

Inoculação microbiana da silagem de alfafa (*Medicago sativa*) e seu efeito sobre o consumo de matéria seca e sobre a fermentação ruminal em bovinos

Silvio Manginelli, Vanessa Jaime de Almeida Magalhães e Paulo Henrique Mazza Rodrigues*

Departamento de Nutrição e Produção Animal, FMVZ, Universidade de São Paulo, Av. Duque de Caxias Norte, 225, 13.635-900, Pirassununga, São Paulo, Brasil. *Author for correspondence. e-mail: pmazza@usp.br

RESUMO. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da inoculação microbiana da alfafa (*Medicago sativa*) para ensilagem sobre o consumo de matéria seca, fermentação ruminal e taxa de passagem de líquidos em bovinos. Doze vacas não-gestantes e não-lactantes foram distribuídas em um delineamento em blocos, e os tratamentos corresponderam à silagem pré-secada de alfafa (60% de MS e 19,5% de PB) controle ou inoculada com o produto Silobac® (*Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*). A dieta experimental continha 50% de silagem de alfafa e 50% de concentrado. O experimento teve duração total de 21 dias, sendo o 21º dia utilizado para colheitas de líquido ruminal realizadas às 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 12h, após a 1ª refeição. A inoculação microbiana da silagem de alfafa não alterou o consumo de MS (inoculada = 2,56 vs. controle = 2,39% PV), o pH do líquido ruminal (6,15 vs. 6,27), a concentração ruminal de N-NH₃ (19,0 vs. 18,2mg/dl), a concentração total de AGVs (122,5 vs. 113,8mM) ou a proporção molar de ácido acético (66,1 vs. 66,8% molar), propiônico (21,1 vs. 19,6% molar) e butírico (12,8 vs. 13,6% molar). Parâmetros relativos à dinâmica líquida ruminal, como o volume líquido (59,5 vs. 63,4 litros) e a taxa de passagem de líquidos (8,6 vs. 8,0%/h), também não foram alterados com a inoculação.

Palavras-chave: ácidos graxos voláteis, bactérias lácticas, inoculante, ruminantes.

ABSTRACT. Microbial inoculation of alfalfa silage (*Medicago sativa*) and its effect on dry matter intake and ruminal fermentation in bovines. The objective of this study was to evaluate the effects of microbial inoculation of alfalfa (*Medicago sativa*) for ensiling on dry matter intake, ruminal fermentation and liquid passage rate in twelve non pregnant dry cows. A randomized block design was used and the treatments were alfalfa haylage control (60% DM and 19.5% CP) or inoculated with Silobac® product (*Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*). Experimental diet contained 50% of alfalfa silage and 50% of concentrate. Experimental period lasted for twenty-one days; the 21st day was used for ruminal liquid sampling at 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 hours after the first meal. Microbial inoculation of alfalfa silage did not influence DM intake (inoculated = 2.56 vs. control = 2.39% BW), pH (6.15 vs. 6.27), NH₃-N content of ruminant liquid (19.0 vs. 18.2mg/dl), total VFA concentration (122.5 vs. 113.8mM) or molar proportion of acetic (66.1 vs. 66.8% molar), propionic (21.1 vs. 19.6% molar) and butyric acid (12.8 vs. 13.6% molar). Neither ruminal liquid volume (59.5 vs. 63.4 litres) nor liquid passage rate of ruminal (8.6 vs. 8.0%/h) were influenced by inoculation.

Key words: volatile fatty acids, lactic acid bacteria, inoculant, ruminants.

Introdução

Os métodos de conservação da alfafa vêm se tornando bastante populares, na forma ensilada principalmente, devido ao seu alto rendimento de matéria seca e conteúdo de proteína bruta (Brouk e Belyea, 1993). Apesar de apresentar alto valor nutritivo, são encontradas características indesejáveis para o adequado processo de fermentação da alfafa.

O momento ideal do corte da alfafa é quando 10% dos perfilhos se apresentam floridos. Entretanto,

nesse estágio, a planta apresenta poder tampão elevado, baixos teores de carboidratos solúveis, alto teor protéico, além do caule tubular e oco, que impedem a completa retirada do ar (McAllister *et al.*, 1998). Segundo McDonald *et al.* (1991), forrageiras que, como a alfafa, possuem alto conteúdo protéico, baixo conteúdo de carboidratos solúveis e grande poder tampão são mais aptas a sofrerem elevada proteólise durante o processo de ensilagem.

A microbiota que está presente naturalmente nas forrageiras é responsável pela fermentação da

silagem e também influencia a eficiência da inoculação microbiana (McDonald *et al.* 1991). Mudanças esperadas com a inoculação na silagem incluem rápido declínio do pH, diminuição da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) por causa da inibição da proteólise, decréscimo nos níveis de acetato e butirato e aumento no conteúdo de ácido láctico (Kung Junior *et al.*, 1984).

Os efeitos da inoculação microbiana na ensilagem de alfafa são bastante variáveis (Bolsen *et al.*, 1989; Muck e Bolsen, 1991). Em alguns estudos, a inoculação produziu pequena melhora na qualidade da silagem (Gordon, 1989a), mas, em muitos outros, tem produzido uma maior eficiência fermentativa, com redução das perdas de MS, melhorando com isso a digestibilidade (Rice *et al.*, 1990) e aumentando o crescimento dos animais, ou ainda, em outros estudos, aumentando a produção leiteira (Gordon, 1989b). Entretanto, segundo Kennedy (1990), Phillip *et al.* (1990) e Fredeen *et al.* (1991), os inoculantes demonstraram não melhorar significativamente a preservação da silagem ou o desempenho animal, ou então melhoraram muito pouco (Fredeen *et al.* 1991). Cai e Ohmomo (1995) chegaram à conclusão de que o tratamento combinado de bactéria ácido-láctica e celulase não melhorou a qualidade da fermentação da silagem.

Foram objetivos do presente estudo avaliar os efeitos da inoculação microbiana da silagem de alfafa sobre o consumo de MS, fermentação ruminal e taxa de passagem de líquidos em bovinos.

Material e métodos

O experimento foi realizado no Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no *Campus* Administrativo de Pirassununga, Estado de São Paulo.

A cultura de alfafa foi cortada em dezembro de 2000, quando em estágio do meio do florescimento. Após colhido e pré-seco por 4 horas, o material original foi pesado e acondicionado em fardos com aproximadamente 150cm de altura e 150cm de diâmetro (capacidade de 600kg), revestidos com película de PVC branca. Aproximadamente 600kg de massa úmida foram colocados em cada silo, correspondendo a uma compactação de aproximadamente 230kg de silagem/m³. Os silos foram mantidos fechados por 100 dias, expostos às intempéries. Os silos foram divididos em dois tratamentos, um controle e outro com adição do inoculante comercial Silobac® (Chr. Hansen Indústria e Comércio Ltda.), por meio da pulverização do material no momento do enfardamento, segundo as recomendações do fabricante. De acordo com tais recomendações, o produto fornece 1,0 x 10⁵ unidades

formadoras de colônia (*Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*) por grama de forragem.

Para o ensaio de fermentação ruminal, foram utilizadas doze fêmeas bovinas mestiças não-lactantes e não-gestantes, portadoras de cânulas ruminais, com aproximadamente 640kg de peso vivo no início do experimento. O delineamento experimental foi em blocos casualizados (Pimentel Gomes, 1985) formados em função do peso dos animais, e os tratamentos formados pelas silagens-controle ou inoculada na proporção de 50% concentrados e 50% de volumosos na dieta (Tabela 1). A ração foi fornecida em duas refeições, às 8h e às 16h, sendo a silagem oferecida juntamente com o concentrado, permitindo-se 15% de sobras.

Tabela 1. Proporções de ingredientes utilizados e composição bromatológica das rações, com base na matéria seca

Ingredientes (%)	Tratamentos	
	Controle	Inoculada
Silagem de alfafa	50,0	-
Silagem de alfafa inoculada	-	50,0
Grãos de milho moidos	40,5	40,5
Grãos de soja extrusados	7,5	7,5
Calcário calcítico	0,10	0,10
Sal branco	0,63	0,63
Mistura mineral ¹	1,21	1,21
	100,00	100,00
Composição		
MS (%)	68,6	73,3
PB (%)	17,3	17,4
Proteína degradável (%) ²	11,8	11,8
Proteína não-degradável (%) ²	5,5	5,5
FDA (%)	22,3	22,1
FDN (%)	27,9	30,2
EE (%)	2,7	2,7
Energia Líq. Lact. (Mcal/kg) ²	1,53	1,53
Ca (%)	0,60	0,60
P (%)	0,50	0,50

¹Composição por kg de mistura mineral: 180g Ca, 90g P, 20gmg, 20g S, 100g Na, 3.000mg Zn, 1.000mg Cu, 1.250mg Mn, 2.000mg Fe, 200mg Co, 90mg I, 36mg Se, 900mg F (máximo); ²Estimado segundo NRC (2001)

Nas Tabelas 1 e 2, encontram-se a composição das rações utilizadas e os resultados das análises bromatológicas das mesmas, respectivamente.

O período experimental foi de 21 dias, dos quais os primeiros 16 foram destinados à adaptação dos animais às dietas, os cinco últimos para a mensuração do consumo de matéria seca e o 21º para a colheita de líquido ruminal. Amostras de líquido ruminal foram coletadas às 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 12h, após a primeira refeição, para determinação dos ácidos graxos voláteis (AGVs), realizada através de cromatografia gasosa (Erwin *et al.*, 1961), determinação do N-NH₃, realizada por colorimetria (Kulasek, 1972; Foldager, 1977), e pH do fluido ruminal em potenciômetro digital portátil.

Tabela 2. Composição bromatológica da silagem de alfafa controle e inoculada (porcentagem com base na MS)

Silagem	MS	PB	EE	MM	FB	FDN	FDA
Controle	56,20	19,51	1,77	13,49	27,50	45,82	40,39
Inoculada	62,64	19,60	1,69	11,64	27,24	50,51	39,94

As determinações do volume líquido e da taxa de passagem de líquidos pelo rúmen foram realizadas através do Polietilenoglicol (PEG 4.000), administrado via fistula ruminal, na quantidade de 300g de PEG por animal. Amostras de líquido para determinações das concentrações de PEG foram tomadas às 0h, 1h, 3h, 6h, 9h, 12h e 24h, sendo a avaliação da concentração de PEG realizada por turbidimetria (Hyden, 1956). A taxa de passagem da fase líquida do conteúdo ruminal, expressa em porcentagem por hora, foi calculada por meio da regressão linear do logaritmo natural da concentração do PEG 4.000 em função do tempo. O volume líquido ruminal, em litros, foi estimado por meio da extrapolação da concentração inicial (zero hora) e da dosagem do marcador (300g/animal). Esses dados foram ainda utilizados para calcular o fluxo líquido e o fluxo líquido por kg de MS consumida por dia.

As análises referentes ao consumo de MS e a dinâmica líquida ruminal foram avaliadas por meio de análise de variância, pelo PROC GLM do SAS (SAS Institute Inc., 1985), que separara como causas de variação efeito de tratamento e efeito de blocos. Os dados referentes aos AGVs, pH e concentrações de N-NH₃ no líquido ruminal foram analisados conforme descrito (delineamento em blocos); porém, adicionados do fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diversos momentos de colheita, entre as refeições. Na presença de interação tempo x tratamento, efeitos de tratamento dentro de tempo foram estudados por meio do comando SLICE do SAS.

Resultados e discussão

Os efeitos da inoculação microbiana da silagem de alfafa sobre o consumo de MS encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Consumo de MS obtido com silagens de alfafa tratadas ou não com inoculante¹

	Tratamentos				Prob.
	Controle	Inoculada	Média	CV	
CMS (kg/d)	15,96	17,38	16,67	15,66	NS
CMS (%PV)	2,39	2,56	2,48	10,49	NS
CMS (g/PV ^{0,75})	121,37	130,65	126,01	11,27	NS

¹CMS: consumo de matéria seca expresso em kg/animal/dia (kg/d), em porcentagem do peso vivo (%PV) ou em g/kg de peso vivo metabólico (g/PV^{0,75}), CV: coeficientes de variação (%), Prob.: probabilidades estatísticas, NS: não-significativo

A adição de inoculante à silagem de alfafa não alterou o consumo de MS, fossem os dados expressos em quilos/animal/dia, em porcentagem do peso vivo ou em gramas/quilo de peso metabólico. De um modo geral, o consumo de MS, que em média foi de 2,5% do peso vivo, apresentou-se dentro do esperado.

Semelhantemente ao aqui constatado, Mader *et al.* (1985) e Phillip *et al.* (1990) não observaram resultados positivos da inoculação sobre o consumo de silagem de alfafa por novilhos e por carneiros,

respectivamente. Também Keady e Murphy (1996) e Keady e Steen (1996) observaram que a inoculação da silagem de gramínea não alterou o consumo de MS por vacas leiteiras e por novilhos, respectivamente.

Já McAllister *et al.* (1998) notaram efeitos dos inoculantes microbianos ao aumentarem o consumo de MS da silagem de alfafa por novilhos, assim como Petit e Flipot (1990), que observaram o efeito da inoculação da silagem de alfafa e de gramínea ao aumentarem o consumo de MS por carneiros, e Sharp *et al.* (1994), os quais observaram aumento no consumo de MS por novilhas, com a adição de inoculante em silagem de gramínea.

Mir *et al.* (1995) alertaram para possíveis limitações, ao fazerem recomendações a respeito da eficiência da inoculação, baseando-se em experimentos de curta duração, uma vez que observaram aumento do consumo de silagens inoculadas de alfafa, por novilhos, durante um período do estudo, mas não em outros.

Os valores do pH, da concentração de AGVs e de N-NH₃ ruminais encontram-se na Tabela 4.

Os valores médios de pH e a relação acético/propiónico indicam, para ambos os tratamentos, fermentação ruminal adequada, ou seja, sem indícios de acidose ruminal.

Não foram observados efeitos da inoculação sobre o pH, concentração total de AGVs ou proporção molar de acetato ou butirato. Também não foram observados efeitos da inoculação microbiana sobre as concentrações ruminais de N-NH₃.

Tabela 4. Efeitos da inoculação microbiana sobre o pH, AGVs totais, proporções molares de acetato, propionato e butirato e concentrações de N-NH₃ no líquido ruminal¹

	Tratamentos				Probabilidade	
	Controle	Inoculada	Média	CV	Trat.	Trat*tempo
pH	6,27	6,15	6,21	4,45	NS	NS
AGVs	113,77	122,49	118,13	19,51	NS	NS
C ₂	66,81	66,12	66,46	6,28	NS	NS
C ₃	19,63	21,12	20,36	21,66	NS	0,0019
C ₄	13,56	12,76	13,16	19,06	NS	NS
C ₂ /C ₃	3,58	3,23	3,40	20,51	NS	0,0224
N-NH ₃	18,23	18,98	18,61	38,76	NS	NS

¹AGVs: ácidos graxos voláteis (mM); C₂: proporção molar de acetato (% molar); C₃: proporção molar de propionato (% molar); C₄: proporção molar de butirato (% molar); C₂/C₃: relação acetato/propionato; N-NH₃: nitrogênio amoniacal (mg/dl); CV: coeficientes de variação; Prob.: probabilidades estatísticas; NS: não-significativo

Embora fosse encontrado efeito da interação tempo x tratamento para as variáveis proporção molar de propionato (Figura 1) e relação acético/propiónico (Figura 2), ao se estudar seus efeitos em cada tempo separadamente, nenhum efeito significativo de tratamento foi detectado dentro do tempo. Pela figura 1, é possível observar apenas uma diminuição numérica e não significativa, das concentrações ruminais de propiónico em dietas contendo silagem inoculada, a partir do tempo 6 horas, em relação à dieta controle.

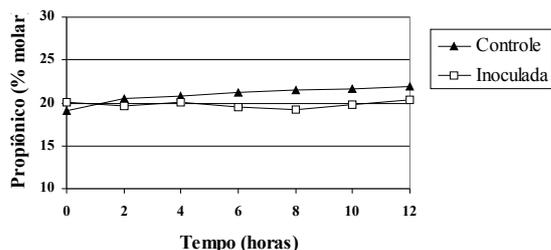


Figura 1. Concentração molar de ácido propiônico com silagens de alfafa controle e inoculada

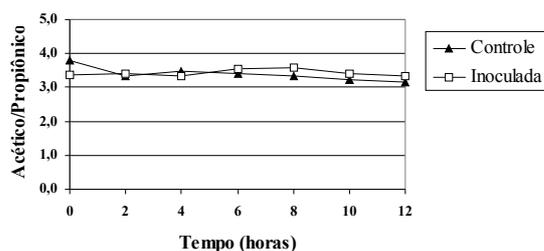


Figura 2. Relação acetato/propionato com silagens de alfafa controle e inoculada

Isso está de acordo com os achados de Keady e Murphy (1996), os quais observaram que a inoculação da silagem de gramínea não teve efeito sobre a fermentação ruminal de vacas leiteiras, assim como Keady e Steen (1996), que também notaram ausência de efeito da inoculação da silagem de gramínea, imediatamente antes do fornecimento aos animais, sobre a degradabilidade ruminal, o pH ruminal, as concentrações de N-NH₃ ou a proporção molar de AGVs.

Concordando com estes, Petit e Flipot (1990) perceberam que a inoculação da silagem de alfafa e de gramínea não alterou a proporção molar de AGVs no rúmen de carneiros. Entretanto, Sharp *et al.* (1994) observaram diminuição na proporção molar de acetato e aumento na proporção de propionato e butirato no rúmen de novilhas alimentadas com silagem de gramínea inoculada. Porém, verificaram que não houve efeito da inoculação sobre o pH ou concentração ruminal de N-NH₃.

Os achados de Mir *et al.* (1995) também demonstraram que a inoculação da silagem de alfafa aumentou a proporção de ácido butírico no rúmen de carneiros, mas não alterou a proporção de acético e propiônico, bem como a concentração ruminal de N-NH₃ e o pH.

Os dados referentes aos efeitos da inoculação da silagem sobre os parâmetros de dinâmica líquida ruminal encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Efeitos da inoculação microbiana da silagem de alfafa sobre o volume líquido ruminal, taxa de passagem de líquidos,

fluxo de passagem de líquidos/dia e fluxo de líquidos/kg de MS consumida/dia¹

	Tratamentos		Média	CV	Prob.
	Controle	Inoculada			
VL	63,37	59,47	61,42	10,69	NS
TP	8,01	8,60	8,30	11,72	NS
FL	121,58	123,25	122,42	15,69	NS
FL/MS	7,69	7,11	7,39	12,60	NS

¹VL: volume líquido ruminal (L); TP: taxa de passagem de líquidos (%/h); FL: fluxo de passagem de líquidos (L/dia); FL/MS: fluxo de passagem de líquidos por quilo de matéria seca consumida por dia; CV: coeficientes de variação; Prob.: probabilidades estatísticas; NS: não-significativo

Independentemente do tratamento, os valores de volume líquido ruminal e as taxas de passagem de líquidos encontrados neste experimento foram 61,4 litros e 8,3%/hora, respectivamente, para animais consumindo 16,7kg de MS por dia e pesando 640kg de peso vivo, em média, no início do experimento. Esses valores são compatíveis com os 46,6 litros de volume líquido obtidos por Clary *et al.* (1993), utilizando a técnica do Co-EDTA em novilhos pesando 430kg de peso vivo. Também parecem ser condizentes com os 41,5 litros encontrados por Rodriguez *et al.* (1986) em novilhos de corte e vacas Jersey pesando 350kg, ao utilizar o PEG como marcador de fase líquida, mas são um pouco mais baixos do que os 81,5 litros obtidos por Yang e Russell (1993), em vacas não-lactantes pesando 685kg, e aos 56,7 litros encontrados por Jacques *et al.* (1987) em novilhos pesando 227kg, quando ambos utilizaram o Co-EDTA. Dados de volume líquido ruminal obtidos por Lemenager *et al.* (1978) foram tão altos quanto 147,2 litros, o que foi explicado pelo fato de o marcador (PEG) ter sido administrado por via oral, resultando em passagem direta do cárdia para o omaso, sem a completa dispersão para dentro do rúmen.

A taxa de passagem de líquidos foi um pouco abaixo dos 9,7%/h e dos 10,9%/h obtidos por Branine e Galyean (1990) e por Rogers e Davis (1982), respectivamente; bastante semelhante aos 8,5%/h, 8%/h e 7%/h encontrados por Rodriguez *et al.* (1986), por Jacques *et al.* (1987) e por Yang e Russell (1993), respectivamente; e muito superior aos 6,5%/h, 5,5%/h e 4,9%/h obtidos por Clary *et al.* (1993), por Lemenager *et al.* (1978) e por Faulkner *et al.* (1985), respectivamente, ao considerarmos bovinos de diferentes pesos recebendo diferentes dietas.

Embora a inoculação não tenha causado nenhum efeito sobre esses parâmetros no presente experimento, Petit e Flipot (1990) perceberam efeito da inoculação da silagem de alfafa e de gramínea sobre o volume líquido ruminal em carneiros, mas não sobre a taxa de passagem de líquidos, possivelmente devido ao aumento no consumo de matéria seca obtido com a inoculação. No presente experimento, a inoculação não aumentou o consumo, e, conseqüentemente, não teve efeito sobre o volume líquido ruminal. Dados referentes aos efeitos dos

inoculantes sobre a dinâmica ruminal são praticamente ausentes na literatura. Entretanto, nosso grupo de pesquisa se propôs estudar os efeitos dos inoculantes em vários parâmetros, tais como: parâmetros de fermentação, de composição química e de valor nutritivo das silagens, bem como o consumo de matéria seca, as provas de desempenho, de fermentação e de dinâmica ruminal. Dessa forma, foi possível descartar alguns desses fatores, como a fermentação ruminal, como a causa dos resultados de desempenho apresentados em alguns estudos.

Conclusão

Com base nas condições do presente experimento, não foi possível observar efeitos benéficos da inoculação microbiana da alfafa para ensilagem sobre o consumo de MS, bem como sobre a fermentação e dinâmica líquida ruminais.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos funcionários Everson Lázaro e Gilmar Botteon, pelo cuidado com os animais, e aos técnicos Ari de Castro, Gilson de Godoy e Simi Robassini, pela ajuda com as análises laboratoriais.

Referências

- BOLSEN, K. K. *et al.* Effect of commercial inoculants on fermentation of 1987 and 1988. *Kansas Silage Crops*. Des Moines: Pioneer Hi-Bred Int., 1989. p. 1-19.
- BRANINE, M. E.; GALYEAN, M. L. Influence of grain and monensin supplementation on ruminal fermentation, intake, digesta kinetics and incidence and severity of frothy bloat in steers grazing winter wheat pasture. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 68, n. 3, p. 1139-1150, 1990.
- BROUK, M.; BELYEA, R. Chewing activity and digestive responses of cows fed alfalfa forages. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v. 76, n. 1, p. 175-182, 1993.
- CAI, Y.; OHMOMO, S. Effect of lactic acid bacteria and cellulase on the changes in microflora during fermentation, gas production and dry matter loss in silage. *Anim. Feed Sci. Technol.*, Amsterdam, v. 66, n.11, p. 941-948, 1995.
- CLARY, E. M. *et al.* Supplemental fat and ionophores in finishing diets: feedlot performance and ruminal digesta kinetics in steers. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 71, n. 11, p. 3115-3123, 1993.
- ERWIN, E. S. *et al.* Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v. 44, n. 9, p. 1768-1771, 1961.
- FAULKNER, D. B. *et al.* Monensin effects on digestibility, ruminal protein escape and microbial protein synthesis on high-fiber diets. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 61, n. 3, p. 654-660, 1985.
- FOLDAGER, J. *Protein requirement and non protein nitrogen for high producing cow in early lactation*. 1977. Thesis (Doctoral in Animal Science) - Michigan State University, East Lansing, 1977.
- FREDEEN, A. H. *et al.* Effects of enzymes and nutrients in a bacterial inoculant on quality of timothy or alfalfa silage and dairy cow performance. *Can. J. Anim. Sci.*, Ottawa, v. 71, n. 3, p. 781-791, 1991.
- GORDON, F. J. A further study on the evaluation through lactating cattle of a bacterial inoculant as an additive for grass silage. *Grass Forage Sci.*, Oxford, v. 44, n. 3, p. 353-357, 1989a.
- GORDON, F. J. The principles of making and storing high quality, high intake silage. In: BRITISH GRASSLAND SOCIETY OCCASIONAL SYMPOSIUM, 23., 1989, Brighton. *Proceedings...* Brighton. 1989b. p. 3-19.
- HYDEN, S. A turbidometric method for the determination of higher polyethylene glycols in biological materials. *K. Lantbr. Högsk. Arb.*, Berlin, v. 22, p.139-145, 1956.
- JACQUES, K. A. *et al.* Influence of lasalocid leval on forage intake, digestibility, ruminal fermentation liquid flow and performance of beef cattle grazing winter range. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 65, n. 3, p. 777-785, 1987.
- KEADY, T. W. J.; MURPHY, J. J. Effects of inoculant treatment on ryegrass silage fermentation, digestibility, rumen fermentation, intake and performance of lactating dairy cattle. *Grass Forage Sci.*, Oxford, v. 51, n. 3, p. 232-241, 1996.
- KEADY, T. W. J.; STEEN, R. W. J. Effects of applying a bacterial inoculant to silage immediately before feeding on silage intake, digestibility, degradability and rumen volatile fatty acid concentrations in growing beef cattle. *Grass Forage Sci.*, Oxford, v. 51, n. 2, p. 155-162, 1996.
- KENNEDY, S. J. An evaluation of three bacterial inoculants and formic acid as additives for first harvest grass. *Grass Forage Sci.*, Oxford, v. 45, n. 3, p. 281-288, 1990.
- KULASEK, G. A micromethod for determination of urea in plasma, whole blood and blood cells using urease and phenol reagent. *Polskie Archiwum Weterynaryjne*, Warsaw, v. 15, n. 4, p. 801-810, 1972.
- KUNG JUNIOR, L. *et al.* Added ammonia or microbial inocula for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v. 67, n. 2, p. 299-306, 1984.
- LEMENAGER, R. P. *et al.* Monensin effects on rumen turnover rate, twenty-four hour VFA pattern, nitrogen components and cellulose disappearance. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 47, n. 1, p. 255-261, 1978.
- MADER, T. L. *et al.* Effect of additive on alfalfa silage fermentation characteristics and feedlot performance of steers. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v. 68, n. 7, p. 1744-1747, 1985.
- McALLISTER, T. A. *et al.* Inoculants for alfalfa silage: effects on aerobic stability, digestibility and the growth performance of feedlot steers. *Livest. Prod. Sci.*, Amsterdam, v. 53, n. 2, p. 171-181, 1998.
- McDONALD, P. *et al.* *The biochemistry of silage*. 2. ed. Marlow: Chalcombe Publications, 1991.
- MIR, Z. *et al.* Effects of microbial inoculant and moisture content on preservation and quality of round baled alfalfa. *Can. J. Anim. Sci.*, Ottawa, v. 75, n. 1, p. 15-23, 1995.
- MUCK, R. E.; BOLSEN, K. K. Silage preservation and silage additive products. *Hay and Silage Management in North America*, p.105, 1991.

NRC-NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7.ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001.

PETIT, H. V.; FLIPOT, P. M. Intake, duodenal flow, and ruminal characteristics of long or short chopped alfalfa-timothy silage with or without inoculant. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v. 73, n. 11, p. 3165-3171, 1990.

PHILLIP, L. E. *et al.* Effects of treating lucerne with an inoculum of lactic acid bacteria or formic acid upon chemical changes during fermentation, and upon the nutritive value of the silage for lambs. *Grass Forage Sci.*, Oxford, v. 45, n. 3, p. 337-344, 1990.

PIMENTEL GOMES, F. *Curso de Estatística Experimental*. Esalq, Piracicaba, SP, 467p, 1985.

RICE, D. W. *et al.* Effect of microbial inoculation on the digestibility of legume silages. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v. 73, p. 195, 1990. Supplement, 1.

RODRIGUEZ, S. L. *et al.* Changes in ruminal concentrations of microbial ammonia and amino acids due to monensin and time. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 63, n. 6, p. 1990-1995, 1986.

ROGERS, J. A.; DAVIS, C. L. Rumen volatile fatty acid production and nutrient utilization in steers fed a diet supplemented with sodium bicarbonate and monensin. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v. 65, n. 6, p. 944-952, 1982.

SAS INSTITUTE INC. *SAS user's guide: statistics*. E. ed. Cary: SAS Institute, 1985.

SHARP, R. *et al.* The digestion of grass silages produced using inoculants of lactic acid bacteria. *Grass Forage Sci.*, Oxford, v. 49, n. 1, p. 42-53, 1994.

YANG, C. M. J.; RUSSELL, J. B. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation *in vivo* and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 71, n. 12, p. 3470-3476, 1993.

Received on February 19, 2003.

Accepted on November 20, 2003.

