etapa de seleção, foram isolados 57 materiais que, em seguida, foram submetidos ao teste de avaliação quanto à produção de metabólitos. Foi fornecida uma solução de caldo de cana ajustada para cinco graus Brix mais 0,1% de extrato de levedura. A solução foi esterilizada previamente à inoculação. As cepas foram cultivadas por 24 h em caldo MRS e ajustadas em espectrofotômetro a 600 nm. Uma amostra de 400 µL de cada cepa foi inoculada em 300 mL de caldo de cana a 35°C por 24 h. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida em HPLC. Os dados obtidos foram analisados por componente principal e foram selecionadas as melhores cepas, de acordo com a produção dos ácidos propiônicos, acético e láctico.

Foram selecionadas as cinco cepas que produziram as maiores concentrações de ácido acético (UFLA SIL17, UFLA SIL24, UFLA SIL25, UFLA SIL27 e UFLA SIL35); as quatro cepas maiores produtoras de ácido láctico (UFLA SIL19, UFLA SIL32, UFLA SIL33 e UFLA SIL34) e as cinco cepas maiores produtoras de ácido propiônico (UFLA SIL41, UFLA SIL42, UFLA SIL46, UFLA SIL51 e UFLA SIL52). As cepas selecionadas foram identificadas por técnicas moleculares e por comparação em banco de dados,

usando o algoritmo BLAST (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2014).

Em uma segunda etapa, as 14 cepas selecionadas foram utilizadas como inoculo em silagens de cana-de-açúcar acondicionadas em minissilos de Policloreto de Vinil (PVC), armazenadas por 61 dias. Três silos foram confeccionados para cada um dos 14 tratamentos em delineamento inteiramente ao acaso.

As silagens inoculadas com as cepas UFLA SIL51 e UFLA SIL52 foram as que apresentaram as menores perdas de MS e as menores concentrações de etanol e maiores de ácido acético. Ambas as cepas apresentaram 98% de similaridade com a espécie *L. hilgardii*, segundo avaliações por técnicas moleculares. Carvalho et al. (2014) avaliaram o comportamento fermentativo de silagens de cana inoculadas com as mesmas cepas citadas anteriormente, isoladas por Ávila et al. (2014), e concluíram que as cepas de *L. hilgardii* UFLA SIL51 e UFLA SIL52 apresentaram as melhores respostas em relação às perdas de MS.

#### **2.4 Perfil de fermentação em silagem de cana-de-açúcar**

Entre os produtos de fermentação encontrados em silagens de cana-de-açúcar pode-se destacar o etanol como sendo o principal (KUNG; STANLEY, 1982). As leveduras presentes na cultura são as principais responsáveis pelo consumo de sacarose e metabolização desse composto até álcool, apesar de que algumas bactérias, comumente encontradas em silagens, também possam produzir álcool, por meio de rotas metabólicas alternativas (ROOKE; HATFIELD, 2003). Daniel et al. (2013) avaliaram a ocorrência de compostos voláteis em silagens de cana-de-açúcar confeccionadas em silos de fazenda e silos laboratoriais de pequena escala e observaram que o etanol é o composto de origem fermentativa, encontrado em maior concentração, seguido dos ácidos

lático e acético. A concentração de etanol em silagens de cana pode ser influenciada pelo estágio de maturidade da cultura (KUNG; STANLEY, 1982), assim como o tempo de estocagem do material (PEDROSO; NUSSIO; PAZIANI, 2005).

Em silagem de cana-de-açúcar, a queda do pH acontece de forma rápida, dentro de três a quatro dias após a vedação, sendo que valores inferiores a 4,0 são facilmente encontrados (ÁVILA et al., 2009; CARVALHO et al., 2014; PEDROSO; NUSSIO; PAZIANI, 2005). A baixa capacidade de tamponamento da cultura associada à produção de ácidos orgânicos fazem com que o pH caia dessa maneira.

As BAL são os principais microrganismos responsáveis pela conversão de açúcares simples, mono e dissacarídeos, em ácidos orgânicos, principalmente o lático. Seis gêneros são frequentemente relacionados aos processos fermentativos em silagens: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*, e um novo grupo isolado por Cai et al. (1999) chamado *Weissella*. Essas bactérias podem ser homoláticas, direcionando rotas metabólicas que produzem somente ácido lático, ou heteroláticas, que são aquelas capazes de produzir, além dos ácidos lático e acético, também álcool como o etanol, com decorrente perda de MS na forma de CO<sub>2</sub>.

Três grupos distintos têm sido utilizados para a classificação desses microrganismos, com base na presença ou ausência de enzimas responsáveis pelo direcionamento das rotas metabólicas. Os microrganismos homofermentativos obrigatórios fermentam hexoses, quase totalmente a ácido lático e não possuem a enzima fosfoquetolase. Os heterofermentativos facultativos que utilizam as mesmas rotas dos homofermentativos, porém possuem a fosfoquetolase e a aldolase que são enzimas responsáveis por catalisar a reação de frutose 1,6 bifosfato a gliceraldeído3fosfato na rota de Embden-Meyerhof, produzindo outros compostos, além do ácido lático e, ainda,

possuem a capacidade de utilizar pentoses como substrato. E, finalmente, os heterofermentativos obrigatórios que produzem compostos diferentes, além do ácido lático oriundo da fermentação de hexoses (AXELSSON, 2004).

O processo de fermentação pode ser subdividido em quatro fases. Fase inicial ou aeróbia, que é caracterizada pelas horas posteriores à colheita, quando a concentração de oxigênio no material é alta, desencadeando reações oxidativas com geração de calor. Fase fermentativa, podendo compreender um período de uma semana até um mês, dependendo da cultura e das condições de ensilagem. Nessa etapa, ocorre competição por substrato entre BAL e alguns outros microrganismos como enterobactérias, clostrídios e leveduras. Também, ocorre produção de gases e a queda rápida do pH, se houver a dominância das BAL e, ainda, o acúmulo de ácido lático se consolida, inibindo os demais grupos de microrganismos sensíveis ao pH baixo. A fase de estabilidade, quando muito, pouco ocorre no que se refere às reações metabólicas, desde que não haja entrada de oxigênio na massa, permanecendo estável até a abertura do silo. Em silagens de cana, mesmo com a ausência de oxigênio, a fase de estabilidade não se caracteriza por manutenção dos valores nutricionais do alimento. Com o passar do tempo ocorre perda de compostos não fibrosos, com consequente concentração da fração fibrosa (MIRANDA et al., 2013). Enzimas tolerantes ao pH baixo, como algumas proteolíticas, atuam nessa fase, degradando componentes proteicos e aumentando a concentração de amônia e proteína solúvel (PAHLOW, 2003; WINDLE; WALKER; KUNG JUNIOR, 2014). Como em cana-de-açúcar o teor de proteínas é muito baixo, esse efeito não tem grande importância.

A fase de desabastecimento do silo pode ser bastante crítica no que se refere às perdas, caso práticas de manejo, como espessura da fatia de corte, maneira com que a silagem é retirada e presença de restos de silagem deteriorada nas proximidades do silo não sejam tratadas com a devida atenção.

Com a exposição do material ensilado ao oxigênio, como consequência da abertura do silo, microrganismos aeróbios consomem os nutrientes resultando em perda de MS (WOOLFORD; SAWCZYC, 1984). As leveduras, por serem capazes de tolerar o baixo pH e, ainda, poderem utilizar ácido láctico como substrato (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991), são as principais responsáveis pela elevação do pH, uma condição adequada para que outros microrganismos como fungos filamentosos, clostrídios e enterobactérias também atuem, acelerando o processo de perdas e resultando em aumento da temperatura e redução na qualidade nutricional do alimento (BORREANI; TABACCO, 2010). Como mencionado previamente, a cultura da cana-de-açúcar possui uma flora epífita abundante e diversa de leveduras (ÁVILA et al., 2010; KHUNNAMWONG et al., 2014), tolerando o pH baixo da silagem de cana. Esses microrganismos parecem continuar metabolizando açúcares e ácido láctico mesmo na fase de estabilidade da silagem de cana-de-açúcar, por causa da redução na concentração de ácido láctico e aumento na de etanol como avançar do tempo de estocagem (CARVALHO et al., 2014; PEDROSO; NUSSIO; PAZIANI, 2005). Porém, uma redução na população de leveduras é observada (CARVALHO et al., 2014), podendo ser resultado do efeito antifúngico de alguns ácidos orgânicos presentes na silagem sobre esses microrganismos.

### **2.5 Estabilidade aeróbia em silagem de cana**

Após a entrada de ar na massa de forragem conservada por meio da ensilagem, microrganismos dependentes do oxigênio tornam-se ativos, consumindo nutrientes presentes no material com produção de calor. Entretanto, alguns compostos presentes na silagem, que foram gerados durante a fase fermentativa, apresentam capacidade de reduzir a atividade desses microrganismos aeróbios. Um método bastante utilizado para quantificar o grau de estabilidade de uma silagem é avaliar o tempo gasto para que a silagem

ultrapasse em 2°C a temperatura ambiente (MORAN et al., 1996). O aumento na temperatura é reflexo da atividade dos microrganismos aeróbios sobre o consumo de substratos. Alguns ácidos possuem boa capacidade para estender o tempo de estabilidade em decorrência da sua ação antifúngica, com o ácido butírico, apresentando maior eficiência no controle, seguido pelos ácidos propiônico e acético (DANNER et al., 2002; KUNG JUNIOR; ROBINSON; RANJIT, 2000).

Silagens de cana-de-açúcar apresentam alta concentração de etanol que, apesar de sugerido por Pedroso, Nussio e Paziani (2005), tenha algum efeito inibitório no desenvolvimento de leveduras, esse mecanismo só ocorre em concentrações superiores a 20% da solução (GUTIERREZ et al., 1991). O ácido láctico, que é encontrado em elevadas concentrações (2-3 % na MS) em silagens de cana (CARVALHO et al., 2014; DANIEL et al., 2013), é responsável pela queda do pH, contudo não contribui na expansão do tempo de estabilidade (DANNER et al., 2002). Os ácidos butírico, propiônico e acético possuem capacidade de prolongar a estabilidade aeróbia, porém os dois primeiros são encontrados em baixa concentração em silagens de cana-de-açúcar, sendo difícil a manipulação das suas concentrações por intermédio do uso de inoculantes. Já, o ácido acético pode ser encontrado em concentrações próximas as do ácido láctico e existe a possibilidade de manipular a sua concentração com o emprego de aditivos microbiológicos.

A estabilidade aeróbia de silagem de cana-de-açúcar sem o uso de aditivos é variável. Alguns autores (ÁVILA et al., 2009, 2010; SANTOS et al., 2012) relataram estabilidades em torno de 15 horas, ao passo que outros autores observaram estabilidades superiores, ao redor de 50 horas (MENDES et al., 2008; SÁ NETO et al., 2013). É consenso na literatura científica que o aumento na concentração de ácido acético resulta em silagens de cana mais estáveis em razão da ação que esse composto causa no metabolismo das leveduras,

reduzindo a sua atividade e produzindo silagens com estabilidade aeróbia acima de 90 horas (MENDES et al., 2008; ZOPPOLATTO; DANIEL; NUSSIO, 2009).

### **2.5.1 Aditivos microbiológicos**

As reações metabólicas envolvendo respiração anaeróbia e fermentação são as responsáveis pela produção de compostos orgânicos, sendo, alguns deles, fundamentais para a conservação da forragem por meio da ensilagem. Diversos microrganismos estão presentes na cana-de-açúcar, compondo a microbiota epífita. A partir da interferência do homem, por meio da colheita e alocação desse material no silo, o equilíbrio entre esses microrganismos é quebrado, sendo alguns beneficiados perante os demais.

Durante o preparo da forragem para a ensilagem, é possível manipular a população de microrganismos, por meio do uso de inoculantes, visando a elevar a população inicial dos desejáveis (WOOLFORD; SAWCZYC, 1984). Além da melhoria da estabilidade aeróbia, o emprego de inóculos microbianos pode impactar no perfil de metabólitos gerados durante o processo.

O gênero de bactérias mais utilizado como inóculo em silagem de cana-de-açúcar no Brasil é o *Lactobacillus*, com destaque para a espécie *L. buchneri* (ZOPOLLATTO; DANIEL; NUSSIO, 2009). Cepas de *L. plantarum* e *L. brevis* foram testadas em silagens de cana, porém o uso de bactérias heteroláticas facultativas nessas silagens não é recomendado, pois podem piorar a sua qualidade (ÁVILA et al., 2014; PEDROSO; NUSSIO; LOURES, 2007). Esse fato ocorre por causada pequena ação do ácido lático no controle de leveduras (DANNER et al., 2003), além do mesmo ser utilizado como substrato por esses microrganismos (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

### **2.6 Cana-de-açúcar *in natura* ou ensilada para vacas leiteiras**



Formular dietas para vacas leiteiras contendo cana-de-açúcar como forragem, seja na forma *in natura* ou de silagem, exige conhecimento técnico para que o desempenho animal não seja prejudicado.

O fornecimento de cana-de-açúcar *in natura* para vacas de alta produção foi avaliado por Corrêa et al. (2003). Nove vacas holandesas de alta produção com  $123 \pm 33$  dias em lactação foram submetidas a uma sequência de três tratamentos em delineamento do tipo quadrado latino 3x3 por períodos de 21 dias. Os tratamentos foram dietas, contendo 20% de FDN de forragem como cana-de-açúcar, silagem de milho dentado ou silagem de milho duro. A produção de leite foi  $2,3 \text{ kg d}^{-1}$  ( $P=0,05$ ) e o consumo de MS  $1,5 \text{ kg d}^{-1}$  ( $P<0,01$ ) menores no tratamento com cana-de-açúcar. A depressão na produção de leite foi atribuída ao menor consumo de MS, porque a digestibilidade da FDN foi menor na cana-de-açúcar (41,9 vs. 23,1%,  $P<0,01$ ), porém a digestibilidade da MS (62,5 %,  $P> 0,10$ ) não diferiu entre os tratamentos, sendo compensada pela maior digestibilidade da matéria orgânica não FDN da cana (74,7 vs. 79,8%,  $P<0,01$ ). A inferência dos resultados encontrados por Corrêa et al. (2003) deve levar em consideração que a substituição da silagem de milho por cana-de-açúcar não reflete somente na mudança dos carboidratos fibrosos, mas envolve, também, a substituição de amido por sacarose na composição dos carboidratos não fibrosos da dieta.

Características agronômicas da cana-de-açúcar como alto rendimento de MS por unidade de área, estágio de maturidade ótimo no período da seca e bom valor nutricional, segundo parâmetros analíticos, muitas vezes torna seu uso atrativo em dietas de vacas leiteiras. No entanto, a substituição total da silagem de milho por cana-de-açúcar deprime o desempenho de vacas leiteiras de alta produção (CORRÊA et al., 2003), sendo a redução no consumo de MS o principal fator de impacto. Entretanto, a inclusão parcial de cana-de-açúcar em

substituição à silagem de milho poderia não causar depressão no desempenho, justificando o uso da forragem em algumas situações.

Com esse intuito, Magalhães et al. (2004) avaliaram a substituição de silagem de milho por cana-de-açúcar para vacas leiteiras com produção média de 24 kg d<sup>-1</sup> em delineamento do tipo quadrado latino 4x4 com períodos de 21 dias. As dietas foram compostas de 60% de forragem, sendo silagem de milho o tratamento controle, e inclusões de cana-de-açúcar, em substituição à silagem de milho, efetuadas nas seguintes proporções: 33,3; 66,6 e 100%. As substituições de 100; 66,6 e 33,3% de silagem de milho por cana-de-açúcar compuseram dietas com 60, 40 e 20% de cana com base na MS. O consumo de MS caiu de forma linear, obedecendo a seguinte equação  $Y=20,0548 - 0,0266X$  (% de cana na dieta, em base de MS).

Compilando dados publicados na literatura, relacionados aos trabalhos envolvendo o fornecimento de cana-de-açúcar para vacas leiteiras entre 2003 a 2014 (Tabela 1), observa-se a mesma tendência relatada por Magalhães et al. (2004) para consumo de MS, em função da proporção de cana na dieta (Figura 1). A produção de leite e as digestibilidades de MS e de FDN seguem o mesmo comportamento (Figura 2). Esses resultados, sugerem que, realmente, a cana-de-açúcar deprime o consumo de MS. Por outro lado, deve-se considerar que os dados são de diferentes trabalhos, envolvendo animais com potencial produtivo, peso e estágio lactacional diferentes.

Tabela 1 Consumo de matéria seca (CMS), proporção de fibra em detergente neutro (FDN) na dieta, produção de leite (PL), teor de gordura do leite (GL) e digestibilidades da MS (DMS) e da FDN (DFDN) em trabalhos publicados entre 2003 e 2014 com o fornecimento de cana-de-açúcar para vacas leiteiras

<b>Autor</b>	<b>Trat<sup>1</sup></b>	<b>Forma</b>	<b>% Cana</b>	<b>CMS,kg<sup>2</sup></b>	<b>FDN,%<sup>3</sup></b>	<b>PL,kg<sup>4</sup></b>	<b>GL,%<sup>5</sup></b>	<b>DMS,%<sup>6</sup></b>	<b>DFDN,%<sup>7</sup></b>
<b>Siécola Júnior et al. (2014)</b>	T1	In-natura	18,4*	18,0	32,9	18,4	3,6	75,1	47,7
	T2	In-natura	18,2*	17,5	34,7	18,2	3,6	71,4	42,2
<b>Pedroso et al. (2010)</b>	T1	In-natura	60,0	21,4	37,5	17,6	3,3	-	-
	T2	Silagem	62,5	18,3	33,9	18,6	3,4	-	-
<b>Moreira et al. (2014) e Santos et al. (2012)</b>	T1	In-natura	60,0	15,4	42,3	13,5	3,6	55,6	21,5
	T2	Silagem	60,0	11,6	52,6	11,5	3,8	47,4	23,8
	T3	Silagem Inoc.	60,0	12,7	49,4	12,6	3,7	49,9	22,1
<b>Lopes et al.(2010) e Magalhães et al. (2006)</b>	T1	In-natura	60,0	15,7	40,5	18,0	3,4	-	-
	T1	In-natura	60,0	17,3	33,6	-	-	64,5	20,5
	T2	In-natura	40,0*	18,5	35,3	-	-	65,2	30,2
	T3	In-natura	20,0*	19,1	37,7	-	-	67,2	40,8
<b>Costa et al. (2013)</b>	T1	In-natura	60,0	15,8	34,0	16,9	3,5	65,8	33,8
	T2	In-natura	50,0	17,5	30,2	18,2	3,3	66,7	34,5
	T3	In-natura	40,0	19,8	27,8	19,7	3,5	67,7	36,7
<b>Mendonça et al. (2004)</b>	T1	In-natura	60,0	14,7	-	-	-	-	-
	T2	In-natura	50,0	15,8	-	-	-	-	-
<b>Sá Neto et al. (2014)</b>	T1	In-natura	18,7*	22,7	32,0	26,7	3,9	-	-
	T2	In-natura	37,5	22,7	32,9	26,5	3,9	-	-
<b>Corrêa et al. (2003)</b>	T1	In-natura	45,3	21,5	27,0	31,9	-	-	-
<b>Souza et al. (2009)</b>	T1	In-natura	60,0	15,5	38,0	18,6	3,6	65,8	31,7
	T2	In-natura	53,0	17,0	37,3	19,7	3,9	63,4	29,7
	T3	In-natura	46,0	16,6	37,0	20,6	3,8	65,2	34,0
<b>Queiroz et al. (2008)</b>	T1	In-natura	40,0	22,3	38,6	24,6	3,3	-	-
	T2	Silagem	40,0	23,5	41,8	24,4	3,6	-	-
	T3	In-natura	22,5*	23,5	39,9	25,2	3,5	-	-
<b>Média</b>	-	-	47,9	17,8	38,5	19,2	3,6	65,2	32,0
<b>Desvio padrão</b>	-	-	12,9	2,6	5,1	4,0	0,1	3,5	6,8

<sup>1</sup>Tratamento; <sup>2</sup>Consumo de matéria seca; <sup>3</sup>Fibra em detergente neutro; <sup>4</sup>Produção de leite, kg d<sup>-1</sup>; <sup>5</sup>Gordura do leite; <sup>6</sup>Digestibilidade da matéria seca; <sup>7</sup>Digestibilidade da FDN; \*Indicam que a dieta continha inclusão de silagem de milho.

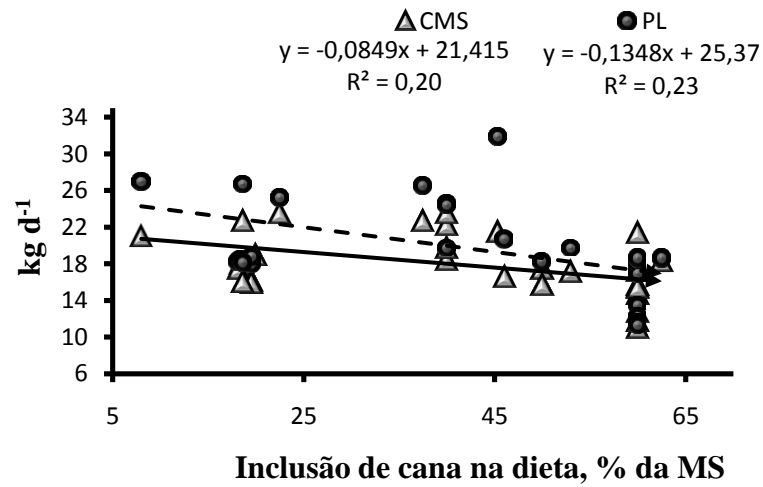


Figura 1 Gráfico de regressão para consumo de MS (CMS) e produção de leite (PL) em função da inclusão de cana na dieta

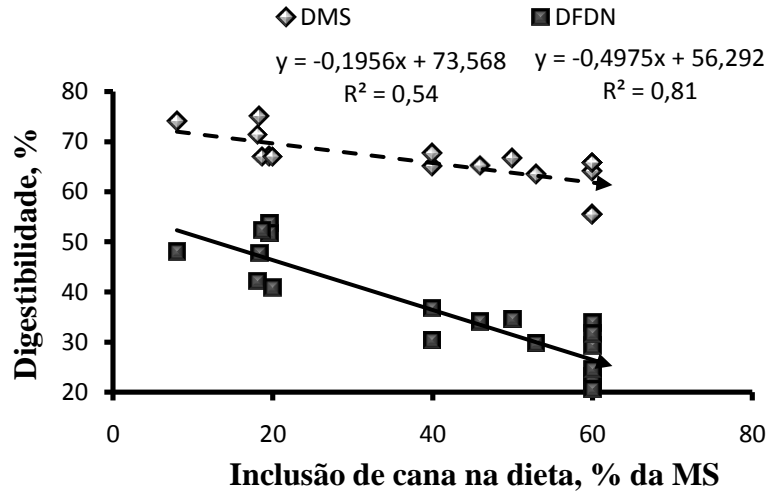


Figura 2 Gráfico de regressão para digestibilidades da MS (DMS) e da FDN (DFDN), em função da inclusão de cana na dieta

## 2.7 Desempenho animal com silagem inoculada

Silagens confeccionadas com aditivos microbiológicos podem impactar, na maioria das vezes, de forma benéfica, nos processos fermentativos, assim como promover respostas positivas no desempenho animal. Existe uma diversidade muito grande de microrganismos utilizados como inóculo em silagens, sendo que alguns são inócuos ou, até mesmo, provocam redução de qualidade do alimento comparado às silagens controle. As respostas ao uso de microrganismos como inóculo em silagens são dependentes da cultura utilizada, do manejo empregado na confecção e aplicação do inóculo, da espécie de bactéria e, até mesmo, da cepa bacteriana utilizada.

Kung Junior et al. (1992) avaliaram o desempenho de vacas leiteiras alimentadas com silagens de milho inoculadas com dois produtos comerciais contendo diferentes cepas de *Lactobacillus plantarum* e um grupo controle. No experimento 1, foram confeccionadas silagens de milho em silos tipo *bag*, sem adição de inóculo e inoculadas a uma taxa de  $1 \times 10^5 \log \text{ufcg}^{-1}$  de forragem com inoculante Ecosyl contendo *L. plantarum*. As silagens foram armazenadas por 120 dias e fornecidas a 20 vacas holandesas ( $73 \pm 25 \text{ DEL}$ ), blocadas em grupos de dois animais e, aleatoriamente, distribuídas a um dos dois tratamentos aplicados por nove semanas. A produção de leite tendeu ( $P < 0,15$ ) a ser  $0,6 \text{ kg d}^{-1}$  maior no tratamento com silagem inoculada, condicionada por consumo de MS superior ( $P < 0,05$ ), a partir da segunda semana. No experimento 2, conduzido da mesma maneira, ambos os tratamentos continham silagens inoculadas, Ecosyl (*L. plantarum*) ou Pionner 1174 (*L. plantarum* mais *Streptococcus faecium*). A diferença numérica de  $0,4 \text{ kg d}^{-1}$  na produção de leite causada por efeito de tratamento não foi estatisticamente comprovada.

A resposta em desempenho de vacas leiteiras alimentadas com silagens inoculadas foi reportada por Kung Junior e Muck (1997), por meio de dados

compilados da literatura entre 1990 a 1996. Ganhos médios de produção de leite da ordem de 1,4 kg d<sup>-1</sup> ocorreram em 47% dos trabalhos, sendo o *L. plantarum* MTD1 a cepa mais consistente na resposta. Não foram detectadas diferenças no consumo de MS, sugerindo os autores que a resposta na produção de leite pode ser efeito de uma melhoria no perfil de fermentação ruminal, decorrente de possíveis efeitos positivos na palatabilidade do alimento, resultando em perfil de ingestão diferenciado. Alguns compostos presentes em silagens como os ácidos propiônico e butírico podem impactar no consumo de MS (ALLEN, 2000).

Krizsan e Randby (2007) confeccionaram 25 silagens de gramíneas temperadas com diferentes combinações entre equipamentos de colheita, aditivos e taxas de inoculação, com o intuito de obter variabilidade nos padrões de fermentação e, conseqüentemente, nos metabólitos presentes nas silagens. Estas foram fornecidas para 30 garrotes da raça Norueguesa. Todos os animais receberam uma dieta comum, contendo silagem de capim pré-secado sem adição de aditivo por duas semanas e, então, foram submetidos a um de cinco tratamentos, por três semanas seguintes. Foram cinco períodos experimentais, sendo que em cada período cinco diferentes silagens (tratamentos) foram fornecidas e as variáveis mensuradas nos animais e nas silagens. A variação no consumo atribuída ao efeito de período foi retirada pelo procedimento de fornecimento das duas semanas de adaptação antes de iniciar os tratamentos, criando uma ferramenta de cálculo para corrigir o consumo entre e dentro de animal. Os dados foram analisados por modelo misto e regressões múltiplas entre o consumo e os compostos das silagens geradas. A variável com maior correlação com o consumo de MS foi a concentração de AGV total, impactando negativamente o consumo. Quando avaliados separadamente, apenas o propionato e o butirato apresentaram efeito depressor, com ajuste de 0,53 e  $P < 0,01$ . As aminas biogênicas apresentaram efeito depressor similar ao propionato e butirato, sendo a triptamina e a cadaverina as com maior potencial

de depressão no consumo ( $R^2=0,48$ ;  $P<0,01$ ). A concentração de etanol não apresentou correlação com o consumo.

Em silagens de cana-de-açúcar, o microrganismo com melhor resposta quanto ao perfil fermentativo, sendo também o mais utilizado, é o *L. buchneri* (ÁVILA et al., 2009; CARVALHO et al., 2014; ZOPOLLATTO; DANIEL; NUSSIO, 2009). Pouca informação é encontrada na literatura relacionada ao uso de inóculo microbiano em silagens de cana-de-açúcar para vacas leiteiras. Santos et al. (2012) avaliaram o desempenho de vacas leiteiras alimentadas com cana *in natura*, silagem de cana queimada com ou sem inóculo e silagem de cana com ou sem inóculo como única forragem, perfazendo 60% da dieta, em base de MS. O microrganismo utilizado na confecção das silagens foi o *L. buchneri* aplicado a uma taxa de inoculação de  $5 \times 10^4$  ufc  $g^{-1}$  de forragem. Serão citados apenas os resultados numéricos publicados no trabalho em razão de uma aparente inadequação da análise estatística utilizada e, também, de aspectos relacionados à metodologia em algumas variáveis. O consumo de MS pelos animais alimentados com silagem sem uso de inóculo foi  $1,4 \text{ kg d}^{-1}$  menor ( $11,4 \text{ kg d}^{-1}$ ). A cana *in natura* propiciou o maior consumo de MS ( $15,4 \text{ kg d}^{-1}$ ). As produções de leite foram iguais a  $13,5$ ;  $12,6$  e  $11,5 \text{ kg d}^{-1}$ , respectivamente para cana *in natura*, silagem inoculada e silagem sem adição de inóculo. Os tempos de ingestão medidos no mesmo experimento, porém publicados em outro trabalho por Moreira et al. (2014), foram de 320 e 335  $\text{mind}^{-1}$  para silagem de cana sem inóculo e inoculada, respectivamente, mostrando similaridade entre as silagens quanto à atividade mastigatória.

Maiores concentrações de ácido acético são encontradas em silagens de cana-de-açúcar inoculadas com *L. buchneri* (ÁVILA et al., 2009; CARVALHO et al., 2012). O ácido acético esteve associado ao menor consumo de MS (ROOK; GILL, 1990). Silagens inoculadas com cepas de *L. buchneri* poderiam, então, proporcionar menor consumo de MS. Entretanto, Daniel et al. (2013)

mostraram não haver efeito do ácido acético e do etanol, dois compostos encontrados em concentrações elevadas em silagens de cana-de-açúcar, sobre o consumo de MS por vacas leiteiras.

## **2.8 Atributos físicos da cana-de-açúcar**

Na forma *in natura*, em que a concentração de sacarose é alta, a cana-de-açúcar apresenta teores de FDN entre 40 e 50% na MS. A FDN foi usada por Mertens (1997) como característica do alimento capaz de predizer o consumo máximo de MS, com base na regulação física. As taxas fracionais de desaparecimento por digestão (kd) e passagem (kp), que são atributos do alimento e do animal, respectivamente, determinam a digestibilidade do alimento. As forragens, comumente usadas na alimentação de ruminantes, podem apresentar diferenças na digestibilidade da FDN. Gramíneas forrageiras de climas tropical e subtropical, cana-de-açúcar, milho e sorgo, de metabolismo C<sub>4</sub> (possuem estrutura anatômica de Kranz), geralmente apresentam menor digestibilidade da FDN comparadas às gramíneas forrageiras de clima frio e leguminosas, em geral, com metabolismo C<sub>3</sub> (não possuem estrutura anatômica de Kranz) (HILL; GATES; BURTON, 1993). Características intrínsecas do alimento como a composição e a forma com que os compostos se organizam na estrutura da planta parecem estabelecer relações quanto ao potencial de digestão dos componentes fibrosos. Maiores taxas de passagem e degradação da FDN podem reduzir o efeito de enchimento, resultando em aumento na digestibilidade da FDN e no consumo de MS (ALLEN, 2000).

A cana-de-açúcar na forma *in natura* apresenta valores de FDN semelhantes ao da silagem de milho, em torno de 50% na MS. Entretanto, a digestibilidade dessa fração mensurada *in vivo* foi 50% menor (CORRÊA et al., 2003; SANTOS et al., 2012). Não se sabe, ao certo, por quais motivos a fibra da cana-de-açúcar possui tão baixa digestibilidade. Apesar de alguns compostos



relacionados à baixa digestibilidade de forragens, como a sílica e a lignina serem encontradas na cana-de-açúcar (TEIXEIRA et al., 2014), estes, por si só, não explicam o fato de outras forrageiras apresentarem concentrações desses compostos semelhantes às da cana-de-açúcar, porém com digestibilidades superiores. A fração indigestível da FDN (FDNi) da cana-de-açúcar *in situ* (240 horas) situa-se em torno de 50% da FDN (DANIEL et al., 2012), enquanto que, para a silagem de milho, esta é de 35% da FDN (SÁ NETO et al., 2014).

A digestibilidade da FDN possui relações com ingestão, ruminação, quebra de partículas, enchimento ruminal e ingestão de MS (COTANCH et al., 2014). Sá Neto et al. (2014) avaliaram o desempenho e o comportamento ingestivo de vacas leiteiras alimentadas com silagens de milho (SM) e de cana-de-açúcar (CA) ou silagem de milho mais cana-de-açúcar (50/50) (SMC), em delineamento do tipo quadrado latino 3x3, com períodos de 21 dias. As dietas foram formuladas para atender ao mesmo índice de FDN fisicamente efetivo (peFDN) 27% da MS, considerando a silagem de milho com fator de efetividade igual a 1,0 e a de cana-de-açúcar, 1,2, valores mensurados, previamente, pela capacidade em prover mastigação (GOULART et al., 2010). A distribuição de partículas acima de 8 mm, mensurada através do separador de partículas da Penn State, foi de 36,0; 35,3 e 29,0% do oferecido e o  $peFDN_{>8}$ , calculado pelo  $FDN \times \% \text{ retida acima da peneira de } 8\text{mm}$  (LAMMERS; BUCKMASTER; HEINRICHS, 1996), foi de 11,9; 11,3 e 8,9, respectivamente, para SM, SMC e CA. A produção de leite ( $27,0 \text{ kg d}^{-1}$ ) e o consumo de MS ( $22,5 \text{ kg d}^{-1}$ ) não diferiram entre os tratamentos. O tempo de ruminação apresentou uma tendência fraca ( $P=0,15$ ) em aumentar com a dieta contendo somente cana-de-açúcar e promoveu um maior ( $P<0,01$ ) tempo de mastigação por unidade de FDN de forragem consumida. O tempo de mastigação por unidade de peFDN foi semelhante entre os tratamentos ( $P>0,15$ ), sugerindo que formular dietas com cana-de-açúcar ou com silagem de milho contendo níveis semelhantes de

peFDN permite obter respostas similares no desempenho e comportamento alimentar de vacas leiteiras.

O aumento no tamanho de partículas da dieta resulta em maior conteúdo de peFDN, reduzindo o risco de acidose e promovendo efeito positivo na ruminação. Para a formação de um *mat* (colchão) consistente que irá promover ruminação, o tamanho e a gravidade específica das partículas são atributos importantes (TAF AJ; ZEBELI; BAES, 2007). Lima et al. (2012) observaram que dietas contendo silagem de milho apresentaram camada flutuante do rúmen com menor rigidez comparadas às dietas contendo cana-de-açúcar e feno de alfafa, ambas as forragens com o mesmo tamanho de partículas. Entretanto, o aumento no tamanho de partículas da dieta com baixo teor de MS pode favorecer o efeito de seleção contra as partículas longas (LEONARDI; ARMENTANO, 2003), resultando em menor consumo de peFDN, o que pode ocasionar mudanças no ambiente ruminal, desencadeando, até mesmo, acidose.

A efetividade física da cana-de-açúcar sendo maior que a da silagem de milho (GOULART et al., 2010) indica que pequenas inclusões de cana-de-açúcar como intuito de elevar a peFDN da dieta, sem que o consumo de MS seja prejudicado, pode se tornar uma opção plausível na nutrição de gado de leite.

## REFERÊNCIAS

ALLEN, M. S. Effects of diets on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, n. 7, p.1598-1624, Feb.2000.

ÁVILA, C. L. S. et al. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v.64, p.384-394, Dec. 2009.

ÁVILA, C. L. S. et al. Identification and characterization of yeast in sugarcane silages. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.109, p.1677-1686, May 2010.

ÁVILA, C. L. S. et al. The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugarcane silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n.2, p. 940-951, Feb. 2014.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. von (Ed.). **Lactic acid bacteria**. New York: M. Dekker, 2004. p. 1-63.

BERNARDES, T. F. et al. Avaliação da queima e da adição de milho desintegrado com palha e sabugo na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 2, p. 269-275, out. 2007.

BIDLACK, J. E.; BUXTON, D. R. Content and deposition rate of cellulose, hemicelluloses and lignin during regrowth of forages grasses and legumes. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, v.72, p.51-56, May1992.

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, Feb. 2010.

CABRAL JUNIOR, C. et al. Multivariate analyses of the epiiphytic microflora on *Saccharum officinarum* silages added with *gliricidia sepium*. **Archivos de Zootenia**, Córdoba, v. 58, p. 395-404, May 2009.

CAI, Y. et al. Influence of *Lactobacillus spp.* from an inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc spp.* from forage crops on silage fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.2982-2987, Oct. 1999.

CARVALHO, B. F. et al. Microbiological and chemical profile of sugarcane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.195, p. 1-13, Jan. 2014.

CORRÊA, C. E. S. et al. Performance of holstein cows fed sugarcane or corn silages of different grain textures. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 621-629, Dec. 2003.

COSTA, L. T. et al. Análise bioeconômica de níveis de glicerina bruta em dietas de vacas lactantes alimentadas com cana-de-açúcar. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.34, n. 2, p.833-844, 2013.

COTANCH, K. W. et al. **Applications of uNDF in ration modeling and formulation**. Cornell: Cornell Nutrition Conference, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1813/37979>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

DANIEL, J. L. P. et al. Fibre digestion potential in sugarcane across the harvest window. **Grass and Forage Science**, Oxford, v.69, n. 2, p.176-184, Dec. 2012.

DANIEL, J. L. P. et al. Occurrence of volatile organic compounds in sugarcane silages. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.185, p. 101-105, June 2013.

DANIEL, J. L. P. et al. Performance of dairy cows fed high levels of acetic acid or ethanol. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.96, p. 398-406, Sept. 2013.

DANNER, H. et al. Acetic acid increase stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n. 1, p. 562-567, Oct. 2002.

FAIX, O.; GRUNWALD, C.; BEINHOFF, O. Determination of phenolic hydroxyl group content of milled wood lignin (MWL's) from different botanical origins using selective aminolysis, FTIR, H-NMR, and UV spectroscopy. **International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Woods**, Berlin, v. 46, n. 1, p. 425-432, Feb. 1992.

GOULART, R. et al. Adjustment of physically effective fiber sources in diets for beef cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, p. 297, June 2010. Abstract. Supplement 1.

GUTIERREZ, L. E. et al. Effects of acetic acid on alcoholic fermentation. **Arquivo de Biologia Tecnológica**, Curitiba, v.34, p.235-242, 1991.

HATFIELD, R. D. Structural polysaccharides in forages and their digestibility. **Agronomy Journal**, Madison, v.18, p. 39-46, 1989.

HILL, G. M.; GATES, R. N.; BURTON, G. W. Forage quality and grazing steer performance from Tifton 85 and Tifton 78 bermuda grass pasture. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.71, p.3219-3225, Aug. 1993.

KHUNNAMWONG, P. et al. *Wickerhamiella siamensis* a novel endophytic and epiphytic yeast species isolated from sugarcane leaf in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Jerusalem, v. 64, n. 11, p. 3849-3855, Aug.2014.

KRIZAN, S. J.; RANDBY, A. T. The effect of fermentation quality on the voluntary intake of grass silage by growing cattle fed silage as the sole feed. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, p. 984-996, Jan. 2007.

KUNG, L.; STANLEY, R. W. Effect of stage of maturity on the nutritive value of whole-plant sugarcane preserved silage. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.54, n.4, p.689-696, Mar. 1982.

KUNG JUNIOR, L. et al. Effect of microbial inoculants on the nutritive value of corn silage for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, p.3763-3770, Dec. 1992.

KUNG JUNIOR, L.; MUCK, R. E. Animal response to silage additives. In: \_\_\_\_\_. **Silage: field to feedbunk**. Ithaca: NRAES, 1997. p. 200-210.

KUNG JUNIOR, L.; ROBINSON, J. R.; RANJIT, N. K. Microbial populations, fermentation end-products, and aerobic stability of corn silage treated with ammonia or propionic acid-base preservative. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, n. 7, p.1479-1486, July 2000.

KUNG JUNIOR, L.; STOKES, M. R.; LIN, C. J. Silage additives. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J.H. (Ed.). **Silage science and technology**. Wisconsin: ASA, 2003. p. 305-360.

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

LARSSON, P. T.; WICKHOLM, K.; IVERSEN, T. A CP/MAS <sup>13</sup>C NMR investigation of molecular ordering in celluloses. **Carbohydrate Research**, Athens, v. 302, p.19-25, Apr. 1997.

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

LIMA, M. L. M. et al. Comparação da fibra em detergente neutro de forragens: comportamento ingestivo e cinética ruminal. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.7, n. 3, p.535-542, jul. 2012.

LIN, C. et al. Epiphytic microflora on alfalfa and whole plant corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, p. 2484-2493, May 1991.

LOPES, F. C. F. et al. Composição química e digestibilidade ruminal *in situ* da forragem de quatro espécies do gênero *Brachiaria*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.62, n. 4, p. 219-228, jul. 2010.

MAGALHÃES, A. L. R. et al. Cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho em dietas para vacas em lactação: desempenho e viabilidade econômica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, p.1292-1302, dez. 2004.

MAGALHÃES, A. L. R. et al. Cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho em dietas para vacas em lactação: parâmetros digestivos e ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n.2, p. 591-599, jan. 2006.

MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **Biochemistry of Silage**. 2<sup>nd</sup> ed. Marlow: Chalcombe, 1991. 340 p.

MEHNAZ, S. Review: microbes, friends and foes of sugarcane. **Journal of Basic Microbiology**, Washington, v.53, p.954-971, Aug. 2013.

MENDES, C. Q. et al. Efeito do *Lactobacillus buchneri* na fermentação, estabilidade aeróbia e no valor nutritivo de silagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.37, n. 12, p.2191-2198, jul. 2008.

MENDONÇA, S. S. et al. Comportamento ingestivo de vacas leiteiras alimentadas com dietas à base de cana-de-açúcar ou silagem de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n.3, p. 723-728, fev. 2004.

MERTENS, D. R. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.80, p.1463-1481, Nov. 1997.

MIRANDA, D. C. L. et al. Composição e pH de silagem de cana-de-açúcar com aditivos químicos e microbiológicos. **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, Belém, v.54, p.122-130, maio/ago. 2013.

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

MORAN, J. P. et al. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic estabily of whole crop wheat silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 11., 1996, Wales. **Proceedings...** Wales: ISC, 1996. p. 162-163.

MOREIRA, J. V. et al. Sugar cane fresh or ensiled with or without bacterial additive in diets for dairy cows. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.36, p.385-391, Oct./Dec.2014.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.**BLAST**. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

PEDROSO, A. F. et al. Performance of dairy cows fed rations produced with sugarcane silages treated with additives or fresh sugarcane. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, n.9, p. 1889-1893, mar. 2010.

PEDROSO, A. F.; NUSSIO, L. G.; LOURES, D. R. S. Efeito do tratamento com aditivos químicos e inoculantes bacterianos nas perdas e na qualidade de silagens de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.36, n. 3, p.558-564, dez. 2007.

PEDROSO, A. F.; NUSSIO, L. G.; PAZIANI, S. F. Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.62, p. 427-432, set./out. 2005.

PISA, G. et al. Diversity of *16S rRNA* genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, p. 1215-1221, Dec. 2011.



PHALOW, G. Silage additives. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Wisconsin: ASA, 2003. p. 31-94.

QUEIROZ, O. C. M. et al. Silagem de cana-de-açúcar comparada a fontes tradicionais de volumosos suplementares no desempenho de vacas de alta produção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 37, n. 2, p. 358-365, ago. 2008.

ROOK, A. J.; GILL, M. Prediction of the voluntary intake of grass silages by beef cattle: linear regressions analyses. **Animal Production Journal**, Purwokerto, v. 50, n. 3, p. 425-438, June 1990.

ROOKE, J. A.; HATFIELD, R. D. Biochemistry of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Wisconsin: ASA, 2003. p. 95-139.

SÁ NETO, A. et al. Exchanging physically effective neutral detergent fiber does not affect chewing activity and performance of late-lactation dairy cows fed corn and sugarcane silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.97, p.1-9, Jan. 2014.

SÁ NETO, A. et al. Silagem de milho ou de cana-de-açúcar com *Lactobacillus buchneri* exclusivamente ou em associação com *L. Plantarum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, p.528-535, maio 2013.

SANTOS, A. B. et al. Vacas lactantes alimentadas com silagem de cana-de-açúcar com e sem aditivo bacteriano: consumo, digestibilidade, produção e composição do leite. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.13, p.720-731, jul./set. 2012.

SIÉCOLA JÚNIOR, S. et al. Despalha da cana-de-açúcar e desempenho de novilhas e vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.66, n. 1, p. 219-228, ago. 2014.

SOEST, P. J. van; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. 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, Feb. 1991.

SOUZA, D. P. et al. Comportamento ingestivo, consumo e digestibilidade de nutrientes, produção e composição do leite de vacas alimentadas com silagem de milho ou cana-de-açúcar com caroço de algodão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n.10, p. 2053-2062, nov. 2009.

TAF AJ, M.; ZEBELI, Q.; BAES, C. H. A meta-analysis examining effects of particle size of total mixed rations on intake, rumen digestion and milk production in high-yielding dairy cows in early lactation. **Journal of Animal and Feed Science Technology**, Shannon, v.138, p.137-161, Sept. 2007.

TEIXEIRA, C. B. et al. Variáveis agronômicas e químicas e degradabilidade ruminal da cana-de-açúcar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.66, n. 3, p. 870-878, jan. 2014.

WINDLE, M. C.; WALKER, N.; KUNG JUNIOR, L. Effects of an exogenous proteases on the fermentation and nutritive value of corn silage harvested at different dry matter contents and ensiled for various length of time. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.97, p. 3053-3060, Jan. 2014.

WOOLFORD, M. K.; SAWCZYC, M. K. An investigation into the effect of cultures of lactic acid bacteria on fermentation in silage: 1., strain selection. **Grass and Forage Science**, Oxford, v.39, p.139-148, 1984.

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

**SEGUNDA PARTE- ARTIGOS**

**ARTIGO 1 Performance of late-lactation dairy cows fed sugarcane silages  
inoculated with epiphytic bacteria of *Lactobacillus hilgardii*  
CCMA 0170**

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico *Journal of Dairy  
Science*.

**PERFORMANCE OF LATE-LACTATION DAIRY COWS FED  
SUGARCANE SILAGE INOCULATED WITH EPIPHYTIC  
BACTERIA OF *LACTOBACILLUS HILGARDII* CCMA 0170**

**ABSTRACT**

The effect of sugarcane silages inoculated with *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 (**LHI**), an epiphytic bacteria isolated from sugarcane, and *L. buchneri* NCIMB 40788 (**LBU**), commercial strain isolated from temperate grasses, on dairy cow performance and feeding behavior were evaluated. The inoculums were previously grown in laboratory to assure the same rate of application, 5 log cfu/g of fresh forage. Nine tons of each silage, and non-inoculated control (**Ctrl**) were made and stored for 35 days prior to opening in experimented bunker silos to allow for more than 0.20m of silo face per day. Fifteen Holstein cows ( $336 \pm 175$  DIM, at experimental begin) were used in replicated 3x3 Latin square design with 21 days period. The diets contained 20% of sugarcane silage in DM base and differ only in the sugarcane silage used (**Ctrl**, **LHI** and **LBU**). Daily DMI (16.1 kg/d) and the digestibilities of DM (67.1%), OM (71.4%) and NDF (52.5%) did not differ among treatments. Milk yield was 0.8 kg/d higher for LHI treatment compared with Ctrl, and 0.7 kg/d compared to LBU. Treatment LHI tended to increase the lactose concentration (4.47 vs. 4.42%) and plasma glucose (57.9 vs. 55.3 mg/dL) compared to Ctrl treatment. LHI and LBU (67.7%) reduce the acetate proportion of total VFA in rumen fluid compared to Ctrl treatment (70.4%). The acetate propionate ratio was lowered by

LHI compared to Ctrl(3.0 vs. 3.3). Cows fed sugarcane silage inoculated with *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 had reduced acetate to propionate ratio in rumen fluid and tended to produce more milk.

**Key words:** Digestibility, intake, inoculums, milk production, *L. hilgardii*.

## INTRODUCTION

Sugar cane silage have high concentrations of ethanol, derived from the fermentation of soluble carbohydrates by yeast (Kung and Stanley, 1982). The use of microbial inoculants when silage is made is carried out in order to raise the initial population of desirable microorganisms and thus manipulate the fermentation so that there is an intense production of organic acids that may promote rapid drop in pH and control undesirable microorganisms (Muck and Kung Jr., 1997). Different organisms have been used as inoculums in silages, however, the potential of the inoculums response in silage is modulated by the interaction between the culture and the involved microorganism (Muck, 1996). Based on this premise, Ávila et al. (2014) selected from strains of lactic acid bacteria (**LAB**) isolates from sugar cane silage with better potential to be used as inoculants for sugar cane silage. Later, Carvalho et al. (2014) reviewed the profile and aerobic stability of sugar cane silages inoculated with these isolates and found that a strain of *L. hilgardii* CCMA 0170 showed the best results.

Responses in animal performance due to the use of inoculants in silages are quite controversial. Some studies show an increase in milk

production when inoculated silage was supplied (Kung et al., 1993, Taylor et al., 2002, Kung et al., 2003) and others did not detect differences (Kent et al., 1989, Kung et al., 2002, Arriola et al., 2011). The studies differ widely as to the microorganism used as inoculums, ensiled culture and lactation stage of the animal, which may affect the response. To our knowledge, no study has been carried out to evaluate the performance of dairy cows fed sugar cane silage inoculated with an epiphytic strain isolated from the culture itself. The objective of this study was to evaluate the performance and feeding behavior of dairy cows in late lactation fed with sugar cane silage inoculated with an epiphytic strain of *L. hilgardii* UFLA SIL52 (CCMA 0170) isolated by Ávila et al. (2014) from sugar cane and compare the reaction with sugar cane silages inoculated with a commercial strain isolated of temperate grass or without addition of inoculums.

## MATERIALS AND METHODS

### Ensiling

Sugarcane, 12 months old, was mechanically harvested and chopped (JF C120, Pinheiro, Itapira, SP), and ensiled in three bunker silos with 20.0m long x 2.1m width x 0.4m high. Approximately nine tons of sugarcane was ensiled for each one of the three treatments: untreated silage made without use of inoculums (**Ctrl**), silage treated with *Lactobacillus hilgardii* UFLA SIL52 (CCMA 0170) a novel strain that was isolated for Ávila et al. (2014) from sugarcane silage (**LHI**) and silage treated with *L. buchneri* NCIMB 40788 (LBU; Lallemand Animal

Nutrition, Milwaukee, WI). Both inoculants were cultured in a 25ml MRS broth for 24h and then transferred to Erlenmeyer flasks with 225 ml of MRS broth and cultured for an additional 24h. Those steps were repeated until 4.5 liters of cultured broth was obtained. After the final culture, the number of cells was counted, and a population of  $9 \log \text{ cfu ml}^{-1}$  was obtained. At the time of application the culture was mixed with sterile distilled water on the ratio 1:7.2 and 37 liters of the mixed were sprayed manually on the herbage utilizing sprayer manual sprinklers to achieve an inoculation rate of  $5 \log \text{ cfu g}^{-1}$  of forage. Individual sprayers were used for each treatment to avoid contamination. The control treatment received the same amount of sterile distilled water. Silos were compacted by tractor sealed with black-on-white polyethylene plastic film with 200- $\mu\text{m}$ -thick and stored for 35 days before opened.

### **Chemical and Microbial Sugarcane Silage Analyses**

Sugar cane silages were collected weekly to chemical and microbiological analyses. Samples were analyzed for levels of ethanol, 1,2propanediol and lactic, acetic, propionic, and butyric acids by High-performance liquid chromatography (**HPLC**) according to Carvalho et al. (2012) weekly. The acids, ethanol and 1,2-propaneiol were identified by comparing their retention times with those of known standards. The HPLC apparatus (model LC-10Ai, Shimadzu Corp., Tokyo, Japan) was equipped with a dual detection system consisting of a UV detector (UV-VisSPD 10Ai) and a refractive index detector (RID 10A). An ion exclusion column from Shimadzu (Shim-pack SRC-101H; 7.9 mm i.d., 30cm long) operated at 50°C was used for the chromatography separation.

The mobile phase consisted of 100 mM perchloric acid solution with a flow rate of 0.6 ml/min. The acids were detected by UV absorbance (210 nm). Ethanol and 1,2-propanediol were identified using the refractive index detector. Water soluble carbohydrates (**WSC**) were analyzed using the phenol method (Dubois et al., 1956). Sugar cane silage samples collected on the same day were analyzed for microbiological growth. About 70 g of sugar cane silages were mixed with 630 ml of 0.1% sterile peptone water and stirred in an orbital mixer at 120rpm for 20 min. Subsequently 10-fold dilutions were prepared to quantify the different microbial groups. The LAB were enumerated using MRS agar (**Difco**) containing 0.1% cysteine-HCL (Merck, Darmstadt, Germany) and 0.4% cyclohexamide (0.4% Sigma) after anaerobic incubation. The plates were incubated at 30°C for 48 h. Yeast were enumerated on dichloran rose bengal chloramphenicol medium (**Difco**) after incubating the plates at 28°C for 72 h. Only plates containing 30 to 300 cfu were enumerated.

### **Cows, Diets, and Experimental Design**

Cows used in this experiment were cared for and maintained according to a protocol approved by the Lavras University Bioethic Committee in Utilization of Animals. The cows were individually fed twice daily at 0700 and 1400 h *ad libitum* to provide 10% refusal rate in a tie-stall barn with sand bedded and high pressure sprinklers at the Better Nature Research Center, located at Ijaci, Minas Gerais, Brazil. Cows were milked three times per day at 0500, 1300 and 2000 h. Fifteen Holstein cows ( $336 \pm 175$  DIM;  $632 \pm 96$  kg BW at trial initiation) were randomly assigned to replicated 3x3 Latin squares. There were 3 periods of 21 d



with 14 d of adaptation and 7 d of sample collection. Cows were randomly allocated to 1 of 3 possible diets each period that were chemically similar and varied only on the source of sugarcane silages. The diets had 60 % of forage (DM base) and were formulated to contain 30% of forage coming from sugarcane silage and 70% from corn silage without inoculums (Table. 2). The proportion of ingredients in diet dry matter was kept constant by weekly monitoring forages dry matter content with a Koster apparatus (Koster Moisture Tester Inc, Brunswick, OH, USA).

### **Feed Sampling and Analyses**

Offered TMR and refusals were measured on days 13 to 16 of each period. The DMI was calculated as the amount of feed offered minus the orts. Samples from ingredients and refusal diets of each cow were collected frozen and a composite sample was formed for each cow period. Samples of silages were frozen and concentrates were kept at room temperature for later formation of composite sample. The composite samples were dried in a forced-air oven at 55°C for 72 h and ground through a 1mm sieve using a Willey mill (Thomas Scientific, PA, USA). A sub-sample was dried in a forced-air oven at 105°C for 24 h to determine the absolute dry matter content. Samples were analyzed for CP (method 990.03; AOAC, 2006), ether extract (method 2003.05; AOAC, 2006) and ash content through incineration at 550°C for 8 h. The NDF content was determined with a fiber analyzer (TECNAL, Piracicaba, SP, Brazil) according to Van Soest et al. (1991) using heat-stable  $\alpha$ -amylase.

## **Milk Production**

Milk yield was measured on d 13 to 16 and milk samples were collected on d 13 to 15 of each period, 0.5% of milk from each milking were collected and stored in bottles with bronopol preservative. Milk samples were analyzed for fat, protein, lactose, solids and MUN by Fourier transform infrared spectroscopy (NexGen, Bentley Instruments, Minnesota, USA) in the Associação Paranaense de Criadores de Gado da Raça Holandesa laboratory. The ECM was calculated as  $(NE_L = 0.0929 \times \text{fat percentage} + 0.0547 \times \text{protein percentage} + 0.0395 \times \text{lactose percentage (Mcal/kg)}) \times (\text{milk production (kg/d)}) \div 0.70$  (Sjaunja et al., 1990). Actual-milk and ECM feed conversions were calculated using average yield and DMI data. Cows were weighted and scored for body condition after morning milking on d 21 of each period.

## **Digestibilities and Allantoin Excretion**

Total tract apparent digestibilities were measured by total collection of feces on d 18 to 20 by trained personal. Feces were collected concurrent to defecation during three 8-hour sampling periods and weighed. The second and third sampling periods were each delayed by 8 h to avoid a major disturbance to the animals while still representing a 24-h collection period. Fecal aliquots (equal fresh weight basis) were immediately frozen along the collection period and a composite sample was formed. Digestibilities of DM, NDF, OM and Non-NDFOM were calculated. Simultaneously to feces collection, urine was collected in buckets. A 10% sulfuric acid solution was immediately added to the urine

samples (1:9) before refrigeration at 4°C. Composite urine samples were diluted 1:3 with distilled water and frozen at -20°C. Allantoin was analyzed as in Chen and Gomes (1992).

### **Chewing Activity and Eating Behavior**

Eating behavior was evaluated on d 17 of each period. Chewing activity was evaluated by visual observation of the mouth activity of each animal every 5 min for 24 h uninterruptedly. Mouth activities considered were feed ingestion, water ingestion, ruminating and idling. Chewing time in minutes per day was defined as the sum of ingestion time and rumination time. The first meal duration was measured on the same day. A person with a stopwatch registered when each cow started eating after morning feeding and when stopped to eat. The number of meals daily was calculated by the sum of meal intervals. The meals size was calculated as ingestion time divided by number of meals. The proportion of daily intake (fresh matter base) during morning (0700 to 1300 h), afternoon (1300 to 1900 h) and during the night (1900 to 0700 h), and proportion of cows eating per hour were evaluated on d 17 of each period. The intake from each daily period was divided by total intake to calculate the proportions.

### **Rumen and Blood Samples**

Rumen fluid samples were obtained on d 21 of each period for volatile fatty acids determination. Animals were randomly sampled within block. Samples were collected 12 hours after the morning feeding. Rumen fluid sampling was performed by flexible oro-gastric tube. About 1.000 ml was collected and 100 ml was immediately frozen in liquid

nitrogen at -196 °C to stop fermentation and stored at -20°C. The ruminal fluid was measured for volatile fatty acids by HPLC. The fluid was centrifuged (10,000 *g* x 10 min) at 4°C. The same HPLC apparatus and technique used for sugarcane silages analyses were used to measure volatile fatty acids from rumen fluid.

Blood samples were obtained from coccygeal vessels 12hours after morning feeding on d 21 of each period. Samples were collected in vacuum tubes containing potassium fluoride. Plasma were separated by centrifugation (1,000 *x g* for 10 min) and analyzed for glucose by kit (Doles Reagentes, Goiânia, GO, Brazil).

### Statistical Analyses

Data were analyzed with the PROC MIXED procedure of SAS 9.3 (SAS Institute, 2012) statistical package, with the following model:  $Y_{ijk} = \mu + C_i + P_j + T_k + e_{ijk}$  where  $\mu$  = overall mean,  $C_i$  = random effect of cow ( $i = 1$  to 15),  $P_j$  = fixed effect of period ( $j = 1$  to 3),  $T_k$  = fixed effect of treatment ( $k = \text{Ctrl, LHI, LBU}$ ) and  $e_{ijk}$  residual error. Treatments were compared with two contrasts Ctrl vs. LHI and LHI vs. LBU. Significant difference were considered when  $P \leq 0.05$ , trends when  $P \leq 0.10$  to  $P > 0.05$  and weak trends when  $P \leq 0.15$  to  $P > 0.10$ .

The percentage of cows eating per hour were analyzed with the PROC MIXED as repeated measures by time (Littel et al., 2006) with the following model=  $Y_{ijkl} = \mu + C_i + P_j + T_k + H_l + H^*T_{kl} + e_{ijkl}$  where  $\mu$  = overall mean,  $C_i$  = random effect of cow ( $i = 1$  to 15),  $P_j$  = effect of period ( $j = 1$  to 3),  $T_k$  = effect of treatment ( $k = \text{Ctrl, LHI, LBU}$ ),  $H_l$  = effect of

hour (1 to 24),  $H*T_{(kl)}$  = interaction between hour and treatment and  $e_{ijkl}$  = residual error. The mean square for cow nested within treatment was used as the error term to test the treatment effect. The covariance structure used was ar (1) because your smaller value for akayke information criterion. Degrees of freedom were calculated using the Kenward-Rogerooption. Means were determined using the least squares means statement and treatment means were compared using the PDIFF option adjusted for bonferroni. Significant difference were considered when  $P \leq 0.05$ , trends when  $P \leq 0.10$  to  $P > 0.05$  and weak trends when  $P \leq 0.15$  to  $P > 0.10$ .

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The nutritional composition, fermentation profile, microbial profile and the distribution of particle sizes of fresh sugar cane and silage are shown in (Table 1). The nutritional composition between sugar cane silage differed throughout the experiment, except for CP and EE. The concentration of NDF content over the 98 days of storage increased 20.8 percentage points in the Ctrl, while for LHI and LBU silages were 14.3 percentage points, respectively (Table 1). The concentration of the fiber in sugar cane silage is not desirable due to its low digestibility (Corrêa et al., 2003). The inoculants based on *L. hilgardii* UFLA SIL52 (CCMA 0170) and *L. buchneri* (NCIMB 40788) have shown the ability to retain the NFC present in sugar cane, which is mostly comprised of sucrose (Hartt et al., 1963). The decrease in the concentration of NFC in fresh sugar cane up to 98 days after silage (DM basis) was 46.8 % in the Ctrl silage, 20.1% in the LHI silage and 27.9 % in the LBU silage with the same tendency to drop being observed in WSC (Table. 1). The higher

concentration of lactic acid and higher proportion of NFC and WSC in inoculated silage are consistent with the lower concentrations of ethanol and NDF when compared to the Ctrl silage (Table 1), suggesting that there was a lower conversion of soluble sugars into ethanol and thus less loss of DM.

Although the heterofermentative LAB have the ability to produce ethanol, yeasts are the primary microorganisms responsible for the conversion of sucrose into ethanol in sugar cane silage (Kung and Stanley, 1982). The population of yeasts in the Ctrl silage was numerically higher when compared to the inoculated silage (Table 1), which may be the result of lower concentrations of acetic acid which is an acid capable of reducing the growth of yeast (Moon, 1983).

The did not differ among treatments ( $P > 0.15$ ). No statistically effect on the DMD, OMD, NDFD and Non-NDFOMD were observed (Table 4). The LHI treatment had a tendency ( $P = 0.07$ ) to yielded milk production 0.8 compared to Ctrl and a weak tendency ( $P = 0.14$ ) to yielded milk production 0.7 kg d<sup>-1</sup> greater than the LBU treatment. The yields in kg d<sup>-1</sup> of fat, protein, lactose, and total solids were greater in the LHI treatment when compared to the Ctrl ( $P \leq 0.05$ ) and only the production of solids and fats tended weakly ( $P = 0.14$ ) (Table 3) to reduce in the treatment LBU when compared with LHI. Probably this response is related to increased production of milk from animals fed with LHI and the contents of milk compounds suffered no treatment effect ( $P > 0.15$ ). Only the lactose content of the LHI treatment tended weakly ( $P = 0.12$ ) to increase 1.2% compared to the Ctrl treatment (Table 3).

Milk production is very dependent on the lactose synthesis of the mammary tissue, presumably due to its osmoregulatory property (Hongyun Liu et al., 2013), promoting water capture by the tissue (Kleiber et al., 1955) which can capture more than 85% of the glucose circulating in the body of lactating cows (Annison et al., 1964), such as plasma glucose in animals fed with LHI silage tended weakly ( $P = 0.13$ ) to be 5.7 % higher when compared to the Ctrl (Table 5) suggesting that the increased production of lactose resulting from the LHI treatment (Table 2) occurred due to the higher glucose content in the blood, without impacting the lactose content in milk in the same way, probably due to increased milk yield production, diluting the content of the compound in the milk.

The propionate tended ( $P = 0.08$ ) to have higher proportion in the rumen fluid and the acetate / propionate ratio decreased ( $P = 0.05$ ) in the LHI treatment when compared to the Ctrl (Table 6). The highest proportion of propionate in the rumen fluid may have increased the contribution of gluconeogenic substrates in the liver. Propionate is one of the gluconeogenic precursors in the liver of lactating cows (Reynolds et al., 1987). The higher plasma glucose content (Table 5), observed in animals fed with LHI silage may be a consequence of this propionate. Diets containing high additions of NFC are capable of increasing the proportion of propionate in the rumen fluid and consequently reduce the acetate / propionate ratio. The Ctrl treatment showed a lower NFC content than the other treatments (Table 2). The sharp loss of NFC in the Ctrl silage, probably used as a substrate in the ethanol synthesis, may have

caused reductions in dietary NFC, since the inclusion of forage was adjusted weekly based on dry matter content, measured by Koster where the volatile fraction is lost. The lower proportion of propionate in the rumen fluid of animals fed with the Ctrl silage may be a result of this lower concentration of NFC.

The proportion of acetate in the rumen fluid was higher in the Ctrl when compared to LHI ( $P = 0.01$ ) (Table 6). The higher concentration of acetate in the rumen fluid of cows fed with the Ctrl silage may be related to a higher concentration of ethanol. Considering only the ethanol derived from sugar cane silage, the animals fed with the Ctrl treatment, LHI and LBU consumed 308, 209 and 183 g ethanol d<sup>-1</sup> respectively. Durix et al. (1990) found that when ethanol was added in a semi-continuous culture system the first metabolite produced from ethanol was acetate resulting in increased concentrations of the compound in the rumen fluid. The proportion of butyrate in the rumen fluid tended ( $P = 0.07$ ) to increase in the animals fed with LHI silage when compared to the Ctrl (Table 6) which may be a result of the higher concentration of sucrose (Vallimont et al., 2004). Part of the NFC of the diets consisted of sucrose derived from sugar cane silage, which may have promoted the increase of butyrate in the rumen fluid in animals fed with LHI and LBU given that the concentration of NFC in the respective sugar cane silages were higher compared to Ctrl. No differences were observed in the rumen fermentation profile between the inoculated silages (Table 6).

The daily remains were maintained above 10% of that offered and were not different among treatments (Table 7). The number of meals,



meal size and the time of ingestion, rumination and chewing did not differ between treatments ( $P > 0.15$ , Table 7). The duration of the first meal was higher in animals fed with the LHI diet when compared to the Ctrl ( $P = 0.05$ , Table 7). Animals fed LHI and LBU diets stayed for longer periods eating the first meal than the animals fed the Ctrl diet. Short-term consumption regulations which involves satiety appear to be related to the oxidation of substrates in the liver (Allen et al., 2009), while the daily consumption is a function of the animal's energy requirements (NRC, 2001). High availability of propionate in the liver may promote an increase in the intermediates of the Krebs cycle (TCA cycle) oxidizing Acetyl-CoA and producing ATP, the high balance of ATP promotes an increased energy state of hepatocytes generating a satiety stimulus interrupting the meal (Allen et al., 2009). Even though the rumen fluid of animals in LHI and LBU treatments have higher concentrations of propionate (Table 7), these were measured 12 hours after feeding, nonetheless, the LHI and LBU silage had lower concentrations of propionate (Table 1) abling the Ctrl silage to have caused the feeling of satiety faster due to a higher concentration of propionate. The proportion of daily consumption tended ( $P = 0.08$ ) to increase in the period from 0700 to 1300 h in animals fed the LHI diet when compared to Ctrl and reduced in the period from 1900 to 0700 h ( $P = 0.04$ , Table 7). The highest proportion of animals ingesting are observed after delivery of meals, at 0700, 1400 h and at the end of the day at 1700 h (Figure 1). At 0700 h there was a trend ( $P < 0.10$ ) in higher percentage of animals ingesting the LBU diet when compared to the Ctrl. At 1600 h there were less animals ingesting the LBU diet when compared to the Ctrl, with

compensation occurring at 1700 h ( $P \leq 0.05$ ). The proportion of animals consuming the LHI diet at 1400 and 1700 h tended ( $P < 0.10$ ) to differ from the LBU. Only at 1100 h was there a tendency ( $P \leq 0.10$ ) of LHI different from the Ctrl. The change in the feeding behavior of the cows may have been a result of differences related to volatile components of sugar cane silage and or aerobic stability.

## CONCLUSIONS

Sugar cane silage inoculated with epiphytic strain of *L. hilgardii* UFLA SIL52 improve milk yield of dairy cows and changed the ruminal fermentable profile without increase dry matter intake.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the financial support of Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Minas Gerais, Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brazil), and Lallemand Animal Nutrition SAS (Milwaukee, WI).

**LITERATURE CITED**

- Allen, M. S., B. J, Bradford, M, Oba. 2009. The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *J. Anim. Sci.* 87:3317-3334.
- Annison, E. F., J. L, Linzel. 1964. The oxidation and utilization of glucose and acetate by mammary gland of the goat in relation to their over-all metabolism and to milk formation. *J. Physiol.* 175:372-385.
- AOACInternational. 2006.Official Methods of Analysis. 18th ed. Assoc. Off.Anal.Chem. Arlington,VA.
- Arriola, K. J., S. C. Kim, C. R. Staples, and A. T. Adesogan. 2011. Effect of applying bacterial inoculants containing different types of bacteria to corn silage on the performance of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 94:3979-3979.
- Ávila, C. L. S., B. F. Carvalho, J. C. Pinto, W. F. Duarte, and R. F. Schwan. 2014. The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugarcane silage.*J. DairySci.* 97:1-12.
- Carvalho, B. F., C. L. S. Ávila, J. C. Pinto, M. N. Pereira, and R. F. Schwan. 2012. Effects of propionic acid and *Lactobacillus*

- buchneri*(UFLA SIL 72) addition on fermentative and microbiological characteristics of sugarcane silage treated with or without calcium oxide. 2012. Grass and Forage Sci. 67:462-471.
- Chen, M. J and Gomez, X. B. 1995. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives- an overview of the technical details. InternationalFeedResources Unit, 20p.
- Corrêa, C. E S., M. N. Pereira, S. G. Oliveira, and M. Hentz Ramos. 2003. Performance of holstein cows fed sugarcane or corn silages of different grain textures. Sci. Agric. 60:621-629.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.
- Durix, A., C. Jean-Blain, H. P. Sallman, and J. P. Jouany. 1991. Use of a semicontinuous culture system to study the metabolism of ethanol in the rumen and its effects on ruminal digestion. Can. J. Anim. Sci. 71:115-123.
- Hartt, C. E., H. P. Kortschak, Ada J. Forbes and G. O. Burr. 1963. Translocation of C<sup>14</sup> in sugarcane. Physiology and biochemistry

department, experiment station, Hawaiian sugar planters association, Honolulu.127:305-318.

Liu H., K. Zhao, and J. Liu. 2013. Effects of glucose availability on expression of the key genes involved in synthesis of milk fat, lactose, and glucose metabolism in bovine mammary epithelial cells. 2013. PloS ONE. 8(6):e66092. doi:10.1371/journal.pone.0066092.

Kleiber M., A. L. Black, M. A. Brown, C. F. Baxter, J. R. Luick, and F. H. Stadtman. 1955. Glucose as a precursor of milk constituents in the intact dairy cow. *BiochimicaetBiophysicaActa*. 17:252-260.

Kung, L., and R. W. Stanley. 1982. Effect of stage of maturity on the nutritive value of whole-plant sugarcane preserved silage. *J. Anim. Sci.* 54:689-696.

Kung, L., M. R. Stokes, C. J. Lin., 2003. Silage additives.p. 305-360. *In* Silage Sci. and technology. Madison: American Society of Agronomy; Crop Society of America; Soil Society of America.

Littel, R. C., P. R. Henry, and C. B. Ammerman. 1998. Statistical analyses of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim.Sci.* 76: 1216-1231.

Moon, N. J.1983.Inhibition of the growth of acid-tolerant yeast by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *J. Appl. Bacteriol.* 55:454-460.

Muck, R. E and Kung Jr., L. 1997. Effects of silage additives on ensiling. p. 187-199. *In* Silage: field to feedbunk. North American Conf. Hershey, Pennsylvania.

National Research Council. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7<sup>th</sup> rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington D.C.

Reynolds, J. P., G. B. Huntington, and H. F. Tyrrell. 1988. Net metabolism of volatile fatty acid, D- $\beta$ -hydroxybutyrate, nonesterified fatty acid, and blood gasses by portal-drained viscera and liver of lactating holstein cows. *J Dairy Sci.*71:2395-2405.

SAS Institute. 2012. SAS/STAT 9.3 User's Guide. Version 9.3ed, Cary, NC.

Vallimont, J. E., F. Bargo, T. W. Cassidy, N. D. Luchini, G. A. Broderick, and G. A. Varga. 2004. Effects of replacing dietary starch with sucrose on ruminal fermentation and nitrogen metabolism in continuous culture. *J. Dairy. Sci.*87: 4221-4229.

Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.

**Table 1** Chemical composition, fermentation and physical characteristics of sugarcane silages without inoculum (Ctrl) or inoculated with *L. hilgardii* (LHI) or *L. buchneri* (LBU)

Item	Ctrl	LHI	LBU
CP, % of DM	3.5 ± 0.4	3.6 ± 0.3	3.4 ± 0.3
NDF, % of DM	68.6 ± 5.2	64.8 ± 2.5	64.4 ± 2.9
EE, % of DM	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.2	2.2 ± 0.1
Ash, % of DM	3.8 ± 0.8	3.5 ± 0.1	3.4 ± 0.2
NFC <sup>1</sup> , % of DM	21.9 ± 8.2	26.2 ± 3.2	26.5 ± 4.3
DM, % of as fed	29.1 ± 2.2	29.1 ± 0.8	27.4 ± 0.7
WSC <sup>2</sup> , g/kg of DM	81.8 ± 23.4	101.0 ± 17.9	93.5 ± 8.6
Acetic acid, g/kg of DM	11.6 ± 6.8	15.1 ± 8.2	15.1 ± 4.2
Lactic acid g/kg of DM	28.3 ± 5.3	30.7 ± 7.7	32.6 ± 8.2
Propionic acid, g/kg of DM	10.9 ± 2.9	8.5 ± 3.0	8.7 ± 3.1
Butyric acid, g/kg of DM	11.5 ± 3.6	9.7 ± 3.0	10.8 ± 2.6
Ethanol, g/kg of DM	96.7 ± 22.8	66.8 ± 17.2	62.3 ± 13.9
1,2-propanediol, g/kg of DM	0.9 ± 0.8	1.3 ± 0.9	1.5 ± 1.1
pH	3.9 ± 0.07	3.9 ± 0.09	3.9 ± 0.09
Yeast, log cfu/g	3.7 ± 0.7	2.7 ± 1.3	2.5 ± 1.1
LAB, log cfu/g	5.9 ± 0.5	6.2 ± 0.3	5.9 ± 0.4

<sup>1</sup>NFC=100-(CP + NDF + EE + Ash).<sup>2</sup>Water soluble carbohydrates.<sup>3</sup>Particle size determined by Penn State Separator.



**Table 2** Composition of the diets formulated with sugarcane silage without inoculum (Ctrl) or inoculated with *L. hilgardii*(LHI) or *L. buchneri*(LBU)

Item	Ctrl	LHI	LBU
Cornsilage, % of DM	41.4 ± 0.7	41.4 ± 1.0	41.7 ± 1.2
Sugarcane silage, % of DM	19.6 ± 0.7	19.6 ± 0.4	18.7 ± 0.5
Soybean meal, % of DM	15.1 ± 0.3	15.2 ± 0.2	15.4 ± 0.2
Citrus pulp, % of DM	6.8 ± 0.3	6.8 ± 0.2	6.9 ± 0.2
Finely ground corn, % of DM	10.7 ± 0.3	10.7 ± 0.3	10.9 ± 0.2
High moisture corn, % of DM	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1
Mineral and vitamin mix <sup>1</sup> , % of DM	0.37 ± 0.0	0.38 ± 0.0	0.39 ± 0.0
Premix, <sup>2</sup> % of DM	3.14 ± 0.0	3.16 ± 0.0	3.20 ± 0.0
CP, % of DM	14.8 ± 0.5	14.8 ± 0.4	15.2 ± 0.4
NDF, % of DM	38.0 ± 1.1	37.3 ± 0.5	36.7 ± 0.7
NDF from corn silage, % of DM	19.2 ± 0.6	19.2 ± 0.7	19.4 ± 0.8
NDF from sugarcane silage, % of DM	13.4 ± 0.6	12.7 ± 0.4	12.0 ± 0.8
EE, % of DM	3.4 ± 0.04	3.3 ± 0.1	3.5 ± 0.1
Ash, % of DM	6.1 ± 0.3	6.0 ± 0.1	5.9 ± 0.1
NFC <sup>3</sup> , % of DM	37.7 ± 1.5	38.6 ± 0.9	38.7 ± 1.3
DM, % of as fed	38.8 ± 1.0	38.9 ± 0.7	38.2 ± 0.6
Particles <sup>4</sup> >19mm, % of as fed	3.0 ± 0.0	3.0 ± 1.0	3.0 ± 2.0
Particles >8, <19mm, % of as fed	32.0 ± 3.0	34.0 ± 2.0	35.0 ± 2.0
Particles <8mm, % of as fed	65.0 ± 3.0	63.0 ± 4.0	62.0 ± 3.0

<sup>1</sup>Mineral and vitamin mix=18.5% of Ca, 15.0% of P, 3.0% of Mg, 3.0% of S, 240 mg of Co/kg, 3000 mg of Cu/kg, 8000 mg of Mn/kg, 12000 mg of Zn/kg, 90 mg of Se/kg, 180 mg of I/kg; 1.000.000 IU vitamin A/kg; 250.000 IU vitamin D/kg; 6.250 IU vitamin E/kg.

<sup>2</sup>Premix 30.0% of urea 22.8% of limestone, 22.5% of sodium bicarbonate, 10.7% of magnesium oxide, 8.0% of marine algae meal and 6.0% of salt.

<sup>3</sup>NFC=100-(CP + NDF + EE + Ash).

<sup>4</sup>Particle size determined by Penn State Separator.

**Table 3** Performance of dairy cows fed sugarcane silages without inoculum (Ctrl) or inoculated with *L. hilgardii*(LHI) or *L. buchneri*(LBU)

Item	Ctrl	LHI	LBU	SEM	Treat <sup>1</sup>	Ctrl vs. LHI	LHI vs. LBU
DMI, kg/d	16.2	16.0	16.1	0.54	0.92	0.70	0.89
Milk yield, kg/d	18.0	18.8	18.1	1.04	0.15	0.07	0.14
Fat yield, kg/d	0.635	0.685	0.650	0.0401	0.09	0.03	0.14
Protein yield, kg/d	0.600	0.637	0.616	0.0346	0.16	0.05	0.27
Lactose yield, kg/d	0.781	0.845	0.812	0.0525	0.05	0.02	0.19
Solids, kg/d	2.179	2.341	2.239	0.1321	0.05	0.02	0.14
Milk Fat, %	3.62	3.66	3.61	0.125	0.68	0.52	0.41
Milk Protein, %	3.42	3.41	3.40	0.06	0.92	0.74	0.96
Milk Lactose, %	4.42	4.47	4.45	0.069	0.29	0.12	0.56
Milk Solids, %	12.37	12.46	12.39	0.182	0.41	0.22	0.29
ECM, kg/d	17.9	18.8	18.0	1.03	0.11	0.06	0.08
Milk yield/DMI	1.12	1.17	1.13	0.064	0.41	0.22	0.29
ECM/DMI	1.05	1.12	1.07	0.064	0.30	0.15	0.26
MUN, mg/dL	17.2	17.0	17.6	0.48	0.49	0.59	0.23
BCS, 1 to 5	3.3	3.1	3.3	0.11	0.33	0.21	0.19
BW, kg	692	691	660	37.3	0.46	0.96	0.29

<sup>1</sup>Probability value for the effect of treatment and contrasts

**Table 4** Total tract apparent digestibility of nutrients in dairy cows fed sugarcane silages without inoculum (Ctrl) or inoculated with *L. hilgardii*(LHI) or *L. buchneri*(LBU)

Item	Ctrl	LHI	LBU	SEM	Treat <sup>1</sup>	Ctrl vs. LHI <sup>1</sup>	LHI vs. LBU <sup>1</sup>
DMD <sup>2</sup> , %	67.2	67.0	67.0	1.61	0.97	0.84	0.99
OMD <sup>3</sup> , %	71.3	71.2	71.8	1.35	0.93	0.77	0.71
NDFD <sup>4</sup> , %	53.6	51.7	52.3	2.56	0.76	0.47	0.81
Non-NDFOMD <sup>5</sup> , %	81.2	80.0	82.4	2.51	0.66	0.64	0.36

<sup>1</sup>Probability value for the effect of treatment and contrasts.

<sup>2</sup>Dry matter digestibility.

<sup>3</sup>Organic matter digestibility.

<sup>4</sup>Neutral detergent fiber digestibility.

<sup>5</sup>Non-NDF organic matter digestibility.

**Table 5** Plasma glucose and urinary allantoin excretion of dairy cows fed sugarcane silages without inoculum (Ctrl) or inoculated with *L. hilgardii*(LHI) or *L. buchneri*(LBU)

Item	Ctrl	LHI	LBU	SEM	Treat <sup>1</sup>	Ctrl vs. LHI <sup>1</sup>	LHI vs. LBU <sup>1</sup>
Glucose, mg/dL	55.3	57.9	55.9	1.35	0.28	0.13	0.22
Allantoin, mg/d	373	320	354	30.9	0.52	0.27	0.44

<sup>1</sup>Probability value for the effect of treatment and contrasts

**Table 6** Rumen fermentation profile of dairy cows fed sugarcane silages without inoculum (Ctrl) or inoculated with *L. hilgardii*(LHI) or *L. buchneri*(LBU)

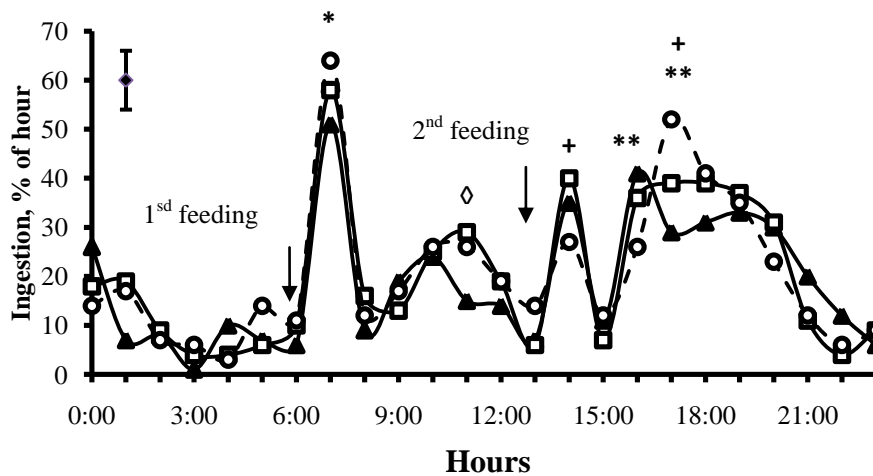
Item	Ctrl	LHI	LBU	SEM	Treat <sup>1</sup>	Ctrl vs. LHI <sup>1</sup>	LHI vs. LBU <sup>1</sup>
Acetate, % of VFA	70.4	67.7	67.7	1.02	0.02	0.01	0.98
Propionate, % of VFA	21.5	22.8	22.2	0.61	0.22	0.08	0.49
Butyrate, % of VFA	8.1	9.4	9.8	0.62	0.06	0.07	0.55
Acetate/Propionate	3.3	3.0	3.1	0.12	0.13	0.05	0.62

<sup>1</sup>Probability value for the effect of treatment and contrasts

**Table 7** Intake pattern and chewing activity of dairy cows fed sugarcane silages without inoculum (Ctrl) or inoculated with *L. hilgardii* (LHI) or *L. buchneri* (LBU)

Item	Ctrl	LHI	LBU	SEM	Treat <sup>1</sup>	Ctrl vs. LHI <sup>1</sup>	LHI vs. LBU <sup>1</sup>
Ingestion, min/d	276	283	289	21.5	0.84	0.57	0.81
Ruminating, min/d	412	409	428	24.6	0.78	0.92	0.52
Chewing, min/d	688	692	717	24.6	0.84	0.86	0.72
First meal, min	30	41	40	4.2	0.05	0.02	0.77
Meal duration, min	28	29	30	1.5	0.47	0.58	0.48
Meals/d	10.6	11.0	10.5	0.61	0.77	0.58	0.49
Intake, % of daily intake							
7000 to 1300 h	25.9	29.5	28.5	1.51	0.19	0.08	0.60
1300 to 1900 h	39.1	41.5	38.9	1.68	0.40	0.27	0.23
1900 to 7000 h	34.8	29.1	32.6	1.98	0.10	0.04	0.18
Orts,% of offered	13.5	11.8	11.2	1.81	0.62	0.50	0.89

<sup>1</sup>Probability value for the effect of treatment and contrasts.



**Figure 1** Proportion of ingestion behavior per hour on treatments sugarcane silages without inoculum (—▲—Ctrl), inoculated with *L. hilgardii* (—□—LHI) or *L. buchneri* (—○—LBU). *P* values: treat= 0.12, hour <0.01 and treat\*hour = 0.68. EPM = 7.0. \*  $P > 0.5 < 0.10$  for Ctrl vs. LBU, \*\* $P < 0.05$  for Ctrl vs. LBU, ◊  $> 0.5 < 0.10$  for Ctrl vs. LHI, + $P > 0.5 < 0.10$  for LHI vs. LBU (Pdiff option).

(VERSÃO PRELIMINAR)

**ARTIGO 2 Response of dairy cows to tifton or sugarcane silage as sources  
of physically effective fiber**

Artigo formatado de acordo com as normas do Journal of Dairy Science.

**RESPONSE OF DAIRY COWS TO TIFTON OR SUGARCANE  
SILAGE AS SOURCES OF PHYSICALLY EFFECTIVE FIBER**

**ABSTRACT**

When diets based on high inclusion of finely chopped corn silage are fed to dairy cows, a source of physically effective fiber is usually required. Sugarcane silage at low inclusion in the diet may be a plausible fiber source in replacement to tropical grass. Performance and feeding behavior of mid lactating dairy cows fed green chopped Tifton 85 or sugarcane silage were evaluated. Twenty-eight individually fed Holstein cows ( $188 \pm 91$  DIM) received a common standardization diet for seven days, were paired blocked based on parity and milk yield, and then assigned to a treatments for 28 days. Response was evaluated during the last week. Treatments Tifton and Sugarcane contained, respectively (% of DM): 39.7 and 40.0% corn silage, 8.9 and 7.7% tifton or sugarcane, 32.9 and 32.3% NDF, 6.9 or 6.2% tifton or sugarcane NDF, 57 and 69% of DM of particle below the 8 mm screen, and 17.4% and 1.8 of DM of particles above the 19 mm screen.

**Key words:** physically effective fiber, feeding behavior, digestibility, rumination

## INTRODUCTION

The majority of Brazilian dairy farms use pull-type, one row forage harvesters for ensilaging corn (Bernardes et al., 2014). In order to achieve kernel damaging, especially with flint type endosperm hybrids (Correa et al., 2002), small theoretical length of cut is usually adopted. Under this scenario, diets with high inclusion of corn silage have reduced physically effective NDF content (Armentano and Pereira, 1997). In such diets, Bermudagrass (*Cynodon spp*), specially the hybrid Tifton-85, is a commonly used fiber source at low dietary inclusion, since this tropical grass has high capacity of capturing nutrients from manure into tissue growth, an environmentally desirable function in confinement dairy systems. However, harvesting tropical grass as hay, haylage, or green chop forage during the rainy season is operationally risky and labor demanding. Sugarcane ensiled once a year during the dry season may be a plausible physically effective NDF source, with management advantages compared to Tifton.

The ensilaging of fresh sugarcane induces a marked increase in forage NDF content as the result of alcoholic yeast fermentation of sugars in the forage (Miranda et al., 2011). Although ground sugarcane has smaller particle size than finely ground corn silage, its low fiber digestibility apparently resulted in similar chewing activity when it completely replaced 200 g per kg of DM of corn silage NDF in the diet of dairy cows, although there were reductions in DMI and lactation performance (Correa et al., 2003). The low fiber digestibility of sugarcane

apparently induces high physical effectiveness of the NDF in the forage (Lima et al., 2012; Sá Neto et al., 2014). In contrast, intensively managed tropical grasses can have high NDF digestibility, in spite of having high NDF content (Lopes et al., 2011), being a plausible source of long fiber in the diet (Castro et al., 2010). The replacement of long Tifton NDF with short particle sugarcane NDF, as a source of physically effective fiber in the diet may be a viable strategy, but the intake and performance responses of dairy cows needs evaluation.

This study evaluated feeding behavior, intake, and lactation performance of dairy cows fed diets containing sugarcane silage or green-chop Tifton, both at low inclusion in the diet.

## **MATERIALS AND METHODS**

The experiment was conducted in an open walled sand bedded tie stall barn with fans and high pressure sprinklers at the Better Nature Research Center, located at Ijaci, Minas Gerais, Brazil (<http://www.holandesflamma.com.br/>). The protocol was approved by the Federal University of Lavras Bioethic Committee in Utilization of Animals (Protocol n° 029/14).

Twenty-eight Holsteins ( $188 \pm 91$  DIM at the beginning of the experiment, 4 primiparous and 24 multiparous) were individually fed a standard diet for 14 d (Covariate period). The TMR was mixed in a stationary mixer and offered twice daily at approximately 0600 h and 1300 h to provide at least 10% refusals. On days 11 to 14 of the standardization period, DMI, milk yield, milk solids content, BW, and



BCS were measured and used as covariate in the statistical model. Cows were paired blocked based on parity and milk yield. Within a block, each cow received a treatment for 28 days and the response was evaluated during the last week. Treatments were: Green chop Tifton-85 (Tifton) or sugarcane silage (Sugarcane) (Table 1).

The Tifton-85 was harvested twice daily before mixing with other ingredients. Harvesting was done with a Pecus 9004 with a PRN 1200 platform equipment (Nogueira Máquinas Agrícolas, São João da Boa Vista, Brazil), without knives to obtain long particle size. Sugarcane, 12 months old, was mechanically harvested and chopped with JF C120 (JF Máquinas Agrícolas, Pinheiro, Brazil), and ensiled in bunker silos. The silage was inoculated with *Lactobacillus hilgardii* UFLA SIL52 and stored for 35 days until opened.

Tifton-85 samples were collected and frozen daily along the experiment and composites were formed per week. Samples of other feed ingredients, mixed diets, and refusals per cow were frozen during days 21 to 28 and composites were formed. Composite samples were dried in forced-air oven at 55°C for 72 h and ground through a 1-mm screen in a Thomas-Willey mill. The DM content was determined by drying at 100°C for 24 h and CP was determined by micro-Kjeldahl analysis (AOAC, 1990). The EE was analyzed according to AOAC (1990) after hydrolysis with hydrochloric acid. Ash was analyzed by incineration at 550°C for 8 h. The NDF was analyzed using a TE-149 fiber analyzer (TECNAL Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, Brazil) with amylase and

sodium sulfide. The composition of forages and concentrates is reported in Table 2.

Temperature of the offered diets was monitored daily during 23 experimental days by *data Loggers* (ESCORT Console Pro 2.07.09), measured continuously at 60-min intervals. Three six liter buckets marked 1 to 3 with legend specifying the treatment, Sugarcane or Tifton, were filled with each one of the two diets and a *data Logger* was placed in the middle of each bucket. Buckets were spread along the feed line, and the feed was replaced each time that a new diet was offered. Simultaneously other three buckets for each treatment right after the first feeding at 0800 am, were filled the same way as described before, *data Loggers* were placed and remained all day long. Thermometers were switched daily between treatments to avoid device effect. Devices allocated in buckets from sugarcane treatment could not repeat the same buckets on the day after and so on. The temperature inside the barn was measured by two *data loggers* at two meters high.

Cows were milked three times per day at 0500, 1300, and 2000 h. Daily DMI and milk yield from d 24 to 28 compared treatments. Milk samples were obtained from each milking and a daily composite was formed. Solids and MUN content were measured (Laboratório Centralizado da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, Curitiba, Brazil) by infrared analysis (Bentley 2000. Bentley Instruments Inc., Chaska, MN). Milk energy secretion (Milk E; Mcal/d) was calculated as:  $[(0.0929 \times \% \text{fat}) + (0.0547 \times \% \text{protein}) + (0.0395 \times \% \text{lactose})] \times \text{kg of milk}$  (NRC, 2001). ECM was calculated as:  $\text{Milk E}/0.70$

(Assumes 0.70 Mcal/kg for milk with 3.7% fat, 3.2% protein, and 4.6% lactose). The BCS (scale of 1 to 5, with 1 being thin and 5 being obese; Wildman et al., 1982) was measured by three trained evaluators on day 28. After the morning milking, BW was also measured at the same day.

Total tract apparent digestibility of DM, OM, NDF, and non-NDF OM was determined on d 25 to 27 by total collection of feces in buckets by trained personal. Feces were collected concurrent to defecation during three 8-hour sampling periods and weighed. The second and third sampling periods begun 8 hours later than the previous sampling, to avoid a major disturbance to the animals while still representing a 24-h collection period. Fecal aliquots (equal fresh weight basis) were immediately frozen during the collection period and a composite sample was formed. Total urinary output was collected in buckets, simultaneously to fecal sampling, to estimate rumen microbial synthesis based on purine derivate excretion. A 10% sulfuric acid solution was immediately added to the urine samples (1:9) before refrigeration at 4°C. Composite urine samples were diluted 1:5 with distilled water and frozen at -20°C. Allantoin was analyzed as described by Chen and Gomes (1992).

Chewing activity was measured on day 24 by continuous observation of buccal activity of each cow at 5 min intervals for 24 h. Buccal activities recorded were: water ingestion, feed ingestion, rumination, and idleness. Chewing time, in min per d, was the sum of rumination and ingestion times. Chewing, ingestion and rumination per unit of DMI and undigested NDF intake (uNDFI) were calculated. On

days 24 to 26 the duration of the first daily meal was measured with a chronometer.

Feed sorting was evaluated on day 25 according to Leonardi & Armentano (2003). The proportion of particles above the 19 mm and 8 mm screens and below the 8 mm screen of the Penn State Particle Separator was evaluated at 0700 h and 1300 h for the offered TMR and at 1300, 1900, and 0700 h for refusals. Sorting values for each screen were: selective refusal for values below 100%, preferential intake for values above 100%, and no selection for values equal to 100%. The proportion of the daily intake between 0700 and 1300 h, 1300 and 1900 h, and 1900 and 0700 h were measured.

Blood samples from the coccygeal vessels were obtained on day 28 to determine plasma urea nitrogen (PUN) and glucose. Plasma glucose content was measured on blood samples obtained 12 h post feeding with vacutainer tubes containing EDTA and potassium fluoride and analyzed with a laboratory kit (Glicose Enzimática Líquida. Doles Reagentes para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brazil). Samples for PUN were obtained immediately before the first daily feeding and at 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, and 18 h after feeding. The blood, collected in vacutainer tubes containing EDTA, was immediately refrigerated, centrifuged at 2,118 x g for 10 min, and the plasma was frozen at -20°C. The PUN content was analyzed with a laboratory kit (Urea 500. Doles Reagentes para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brazil).

### *Statistical analysis*

Data was analyzed with the PROC MIXED of SAS 9.3 (SAS Institute, 2012). The model contained the continuous covariate effect, the random effect of block (1 to 14), and the fixed effect of treatment (Tifton, Sugarcane). For data obtained over time, to the previous model, without the covariate effect, was added the fixed effect of time and its interaction with treatment. The mean square for cow nested within treatment was the error term to test the treatment effect. The best covariance structure was defined by the Akaike's information criterion among autoregressive, compound symmetry or unstructured. For variables measured once, the model was block and treatment. Diet temperature data over time was analyzed with a model that contained the fixed effects of day (1 to 23) and treatment, the interaction of day and treatment, the fixed effect of hour (0800 am to 0500 am), and the interaction of treatment and hour. The mean square for bucket nested within the interaction of day and treatment was used as the error term to test the treatment and day effects. Statistical significance, trends, and weak trends were considered at  $P \leq 0.05$ ,  $P > 0.05$  to  $P \leq 0.10$ , and  $P > 0.10$  to  $P \leq 0.15$ , respectively.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The ingested diets had 8.9% and 7.7 % (DM basis) Tifton-85 and sugarcane, respectively representing 21% and 20 % of the NDF on the diet (Table 1). This small difference is because the daily chopped Tifton showed variations in its composition, mainly in DM, CP and NDF, throughout the experimental weeks (Table 2). The Tifton treatment diet showed greater particle size, with 43 % of diet DM above 8 mm screen,

while Sugarcane treatment diet had 31 % above the 8mm screen (Table 2). The Sugarcane treatment showed a weak tendency ( $P = 0.12$ , Table 3) to reduce DMI and NDFI. The NDFI as a percentage of body weight and intake of  $\text{NDF}_{>8}$  were higher for Tifton treatment than Sugarcane treatment (1.15 % and 4.0 kg/d vs 1.05 % and 2.7 kg/d, respectively) ( $P < 0.01$ , Table 3). This results suggests that the intake depression by sugarcane is not related only to NDFI as a percentage of body weight, as proposed by Mertens (1997) and the higher  $\text{NDFI}_{>8}$  was not responsible for intake regulation in the Tifton treatment, as proposed by Zebeli et al. (2012). When substitutions of sugarcane replaced corn silage there was a linear drop in intake (Magalhães et al., 2004), suggesting that the depression in intake might be a consequence of low sugarcane NDF digestibility (Corrêa et al., 2003). Although statistically difference was not proved the uNDFI were numerically high for Sugarcane treatment (Table 3), resulted of the high uNDF diet contend (Table 1). The NDFD weakly tended to increase 5.7 units for Tifton treatment diet ( $P = 0.12$ , Table 4). This difference can allow a 0.97 kg/d increase in intake according to Oba and Allen (1999). Similar to the actual difference observed in this work (Table 3). The uNDFI as percentage of BW were equal between treatments (0.53 %). Based on this results DMI seems to be physically regulated by the uNDF as % of BW. The DOMI tended ( $P = 0.09$ , Table 10) to be greater in the Tifton treatment, probably because the greater DMI, since there was no difference in OMD (Table 11).

Feed efficiency calculated as milk/DMI had a weak tendency ( $P = 0.11$ , Table 10) to be greater for the Sugarcane than the Tifton treatment,

as a result of the same milk yield, and a lower DMI in the Tifton treatment. The tendency for greater DOMI for the Tifton treatment might have resulted in improved BCS ( $P = 0.11$ , Table 3), because cows have already passed peak production, and milk production was not affected by treatment. Milk yield, milk components and feed efficiency calculated as ECM/DMI were not affected by treatment ( $P > 0.15$ , Table 3). Despite numerically higher plasma glucose, plasma glucose and allantoin did not differ significantly between treatments.

The Sugarcane diet had 0.5 % urea in its formula to achieve the same CP that Tifton diet did (Table 1). PUN tended ( $P = 0.09$ ) to be higher for the Sugarcane treatment, and there was no interaction between treatment and time ( $P = 0.55$ , Figure 1). Plasma urea nitrogen peaked three hours after the first feeding, in agreement with the findings of Santos et al. (2011). Fast hydrolysis of urea to ammonia in the rumen and ammonia's passive passage through rumen epithelium (Aschenbach et al., 2013) might have resulted in higher PUN of cows fed the Sugarcane diet. Although there was no statistically difference on MUN (Table 3), the nitrogen not excreted in milk must be metabolized to urea in the liver. This urea can move back to rumen by saliva or are excreted with urine which may cause an environmental damage if an inappropriate attention are given.

Sugarcane treatment tended to reduce ingestion and ruminating time by 15.1 % and 8.8 %, respectively ( $P = 0.09$  and  $0.08$ , Table 5). The tendency for lower ingestion time is in agreement with less time spent ingesting feed per unit of DMI by cows fed the sugarcane diet, probably

because dairy cows eat diets with reduced particle size more quickly (DeVries et al., 2007). Greater DMI and particle size of Tifton diet might have resulted in greater ruminating time according to Tafaj et al. (2006). Lower NDF digestibility of sugarcane may not be enough to compensate for smaller particle size to stimulate rumination. The lower sugarcane NDF digestibility was not effective to stimulate rumination as Tifton diets with greater particle size did (Table 1).

The Tifton treatment promoted greater chewing time ( $P = 0.03$ , Table 4). Probably this response resulted of higher particle size of the diet, higher intake, and higher proportion of particles above 8mm (Table 1). This results suggests that chewing is mainly stimulated by fiber physically attributes than diet NDF contend alone, since both diets were similar in NDF. There was no difference in chewing per unit NDFI between treatments (Table 4). However, there was a tendency for greater chewing time per unit of DMI (38 vs 34 min/kg DMI) ( $P = 0.08$ , Table 4). The greater physical effectiveness of Tifton diet seems to be correlated with the high peNDF of the treatment according to Bauchemin et al. (2003) and Kononoff et al. (2003).

There was an increase in the temperature of the Sugarcane compared to Tifton diet after 1800 h when the diet were not replaced at second feeding time ( $P < 0.05$ , Figure 3) and only after 2200 h when the diet were replacement ( $P < 0.05$ , Figure 2). The increase in temperature might have contributed to the fewer meals ( $P = 0.05$ , Table 4) on cows fed Sugarcane treatment compared with Tifton. Increase in the diet temperature in relation to the environment temperature are an indicator of



aerobic instability (Kung Jr et al., 1998) which results in lower dry matter intake (Dekoa et al., 1982). The drop in temperature inside the *tie stall* barn after 1700 h pull the Tifton diet temperature down but the same effect was not observed for Sugarcane diet. This data suggests that diets with green chopped Tifton are more stable than diets with sugarcane silages. Higher temperatures of the sugarcane diet may be a result of specifically aerobic microorganism activity as epiphytic yeasts strain usually found in sugarcane silages (Ávila et al., 2010).

The average proportion of cows eating through the day was 25.8 % for the Tifton treatment and 20.8 % for Sugarcane treatment ( $P = 0.03$ ), and at 1200, 1500 and 1800 h the proportion of cows eating the tifton diet was greater ( $P < 0.05$ , Figure 4). The Sugarcane treatment had a higher intra-meal interval ( $P = 0.01$ , Table 4). We suppose that reticulo-rumen filling of animals fed sugarcane diet, which have lower NDF digestibility, resulted in fewer cows eating throughout the day. A greater proportion of cows eating after feedings and at the end of the day was observed for both treatments.

Daily orts were 10.5% and 10.6 % of offered feed for Tifton and Sugarcane treatments, respectively. There was preferential sorting for 19 mm screen by both treatments at 0700 to 1300 h and 1300 to 1900 h (Table 5). This found are not in agreement with Kononoff et al. (2003b), which suggests that particle above 19 mm are the most effective at stimulating chewing, but they are also most sorted out. During the same period of time, cows fed the sugarcane diet sorted in favor of the 8 mm screen ( $P = 0.01$ ) while cows fed Tifton diet did not show sorting

behavior for 8mm screen (Table 5). The lower particle size of the Sugarcane diet (Table 1) might be responsible for preferential sorting for 8 mm screen, in an attempt to compensate for the lower availability of particles above the 19 mm screen.

### **CONCLUSION**

Sugarcane silage, even at a low inclusion rate, tended to depress dry matter intake and ruminating time, suggesting reduction in particle size reduces ruminating time even for forage sources with low digestible fiber.

## REFERENCES

- Armentano L.E. and M. N. Pereira. 1997. Measuring the effectiveness of fiber by animal response trials. *J. Dairy Sci.* 80:1416-1425.
- Aschenbach, J. R., G. B. Penner, F. Stumpff and G. Gäbel. 2011. Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *J. Anim. Sci.* v.89:1092-1107.
- Ávila, C. L. S., C. E. C. Bravo Martins and R. F. Schwan. 2010. Identification and characterization of yeast in sugarcane silages. *App. Microbiol.* v.109:1677-1686.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15<sup>th</sup> ed. Assoc. Off. Anal. Chem. Arlington, VA.
- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang and L. M. Rode. 2003. Effects of particle size of alfalfa-based dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production. *J. Dairy Sci.* v.86:630-646.
- Bernardes, T. F. and A. C. do Rêgo. 2014. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. *J. Dairy Sci.* v.97:1852-1861.

- Castro, J. J., J. K. Bernard., N. A. Mullis and R. B. Eggleston. 2010. Brown midrib corn silage and Tifton 85 bermudagrass in rations of early-lactation cows. *J. Dairy Sci.* v.93:2143-2152.
- Chen, X. B., and M. J. Gomes. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: An overview of technical details. *Int. Feed Res. Unit, Occasional Publ. Rowett Research Institute, Aberdeen, United Kingdom.*
- Correa, C. E. S., R. D. Shaver, M. N. Pereira, J. G. Lauer and K. Konh. 2002. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. *J. DairySci.* v.85:3008-3012.
- Correa, C. E. S., M. N. Pereira, S. G. Oliveira and M. H. Ramos. 2003. Performance of holstein cows fed sugarcane or corn silages of different grain textures. *Sci. Agric.* v.60:621-629.
- Dekoa, K., T. Bando, T and M. Okamoto. 1982. Effect of aerobic deterioration of corn silage on rumen fermentation, ruminating behavior and digestibility by sheep. *Bull. Shitoku Anim. Husb. Exp. Stn.* v.12:19-25.

- DeVries, T. J., K. A. Beauchemin and M. A. G. VonKeyserlingk. 2007. Dietary forage concentration affects the feed sorting behavior of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* v.90:5572-5579.
- Kononoff, P. J., A. J. Heinrichs and H. A. Lehman. 2003. The effect of corn silage particle size on eating behavior, chewing activities, and rumen fermentation in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* v.86:3343-3353.
- Kung, L. Jr., A. C. Sheperd, A. M. Smagala, K. M. Endres, C. A. Bessett, N. K. Ranjit, and J. L. Glancey. 1988. 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.* v.81:1322-1330.
- Leonardi, C and L. E. Armentano. 2003. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. *J. DairySci.* v.86:557-564.
- Lima, M. L. M., E. R. Carvalho, W. R. S. Mattos, L. G. Nussio, F. G. F. Castro and A. G. Amaral. 2012. Comparação da fibra em detergente neutro de forragens: comportamento ingestivo e cinética ruminal. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias.* v.7:535-542.

- Lopes, F. C. F., D. S. C. Paciullo, E. F. Mota, J. C. Pereira, A. A. Azambuja, A. C. S. Motta, G. S. Rodrigues and A. C. A. Duque. 2011. Composição química e digestibilidade ruminal *in situ* da forragem de quatro espécies do gênero *Brachiaria*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v.62:883-888.
- Magalhães, A. L. R., J. M. S. Campos, S. C. Valadares Filho, R. A. Torres, J. M. Neto and A. J. Assis. 2004. Cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho em dietas para vacas em lactação: desempenho e viabilidade econômica. R. Bras. Zootec. v.33:1292-1302.
- Mertens, D. R. 1997. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. J. Dairy Sci. v.80:1463-1481.
- Miranda, D. C. L., G. S. Dias Júnior, F. Lopes, R. A. N. Pereira and M. N. Pereira. 2011. Composition and pH of sugarcane silage with chemical and microbiological additives. Rev. Ci. Agra. v.54:122-130.
- National Research Council. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7<sup>th</sup> rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington D.C.

Oba, M and M. S. Allen. 1999a. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. *J. Dairy Sci.* v.82:589-596.

Sá Neto, A., A. W. Bispo, D. Junges, A. K. Bercht, M. Zopollatto, J. L. P. Daniel and L. G. Nussio. 2014. Exchanging physically effective neutral detergent fiber does not affect chewing activity and performance of late lactation dairy cows fed corn and sugarcane silages. *J. Dairy Sci.* v.97:1-9.

Santos, J. F., G. S. Dias Júnior, L. L. Bitencourt and M. N. Pereira 2011. Resposta de vacas leiteiras à substituição parcial de farelo de soja por ureia encapsulada. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.63:423-432.

SAS Institute. SAS/STAT 9.3 User's Guide. Version 9.3.ed, Cary, NC. 2012.

Tafaj, M., Q. Zebeli and A. Maulbetsch et al. 2006. Effects of fibre concentration of diets consisting of hay and slowly degradable concentrate on the fermentation patterns and digesta particle size in

the rumen of mid-lactation dairy cows. *Arch. Anim. Nutr.* v.60:254-266.

Wildman, E. E., G. M. Jones, P. E. Wagner, R. L. Boman, H. F. Troutt, and T. N. Lesch. 1982. A dairy-cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65:495-501.

Zebeli, Q., J. R. Aschenbach, M. Tafaj, J. Boguhn, B. N. Ametaj and W. Drochner. 2012. Invited review: role of physically effective fiber and estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. *J. Dairy Sci.* v.95:1041-1056.



**Table 1** Composition of the diets during the covariate period and on treatments Tifton or Sugarcane

	Covariate	Tifton	Sugarcane
Ingredient, % of DM			
Corn silage	40.2	39.7	40.0
Sugarcane silage			7.7
Green chop Tifton-85	8.2	8.9	
Soybean meal	19.2	20.4	20.5
Finely ground mature corn	21.1	20.4	20.6
Citrus pulp	8.5	8.2	8.2
Urea			0.5
Premix <sup>1</sup>	2.8	2.5	2.5
Nutrients, % of DM			
CP	16.0	15.0	15.6
NDF	31.9	32.9	32.3
Forage NDF		23.0	23.3
Tifton-85 NDF		6.9	
Sugarcane NDF			6.2
NDF>8mm		18.2	13.9
uNDF <sup>2</sup>		14.9	16.9
EE	3.6	3.5	3.1
Ash	6.8	6.5	6.4
NFC <sup>3</sup>	45.3	42.1	42.6
Particle size distribution, % of diet			
Feed particles >19mm, as fed basis		20.7	2.1
Feed particles 8-19mm, as fed basis		26.3	31.6
Feed particles <8mm, as fed basis		53.0	66.3
Feed particles >19mm, DM basis		17.4	1.8
Feed particles 8-19mm, DM basis		25.6	29.2
Feed particles <8mm, DM basis		57.0	69.0
DM, % of as fed	39.1	40.6	41.7

<sup>1</sup>Premix: 28% limestone, 28% sodium bicarbonate, 12% magnesium oxide, 8% NaCl, 8% ground algae skeletons, and 16% minerals and vitamins (18.5% of Ca, 15.0% of P, 3.0% of Mg, 3.0% of S, 240 ppm of Co, 3000 ppm of Cu, 8000 ppm of Mn, 12000 ppm of Zn, 90 ppm of Se, 180 ppm of I; 1.000.000 IU/kg Vit A; 250.000 IU/kg Vit D; 6.250 IU/kg Vit E).

<sup>2</sup>Undegested NDF

<sup>3</sup>NFC=100 - (CP + NDF + EE + Ash).

**Table 2** Composition of feedstuffs (% of DM)

	DM <sup>1</sup>	CP	NDF	EE	Ash	NFC <sup>2</sup>
Corn silage	25.6	8.0	52.0	3.8	4.4	31.8
Sugarcane silage	26.8	3.5	72.7	2.1	3.6	18.1
Green chop Tifton-85						
-Week 1	21.6	15.8	67.7	2.5	6.8	7.2
-Week 2	22.6	15.5	68.9	2.4	6.7	6.5
-Week 3	25.4	15.2	69.4	2.5	7.0	5.9
-Week 4	23.8	14.9	69.4	2.4	7.0	6.2
Citrus pulp	86.7	6.6	28.5	3.1	7.8	53.5
Soybean meal	87.4	40.3	15.9	2.8	5.6	35.4
Finely ground mature corn	86.7	7.7	12.4	4.2	1.0	74.7

<sup>1</sup>% of as fed.<sup>2</sup>NFC=100 - (CP + NDF + EE + Ash)**Table 3** Total tract apparent digestibility on treatments Tifton or Sugarcane

	Tifton	Sugarcane	SEM	<i>P</i>
DMD <sup>1</sup>	74.5	71.9	1.31	0.17
NDFD <sup>2</sup>	54.1	48.4	2.45	0.12
OMD <sup>3</sup>	76.7	74.5	1.06	0.16
nNDFOMD <sup>4</sup>	88.7	88.2	0.72	0.71

<sup>1</sup>DM digestibility<sup>2</sup>NDF digestibility<sup>3</sup>OM digestibility<sup>4</sup>Non-NDF OM digestibility

**Table 4** Chewing activity, ingestion behavior, and proportion of daily intake in periods of the day on treatments Tifton or Sugarcane

	Tifton	Sugarcane	SEM	<i>P</i> treat
Ingestion, min/d	383	325	23.1	0.09
Ruminating, min/d	450	410	15.9	0.08
Chewing, min/d <sup>1</sup>	833	735	29.0	0.03
Ingestion, min/kg DMI	18	15	1.1	0.14
Ruminating, min/kg DMI	21	19	1.0	0.28
Chewing, min/kg DMI	38	34	1.9	0.08
Eating, min/kg NDFI	54	47	3.3	0.16
Ruminating, min/kg NDFI	63	59	3.1	0.38
Chewing, min/kg NDFI	117	106	5.2	0.16
Firstmealduration, min	44	42	3.7	0.82
Meal size, min	26	25	2.1	0.86
Intrameal interval, min	72	89	5.3	0.01
Meals/d	15	13	0.6	0.05
0700 to 1300 h,% of daily intake <sup>2</sup>	38	35	1.5	0.12
1300 to 1900 h,% of daily intake <sup>3</sup>	39	41	1.4	0.21
1900 to 0700 h,% of daily intake <sup>4</sup>	23	24	1.3	0.62

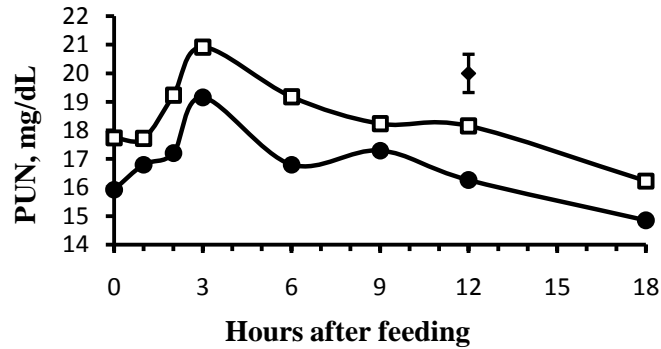
<sup>1</sup>Ingestion + Rumination<sup>2</sup>Intake from 0700 h to 1300 h<sup>3</sup>Intake from 1300 h to 1900 h<sup>4</sup>Intake from 1900 h to 0700 h

**Table 5** Selection index in periods of the day on treatments Tifton or Sugarcane

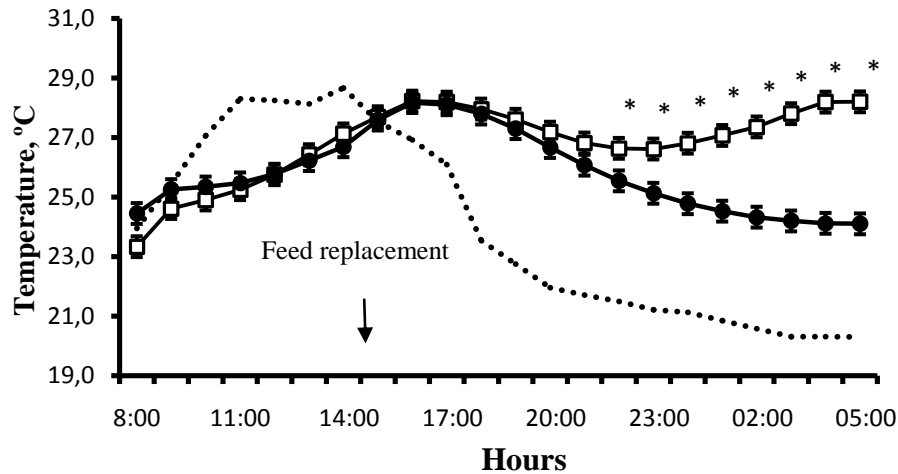
	Tifton	Sugarcane	SEM	<i>P</i>
0700 to 1300 h	Observed/Predicted <sup>1</sup>			
>19mm <sup>2</sup>	129	135	6.3	0.47
8-19mm	103	116	2.7	0.01
<8mm	90	88	2.4	0.67
1300 to 1900 h				
>19mm	140	146	10.8	0.66
8-19mm	100	115	4.0	0.01
<8mm	93	87	4.6	0.36
1900 to 0700 h				
>19mm	102	89	6.1	0.16
8-19mm	97	99	1.9	0.42
<8mm	102	100	1.3	0.39
Orts, % of offered DM	10.5	10.6	0.8	0.90

<sup>1</sup><100% = rejection, >100% = preferential intake, =100% = no selection.

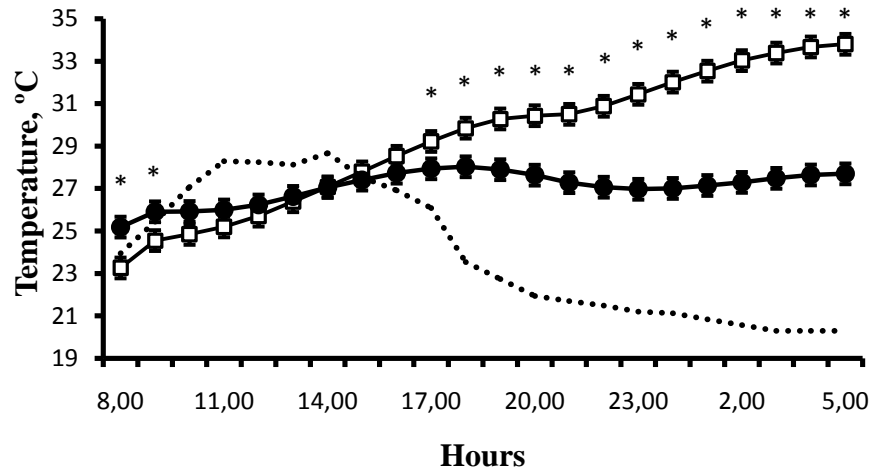
<sup>2</sup>Diameter of sieves of the Penn State Particle Separator.



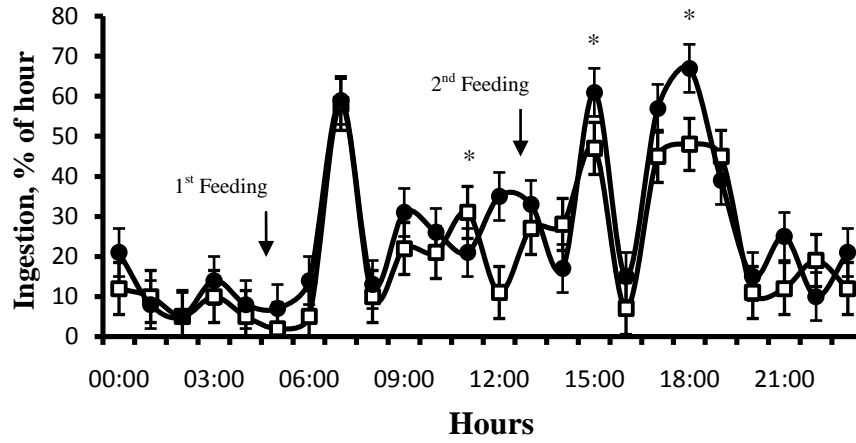
**Figure 1** Plasma urea nitrogen (PUN) along the day on treatments Tifton (—●—) or Sugarcane (—□—). *P* values: Treat = 0.09, Hour < 0.01, Treat\*Hour = 0.55. EPM=0.67.



**Figure 2** Temperature of the diet in buckets on treatments Tifton (—●—) or Sugarcane (—□—) with diets replaced at feeding time. The dotted line (.....) is the temperature inside the tie stall. *P* values: Treat < 0.01, Hour < 0.01, and Treat\*Hour < 0.01. EPM = 0.30. Asterisks *P* < 0.05 (Slice option).



**Figure 3** Temperature of the diet in buckets on treatments Tifton (—●—) or Sugarcane (—□—) without diet replacement at feeding time. The dotted line (.....) is the temperature inside the tie stall. *P* values: Treat < 0.01, Hour < 0.01, and Treat\*Hour < 0.01.EPM = 0.48. Asterisks *P* < 0.05 (Slice option).



**Figure 4** Proportion of ingestion behavior per hour on treatments Tifton (—●—) or Sugarcane (—□—). *P* values: Treat = 0.03, Hour < 0.01, and Treat\*Hour = 0.15. EPM = 6.0. Asterisks *P* < 0.05 (Sliceoption).

(VERSÃO PRELIMINAR)