

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DO PROCESSAMENTO, INOCULANTE
BACTERIANO E TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE A
QUALIDADE DA SILAGEM DA PLANTA INTEIRA DE MILHO**

Marina Elizabeth Barbosa Andrade

Mestra em Zootecnia

2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DO PROCESSAMENTO, INOCULANTE
BACTERIANO E TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE A
QUALIDADE DA SILAGEM DA PLANTA INTEIRA DE MILHO**

Marina Elizabeth Barbosa Andrade

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Silveira Rabêlo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Zootecnia.

A553e

Andrade, Marina Elizabeth Barbosa

Efeito do processamento, inoculante bacteriano e tempo de armazenamento sobre a qualidade da silagem da planta inteira de milho / Marina Elizabeth Barbosa Andrade. -- Jaboticabal, 2022

77 p.: tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Ricardo Andrade Reis

Coorientador: Carlos Henrique Silveira Rabêlo

1. Qualidade da silagem. 2. Processador de grãos. 3. Inoculantes bacterianos. 4. Estabilidade aeróbia. 5. Desempenho animal. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITO DO PROCESSAMENTO, INOCULANTE BACTERIANO E TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE A QUALIDADE DA SILAGEM DA PLANTA INTEIRA DE MILHO

AUTORA: MARINA ELIZABETH BARBOSA ANDRADE

ORIENTADOR: RICARDO ANDRADE REIS

COORIENTADOR: CARLOS HENRIQUE SILVEIRA RABÊLO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. RICARDO ANDRADE REIS (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV UNESP Jaboticabal



Profa. Dra. NAIARA CAIXETA DA SILVA (Participação Virtual)
Universidade Federal de Goiás/UEG / Goiânia/GO



Dra. MÁRCIA HELENA MACHADO DA ROCHA FERNANDES (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. JOÃO CARLOS DE CARVALHO ALMEIDA (Participação Virtual)
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRJ / Seropédica/RJ



Pós-doutoranda JULIANA DUARTE MESSANA (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 08 de abril de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARINA ELIZABETH BARBOSA ANDRADE – nascida em 3 de abril de 1992 no município de Araguari, Minas Gerais. Iniciou o curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Uberlândia, em março de 2010. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica e participou da coordenação do grupo de estudos e pesquisa em nutrição de ruminantes, ambos sob orientação do Prof. Dr. Gilberto de Lima Macedo Junior. Em março de 2015 ingressou no mestrado em Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Unesp, Jaboticabal-SP, sob orientação da Profa. Izabelle Auxiliadora Molina de Almeida Teixeira, recebendo o título de mestra em julho de 2017. Em agosto do mesmo ano iniciou o doutorado em Zootecnia na mesma instituição sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis.

“If you can't fly then run, if you can't run then walk, if you can't walk then crawl, but whatever you do, you have to keep moving forward.”

Martin Luther King Jr.

“Dream on

Dream until your dream come true. “

Steven Tyler

DEDICO

A minha querida mãe Eliana, por não medir esforços e investir tudo em minha educação e de meu irmão.

Aos meus pais, Eliana e José César, exemplos de caráter e resiliência, pelo suporte, incentivo, amor incondicional e por lutarem ao meu lado incansavelmente.

Aos meus avós (*in memoria*) João, Teresina e Auristela, e tia Dolores (*in memoria*) pelo amor, cuidado e proteção.

Ao meu irmão Hugo e minha tia Aparecida, por sempre torcerem pela minha vitória, acreditarem na minha capacidade, e pelo auxílio nos momentos difíceis.

Aos meus sobrinhos Davi e Arthur, pela alegria e renovação que suas vidas trouxeram para minha.

Toda minha gratidão e amor por ter vocês em minha vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida e por não deixar faltar nada em nenhum momento, por cuidar de cada detalhe, por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho, e por essa jornada repleta de aprendizagem.

Aos meus pais Eliana e César, por todo amor, cuidado e dedicação. Por nunca desistirem da luta apesar de todas as dificuldades, por passarem privações para dar o melhor para seus filhos, por serem exemplos de caráter e perseverança, por compreenderem minhas ausências. Devo tudo a vocês. Amor e gratidão.

Ao meu amor, Ney, pelo companheirismo, por enxugar minhas lágrimas e me segurar nos momentos em que eu me via sem forças. Obrigada por suportar meus estresses e dias difíceis, me abraçar e afirmar que os dias difíceis iriam passar, por fazer de minha luta a sua luta e permanecer sempre ao meu lado e cuidar de mim com tanto cuidado. Obrigada por me dar o meu melhor presente, Maria Zuri, que me salva todos os dias e me dá forças para continuar. Te amo.

Ao meu irmão Hugo, cunhada Márcia, e sobrinhos Davi e Arthur, por serem essa família linda que sempre me apoiou e esteve do meu lado, que renovaram minhas forças em todos os poucos momentos que pude estar presente fisicamente.

A minha tia Cida, madrastas Leila e Luiza, por cuidarem dos meus pais em minha ausência, pelas orações e ajuda nos momentos difíceis.

Aos meus tios Nivaldo (*in memoria*), Vicente, Lazineira e Adelzia, primos Mariana, Fabiano, Elizabeth e Leonardo e madrinha Nilva, pelas orações e por torcerem pela minha vitória.

Aos meus amigos João e Edleusa, que me deram todo suporte no início da minha vida acadêmica e sempre torceram por minha vitória. Sou muito grata por tanto.

A minha grande amiga/irmã Raiza que passou todos os momentos durante a pós-graduação ao meu lado. Deus não poderia ter escolhido uma companheira melhor para dividir alegrias, angústias, casa, laboratório, academia, inglês, caixa de chocolate, cachorra, livros, entre outras coisas. Obrigada por estar sempre ao meu lado em todos os momentos e me ensinar tanto todos os dias. Te amo.

A minha amiga/irmã Fabíola, ao André, Ana e Matheus, por ser família, por me acolherem sempre, pela preocupação, apoio, torcida e mesmo de longe se fazem presentes em minha vida em todas as etapas.

Ao meu grande mestre Prof. Dr. Gilberto agradeço todas as oportunidades, desenvolvimento pessoal e profissional que me proporcionou, ensinamentos, direcionamento, como também a todos do grupo GEPNutRi. Meu agradecimento se estende a todo corpo docente da UFU, por todas as experiências vividas e ensinamentos, onde iniciou a construção profissional de quem eu sou hoje.

A minha orientadora de mestrado Izabelle, por fazer parte dessa jornada, pela relação que construímos e todas as trocas, pela paciência, confiança e ensinamentos. Meu agradecimento se estende ao grupo Cabritolândia e todos seus membros, em especial Amélia, Bruno, Márcia e Prof. Kléber que me acolheu com muito carinho durante o mestrado e me ensinaram tanto.

A minha coorientadora de mestrado e amiga Carla Härter, pelos ensinamentos, apoio, carinho, preocupação e cuidado.

Ao meu orientador Prof. Ricardo, por todo suporte, paciência, ensinamentos, confiança, ajuda e por acreditar em minha capacidade. Sou muito grata por todo caminho que percorremos e não tenho palavras para agradecer. Obrigada por tanto.

Ao meu coorientador Carlos, por toda ajuda e disponibilidade, paciência, ensinamentos, pela amizade, conselhos e muito mais. Sou muito grata por ter percorrido esse caminho comigo e toda nossa troca.

A minha banca de qualificação, composta pela Profa. Márcia, Prof. João Daniel, Prof. Carlos e Prof. Gustavo, pelas sugestões, que foram essenciais para a melhoria desse trabalho.

A minha banca de defesa, composta pela Profa. Márcia, Profa. Naiara, Profa. Juliana e Prof. João Carlos, por aceitarem essa missão e por toda contribuição.

Ao meu grupo UnespFor, Luiz Gustavo, Débora, Mariane, Carol Corrêa, Abmael, Ana Luiza, Vânia, Carol, Letícia, Nathália, Andressa, Karine, Rhaony, Erick, Vanessa, Francisco, Gilmar, Camila, Yuri, Matheus, Izabela, Profa. Ana, e todos os demais membros, estagiários, funcionários, como também agradeço a Aline Spaggiari, Cíntia Carol, Clebson, Yury, Kênia, Paloma, Rayanne, Sergio e Larissa, eu aprendi muito com cada um de vocês e vou levá-los sempre em meu coração. Obrigada pelo acolhimento e toda a troca, pela ajuda nos experimentos e análises. Eu não teria conseguido sem a ajuda de vocês.

A minha amiga Jéssica Gervásio por toda ajuda com todas as análises, mesmo que a distância, conselhos, correções, por todo apoio e troca que tivemos, e por nunca largar minha mão.

Minha amiga Letícia Marra, por todo apoio, risadas, troca, consolo, sororidade.

Meu amigo Marcelo Gindri, pela ajuda e consultoria estatística, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, por todos os ensinamentos e por ser exemplo de resiliência e perseverança, por acreditar junto comigo.

Minhas amigas Débora, Mariane e Carol, por ser meu apoio, sempre estar ao meu lado, por toda ajuda, companheirismo, colo, abraço, e tudo que vivemos juntas.

As minhas amigas de graduação Luana, Paola, Bruna, Jeane, Izabel, Érica e Miriã, e minhas amigas de colegial Fabíola, Bruna, Ana Laura e Luciana por sempre estarem ao meu lado, me dando forças para continuar, me incentivando e torcendo pela minha vitória. Amo vocês!

As “donas da casa”, minha segunda família, primeiramente a Claudênia e a Flávia por me acolherem com tanto carinho e cuidar, apoiar e estar comigo em todos os momentos. Posteriormente, Raiza, Maria Clara, Stefany, Cíntia, kétuly, Roberta e todos os estagiários que aqui passaram, pela palavra amiga, compreensão, ajuda e todos os momentos que passamos juntas.

A minha querida amiga Izabel e sua mãe Tuniquinha, por ser lar, pelo acolhimento, amor, cuidado, risadas, conselhos, momentos maravilhosos e por fazer o melhor arroz com pequi que existe.

A minha família de Ibitiúva, Dona Maria, Ana Elisa, Dominique, Ana Maria, Silvana, Denilson, Diony e Lucas por todo amor, preocupação, acolhimento, os jogos de dominó e os divertidos domingos.

A minha amiga Joelma e sua família, por toda torcida, acolhimento, carinho e cuidado comigo.

A minha amiga Nina por todo cuidado e amor, conversas, puxões de orelha, conselho e risadas.

A Edilene e toda equipe Field, pela amizade, apoio, troca de conhecimento, paciência e cuidado. Todos os professores da Field que tive oportunidade de ser aluna me ensinaram tanto e parte do meu crescimento pessoal e profissional é graças a

dedicação de cada um deles. Sou muito grata por tudo que a Field me proporcionou e por todo suporte oferecido.

Aos padrões da minha mãe, Weverton e Elisângela, Flávio e Roberta, pela torcida e apoio em toda essa caminhada, e por não nos deixar faltar nada.

A Unesp Jaboticabal, juntamente com a cidade de Jaboticabal, que me acolheram de uma forma acolhedora e me deram um lar.

A todos os funcionários, porteiros, seguranças, em especial Seu Tião, Juninho, Ana Paula Sader, Lucas, a Greice da EsalqLab e os funcionários da seção técnica de pós-graduação, sempre solícitos, prontos para ajudar, meus mais sinceros agradecimentos.

Ao CNPq pela bolsa concedida, e a FAPESP pelo financiamento do projeto, sem esse apoio financeiro não seria possível realizar esse projeto da maneira com que foi realizado.

A todos que diretamente ou indiretamente auxiliaram e torceram para que eu conseguisse vencer mais essa etapa, minha gratidão eterna. Obrigada!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
1.1 Introdução	1
1.2 Revisão bibliográfica	2
1.2.1 Processo fermentativo	2
1.2.2 Processamento de grãos	3
1.2.3 Inoculantes bacterianos	7
1.2.4 Tempo de armazenamento	9
1.3 Referências bibliográficas	11
CAPÍTULO 2 - Efeito do processamento do grão de milho e tempo de armazenamento sobre o processo fermentativo, características nutricionais e físicas da silagem de milho	17
2.1 Introdução	17
2.2 Material e métodos	19
2.2.1 Tratamentos e processo de ensilagem	19
2.2.2 Determinação das perdas fermentativas e estabilidade aeróbia	20
2.2.3 Análises químicas	21
2.2.4 Degradabilidade in situ	22
2.2.5 Características físicas	23
2.2.6 Delineamento experimental e análise estatística	24
2.3 Resultados	24
2.4 Discussão	36
2.5 Conclusões	38
2.6 Referências Bibliográficas	38
CAPÍTULO 3 - Efeito da inoculação bacteriana e tempo de armazenamento sobre o processo fermentativo, características nutricionais e físicas da silagem de milho	42
3.1 Introdução	43
3.2 Material e métodos	44
3.2.1 Tratamentos e processo de ensilagem	44
3.2.2 Determinação das perdas fermentativas e estabilidade aeróbia	45
3.2.3 Análises químicas	45
3.2.4 Degradabilidade in situ	47
3.2.5 Características físicas	48
3.2.6 Delineamento experimental e análise estatística	49
3.3 Resultados	49
3.4 Discussão	60

3.5	Conclusões	61
3.6	Referências Bibliográficas.....	61
CAPÍTULO 4 - Impacto da inoculação bacteriana em silagens de milho armazenada por longo tempo sobre o desempenho de ovinos		65
4.1	Introdução.....	65
4.2	Material e métodos.....	66
4.2.1	Tratamentos e processo de ensilagem	66
4.2.2	Desempenho animal e dietas.....	67
4.2.3	Rendimento de carcaça	68
4.2.4	Análises químicas.....	69
4.2.5	Delineamento experimental e análise estatística	71
4.3	Resultados	71
4.4	Discussão	74
4.5	Conclusões	75
4.6	Referências Bibliográficas.....	75



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **“Efeito do estágio de maturidade, inoculante bacteriano e processamento do grão de milho sobre a qualidade da silagem de milho”**, protocolo nº 017453/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de dezembro de 2018.

Vigência do Projeto	01/02/2019 a 01/07/2019
Espécie / Linhagem	Ovina
Nº de animais	52
Peso / Idade	20- 65kg
Sexo	Macho
Origem	FCAV- UNESP

Jaboticabal, 06 de dezembro de 2018.

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

EFEITO DO PROCESSAMENTO, INOCULANTE BACTERIANO E TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE A QUALIDADE DA SILAGEM DA PLANTA INTEIRA DE MILHO

RESUMO – Objetivou-se avaliar o impacto da utilização de processador de grãos, inoculação bacteriana e tempo de armazenamento, e suas interações sobre a fermentação, estabilidade aeróbia, características nutricionais e físicas da silagem de milho. Adicionalmente, avaliou-se a inoculação de silagem de milho com *Lentilactobacillus buchneri* armazenada por 360 dias no desempenho de cordeiros. Assim foram conduzidos três estudos: sendo o primeiro e segundo estudo realizados para avaliar o efeito do processamento e inoculação com *L. buchneri*, respectivamente, sobre o processo fermentativo, composição química, características físicas e degradabilidade *in situ* (DIS) da MS e amido de silagens de milho armazenadas por diferentes tempos. Com o terceiro estudo pode-se avaliar os efeitos da inoculação bacteriana de silagem de milho armazenadas por 360 dias e seus efeitos sobre o desempenho de ovinos terminados no confinamento. Nos estudos 1 e 2, os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, como medidas repetidas no tempo, sendo que no estudo 1 foi considerado o efeito de processamento (sem e com utilização de processador de grãos na ensilagem) e sua interação com o tempo de armazenamento. No estudo 2 foi considerado o efeito de inoculação (sem e com utilização de *L. buchneri* CNCM I-4323 em uma concentração de 1×10^5 ufc / g de forragem na ensilagem) e sua interação com o tempo de armazenamento. Já o estudo de desempenho, foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, utilizando dois tratamentos (sem e com utilização de *L. buchneri* CNCM I-4323 em uma concentração de 1×10^5 ufc / g de forragem na ensilagem). Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento MIXED do SAS (SAS® Studio, SAS Institute Inc., Cary, NC). Em todos os testes, médias foram comparadas pelo teste Tukey e diferenças significativas foram consideradas a 5% de probabilidade. No estudo 1, a proporção de FDN, FDA, lignina e carboidratos solúveis (CS), foram maiores quando se utilizou o processador de grãos no momento da ensilagem. Já o NNP, amido e prolamina foram menores quando se utilizou o processador. As proporções de MM, FDN e FDA diminuíram com o tempo de armazenamento, diferentemente do NNP o qual aumentou. No ácido butírico e NNH₃, houve interação entre processamento e tempo de armazenamento. O etanol, 1,2 propanodiol e ácido acético não foram afetados pelo processamento. O ácido láctico foi maior quando se utilizou o processador de grãos no momento da ensilagem, já os valores de ácido propiônico, pH, perdas de MS e produção de efluentes foram menores. O tempo de armazenamento não interferiu nos valores de etanol, pH e produção de efluentes, contudo, a proporção de 1,2 propanodiol, ácido láctico, acético e propiônico, e perdas de MS foram afetadas. Na temperatura máxima houve interação entre processamento e tempo de armazenamento. A estabilidade aeróbia (EA), ADITE e perdas de MS durante o tempo de estabilidade (PMSE), não diferiram entre os processamentos de grãos (uso ou não). Por outro lado, todas essas variáveis apresentaram diferenças quando avaliado em relação ao tempo de armazenamento. Houve interação entre processamento e tempo de armazenamento nas proporções retidas na peneira de 8 e 4 mm. O KPS, a peneira de 19 mm e o fundo foram afetadas pelo tipo de processamento utilizado durante a ensilagem. A utilização ou não de processador de grãos na ensilagem resultou em maior DIS do amido (12h), contudo

o tempo de armazenamento não afetou essa variável. A DIS da MS (12h), DIS da MS (24h) e a DIS do amido (24h) não apresentaram diferenças quando comparadas quanto ao tipo de processamento, tempo de armazenamento e a interação desses fatores. Conclui-se que a utilização do processador de grãos na ensilagem aumentou o KPS, melhorou a DIS do amido (12h) e a qualidade fermentativa da massa ensilada. As variáveis relacionadas com estabilidade aeróbia das silagens apresentaram melhores resultados em tempos mais prolongados de armazenamento. No estudo 2, nas proporções de NNP e CS houve interação entre inoculação e tempo de armazenamento. A MS, FDN, Lignina, PB, amido e prolamina não foram afetadas pelo uso de inoculante. O tempo de armazenamento não interferiu na lignina, PB e prolamina. As proporções de MM, FDN e FDA diminuíram ao longo do tempo de armazenamento, enquanto as proporções de amido aumentaram. O etanol não foi afetado pela inoculação, assim como os valores de pH, NNH₃, perdas de MS e produção de efluentes. Contudo, o 1,2 propanodiol, o ácido láctico, o ácido acético e o ácido propiônico, foram maiores e o ácido butírico menor quando se utilizou *L. buchneri* como inoculante na ensilagem. O tempo de armazenamento não interferiu nos valores de etanol, 1,2 propanodiol, ácido láctico, ácido acético e NNH₃. Contudo, o ácido propiônico, ácido butírico, pH, perdas de MS e produção de efluentes foram afetadas quando armazenadas por diferentes tempos. Na EA e ADITE houve interação entre a inoculação e o tempo de armazenamento. A temperatura máxima e PMSE, não diferiram entre os tratamentos. Por outro lado, essas variáveis apresentaram diferenças quando avaliado em relação ao tempo de armazenamento. O KPS e as proporções retidas nas peneiras de 19, 8, 4 mm e fundo não foram afetadas pelo tempo de armazenamento. A DIS da MS (12h), apresentou interação entre o tempo de armazenamento e a inoculação. Na DIS da MS (24h) e na DIS do amido (24h) observamos diferenças nos tempos diferentes de armazenamento, contudo, a inoculação não afetou essas variáveis. A inoculação e o tempo de armazenamento não afetaram a DIS do amido (12h). Conclui-se que o tempo mais prolongado de armazenamento melhorou a DIS (24 h) da MS e amido. As variáveis relacionadas com a estabilidade aeróbia responderam positivamente ao tratamento utilizando inoculante até os 150 dias de armazenamento, após 150 dias de armazenamento a utilização ou não de *L. buchneri* foi indiferente considerando essas variáveis. A inoculação com *L. buchneri* na ensilagem melhorou a qualidade fermentativa da massa ensilada. No estudo 3, não foram encontradas diferenças na composição química das silagens de milho armazenadas por 360 dias, utilizando ou não *L. buchneri* como inoculante no momento da ensilagem. Igualmente, o consumo de nutrientes, ganho de peso médio diário, eficiência alimentar, rendimento de carcaça e as perdas por resfriamento dos cordeiros durante o confinamento, não apresentaram diferenças estatísticas. Já dentre os produtos da fermentação, os valores de 1,2 propanodiol, ácido acético e propiônico foram maiores quando se utilizou *L. buchneri* como inoculante, e menores no ácido butírico e N-NH₃. Conclui-se que a inoculação com *L. buchneri*, aliada ao longo tempo de armazenamento, modificou o padrão fermentativo das silagens, contudo essas mudanças não foram suficientes para alterar o consumo de matéria seca e de nutrientes pelos cordeiros, como também não afetou o desempenho.

Palavras-chave: características nutricionais, degradabilidade *in situ*, estabilidade aeróbia, KPS, *Lentilactobacillus buchneri*, processo fermentativo

EFFECT OF PROCESSING, BACTERIAL INOCULANT AND STORAGE TIME ON WHOLE PLANT CORN SILAGE QUALITY

RESUMO – The objective was to evaluate the impact of using a grain processor, bacterial inoculation and storage time, and their interactions on fermentation, aerobic stability, nutritional and physical characteristics of corn silage. Additionally, the inoculation of corn silage with *Lentilactobacillus buchneri* stored for 360 days on the performance of lambs was evaluated. Thus, three studies were conducted: the first and second studies were to evaluate the effect of processing and inoculation with *L. buchneri*, respectively, on the fermentation process, chemical composition, physical characteristics and *in situ* degradability (ISD) of DM and starch from corn silages stored for different times. In the third study, it was possible to evaluate the effects of bacterial inoculation of corn silage stored for 360 days and the results on the performance of sheep finished in feedlots. The studies 1 and 2, were made in a completely randomized design, with repeated measures in time. In study 1, the processing effect (with and without the use of a grain processor in the ensilage) and its interaction with storage time were evaluated. In study 2, the inoculation effect (with and without the use of *L. buchneri* CNCM I-4323 at a concentration of 1×10^5 cfu / g of forage in the ensilage) and its interaction with storage time were evaluated. The performance study was made in a completely randomized design, using two treatments (without and with the use of *L. buchneri* CNCM I-4323 at a concentration of 1×10^5 cfu / g of forage in the ensilage). Data were analyzed using the SAS MIXED procedure (SAS® Studio, SAS Institute Inc., Cary, NC). In all tests, means were compared using the Tukey test and significant differences were considered at 5% probability. In study 1, the proportions of NDF, ADF, Lignin and soluble carbohydrates (SC) were higher when the grain processor was used at the time of ensiling. On the other hand, NNP, starch and prolamin were lower when the processor was used. The proportions of MM, NDF and ADF decreased with storage time, unlike NNP which increased. In butyric acid and NNH₃, there was interaction between processing and storage time. Ethanol, 1,2 propanediol and acetic acid were not affected by processing. Lactic acid was higher when the grain processor was used at the time of ensiling, while the values of propionic acid, pH, DM losses and effluent production were lower. The storage time did not affect the values of ethanol, pH and effluent production, however, the proportion of 1,2 propanediol, lactic, acetic and propionic acid, and DM losses were affected. At maximum temperature, there was an interaction between processing and storage time. Aerobic stability (AS), ADITE and DM losses during stability time (DMLS) did not differ between grain processing (use or not). On the other hand, all these variables showed differences when evaluated in relation to storage time. There was interaction between processing and storage time in the proportions retained in the 8-mm and 4-mm sieve. KPS, 19-mm sieve and bottom were affected by the type of processing used during ensiling. The use or not of a grain processor in the silage resulted in higher starch ISD (12h), however the storage time did not affect this variable. DM ISD (12h), DM ISD (24h) and starch ISD (24h) did not show differences when compared with regard to the type of processing, storage time and the interaction of these factors. It is concluded that the use of the grain processor in the silage increased the KPS, improved the ISD of the starch (12h) and the fermentative quality of the ensiled mass. The variables related to aerobic stability of silages showed better results in longer storage times. In study 2, in the

proportions of NNP and SC, there was an interaction between inoculation and storage time. DM, NDF, Lignin, CP, starch and prolamin were not affected by inoculant use. Storage time did not affect lignin, CP and prolamin. The proportions of MM, NDF and ADF decreased over time of storage, while the proportions of starch increased. Ethanol was not affected by inoculation, as well as pH values, NNH₃, DM losses and effluent production. However, 1,2 propanediol, lactic acid, acetic acid and propionic acid were higher and butyric acid was lower when *L. buchneri* was used as inoculant in silage. Storage time did not affect the values of ethanol, 1,2 propanediol, lactic acid, acetic acid and NNH₃. However, propionic acid, butyric acid, pH, DM losses and effluent production were affected when stored for different times. In AS and ADITE, there was an interaction between inoculation and storage time. The maximum temperature and DMLS did not differ between treatments. On the other hand, these variables showed differences when evaluated in relation to storage time. KPS and proportions retained on 19, 8, 4 mm and bottom sieves were not affected by storage time. DM ISD (12h) showed interaction between storage time and inoculation. In DM ISD (24h) and starch ISD (24h) were observed differences in different storage times, however, inoculation did not affect these variables. Inoculation and storage time did not affect starch ISD (12h). It was concluded that the longer storage time improved the ISD (24 h) of DM and starch. The variables related to aerobic stability responded positively to the treatment using inoculant up to 150 days of storage, after 150 days the use or not of *L. buchneri* was indifferent considering these variables. Inoculation with *L. buchneri* in the silage improved the fermentative quality of the ensiled mass. In study 3, no differences were found in the chemical composition of corn silages stored for 360 days, using or not *L. buchneri* as inoculant at the time of ensiling. Also, during feedlots the consumption of nutrients, daily weight gain, feed efficiency, carcass yield and losses due to cooling of lambs did not show statistical differences. Among the fermentation products, the values of 1,2 propanediol, acetic and propionic acid were higher when using *L. buchneri* as inoculant, and lower in butyric acid and N-NH₃. It was concluded that the inoculation with *L. buchneri*, combined with the long storage time, modified the fermentation pattern of the silages, however these changes were not enough to alter the dry matter and nutrients intake by the lambs, but also did not affect performance.

Keywords: nutritional characteristics, in situ degradability, aerobic stability, KPS, *Lentilactobacillus buchneri*, fermentation process

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1 Introdução

A silagem de milho representa a principal fonte de volumoso na alimentação do rebanho leiteiro e de bovinos confinados no Brasil (Bernardes & Rêgo, 2015; Silvestre & Millen, 2021), e de bovinos leiteiros em todo o mundo (Ferra- retto et al., 2017). Sabe-se que a principal fonte de energia deste volumoso é proveniente de carboidratos não fibrosos, destacadamente do amido presente nos grãos, bem como da fração fibrosa potencialmente digestível (Allen et al., 1997). No entanto, os híbridos de milho comercializados no país são basicamente do tipo flint (Pereira et al., 2004).

Híbridos flint são largamente utilizados por apresentarem maior resistência a condições ambientais adversas e ataque de pragas e doenças, porém, o grão de milho destes híbridos possui maior resistência ao ataque dos microrga- nismos ruminais devido à maior proporção de endosperma vítreo comparado com os híbridos dentados (Philippeau et al., 1999), reduzindo a digestibilidade do amido (Correa et al., 2002). Desta maneira, a busca por estratégias que me- lhorem a eficiência de utilização da silagem de milho e da fração amido visando otimizar a produção animal se faz necessária.

Estudos têm apontado que o processamento de grãos na ensilagem (Bal et al., 2000; Johnson et al., 2003; Salvati, 2019), a utilização de inoculantes bac- terianos (Hu et al., 2009; Saylor et al., 2020) e o tempo de armazenamento da silagem (Daniel et al., 2015; Der Bedrosian et al., 2012; Hoffman et al., 2011; Hristov et al., 2020) podem alterar o processo fermentativo e podem ter efeito direto sobre a disponibilidade do amido. De maneira geral, as hipóteses associ- adas a cada um dos fatores de forma isolada e descritas acima para aumentar a disponibilidade do amido atualmente são bem aceitas. Contudo, muitas dúvidas ainda existem quando consideramos a interação entre o processamento de grãos, inoculação bacteriana e tempo de armazenamento, e os resultados atuais se mostram controversos.

Embora esteja elucidado que o *Lentilactobacillus buchneri* possa atuar em tempos prolongados de fermentação e o mesmo poderia alterar o processo fer- mentativo (Kleinschmit & Kung, 2006) e, conseqüentemente, melhorar a

digestibilidade do amido e também da matéria seca – MS (Salvo et al., 2013), estudos conduzidos com silagem de milho reportaram que não houve qualquer efeito deste microrganismo de forma isolada (Filya, 2003; Rabelo et al., 2017) ou associado às bactérias ácido-láticas homofermentativas (Junges et al., 2015) sobre as variáveis citadas acima.

A utilização de máquina automotriz equipada com sistema de rolos esmagadores, tem mostrado resultados promissores em relação ao aumento da digestibilidade do amido, devido ao processo de picagem onde ocorre a quebra uniforme dos grãos do milho, o que reduz o tamanho da partícula desses grãos e facilita o acesso aos microrganismos (Bal et al., 2000; Cooke; Bernard, 2005; Johnson et al., 2003, Salvati, 2019). Por outro lado, há poucos estudos mostrando como a utilização de um maquinário acoplado a colhedora, que quebra os grãos durante o processo de picagem da planta de milho, afeta as variáveis relacionadas à qualidade das silagens produzidas em condições tropicais, utilizando híbridos flint, assim como a sua interação com tempo de armazenamento.

1.2 Revisão bibliográfica

1.2.1 Processo fermentativo

Silagem é o produto da fermentação de culturas agrícolas, em condições de anaerobiose. O princípio básico da conservação da silagem é a fermentação de açúcares por bactérias, com produção de ácidos orgânicos e por consequência redução do pH da massa ensilada. Com isso, a ensilagem envolve um complexo processo bioquímico e microbiológico da colheita até a utilização na alimentação animal. Para obter-se uma silagem de alta qualidade se faz necessário utilizar uma forrageira de alto valor nutritivo e empregar tecnologia apropriada em todas as fases do processo de ensilagem para assegurar a preservação dos nutrientes (Jobim e Nussio, 2013).

A cultura do milho (*Zea mays L.*) apresenta alta capacidade de fermentação, isto é, possui todos os pré-requisitos para alcançar um padrão de fermentação adequado no silo, como um teor de matéria seca (MS) adequado, elevada concentração de carboidratos solúveis, e baixo poder tamponante no momento ideal do corte (Allen et al., 2003; Nussio et al., 2001). Outras características

importantes dessa cultura são: elevado potencial de produção de matéria seca, elevada qualidade nutricional, assim como flexibilidade de uso (Siqueira e Bernardes, 2013). Características como essas fazem com que a silagem de milho represente a principal fonte de volumoso na alimentação do rebanho leiteiro e de bovinos confinados no Brasil (Bernardes & Rêgo, 2015; Silvestre e Millen, 2021), e de bovinos leiteiros em todo o mundo (Ferraretto et al., 2017).

O processo de fermentação da silagem pode-se separar em 5 fases (Jobim e Nussio, 2013): a primeira é a fase aeróbia, no qual há a presença de oxigênio. Começa desde a colheita até o armazenamento e termina quando todo o oxigênio se esgota. Por isso a compactação e a duração desses processos devem ser eficientes, para que não se tenha muito oxigênio na massa de forragem e com isso ocorra pouca respiração celular. A segunda fase é a de transição, nessa fase se inicia também a multiplicação de bactérias acéticas e consumo de carboidratos solúveis. A produção de ácido acético nessa fase resulta em uma mudança de pH de 6 para 4,2. A terceira fase é a anaeróbia, onde reduz a multiplicação de bactérias acéticas pelo baixo pH, e o ambiente propicia o crescimento das bactérias ácido lácticas. Na quarta fase se inicia a estabilidade, e é caracterizada pela contínua formação de ácido láctico, normalização da temperatura e redução da atividade bacteriana, pH abaixo de 4. Já na quinta fase ocorre a estabilidade da silagem, onde o processo fermentativo se estabiliza, contudo, algumas atividades microbiológicas e enzimáticas continuam mesmo após a fermentação atingir a fase estável.

Após atingir a fase de estabilização os nutrientes ficam conservados até que se interrompa a anaerobiose. A exposição da silagem ao ar, propicia, inicialmente a degradação dos nutrientes pela ação de leveduras utilizando inicialmente os carboidratos solúveis residuais e o ácido láctico, e assim o pH aumenta. Posteriormente, tem-se a degradação dos nutrientes pela ação de bactérias aeróbias e fungos filamentosos, aumentando então a temperatura e afetando a estabilidade aeróbia dessa silagem. A estabilidade aeróbia da silagem nada mais é do que a velocidade com que a massa deteriora após a abertura dos silos (Jobim e Nussio, 2013).

1.2.2 Processamento de grãos

A utilização de algum tipo de processamento do grão no momento da ensilagem é particularmente importante para o Brasil, onde a maior parte do milho cultivado tem endosperma duro, híbridos flint, que são de baixa digestibilidade (Correa et al., 2002). Híbridos flint são largamente utilizados por apresentarem maior resistência a condições ambientais adversas e ataque de pragas e doenças, porém, o grão de milho destes híbridos possui maior resistência ao ataque dos microrganismos ruminais devido à maior proporção de endosperma vítreo comparado com os híbridos dentados (Philippeau et al., 1999). O processo de colheita e ensilagem exercem papel fundamental sobre a qualidade da conservação desse material (Bernardes et al., 2018) e as decisões tomadas durante essas etapas podem afetar o valor alimentar da silagem durante todo o tempo de utilização (Kung Jr. e Muck, 2017).

Na ensilagem, ajustar as máquinas para o correto tamanho de partículas e processamento dos grãos são essenciais, pois as características físicas da silagem podem interferir no processo fermentativo, como também na disponibilidade de nutrientes para os animais (NRC, 2001). Com isso, uso de máquinas automotrizes no Brasil tem se tornado uma prática cada vez mais comum, em substituição as ensiladeiras tradicionais, devido à necessidade de melhorar a eficiência da utilização de grãos, e aumentar a digestibilidade do amido, principalmente (Bernardes e Rego, 2015; Salvati, 2019).

O processamento do grão na ensilagem de milho é realizado durante a colheita, geralmente com máquina automotriz equipada com sistema de rolos esmagadores, onde esse sistema é responsável pela quebra uniforme dos grãos do milho durante o processo de picagem, o que fratura os grãos de milho rompendo o pericarpo o que reduz o tamanho da partícula dos grãos e consequentemente leva ao aumento na digestibilidade do amido (Bal et al., 2000; Cooke; Bernard, 2005; Johnson et al., 2003; Salvati, 2019). Além do sistema de rolos esmagadores, ainda existem outros processadores que podem ser acoplados a colhedora que quebram os grãos durante o processo de picagem da planta de milho. Com isso, a eficiência do processamento é influenciada por diversos fatores tais como: a maturidade da planta, comprimento do corte, tipo de processador utilizado, diferença de velocidade entre os rolos, assim como o espaçamento entre eles (Shinners et al., 2000; Ferraretto e Shaver, 2012).

A taxa e a extensão da digestão do amido pelo ruminante podem ser afetadas por muitos fatores, o que interfere de forma dinâmica na quantidade de amido que será fermentado no rúmen ou que chegará ao intestino delgado (Carbonare, 2020). O amido quando chega no rúmen é convertido em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Berchielli et al., 2006), principalmente acetato e propionato, o que aumentam sua eficiência de utilização metabólica quando comparado à absorção intestinal em forma de glicose (Philippeau et al., 1999).

Ferraretto e Shaver (2015), em uma meta-análise sobre silagem de milho de planta inteira, relataram que os teores de amido total das silagens possuem variações entre 16 a 46% e os valores de degradabilidade ruminal deste amido em silagem de planta inteira de milho variam de 24 a 66% e sendo que no trato digestório total podem chegar de 80 a 99%. Essa degradabilidade é afetada por propriedades físicas dos grãos (Ferreira e Mertens, 2005) e quando quebrados em partículas menores apresentam alto grau de degradação ruminal (Dias Junior et al., 2016), isto é, duas silagens podem ser utilizadas de formas diferentes pelo animal, mesmo possuindo o mesmo teor de amido, essa diferença se dá pela disponibilidade desse amido em cada silagem, que é influenciado pelo processamento físico dos grãos (Carbonare, 2020).

Ferreira e Mertens (2005) propuseram uma técnica que permite avaliar quantitativamente a extensão da fragmentação dos grãos da silagem de milho planta inteira, denominada KPS (Kernel Processing Score) ou CSPS (Corn Silage Processing Score), onde se utiliza cinco peneiras de gramaturas diferentes (19,00; 13,20; 9,50; 6,70 e 4,75 mm), mais um fundo, que permanecem durante 15 minutos em um agitador de peneiras e avaliam a proporção de amido que passa através da peneira de 4,75 mm em relação ao amido total da silagem. O valor de 4,75 mm foi utilizado, pois os autores observaram que a digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) foi 30% menor em grãos fragmentados em partículas maiores que 4,75 mm, do que quando comparados àqueles finamente moídos. Sendo que o KPS representa a proporção de grãos quebrados em pelo menos $\frac{1}{4}$ de grão que são capazes de passarem através da peneira de 4,75 mm (Ferreira e Mertens, 2005).

Shinners e Holmes (2013) desenvolveram uma tabela de categorização para auxiliar na classificação do processamento dos grãos, utilizando a metodologia de KPS como ferramenta (Tabela 1).

Tabela 1. Categorização do processamento de grãos da silagem, utilizando a metodologia de KPS como ferramenta (Shinners e Holmes, 2013).

Categoria	KPS (%)
Ótimo	>70%
Bom	50 – 69%
Ruim	<50%

O tipo de maquinário e a regulagem do mesmo também podem afetar na qualidade da silagem produzida, de modo que o tamanho de partícula afeta na qualidade da compactação e conseqüentemente partículas maiores geram maior porosidade no interior da massa ensilada, afetando na anaerobiose do ambiente, e favorecendo o desenvolvimento de fungos e leveduras, que degradam os nutrientes e reduzem a qualidade final da silagem (Rooke e Hatfield, 2003; Neumann et al., 2007).

Com intuito de quantificar o melhor tamanho de partículas, e proporcionar menores perdas fermentativas e nutricionais, na Universidade da Pensilvânia (UPenn, EUA) foi desenvolvido um conjunto de peneiras para classificação do tamanho de partícula ideal, chamado Penn State Particle Size Separator (Heinrichs e Kononoff, 2002). Na tabela 2 é apresentada a distribuição adequada de partículas nas peneiras segundo Heinrichs (2013).

Tabela 2. Distribuição adequada de partículas nas peneiras para silagem de milho planta inteira (Heinrichs, 2013).

Peneiras	Gramatura	Distribuição
1	> 19 mm	3-8%
2	8 a 19 mm	45-65%
3	4 a 8 mm	20-30%
4	< 4 mm	<10%

Salvati (2019) utilizando silagem de milho colhidas pelo mesmo maquinário, contudo uma parte utilizando quebrador de grãos e outra parte sem o quebrador de grãos, com tamanho teórico de corte (TTC) de 6 e 10 mm em ambas e armazenadas por 35 dias, observou que o processador de grãos reduziu o material retido na peneira de 19 mm de 4,7 para 1,8%, o que por sua vez

aumentou a percentagem de partículas retidas na peneira de 8 mm e diminuiu o tamanho médio de partícula (TMP). O processador de grãos levou a uma redução do tamanho geométrico dos grãos, com subsequente aumento da área superficial, além de aumentar a porcentagem de grãos menores que 4,75 mm de 56,4 para 80,0%.

Em outro estudo, com vacas alimentadas com silagem de milho colhidas por diferentes máquinas (sem processador e autopropelidas) e tamanho teórico de corte (TTC) de 6, 12 e 18 mm, armazenadas por 270 dias, Salvati (2019) observou maior produção e qualidade de leite, sem alterações no consumo de matéria seca, maior digestibilidade do amido no trato total e na glicose plasmática nas vacas alimentadas com TTC 6 e 12 mm e colhidas com autopropelidas. Contudo, mesmo usando autopropelida, no TTC de 18 mm, foi observado uma menor digestibilidade do amido no trato total e desempenho das vacas.

Saylor et al. (2021) colheram plantas de milho inteiras, separaram as espigas da porção forrageira, deixaram os grãos de milho intactos ou quebrados (de forma manual utilizando um martelo), picaram a porção restante da forragem das plantas de milho, e reconstituíram esse material de forma a simular uma silagem de milho de planta inteira, utilizando grãos intactos ou quebrados, e armazenaram esse material por 30 dias. Analisando tanto os grãos separadamente quanto a silagem de milho reconstituída, no tempo 0 e no tempo de 30 dias, foi observado que a digestibilidade ruminal in vitro do amido (7 h) aumentou com a ensilagem apenas nos grãos que foram quebrados, evidenciando a importância da quebra do grão para melhorar a digestibilidade do amido na silagem de milho.

1.2.3 Inoculantes bacterianos

Apesar da planta de milho apresentar características desejáveis ao processo de ensilagem, após a abertura dos silos, a silagem torna-se susceptível à deterioração pela presença de ácido láctico e alta concentração de nutrientes, os quais são utilizados como substrato para o desenvolvimento, principalmente, de leveduras, bactéria aeróbias e fungos filamentosos, causando a deterioração da silagem, o que podem afetar o consumo e desempenho animal (Salvo et al., 2013).

Inoculantes bacterianos usados como aditivos incluem bactérias homofermentativas, heterofermentativas ou a combinação delas. Os microrganismos homofermentativos caracterizam-se pela taxa de fermentação mais rápida, menor proteólise, maior concentração de ácido lático, menores teores de ácidos acético e butírico e maior recuperação da matéria seca e da energia. Bactérias heterofermentativas utilizam ácido lático e glicose como substrato para produção de ácido acético e propiônico, os quais são efetivos no controle de fungos filamentosos e leveduras, especialmente sob pH baixo (Zopollatto, Daniel e Nussio, 2009; Checoli, 2015), além da produção de etanol e CO₂ (Siqueira e Bernardes, 2013).

Dentre os microrganismos que atuam no processo fermentativo de silagem temos as espécies de *Lactobacillus*, bactérias produtoras de ácido lático (BAL), que podem ser classificadas em três grupos de acordo com seu metabolismo em (Holzer et al., 2003): Homofermentativa Obrigatória: *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. salivarius*, *Pediococcus spp.*, *Paralactobacillus spp.* e *Enterococcus faecium*; Heterofermentativa Facultativa: o *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum* e *L. sakei*; e Heterofermentativa Obrigatória: o *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. reuteri* (*Leuconostocaceae*) e *L. kefir*. Esses grupos são divididos de acordo com os produtos oriundos do resultado da fermentação através de suas vias metabólicas, homofermentativas (isto é, produzindo principalmente ácido lático) ou heterofermentativo (ou seja, produzindo produtos adicionais, como etanol, ácido acético e CO₂) (Pahlow et al., 2003; Checoli, 2015).

A adição de inoculantes bacterianos, destacadamente o *L. buchneri* (bactéria ácido-lática heterofermentativa), pode afetar os produtos da fermentação e a disponibilidade do amido quando a silagem é armazenada por longos tempos (acima de 120 dias; Kleinschmit & Kung, 2006). Esta hipótese foi primariamente suportada pelo contínuo aumento na concentração de 1,2-propanodiol (produto do metabolismo do ácido lático pelo *L. buchneri*) e nitrogênio amoniacal (N-NH₃) devido ao crescente tempo de armazenamento da silagem de milho (Kleinschmit & Kung, 2006). Posteriormente, a maior disponibilidade do amido foi atribuída à degradação das zeínas hidrofóbicas causada pelo aumento da atividade proteolítica em tempos prolongados de armazenamento, observada em silagens de grãos úmidos de milho (Hoffman et al., 2011; Gervásio, 2021).

Os inoculantes que contém *L. buchneri* tem como finalidade a produção de ácido láctico e acético. Embora, o último ácido seja mais fraco que o primeiro, tornando menos eficiente em garantir a fermentação exclusivamente láctica, este tem duas funções adicionais, melhorar a estabilidade aeróbica e inibir o crescimento de leveduras após a abertura do silo (Driehuis et al., 1999). Nos trabalhos de Basso et al. (2012), Salvo et al. (2013) e Rabelo et al. (2017), as silagens tratadas com *L. buchneri* foram mais estáveis do que a silagem sem o tratamento (controle).

Por outro lado, existe resultados controversos em relação a digestibilidade, onde a digestibilidade da MS pode não ser afetada ao se utilizar o *L. buchneri*, como relataram Rabelo et al. (2017), contrário a Basso et al. (2014) onde a digestibilidade da MS foi menor ao se utilizar inoculante. Já Salvo et al. (2013) observaram que a digestibilidade aparente da MS foi maior em resposta a inoculação. Já a digestibilidade da FDN não foi alterada ao se comparar silagens com inoculante e sem inoculante (Rabelo et al., 2017; Basso et al., 2014; Basso et al., 2018; Salvo et al. 2013).

Weinberg et al. (2004) citam um possível aumento no ganho de peso em animais alimentados com silagens inoculadas, e pode ocorrer devido à melhora na digestão da fibra por uma interação entre microrganismos da silagem e do rúmen, ou até mesmo por um efeito probiótico do inoculante. Contudo, Rabelo et al. (2017) não observaram o efeito probiótico da inoculação com *L. buchneri*, e observaram que o seu uso alterou a fermentação dentro do silo, melhorou a qualidade da silagem e possibilitou alguns benefícios para a fermentação ruminal. Já Basso et al. (2018) encontraram um aumento no consumo e maior ganho de peso nos cordeiros alimentadas com dietas contendo silagens inoculadas com *L. buchneri* associadas a baixa utilização de concentrado. Com isso, os mecanismos relacionados a utilização de bactérias ácidos-lácticas sobre o desempenho animal ainda não estão totalmente claros.

1.2.4 Tempo de armazenamento

O silo é um sistema dinâmico que sofre inúmeras alterações ao longo do tempo de armazenamento (Saylor et al., 2021). Embora se considere que a fase de fermentação estável de uma silagem deva ser atingida entre 2 a 6 semanas

após a ensilagem (dependendo de diversas condições; Pahlow et al., 2003), alguns estudos têm reportado contínuo acréscimo nas concentrações de proteína solúvel e (N-NH₃) nas silagens com o aumento no tempo de armazenamento (Daniel et al., 2015; Der Bedrosian et al., 2012; Hoffman et al., 2011; Windle et al., 2014), sendo o maior tempo avaliado nos estudos supracitados de 570 dias. Em comum, estes estudos também reportaram contínuo acréscimo na digestibilidade do amido com o crescente tempo de armazenamento, o qual deve ser atribuído à atividade proteolítica (degradação da matriz proteica que protege os grânulos de amido) causadas pela atividade de bactérias (60%), enzimas (30%), fungos (5%) e produtos da fermentação (5%) (Junges et al., 2015), promovendo a hidrólise da fração proteica do grão, resultado em maiores valores de (N-NH₃) e proteína solúvel.

Ferraretto et al. (2015) testaram silagens de milho planta inteira, com tempos de aberturas até 240 dias, observaram que o N-NH₃ e proteína solúvel foram bons indicadores de digestibilidade *in vitro* de amido e o tempo de armazenamento afetam esses fatores, como também o perfil de fermentação. Outros estudos também relataram aumento da digestibilidade do amido em tempo prolongados de armazenamento (Newbold et al., 2006; Kung, 2013; Carvalho et al., 2017). Visando maximizar a digestibilidade do amido, Daniel et al. (2015) em um estudo meta-analítico contemplando vários genótipos e o tempo de armazenamento entre 0 a 570 dias, recomendaram que o tempo mínimo de armazenamento da silagem de milho deve ser de 120 dias, observando um aumento de 0,28 unidades percentuais por dia na digestibilidade do amido, até 30 dias de armazenamento, e após 30 dias com um aumento de 0,033 unidades percentuais por dia.

Salvati (2019) utilizando silagem de milho colhidas por diferentes máquinas (sem processador e autopropelidas) e tamanhos teórico de corte (TTC) armazenadas por 0, 35 e 140 dias, observou que o tempo de armazenamento aumentou o tamanho médio de partículas (TMP) da fração grãos em ambas as colhedoras. Além disso, observou um aumento na porcentagem de partículas longas (>19 mm) e do corn silage processing score (CSPS ou KPS) após 140 dias de armazenamento, nas amostras colhidas por autopropelidas, concluindo que o tempo de armazenamento de pelo menos 140 dias podem ser estratégias

para maximizar o processamento de grãos e, assim, a digestibilidade do amido em silagem de milho.

A fração fibrosa também pode ser afetada pelo tempo de armazenamento de silagem de milho de planta inteira, sabe-se que durante o processo fermentativo, alguma degradação da hemicelulose é esperada devido à hidrólise ácida e/ou ação enzimática de alguns microrganismos (McDonald et al., 1991). Sendo a hemicelulose a fração mais digestível da FDN, é esperado que a FDN remanescente na silagem tenha menor digestibilidade comparada com a da planta de milho e pode ser afetada negativamente de acordo com o tempo de armazenamento. Contudo, Ferraretto et al., (2015) em silagem de milho planta inteira não observaram efeito na digestibilidade *in vitro* (30h) da FDN armazenadas durante 0, 30, 120, e 240 dias, e do mesmo modo, nos valores de FDN da silagem comparadas ao da planta de milho antes de ensilar. Der Bedrosian et al. (2012) encontraram maiores valores de digestibilidade de FDN na planta de milho antes de ensilar comparado aos da silagem, e isso foi atribuído à solubilização da fibra durante a ensilagem. Cherney et al. (2007) e Rossi (2020) também relataram maior concentração de FDN na planta de milho antes de ensilar em comparação com a silagem.

Mediante o exposto e a inconsistência dos dados observado, os estudos presentes nos próximos capítulos vislumbraram avaliar o impacto da ensilagem da planta inteira de milho, utilizando ou não processador de grãos na ensilagem e/ou utilizando ou não inoculação bacteriana (*L. buchneri*), armazenadas por diferentes tempos, sobre o processo fermentativo, estabilidade aeróbia, composição química, características físicas, degradabilidade *in situ* da MS e amido e desempenho de ovinos.

1.3 Referências bibliográficas

Allen MS, Coors, JG, Roth, GW (2003) Corn Silage. In: Buxton, DR, Muck, RE, Harisson, JH (Eds.) **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America 547-608.

Allen MS, Oba M, Choi B (1997) Nutritionist's perspective on corn hybrids for silage. In: Silage: Field to feedbunk, Hershey. **Proceedings...** Ithaca: Northeast Regional Agricultural Engineering Service 99: 25-36.

Bal MA, Shaver RD, Shinnors KJ, Coors JG, Lauer JG, Straub RJ, Koegel RG (2000) Stage of maturity, processing, and hybrid effects on ruminal in situ disappearance of whole-plant corn silage. **Animal Feed Science and Technology** 94: 86-83.

Basso FC, Rabelo, CHS, Lara EC, Siqueira GR, Reis RA (2018) Effects of *Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788 and forage: Concentrate ratio on the growth performance of finishing feedlot lambs fed maize silage. **Animal Feed Science and Technology** 244: 104 - 115.

Basso FC, Adesogan, AT, Lara EC, Rabelo CHS, Berchielli TT, Teixeira IAMA, Siqueira GR, Reis, R.A. (2014) Effects of feeding corn silage inoculated with microbial additives on the ruminal fermentation, microbial protein yield, and growth performance of lambs. **Journal of Animal Science** 92: 5640 - 5650

Berchielli TT, Pires AV, Oliveira SG **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal, SP, 2006. 583p.

Bernardes TF, Rêgo AC (2014) Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science** 97: 1852-1861

Bernardes TF, Daniel JLP, Adesogan AT, McAllister TA, Drouin P, Nussio LG, Huhtanen P, Tremblay GF, Bélanger G, Cai Y (2018) Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. **Journal of Dairy Science** 101: 4001-4019.

Bernardes TF, Rêgo AC (2014) Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science** 97: 1852-1861.

Carbonare MSD (2020) **Processamento de grãos (KPS) da silagem de milho e aproveitamento do amido por vacas em lactação em fazendas comerciais**. 205 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba.

Carvalho BF, Ávila CLS, Bernardes TF, Pereira MN, Santos C, Schwan RF (2017) Fermentation profile and identification of lactic acid content and yeasts of rehydrated corn kernel silage. **Journal of Applied Microbiology** 122: 589–600.

Checoli MB. **Silagens de cana-de-açúcar tratadas com *Lactobacillus kefir* e *L. brevis*: efeitos no perfil fermentativo e na estabilidade aeróbia**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Viçosa, MG, 2015.

Cherney DJR, Cherney JH, Cox WJ (2007). Forage quality differences of corn hybrids as influenced by ensiling. **Forage Grazinglands** 5: 1 <http://dx.doi.org/10.1094/FG-2007-0918-01-RS>.

Cooke KM, Bernard JK (2005) Effect of Length of Cut and Kernel Processing on Use of Corn Silage by Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science** 88: 310-316.

Correa CES, Shaver RD, Pereira MN, Lauer JG, Kohn K (2002). Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science** 85: 3008-3012.

Daniel JLP, Junges D, Nussio LG (2015) A meta-analysis of the effects of length of storage on starch digestibility and aerobic stability of corn silages. In: XVII International Silage Conference, **Resumos...**Piracicaba, 2015: 306-307.

Der Bedrosian MC, Nestor KE, Kung Jr. L (2012) The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science** 95: 5115-5126.

Dias Junior GS, Ferraretto LF, Salvati GGS, Resende LC, Hoffman PC, Pereira MN, Shaver RD (2016) Relationship between processing score and kernel-fraction particle size in whole-plant corn silage. **Journal of Dairy Science**, 99: 2719 – 2729. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10411>.

Driehuis F, Oude Elferink, SJWH, Spoelstra SF (1999). Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated *with Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology** 87: 583-594.

Ferraretto LF, Shaver RD, Luck BD (2017). Silage review: Recent advances and future technologies for whole-plant and fractionated corn silage harvesting. **Journal of Dairy Science** 101: 3937-3951.

Ferraretto LF, Shaver, RD. (2015) Effects of whole-plant corn silage hybrid type on intake, digestion, ruminal fermentation, and lactation performance by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of Dairy Science** 98: 2662-2675.

Ferraretto LF, Shaver RD (2012) Effect of Corn Shredlage on lactation performance and total tract starch digestibility by dairy cows. **The Professional Animal Scientist** 28: 639–647.

Ferreira G, Mertens DR (2005) Chemical and Physical Characteristics of Corn Silages and Their Effects on In Vitro Disappearance. **Journal of Dairy Science** 88: 4414–4425.

Gervásio JRS (2021) **Reidratação e ensilagem de grãos de milho com diferentes granulometrias e inclusões na dieta para bovinos de corte**. Tese (doutorado) 70p. – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

Heinrichs J, The Penn State Particle Separator. **Penn State Cooperative Extension**, v.13, n.183, 2013.

Heinrichs J, Kononoff PJ. Evaluating particle size of forages and TMRs using the New Penn State Forage Particle Separator. Pennsylvania State University, College of Agricultural Sciences, **Cooperative Extension** DAS 02-42, 2002,14p.

Hoffman PC, Esser NM, Shaver, R.D, Coblenz W, Scott MP, Bodnar AL, Schmidt R, Charley B. (2011) Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science** 94: 2465-2474.

Holzer M, Mayrhuber E, Danner H, Braun R (2003). The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. **Trends in Biotechnology**, 21(6), 282–287, 2003.

Hristov AN, Harper MT, Roth G, Canale C, Huhtanen P, Richard TL e DiMarco K (2020) Effects of ensiling time on corn silage neutral contentes fiber degradability and relationship between laboratory fiber analyses and in vivo digestibility. **Journal of Dairy Science** 103: 2333-2346.

Hu W, Schmidt RJ, McDonnell EE, Klingerman CM, Kung Jr L (2009) The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. **Journal of Dairy Science** 92: 3907-3914.

Jobim CC, Nussio LG (Eds.) (2013) Princípios Básicos da Fermentação na Ensilagem. **Forragicultura: Ciência, Tecnologia e Gestão dos recursos forrageiros**. Jaboticabal, 649p.

Johnson LM, Harrison JH, Davidson D, Mahanna WC, Shinnors K. (2003) Corn silage management: Effects of hybrid, chop length, and mechanical processing on digestion and energy content. **Journal of Dairy Science** 86: 208–231.

Junges D, Daniel JLP, Fernandes J, Nussio LG (2015) Prolonged storage period increases the starch degradability of flint corn silage. In: XVII International Silage Conference. **Anais...**, Piracicaba: p. 302-303.

Kleinschmit, DH, Kung Jr L. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage during various stages of ensiling. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3999-4004, 2006.

Kung Jr L, Muck, R. (2017) Silage harvesting and storage. In: LARGE DAIRY HERD MANAGEMENT, 3., 2017, Champaign, IL. **American Dairy Science Association (ADSA)**. Champaign, 2017: 723-738.

Kung Jr L, (2013) The effect of length of storage on the nutritive value and aerobic stability of silages. In: III International Symposium of forage quality and conservation. **Anais...**Campinas: Brasil, p.7-19

McDonald, P.; Henderson, A.R.; Heron, S.J.E. **The Biochemistry of Silage**. Marlow: Chalcomb Publications, 1991. 340 p.

Muck, R. Advances in inoculants for silage (2008) In: Simpósio sobre Manejo Estratégico De Pastagem, 4., 2008, Viçosa. **Anais...**Viçosa:. 221-232.

Neumann M, Mullbach PRF, Ost PR, Nornberg JL, Romano MA, Restle J, Sandini IE (2007) Características da fermentação da silagem obtida em diferentes tipos de silos sob efeito do tamanho de partícula e da altura de colheita das plantas de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, 37: 847 – 854.

Newbold JR, Lewis EA, Lavrijssen J, Brand HJ, Vedder H e Bakker J (2006) Effect of storage time on ruminal starch degradability in corn silage. **Journal of Dairy Science** 89:190.

NRC - National Research Council. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 381p.

Nussio LG, Simas JEC, Lima MLM (2001). Determinação do ponto de maturidade ideal para colheita do milho para silagem. In: **Anais...Milho para a silagem**. Piracicaba: FEALQ 11-26.

Pahlow G, Muck RE, Driehuis F, Oude Elferink SJWH, Spoelstra SF (2003) Microbiology of ensiling. In: Buxton, D.R.; Muck, R.E.; Harrison, J.H. (Eds.) **Silage Science and Technology**. Madison, USA: American Society of Agronomy 31-93.

Pereira MN, Von Pinho RG, Bruno RGS, Calestine GA (2004) Ruminal degradability of hard or soft texture corn grain at three maturity stages. **Scientia Agricola** 61: 358-363.

Philippeau C, Monredon FLDD, Michalet-Doreau B (1999) Relationship between ruminal starch degradation and the physical characteristics of corn grain. **Journal of Animal Science** 77: 238-243.

Rabelo CHS, Basso FC, Lara EC, Jorge LGO, Harter CJ, Mesquita LG, Silva LFP, Reis RA (2017) Effects of *Lactobacillus buchneri* as a silage inoculant and as a probiotic on feed intake, apparent digestibility and ruminal fermentation and microbiology in wethers fed low-dry-matter whole-crop maize silage. **Grass and Forage Science** 1:1 - 11.

Rooke JA, Hatfield RD (2003) Biochemistry of Ensiling. In.: Buxton DR, Muck RE, Harrison JH (Eds.) **Silage Science and Technology**. American Society of Agronomy, Madison 95–140.

Rossi LG (2020) **Impacto do estágio de maturidade, do uso de inoculante bacteriano e do tempo de armazenagem sobre a qualidade da silagem de milho**. Tese (doutorado) 98p. – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

Salvati G (2019) **Strategies to improve kernel processing and dairy cow performance in whole- plant corn silage based on vitreous endosperm hybrid** Tese (doutorado) 84p. – Universidade de São Paulo (USP), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”., Piracicaba.

Salvo PAR, Basso FC, Rabelo CHS, Oliveira AA, Sader AP, Casagrande DR, Berchielli TT, Reis RA (2013) Características de silagens de milho inoculadas com *Lactobacillus buchneri* e *L. plantarum*. **Archivos de Zootecnia** 62:1 – 12.

Saylor BA, McCary, CL, Diepersloot EC, Heinzen CJ, Pupo MR, Gusmão JO, Ghizzi LG, Sultana H, Ferraretto LF (2021 a) Effect of forage processor roll gap width and storage length on fermentation profile, nutrient composition, kernel processing score, and starch disappearance of whole-plant maize silage harvested at three different maturities. **Agriculture** 2021 11: 574.

Saylor BA, Casale F (2020) Effect of microbial inoculation and particle size on fermentation profile, aerobic stability, and ruminal in situ starch degradation of high-moisture corn ensiled for a short period. **Journal of Dairy Science** 1:379-395.

Saylor, BA; Diepersloot, EC; Heinzen, C; McCary,CL; Ferraretto, LF; (2021 b) Effect of kernel breakage on the fermentation profile, nitrogen fractions, and in vitro starch digestibility of whole-plant corn silage and ensiled corn grain, **JDS Communications** 2: 191-195. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2021-0093>.

Silvestre AM, Millen DD (2021) The 2019 Brazilian survey on nutritional practices provided by feedlot cattle consulting nutritionists. **Revista Brasileira de Zootecnia** 50: e20200189. DOI: 10.37496/rbz5020200189

Shinners, KJ, Holmes BJ (2013) Making Sure Your Kernel Processor Is Doing Its Job. **Focus on Forage** 15:4.

Shinners KJ, Jirovec AG, Shaver RD, Bal M. 2000. Processing whole-plant corn silage with crop processing rolls on a pull-type forage harvester. **Applied Engineering in Agriculture** 16(4): 323-331.

Siqueira GR, Bernardes TF (2013) Culturas destinadas à ensilagem. In: Reis, R. A.; Bernardes, T. F.; Siqueira, G. R. **Forragicultura: Ciência, tecnologia e gestão dos recursos forrageiros** Cap. 41, 661-670.

Windle MC, Walker N, Kung Jr L. (2014) Effects of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of corn silage harvested at different dry matter contents and ensiled for various lengths of time **Journal of Dairy Science** 97: 3053-3060.

Weinberg ZG, Muck RE, Weimer PJ, Chen Y, Gamburg M (2004) Lactic acid bacteria used in inoculants for silage as probiotics for ruminants. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 118, p. 1-9.

Zopollatto M, Daniel JLP, Nussio LG. (2009) Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia** 38: 170-89.

CAPÍTULO 2 - Efeito do processamento do grão de milho e tempo de armazenamento sobre o processo fermentativo, características nutricionais e físicas da silagem de milho

RESUMO – O objetivo desse estudo foi avaliar o impacto do processamento de grãos sobre o processo fermentativo, composição química, características físicas e degradabilidade *in situ* (DIS) da MS e amido em silagens de milho armazenadas por diferentes tempos. O estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, como medidas repetidas no tempo, considerando o efeito de processamento (sem e com utilização de processador de grãos na ensilagem) e sua interação com o tempo de armazenamento. Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento MIXED do SAS (SAS® Studio, SAS Institute Inc., Cary, NC). Em todos os testes, médias foram comparadas pelo teste Tukey e diferenças significativas foram consideradas a 5% de probabilidade. A proporção de FDN, FDA, Lignina e CS, foram maiores quando se utilizou o processador de grãos no momento da ensilagem. Já o NNP, amido e prolamina foram menores quando se utilizou o processador. As proporções de MM, FDN e FDA diminuíram com o tempo de armazenamento, diferentemente do NNP o qual aumentou. No ácido butírico e NNH₃, houve interação entre processamento e tempo de armazenamento. O etanol, 1,2 propanodiol e ácido acético não foram afetados pelo processamento. O ácido láctico foi maior quando se utilizou o processador de grãos no momento da ensilagem, já os valores de ácido propiônico, pH, perdas de MS e produção de efluentes foram menores. O tempo de armazenamento não interferiu nos valores de etanol, pH e produção de efluentes, contudo, a proporção de 1,2 propanodiol, ácido láctico, acético e propiônico, e perdas de MS foram afetadas. Na temperatura máxima houve interação entre processamento e tempo de armazenamento. A estabilidade aeróbia (EA), ADITE e perdas de MS durante o tempo de estabilidade (PMSE), não diferiram entre os processamentos de grãos (uso ou não). Por outro lado, todas essas variáveis apresentaram diferenças quando avaliado em relação ao tempo de armazenamento. Houve interação entre processamento e tempo de armazenamento nas proporções retidas na peneira de 8 e 4 mm. O KPS, a peneira de 19 mm e o fundo foram afetadas pelo tipo de processamento utilizado durante a ensilagem. A utilização ou não de processador de grãos na ensilagem resultou em maior DIS do amido (12h), contudo o tempo de armazenamento não afetou essa variável. A DIS da MS (12h), DIS da MS (24h) e a DIS do amido (24h) não apresentaram diferenças quando comparadas quanto ao tipo de processamento, tempo de armazenamento e a interação desses fatores. Conclui-se que a utilização do processador de grãos na ensilagem aumentou o KPS, melhorou a DIS do amido (12h) e a qualidade fermentativa da massa ensilada. As variáveis relacionadas com estabilidade aeróbia das silagens apresentaram melhores resultados em tempos mais prolongados de armazenamento.

Palavras-chave: degradabilidade *in situ*, estabilidade aeróbia, KPS

2.1 Introdução

A silagem de milho representa a principal fonte de volumoso na alimentação de bovinos confinados no Brasil (Silvestre & Millen, 2021), e de bovinos

leiteiros em todo o mundo (Bernardes & Rêgo, 2015; Ferraretto et al., 2017). Sabe-se que a principal fonte de energia deste volumoso é proveniente de carboidratos não fibrosos, destacadamente do amido presente nos grãos (Allen et al., 1997). Desta maneira, a busca por estratégias que melhorem a eficiência de utilização da fração amido da silagem de milho, visando otimizar a produção animal se faz necessária.

Estudos têm apontado que o processamento de grãos na ensilagem (Bal et al., 2000; Johnson et al., 2003; Salvati, 2019) e o tempo de armazenamento da silagem (Daniel et al., 2015; Der Bedrosian et al., 2012; Hoffman et al., 2011; Hristov et al., 2020; Saylor et al., 2021) podem alterar o processo fermentativo e podem ter efeito direto sobre a disponibilidade do amido para o animal.

Embora a utilização de máquina automotriz equipada com sistema de rolos esmagadores, tem mostrado resultados promissores em relação ao aumento da digestibilidade do amido, devido ao processo de picagem onde ocorre a quebra uniforme dos grãos do milho, o que reduz o tamanho da partícula desses grãos e facilita o acesso aos microrganismos (Bal et al., 2000; Cooke e Bernard, 2005; Johnson et al., 2003, Salvati, 2019). Por outro lado, há poucos estudos mostrando como a utilização de um maquinário acoplado a colhedora que quebra os grãos durante o processo de picagem da planta de milho, afeta as variáveis relacionadas à qualidade das silagens produzidas em condições tropicais, utilizando híbridos flint, assim como a sua interação com tempo de armazenamento.

O silo é um sistema dinâmico que sofre inúmeras alterações ao longo do tempo de armazenamento (Saylor et al., 2021). Embora se considere que a fase de fermentação estável de uma silagem deva ser atingida entre 2 a 6 semanas após a ensilagem (dependendo de diversas condições; Pahlow et al., 2003), alguns estudos (Daniel et al., 2015; Der Bedrosian et al., 2012; Hoffman et al., 2011; Windle et al., 2014), avaliando tempos de armazenamento de até 570 dias, têm reportado contínuo acréscimo na digestibilidade do amido com o crescente tempo de armazenamento, o qual deve ser atribuído à atividade proteolítica (degradação da matriz proteica que protege os grânulos de amido) causadas pela atividade de bactérias (60%), enzimas (30%), fungos (5%) e produtos da fermentação (5%) (Junges et al., 2015).

Com isso, o objetivo desse estudo foi avaliar o impacto do processamento de grãos sobre o processo fermentativo, composição química, características físicas e degradabilidade *in situ* da MS e amido em silagens de milho armazenadas por diferentes tempos.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Tratamentos e processo de ensilagem

A área de produção era localizada próximo as coordenadas geodésicas 21°14' latitude Sul e 48°16' longitude Oeste, com altitude média de 593 metros, declividade 5,8%, apresentando clima Aw de acordo com classificação de Köppen. O solo é classificado como Oxisols (Soil Taxonomy, 2006) com relevo suave ondulado (EMBRAPA, 1999).

A semeadura do híbrido de milho 2B710PW (híbrido simples, ciclo precoce, semi-duro), ocorreu em 17 de novembro de 2017 com espaçamento entre linhas de 0,90 metros com 6 sementes por metro, com população de 66.666 sementes ha⁻¹. Na adubação de semeadura foram utilizados 350 kg ha⁻¹ da fórmula 08-28-16 NPK. Na adubação de cobertura foi feita a aplicação de 200 kg de ureia e 200 kg ha⁻¹ da fórmula 30-00-10 NPK em 28 de novembro de 2017. A colheita foi realizada aos 82 dias após a semeadura, com produção média de 16,2 t MS/ha.

Durante a safra, a temperatura média atingida foi de 24°C, sendo 35°C a máxima e 14°C a temperatura mínima. A umidade relativa média foi de 77%, sendo a máxima de 100% e a mínima de 20%. A radiação média foi 27 MJm² dia e a precipitação média diária foi de 7 mm. Os dados climatológicos apresentaram-se dentro das condições ideais de desenvolvimento da cultura (Embrapa, 2021).

O milho foi colhido com aproximadamente 30% de MS em toda a planta. A colheita do milho foi realizada de forma mecanizada, parte com a colhedora New Pecu[®], Nogueira Máquinas, contendo processador de grãos (sistema quebra grãos que promove a quebra uniforme dos grãos do milho durante o processo de picagem), e outra parte com a colhedora JF 92 Z4 Serie 3 sem processador de grãos, ambas visando obter partículas com tamanho médio próximo a 10 mm.

Após a colheita, o milho foi inulado com *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323 (Lallemand Animal Nutrition, Goiânia, GO, Brasil) em uma concentração de 1×10^5 unidades formadoras de colônia (ufc)/g de forragem. O inoculante foi diluído em água destilada (5 L/t) e aplicado sobre a forragem de todos os tratamentos com auxílio de borrifador manual sob constante homogeneização da forragem.

Tubos de PVC com capacidade de 5 L foram utilizados como silos experimentais em quadruplicata por tratamento. A compactação da forragem foi realizada com auxílio de soquetes de madeira visando obter uma massa específica próxima a 600 kg/m^3 de matéria natural. Posteriormente, os silos foram lacrados com fita adesiva, pesados e armazenados em temperatura ambiente por 90, 150, 240 e 360 dias. No momento da ensilagem (tempo 0), a forragem foi amostrada para determinação da composição química. Em todos os tempos de armazenamento, uma amostra (~300 g) de cada repetição em cada tratamento foi colhida e armazenada a -20°C em freezer para posteriores análises químicas.

2.2.2 *Determinação das perdas fermentativas e estabilidade aeróbia*

Decorridos os dias de armazenamento pré-determinados, os silos foram novamente pesados para a quantificação de perda total de MS e produção de efluentes, conforme proposto por Jobim et al. (2007).

Na avaliação da estabilidade aeróbia, uma porção (~1,2 kg) de silagem de cada repetição em cada tratamento foi removida dos silos, revolvida e homogeneizada em bandejas plásticas para haver maior penetração de oxigênio e colocada em baldes plásticos (capacidade de 5 L) em uma sala sob temperatura controlada ($\pm 25^\circ\text{C}$). Durante 10 dias, a temperatura de cada silagem foi mensurada a cada meia hora por meio de um 'datalogger' inserido no centro da massa presente no balde. A temperatura ambiente também foi mensurada por meio de um 'datalogger' alocado próximo aos baldes contendo as silagens. A estabilidade aeróbia foi definida como o número de horas que a temperatura da silagem permaneceu estável antes de aumentar 2°C acima da temperatura ambiente (Moran et al. 1996). A temperatura diária acumulada (ADITE) foi calculada como a soma das médias diárias da diferença entre a temperatura da silagem e a temperatura ambiente durante os 5 primeiros dias de exposição aeróbia. Os baldes foram

pesados antes e depois do tempo de estabilidade aeróbia e calculado as perdas de MS durante o processo.

2.2.3 Análises químicas

Um extrato aquoso contendo 25 g de silagem e 225 mL de água destilada foi preparado (Kung et al., 1984) utilizando um liquidificador Philips Walita (Walita, Varginha, MG, Brasil) misturando por 1 min na configuração mais alta e filtrado em filtros de TNT, para determinar os valores de pH e nitrogênio amoniacal (N-NH₃). O pH do filtrado foi medido imediatamente por meio de um medidor de pH (modelo MA522, Marconi Laboratory Equipment, Piracicaba, SP, Brasil). O N-NH₃ foi determinado por destilação em aparelho micro-Kjeldahl (AOAC, 1996; método n^o. 941.04) e expresso em relação ao N total (N-NH₃/NT). O extrato aquoso produzido com a silagem foi filtrado e centrifugado a 10.000 × g por 15 minutos a -4°C e posteriormente utilizado na determinação da concentração dos produtos da fermentação, ácido lático, AGCC (ácido acético, propiônico e butírico), etanol e 1,2 – propanodiol. Para isso, foi utilizado cromatógrafo gasoso com detector de massas (GCMS) (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), usando coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, USA; 60m, 0,25 mm ø, 0,25 µm crossbond carbowax polyethylene glycol) e parâmetros analíticos conforme as recomendações do fabricante.

Após passarem pelo processo de secagem em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas, as amostras da planta e silagem foram moídas em moinho de faca (peneira de 1 mm). Para determinação da MS, as amostras foram secas em estufa a 105 °C por 12 horas (AOAC, 1996; método n^o. 930.15). A MS foi corrigida (MSc) para compostos voláteis, usando uma equação (Eq. 1) proposta por Weissbach e Strubelt (2008):

$$\text{MSc (g/kg)} = \text{MS} + (0,95 \times \text{AGCC}) + (0,08 \times \text{Ácido lático}) + (0,77 \times \text{1,2-propanodiol}) + (1 \times \text{outros álcoois}) \quad (1)$$

Onde todos os compostos voláteis são expressos em g / kg de matéria verde (MV).

A matéria mineral foi determinada após queima na mufla a 500°C por 5 horas (AOAC, 1996; método nº. 923.03). O NT foi determinado por destilação em aparelho micro-Kjeldahl (AOAC, 1996; método nº. 941.04), e a proteína bruta (PB) foi calculada como $NT \times 6,25$. A proteína solúvel (PS) foi determinada com a utilização de ácido tricloracético (Licitra et al., 1996) seguindo os procedimentos descritos no INCT (Detmann et al., 2012) e expressa em relação a PB.

A fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas em autoclave, e posteriormente foi analisado a lignina, utilizando sacos de ANKON F57, seguindo os procedimentos descritos no INCT (Detmann et al., 2012). O FDN foi determinado utilizando-se amilase termoestável sem adição de sulfito de sódio e, ambos FDN e FDA foram corrigidos para cinzas. A lignina foi determinada com a utilização de ácido sulfúrico seguindo os procedimentos descritos no INCT (Detmann et al., 2012) e foi corrigida para cinzas.

Os carboidratos solúveis foram analisados a partir do método de antrona (Dische, 1962). O teor de amido foi determinado utilizando o método de hidrólise enzimática, de acordo com Hall (2009). A prolamina foi analisada por meio de colorimetria descritos por Nellis, Hoffman e Shaver (2013).

2.2.4 Degradabilidade *in situ*

Na análise de degradabilidade *in situ* da MS (DISMS) e amido (DISAmido) foram utilizadas amostras frescas das silagens com o tamanho de partícula original de cada tratamento nos diferentes tempos de armazenamento, e foram pesadas proporcionalmente a 5 g de matéria seca. Foram incubadas por 12 horas e 24 horas em sacos para degradabilidade (modelo R1020, Ankon, 50±15 micras) conforme descrito por Nocek (1988), sendo colocados primeiro os sacos de 24 horas e, após 12 horas, os sacos de 12 horas, todos foram retirados ao mesmo tempo, lavados e secos por 72 horas em estufa de circulação forçada a 55°C para posterior pesagem.

Foram utilizados 2 bovinos Nelore canulados no rúmen recebendo dieta com silagem de milho, concentrado e sal mineral, relação V:C de 80:20, com quinze dias de adaptação e um de incubação. Em cada animal foram incubados todos os tratamentos, foram usados quatro saquinhos para cada tratamento.

Após as 12 horas os sacos foram lavados e secos por 72 horas em estufa de circulação forçada a 55°C para pesar posteriormente. Após a pesagem, os resíduos da incubação foram moídos em moinho de faca (peneira de 1 mm), para posterior análise de MS e Amido, seguindo as metodologias citadas anteriormente (AOAC, 1996; método nº. 930.15; Hall, 2009). A DISMS e DISAmido (%) foram obtidas como a diferença entre 100 e a MS e Amido indigestível, respectivamente.

Na tabela 1 observamos a composição química, pH e degradabilidade *in situ* da MS e amido das plantas de milho antes da ensilagem, utilizando ou não processador de grãos no momento da ensilagem.

Tabela 1. Composição química, pH e degradabilidade *in situ* da planta de milho antes da ensilagem.

	SP	CP	DP
Composição química (% MS)			
MS	30,5	29,3	0,352
MM	4,39	4,45	0,059
FDN	55,1	56,7	0,768
FDA	26,5	27,1	0,316
Lignina	3,53	3,63	0,051
PB	9,18	9,38	0,171
NNP (NT)	10,9	12,2	0,835
Amido	15,2	15,5	0,416
Prolamina	2,84	2,46	0,114
CS	17,1	16,4	0,533
N-NH3 (NT)	1,44	1,26	0,133
pH	5,99	6,06	0,039
DISMS % (12h)	32,1	41,5	2,95
DISMS % (24h)	46,3	50,6	1,08
DISAmido % (12h)	33,5	56,7	8,02
DISAmido % (24h)	44,5	69,8	6,08

MS= matéria seca; MM= matéria mineral; FDN=Fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; PB= proteína bruta; NNP (NT)= nitrogênio não proteico em relação ao N total; CS = Carboidratos solúveis; N-NH3 (NT)= nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total; SP= Sem processador de grãos; CP= Com processador de grãos; DP= desvio padrão.

2.2.5 Características físicas

A extensão da fragmentação dos grãos da silagem de milho foi analisada utilizando a metodologia de KPS, segundo Ferreira e Mertens (2005). Para

analisar a distribuição do tamanho de partícula foi utilizado o conjunto de peneiras com gramatura de 19, 8 e 4 mm mais um fundo, seguindo as instruções de Heinrichs (2013).

Na tabela 2 observamos as características físicas da planta de milho antes da ensilagem.

Tabela 2. Características físicas (%) da planta de milho antes da ensilagem.

	SP	CP	DP
KPS	44,4	78,0	2,03
Peneira 19 mm	7,22	3,16	0,636
Peneira 8 mm	47,6	30,8	1,25
Peneira 4 mm	32,4	41,8	1,13
Fundo	12,83	24,4	0,630

KPS = Processamento de grãos; SP= Sem processador de grãos; CP= Com processador de grãos; DP= desvio padrão.

2.2.6 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado como medidas repetidas no tempo, com quatro repetições por tratamento. Foi utilizado o seguinte modelo: $Y_{ijk} = \mu + P_i + T_k + PT_{ik} + e_{ijk}$, em que efeitos fixos são μ = média geral; P_i = efeito de processamento (i = sem e com utilização de processamento de grãos); T_k = tempos de armazenamento dos silos (k = 90, 150, 240 e 360 dias); PT_{ik} = interação entre processamento e tempos de armazenamento, e e_{ijk} = erro experimental como fator aleatório.

Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento MIXED do SAS (SAS® Studio, SAS Institute Inc., Cary, NC). Em todos os testes, médias foram comparadas pelo teste Tukey e diferenças significativas foram consideradas a 5% de probabilidade.

2.3 Resultados

Na composição química das silagens de milho armazenadas por 90, 150, 240 e 360 dias, no teor de MS houve interação entre processamento e tempo de armazenamento ($p < 0,05$; Tabela 3; Figura 1). Os teores de MS, no tratamento utilizando processador de grãos, foram maiores nos tempos de 240 e 360 dias,

já no tratamento sem a utilização de processador de grãos, o teor de MS foi maior no tempo de 90 dias (Figura 1).

A proporção de MM e PB não foram afetadas pelo processamento ($p > 0,05$; Tabela 3). Contudo a proporção de FDN, FDA, Lignina e CS, foram maiores quando se utilizou o processador de grãos no momento da ensilagem ($p < 0,05$; Tabela 3). Já o NNP, amido e prolamina foram menores quando se utilizou o processador ($p < 0,05$; Tabela 3).

O tempo de armazenamento não interferiu na lignina, PB, amido, prolamina e CS ($p > 0,05$; Tabela 3). Entretanto, as proporções de MM, FDN e FDA diminuíram quando armazenadas por 90,150,240 e 360 dias, diferentemente do NNP o qual aumentou ($p < 0,05$; Tabela 3). As proporções de FDN e FDA, foram maiores no tempo de armazenamento de 90 e 150 dias e menores valores foram encontrados no tempo de 360 dias (Tabela 3). Já o NNP, o tempo de 90 dias apresentou os menores valores e 360 dias os maiores (Tabela 3).

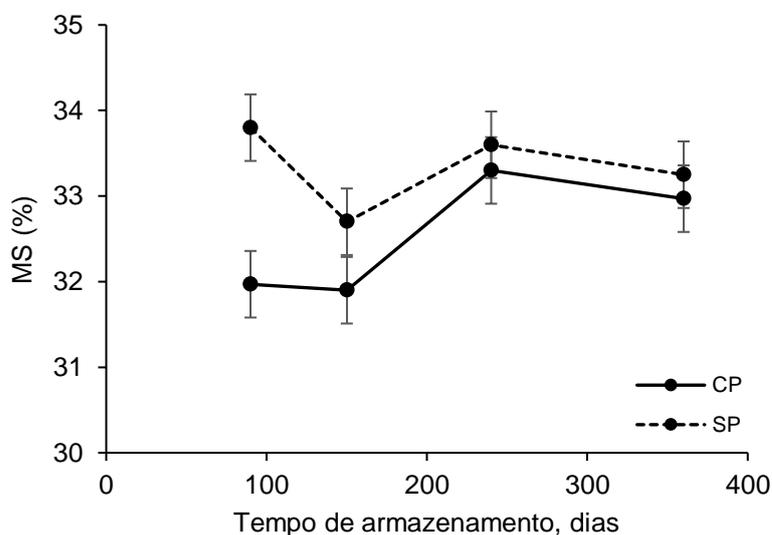


Figura 1. Teor de matéria seca (MS) de silagem de milho utilizando (CP) ou não (SP) processamento de grãos na ensilagem e diferentes tempos de aberturas.

Tabela 3. Composição química de silagem de milho utilizando ou não processamento de grãos na ensilagem e diferentes tempos de aberturas.

	Tempos de aberturas (dias)					Processamento			P-valor		
	90	150	240	360	SEM	SP	CP	SEM	P	T	P x T
Composição química (% MS)											
MS	32,9	32,3	33,5	33,1	0,201	33,4	32,5	0,146	<0,001	0,003	0,038
MM	3,75 ^a	3,46 ^{ab}	3,29 ^b	3,11 ^b	0,105	3,40	3,40	0,081	0,974	0,001	0,114
FDN	44,3 ^a	44,3 ^a	42,3 ^{ab}	41,2 ^b	0,601	40,3 ^b	45,7 ^a	0,388	<0,001	<0,001	0,187
FDA	22,1 ^a	22,2 ^a	21,7 ^{ab}	20,8 ^b	0,267	20,1 ^b	23,3 ^a	0,177	<0,001	0,004	0,123
Lignina	2,61	2,77	2,61	2,59	0,072	2,36 ^b	2,92 ^a	0,044	<0,001	0,340	0,430
PB	8,61	8,42	8,30	8,44	0,185	8,41	8,47	0,148	0,730	0,580	0,686
NNP (NT)	38,1 ^b	40,5 ^{ab}	43,2 ^{ab}	45,7 ^a	1,833	47,9 ^a	35,8 ^b	1,456	<0,001	0,026	0,766
Amido	23,3	23,3	23,8	24,3	0,704	25,4 ^a	21,9 ^b	0,532	<0,001	0,655	0,450
Prolamina	2,97	2,98	2,95	2,91	0,091	3,20 ^a	2,71 ^b	0,070	<0,001	0,900	0,091
CS	5,17	5,61	5,62	5,09	0,195	5,07 ^b	5,68 ^a	0,119	0,005	0,124	0,389

MS= matéria seca; MM= matéria mineral; FDN=Fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; PB= proteína bruta; NNP (NT)= nitrogênio não proteico em relação ao N total; CS = Carboidratos solúveis; SP= Sem processador de grãos; CP= Com processador de grãos; SEM= erro padrão da média; P= processamento; T= tempo; P x T = Interação entre processamento e tempo.

* Médias seguidas de mesma letra na linha não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Nos produtos da fermentação das silagens de milho armazenadas por 90, 150, 240 e 360 dias, nas variáveis ácido butírico e NNH_3 houve interação entre processamento e tempo de armazenamento ($p < 0,05$; Tabela 4; Figura 2). O ácido butírico não diferiu entre si nos tempos 90, 150 e 240 dias, quando comparado os tratamentos utilizando ou não processador de grãos, e foi diferente no tempo de 360 dias, sendo que o tratamento que não utilizou o processador apresentou maiores valores desse ácido em 360 dias (Figura 2). Já o NNH_3 , nos tempos de 90 e 150 dias a utilização ou não do processador de grãos não diferiram entre os tratamentos. No entanto, no tempo de 240 dias a não utilização de processador de grãos gerou menores valores de NNH_3 comparadas com a utilização dessa ferramenta, contudo essa variável se comportou de maneira oposta no tempo de 360 dias (Figura 2).

Dentro do tratamento utilizando processador de grãos não se observou diferenças entre os tempos de aberturas nas variáveis ácido butírico e NNH_3 (Figura 2). No entanto, no tratamento sem a utilização do processador de grãos observamos variação entre os tempos de abertura (Figura 2).

O etanol, 1,2 propanodiol e ácido acético não foram afetados pelo processamento ($p > 0,05$; Tabela 4). Contudo, o ácido lático foi maior quando se utilizou o processador de grãos no momento da ensilagem ($p < 0,05$; Tabela 4). Já os valores de ácido propiônico, pH, perdas de MS e produção de efluentes foram menores quando se utilizou o processador de grãos no momento da ensilagem ($p < 0,05$; Tabela 4).

O tempo de armazenamento não interferiu nos valores de etanol, pH e produção de efluentes ($p > 0,05$; Tabela 4). Contudo, a proporção de 1,2 propanodiol, ácido lático, acético e propiônico, e perdas de MS foram afetadas quando armazenadas por diferentes tempos ($p < 0,05$; Tabela 4). A variável 1,2 propanodiol apresentou os maiores valores no tempo de 360 dias e menores valores nos tempos de 90 e 150 dias (Tabela 4). Já o ácido lático e o ácido acético se comportaram de maneira opostas, enquanto o ácido lático apresentou maiores valores com 90 dias e menores com 360 dias, o acético apresentou maiores valores com 360 dias e menores com 90 e 150 dias, o mesmo comportamento foi observado para o ácido propiônico (Tabela 4). As perdas de MS foram menores nos tempos 90, 150 e 240 dias, comparadas ao tempo de 360 dias, e iguais entre si (Tabela 4).

Tabela 4. Compostos orgânicos, pH, N-NH₃, perdas de MS e produção de efluentes de silagem de milho utilizando ou não processamento de grãos na ensilagem e diferentes tempos de aberturas.

	Tempos de aberturas (dias)					Processamento			P-valor			
	90	150	240	360	SEM	SP	CP	SEM	P	T	P x T	
Compostos orgânicos (% MS)												
Etanol	0,374	0,267	0,300	0,274	0,042	0,294	0,313	0,017	0,561	0,102	0,520	
1,2 Propanodiol	0,0003 ^b	0,0003 ^b	0,0006 ^{ab}	0,0010 ^a	0,0001	0,0007	0,0004	0,0001	0,105	0,018	0,863	
Ácido láctico	6,53 ^a	5,10 ^b	5,44 ^{ab}	4,55 ^b	0,334	4,38 ^b	6,43 ^a	0,247	<0,001	0,004	0,210	
Ácido acético	0,606 ^b	0,593 ^b	0,752 ^{ab}	0,918 ^a	0,060	0,661	0,774	0,037	0,115	0,013	0,444	
Ácido propiônico	0,006 ^b	0,004 ^b	0,011 ^{ab}	0,013 ^a	0,002	0,011 ^a	0,006 ^b	0,001	0,030	0,016	0,172	
Ácido butírico	0,006	0,010	0,024	0,080	0,019	0,056	0,004	0,014	0,013	0,045	0,036	
pH	3,71	3,71	3,72	3,70	0,012	3,76 ^a	3,66 ^b	0,008	<0,001	0,521	0,227	
N-NH ₃ (NT)	2,03	1,83	2,18	2,91	0,175	2,38	2,10	0,101	0,168	0,006	0,015	
Perdas MS (% MS)	5,50 ^b	5,26 ^b	5,03 ^b	8,30 ^a	0,587	7,26 ^a	4,78 ^b	0,398	0,001	0,006	0,560	
Efluentes (kg/t MV)	34,9	33,6	41,5	43,1	2,57	43,9 ^a	32,7 ^b	1,58	0,001	0,070	0,104	

N-NH₃ (NT)= nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total; SP= Sem processador de grãos; CP= Com processador de grãos; MV = matéria verde; SEM= erro padrão da média; P= processamento; T= tempo; P x T = Interação entre processamento e tempo. * Médias seguidas de mesma letra na linha não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

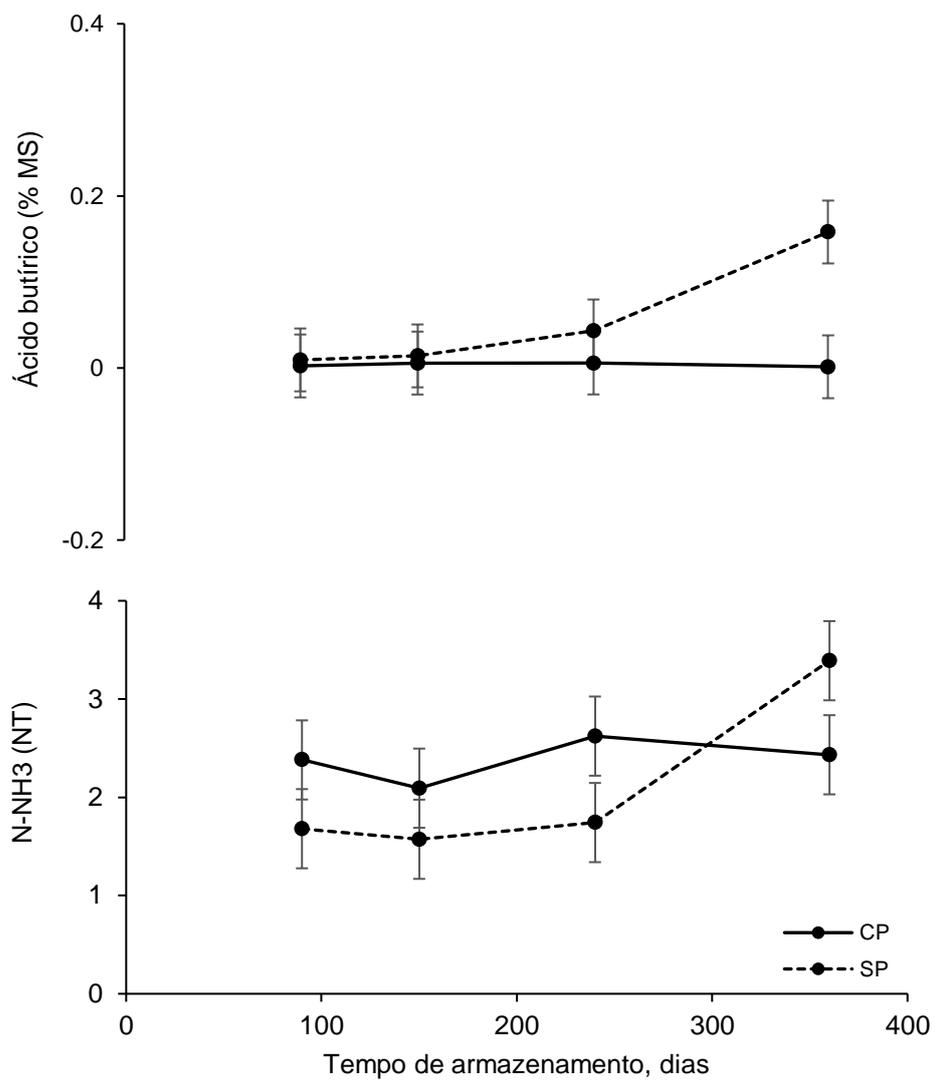


Figura 2. Ácido butírico (%MS) e nitrogênio amoniacal (N-NH₃) de silagem de milho utilizando (CP) ou não (SP) processamento de grãos na ensilagem e diferentes tempos de aberturas.

As variáveis relacionadas com estabilidade aeróbia das silagens, na T máx houve interação entre processamento e tempo de armazenamento ($p < 0,05$; Tabela 5; Figura 3). No tempo de 90 dias a não utilização de processador de grãos resultou em maiores temperaturas máximas, entretanto no tempo de 150 dias foi observado o contrário, temperaturas máximas menores no tratamento sem a utilização de processador (Figura 3). Contudo, as temperaturas máximas das silagens diminuíram com o tempo de armazenamento (Figura 3).

A EA (h), ADITE e perdas de MS durante o tempo de estabilidade (PMSE), não diferiram entre os processamentos de grãos (uso ou não) ($p > 0,05$; Tabela 5). Por outro lado, todas essas variáveis apresentaram diferenças quando avaliado em relação ao tempo de armazenamento ($p < 0,05$; Tabela 5). A EA (h) apresentou maiores valores no tempo de 240 e 360 dias, em que esses foram iguais entre si e diferiram dos tempos 90 e 150 dias, que também apresentaram valores semelhantes entre si (Tabela 5). O ADITE e a PMSE apresentaram menores valores nas silagens armazenadas por 360 dias comparada as com tempo de armazenamento de 90 dias (Tabela 5).

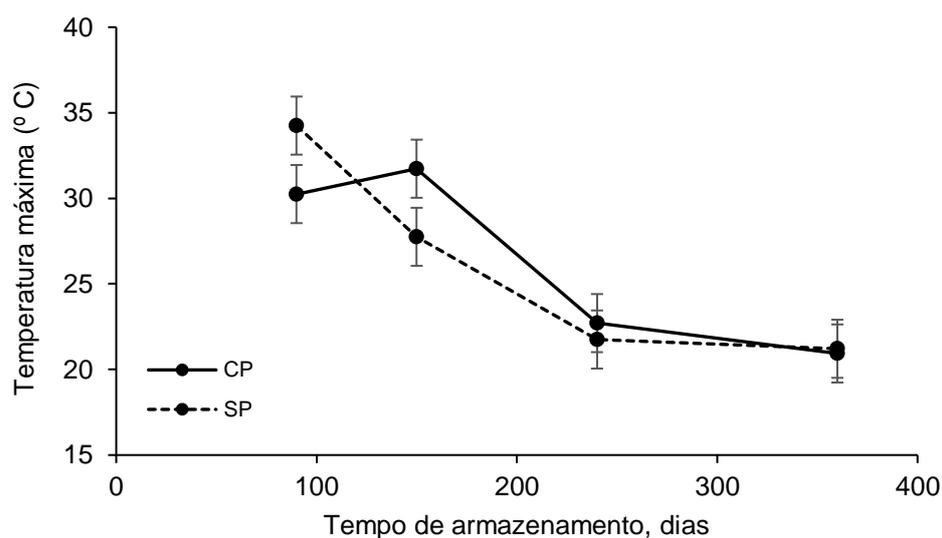


Figura 3. Temperatura máxima ($^{\circ}$ C) atingida por silagens de milho utilizando (CP) ou não (SP) processamento de grãos na ensilagem e diferentes tempos de aberturas.

Tabela 5. Estabilidade aeróbia de silagens de milho utilizando ou não processamento de grãos na ensilagem e diferentes tempos de aberturas.

	Tempos de aberturas (dias)				SEM	Processamento			P-valor		
	90	150	240	360		SP	CP	SEM	P	T	P X T
EA (h)	127 ^b	123 ^b	207 ^a	235 ^a	16,7	177	169	12,3	0,644	0,001	0,880
T máx (°C)	32,3	29,7	22,2	21,1	0,899	26,2	26,4	0,678	0,823	<0,001	0,007
ADITE	2,75 ^a	-0,875 ^{ab}	-0,682 ^{ab}	-3,94 ^b	1,87	-1,44	0,063	1,56	0,333	0,040	0,902
PMSE (% MS)	15,7 ^a	10,9 ^b	6,72 ^b	4,39 ^{bc}	1,45	8,33	10,54	0,909	0,078	<0,001	0,567

EA = estabilidade aeróbia; T máx = temperatura máxima; ADITE = média das somas das temperaturas acumuladas durante 5 dias; PMSE = perdas de matéria durante o tempo de estabilidade. SP= Sem processador de grãos; CP= Com processador de grãos; SEM= erro padrão da média; P= processamento; T= tempo; P x T = Interação entre processamento e tempo. * Médias seguidas de mesma letra na linha não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Nas variáveis relacionadas as características físicas das silagens foram observadas interação entre processamento e tempo de armazenamento nas proporções retidas na peneira de 8 e 4 mm ($p < 0,05$; Tabela 6; Figura 4). No tratamento utilizando o processador de grãos, nas proporções retidas na peneira de 8 mm, as aberturas que ocorreram com 90 e 150 dias foram iguais entre si e inferiores das aberturas que ocorreram no tempo 240 dias e 360 dias e essas foram iguais entre si, e o oposto ocorreu nas proporções retidas na peneira de 4 mm (Figura 4). O tratamento sem a utilização do processador de grãos, nas proporções retidas na peneira de 8 mm, as aberturas que ocorreram nos tempos de 240 e 360 foram iguais entre si e superiores à de 150 dias (Figura 4). Já nas proporções retidas na peneira de 4 mm, a abertura que ocorreu no tempo de 90 dias foi superior à de 360 dias (Figura 4).

O KPS, a peneira de 19 mm e o fundo foram afetadas pelo tipo de processamento utilizado durante a ensilagem ($p < 0,05$; Tabela 6). O KPS foi superior quando se utilizou o processador de grãos no momento da ensilagem e mesmo comportamento foi observado nas proporções retidas no fundo das peneiras ($p < 0,05$; Tabela 6). Já as proporções retidas na peneira de 19 mm foram menores quando se utilizou o processador de grãos no momento da ensilagem ($p < 0,05$; Tabela 6). No tempo de armazenamento foi observado que as proporções retidas no fundo foram maiores no tempo de 150 dias comparadas ao tempo de 240 dias ($p < 0,05$; Tabela 6).

Tabela 6. Características físicas de silagem de milho utilizando ou não processamento de grãos na ensilagem e diferentes tempos de aberturas.

	Tempos de aberturas (dias)				SEM	Processamento			P-valor		
	90	150	240	360		SP	CP	SEM	P	T	P X T
KPS	65,0	64,7	65,1	65,1	1,75	46,7 ^b	83,2 ^a	1,19	<0,001	0,998	0,076
Peneira 19 mm	3,39	4,53	5,37	4,87	0,617	5,73 ^a	3,35 ^b	0,427	<0,001	0,122	0,790
Peneira 8 mm	52,5	53,5	59,9	59,6	1,11	62,3	50,5	0,868	<0,001	<0,001	0,027
Peneira 4 mm	34,1	31,7	27,4	27,6	0,647	25,5	34,9	0,439	<0,001	<0,001	0,032
Fundo	10,1 ^{ab}	10,3 ^a	7,73 ^b	7,93 ^{ab}	0,612	6,50 ^b	11,5 ^a	0,400	<0,001	0,015	0,427

KPS = Processamento de grãos; SP= Sem processador de grãos; CP= Com processador de grãos; SEM= erro padrão da média; P= processamento; T= tempo; P x T = Interação entre processamento e tempo. * Médias seguidas de mesma letra na linha não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

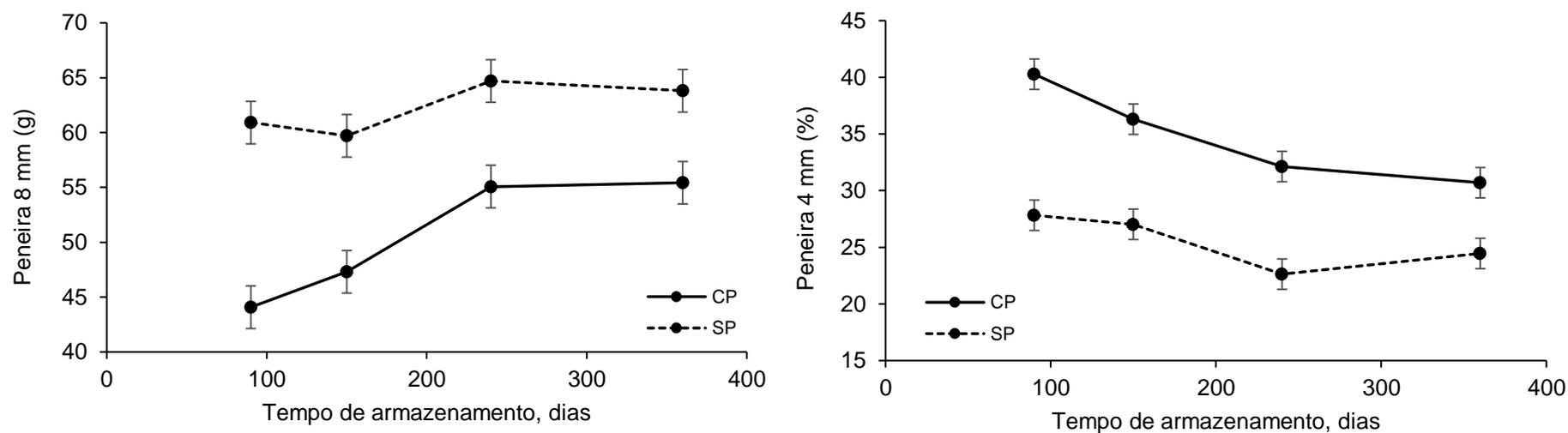


Figura 4. Porcentagem de silagem de milho retida na peneira de 8 e 4 mm, utilizando (CP) ou não (SP) processamento de grãos na ensilagem e diferentes tempos de aberturas.

Nas variáveis relacionadas com degradabilidade *in situ* observamos que a utilização ou não de processador de grãos na ensilagem resultou em maior DISAmido (12h) ($p < 0,05$), contudo não foi afetada pelo tempo de armazenamento ($p > 0,05$; Tabela 7; Figura 5). A DISMS (12h), DISMS (24h) e a DISAmido (24h) não apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas quanto ao tipo de processamento, tempo de armazenamento e a interação desses fatores ($p > 0,05$; Tabela 7).

Tabela 7. Análise de variância da degradabilidade *in situ* da MS (DISMS %) e amido (DISAmido %), de silagens de milho utilizando ou não processamento de grãos na ensilagem e diferentes tempos de aberturas, incubadas por 12 e 24 horas.

	P-valor		
	P	T	P X T
DISMS % (12h)	0,061	0,070	0,054
DISMS % (24h)	0,712	0,473	0,149
DISAmido % (12h)	0,048	0,490	0,687
DISAmido % (24h)	0,118	0,197	0,417

SP= Sem processador de grãos; CP= Com processador de grãos; SEM= erro padrão da média; P= processamento; T= tempo; P x T = Interação entre processamento e tempo.

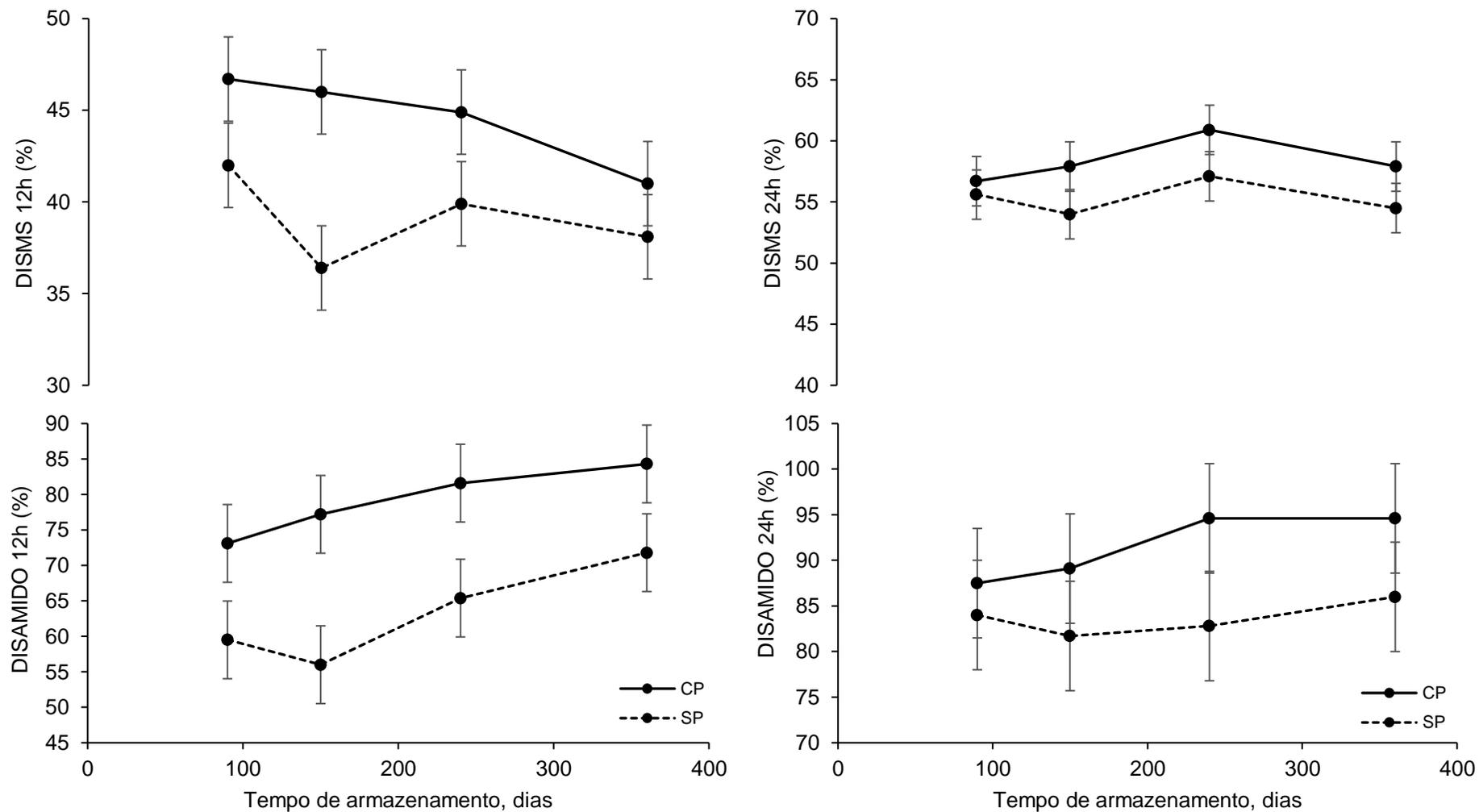


Figura 5. Degradabilidade *in situ* da MS (DISMS %), amido (DISAmido %), de silagens de milho utilizando (CP) ou não (SP) processamento de grãos na ensilagem e diferentes tempos de aberturas, incubadas por 12 e 24 horas.

2.4 Discussão

Apesar da prolamina não ter diminuído com tempo, como era esperado (Gervásio, 2021), valores de prolamina maiores no tratamento sem processador podem indicar uma maior dificuldade dos microrganismos em acessar essa matriz proteica nesse tratamento. A maior DISAMIDO 12 h encontrada no tratamento com o processador evidencia isso, já que a digestão do amido é reduzida de acordo com a complexidade da interação entre a matriz proteica e os grânulos de amido (Hoffman et al., 2011). Saylor et al. (2021) observaram que a digestibilidade ruminal in vitro do amido (7 h) aumentou com a ensilagem apenas nos grãos que foram quebrados evidenciando a importância da quebra do grão para melhorar a digestibilidade do amido na silagem de milho.

O que pode explicar o tempo de armazenamento não ter tido efeito sobre a prolamina, e apenas apresentar menores valores com a utilização do processador, seria a maturidade com que a planta foi colhida (30% MS). Observa-se maior complexidade da interação entre a matriz proteica e os grânulos de amido em plantas mais maduras, além de um aumento na vitreosidade e densidade dos grãos de milho (Correa et al., 2002; Hoffman et al., 2011).

Apesar do NNP aumentar com o tempo e essa variável ser correlacionada positivamente com digestibilidade do amido, não houve efeito do tempo de armazenamento (90, 150, 240 e 360 dias) sobre a DISAmido 12 e 24 horas. Daniel et al. (2015) em um estudo meta-analítico contemplando vários genótipos e o tempo de armazenamento entre 0 a 570 dias, observaram um aumento mais intenso na digestibilidade do amido de 0,28 unidades percentuais até 30 dias de armazenamento, e após 30 dias um aumento de 0,033 unidades percentuais por dia. Esse comportamento pode explicar os tempos de armazenamento avaliados não apresentar diferença na DISAmido.

O tempo de armazenamento afetou diretamente a fração fibrosa das silagens, apresentando menores proporções nos tempos mais longos de armazenamento. Isso pode ter ocorrido devido à solubilização da fibra durante a ensilagem. Sabe-se que durante o processo fermentativo, alguma degradação da hemicelulose é esperada devido à hidrólise ácida e/ou ação enzimática de alguns microrganismos (McDonald et al., 1991). Sendo a hemicelulose a fração mais digestível da FDN, é esperado que a FDN remanescente na silagem tenha menor

digestibilidade. Ademais, essa solubilização ocorreu de maneira diferente entre os tratamentos, o que fez que proporcionalmente o amido apresentasse valores menores onde a FDN apresentou valores maiores e vice e versa.

Independente do tratamento, as variáveis relacionadas com estabilidade aeróbia das silagens apresentaram melhores resultados em tempos mais prolongados de armazenamento. Provavelmente pelo aumento dos ácidos acético e 1,2 propanodiol (produto do metabolismo do ácido láctico pelo *L. buchneri*), esses ácidos estão relacionados com a melhoria na estabilidade aeróbica e inibição do crescimento de leveduras após a abertura do silo (Driehuis et al., 1999; Checchi, 2015).

Maiores valores de CS residuais, e menores valores de pH, ácido butírico, PMS e perdas por efluentes mostram uma melhor qualidade fermentativa no tratamento utilizando processador comparado ao tratamento sem a utilização. Isso pode estar relacionado com as características físicas dessas silagens, onde as maiores proporções retidas nas peneiras de 19 e 8 mm foram encontradas no tratamento sem a utilização do processador de grãos. Essas partículas maiores podem ter afetado a compactação da massa no momento da ensilagem, e consequentemente partículas maiores geram maior porosidade no interior da massa ensilada, alongando o tempo da respiração celular nessa primeira fase (aeróbia) do processo fermentativo (Rooke e Hatfield, 2003; Neumann et al., 2007; Lugão et al., 2011), o que consumiu ainda mais os CS presentes, e essa ineficiência nesse processo aliado ao tamanho de partícula pode ter interferido posteriormente nos valores de pH, ácido butírico, PMS e perdas por efluentes.

Apesar de ambos os tratamentos estarem dentro da faixa recomendada de distribuição de partículas (Heinrichs, 2013). O KPS resultado do tratamento utilizando processador de grãos segundo a caracterização de Shinnars e Holmes (2013) foi considerado ótimo (>70%), enquanto o sem a utilização do processador foi categorizada como ruim (<50%). Essa variável permite avaliar quantitativamente a extensão da fragmentação dos grãos da silagem de milho, e está diretamente correlacionada com a digestibilidade, pois afeta diretamente a taxa e a extensão da digestão do amido pelos ruminantes (Carbonare, 2020). Comparando um tratamento com um outro observamos que a utilização de quebrador de grão na ensilagem levou a um aumento de 36,5% no valor de KPS. Salvati (2019) utilizando silagem de milho colhidas pelo mesmo maquinário, contudo

uma parte utilizando quebrador de grãos e outra parte sem o quebrador de grãos, encontrou um aumento de 23,6% utilizando o quebrador. A DISAmido (12 h) pode ter sido maior no tratamento utilizando processador de grãos em resposta a esse aumento da extensão da fragmentação dos grãos nas silagens de milho avaliadas nesse tratamento.

2.5 Conclusões

A utilização do processador de grãos na ensilagem aumentou o KPS, melhorou a degradabilidade *in situ* do amido (12h) e a qualidade fermentativa da massa ensilada. A degradabilidade *in situ* do amido (12 e 24 h) não diferiram nos diferentes tempos de armazenamento. As variáveis relacionadas com estabilidade aeróbia das silagens apresentaram melhores resultados em tempos mais prolongados de armazenamento (após 150 dias de armazenamento).

2.6 Referências Bibliográficas

Allen MS, Coors, JG, Roth, GW (2003) Corn Silage. In: Buxton, DR, Muck, RE, Harisson, JH (Eds.) **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America 547-608.

AOAC - Association of official analytical chemist (1996) **Official methods of analysis**. 16th edition. AOAC International, Washington, D.C: Association of Official Analytical Chemists.

Bal MA, Shaver RD, Shinnors KJ, Coors JG, Lauer JG, Straub RJ, Koegel RG (2000) Stage of maturity, processing, and hybrid effects on ruminal *in situ* disappearance of whole-plant corn silage. **Animal Feed Science and Technology** 94: 86-83.

Bernardes TF, Rêgo AC (2014) Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science** 97: 1852-1861

Carbonare MSD (2020) **Processamento de grãos (KPS) da silagem de milho e aproveitamento do amido por vacas em lactação em fazendas comerciais**. 205 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba.

Checoli MB. **Silagens de cana-de-açúcar tratadas com *Lactobacillus kefir* e *L. brevis*: efeitos no perfil fermentativo e na estabilidade aeróbia**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Viçosa, MG, 2015.

Cooke KM, Bernard JK (2005) Effect of Length of Cut and Kernel Processing on Use of Corn Silage by Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science** 88: 310-316.

Correa CES, Shaver RD, Pereira MN, Lauer JG, Kohn K. (2002) Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science** 85: 3008-3012.

Daniel JLP, Junges D, Nussio LG (2015) A meta-analysis of the effects of length of storage on starch digestibility and aerobic stability of corn silages. In: XVII International Silage Conference, **Resumos...**Piracicaba, 2015: 306-307.

Der Bedrosian MC, Nestor KE, Kung Jr. L (2012) The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science** 95: 5115-5126.

Detmann, E.; Souza, M. A.; Valadares Filho, S. C.; Queiroz, A. C.; Berchielli, T. T.; Saliba, E. O. S.; Cabral, L. S.; Pina, D. S.; Ladeira, M. M.; Azevêdo, J. A. G. (Eds.) **Métodos para análise de alimentos. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 214p., 2012.**

Dische, Z. (1962). Color reactions of carbohydrates. In: Methods in carbohydrate chemistry, Vol. 1 (Whistler, R. L. & Wolfrom, M. L. (Eds)). **Academic Press, New York and London, 478-512.**

Driehuis F, Oude Elferink, SJWH, Spoelstra SF, (1999). Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated *with Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology** 87: 583-594.

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (1999). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 412p. ISBN: 85-7383-056-5.

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2021) Clima e solo. Embrapa Milho e Sorgo. **Sistema de Produção, 1**. 8ª edição. ISSN 1679-012X.

Ferraretto LF, Shaver RD, Luck BD (2017). Silage review: Recent advances and future technologies for whole-plant and fractionated corn silage harvesting. **Journal of Dairy Science** 101: 3937-3951.

Ferreira G, Mertens DR (2005) Chemical and Physical Characteristics of Corn Silages and Their Effects on In Vitro Disappearance. **Journal of Dairy Science** 88: 4414–4425.

Gervásio JRS (2021) **Reidratação e ensilagem de grãos de milho com diferentes granulometrias e inclusões na dieta para bovinos de corte**. Tese (doutorado) 70p. – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

Hall MB (2009) Analysis of starch, including malto oligosaccharides in animal feeds: a comparison of methods and a recommended method for AOAC collaborative study. **Journal – Association of Official Analytical Chemists** 92:42-49.

Heinrichs J, The Penn State Particle Separator. **Penn State Cooperative Extension**, v.13, n.183, 2013.

Hoffman PC, Esser NM, Shaver, R.D, Coblenz W, Scott MP, Bodnar AL, Schmidt R, Charley B. (2011) Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science** 94: 2465-2474.

Hristov AN, Harper MT, Roth G, Canale C, Huhtanen P, Richard TL e DiMarco K (2020) Effects of ensiling time on corn silage neutral content fiber degradability and relationship between laboratory fiber analyses and in vivo digestibility. **Journal of Dairy Science** 103: 2333-2346.

Jobim CC, Nussio LG, Reis RA, Schmidt P (2007) Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia** 36, suplemento especial, p. 101-119.

Johnson LM, Harrison JH, Davidson D, Mahanna WC, Shinnors K. (2003) Corn silage management: Effects of hybrid, chop length, and mechanical processing on digestion and energy content. **Journal of Dairy Science** 86: 208–231.

Junges D, Daniel JLP, Fernandes J, Nussio LG (2015) Prolonged storage period increases the starch degradability of flint corn silage. In: XVII International Silage Conference. **Anais...**, Piracicaba: p. 302-303.

Kung LJr., Grieve DB, Thomas JW, Huber JT (1984) Added ammonia or microbial inoculant for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science** 67, 299–306.

Licitra G, Hernandez TM, Van Soest PJ (1996) Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminants feeds. **Animal Feed Science and Technology** 57: 347-358.

Lugão SMB, Bett V, Moro V, Lançanova JAC (2011) Silagem de milho de planta inteira. In: Kiyota N, Vieira JAN, Yagi R, Lugão, SMB. **Silagem de milho na atividade leiteira do sudoeste do Paraná: do manejo do solo e de seus nutrientes à ensilagem de planta inteira e grãos úmidos**. Londrina: IAPAR, p.47-42, 2011.

McDonald, P.; Henderson, A.R.; Heron, S.J.E. **The Biochemistry of Silage**. Marlow: Chalcomb Publications, 1991. 340 p.

Moran JP, Weinberg ZG, Ashbell G, Hen Y, Owen TR (1996) A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In '**Proceedings** of the 11th International Silage Conference'. pp. 162–163

Nellis SE, Hoffman PC, Shaver RD (2013) Technical note: a modified method to quantify prolamin proteins in dry and high-moisture. **Journal of Dairy Science** 96: 4647–4652. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6575>

Neumann M, Mullbach PRF, Ost PR, Nornberg JL, Romano MA, Restle J, Sandini IE (2007) Características da fermentação da silagem obtida em diferentes tipos de silos sob efeito do tamanho de partícula e da altura de colheita das plantas de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, 37: 847 – 854.

Nocek JE (1988) In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. **Journal of Dairy Science** 71: 2051 - 2069

Pahlow G, Muck RE, Driehuis F, Oude Elferink SJWH, Spoelstra SF (2003) Microbiology of ensiling. In: Buxton, D.R.; Muck, R.E.; Harrison, J.H. (Eds.) **Silage Science and Technology**. Madison, USA: American Society of Agronomy 31-93.

Rooke JA, Hatfield RD (2003) Biochemistry of Ensiling. In.: Buxton DR, Muck RE, Harrison JH (Eds.) **Silage Science and Technology**. American Society of Agronomy, Madison 95–140.

Salvati G (2019) **Strategies to improve kernel processing and dairy cow performance in whole- plant corn silage based on vitreous endosperm hybrid** Tese (doutorado) 84p. – Universidade de São Paulo (USP), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”., Piracicaba.

Saylor BA, McCary, CL, Diepersloot EC, Heinzen CJ, Pupo MR, Gusmão JO, Ghizzi LG, Sultana H, Ferraretto LF (2021) Effect of forage processor roll gap width and storage length on fermentation profile, nutrient composition, kernel processing score, and starch disappearance of whole-plant maize silage harvested at three different maturities. **Agriculture** 2021 11: 574. <https://doi.org/10.3390/agriculture11070574>

Shinners, KJ, Holmes BJ (2013) Making Sure Your Kernel Processor Is Doing Its Job. **Focus on Forage** 15:.4.

Silvestre AM, Millen DD (2021) The 2019 Brazilian survey on nutritional practices provided by feedlot cattle consulting nutritionists. **Revista Brasileira de Zootecnia** 50: e20200189. DOI: 10.37496/rbz5020200189

Soil Survey Staff (2006) **Soil taxonomy: Keys to Soil Taxonomy**. 10ed. US Department of Agriculture (USDA), Natural Resources Conservation Service (NRCS). Government Printing Office, Washington, DC, USA.

Weissbach F, Strubelt C (2008) Correcting the dry matter content of maize silages as a substrate for biogas production. **Landtechnik** 63: 82–83.

CAPÍTULO 3 - Efeito da inoculação bacteriana e tempo de armazenamento sobre o processo fermentativo, características nutricionais e físicas da silagem de milho

RESUMO – O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da inoculação bacteriana sobre o processo fermentativo, composição química, características físicas e degradabilidade *in situ* (DIS) da MS e amido em silagens de milho armazenadas por diferentes tempos. O estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, como medidas repetidas no tempo, considerando o efeito de inoculação (sem e com utilização de *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323 em uma concentração de 1×10^5 ufc / g de forragem na ensilagem) e sua interação com o tempo de armazenamento. Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento MIXED do SAS (SAS® Studio, SAS Institute Inc., Cary, NC). Em todos os testes, médias foram comparadas pelo teste Tukey e diferenças significativas foram consideradas a 5% de probabilidade. Nas proporções de NNP e CS houve interação entre inoculação e tempo de armazenamento. A MS, FDN, Lignina, PB, amido e prolamina não foram afetadas pelo uso de inoculante. O tempo de armazenamento não interferiu na lignina, PB e prolamina. As proporções de MM, FDN e FDA diminuíram ao longo do tempo de armazenamento, enquanto as proporções de amido aumentaram. O etanol não foi afetado pela inoculação, assim como os valores de pH, NNH₃, perdas de MS e produção de efluentes. Contudo, o 1,2 propanodiol, o ácido lático, o ácido acético e o ácido propiônico, foram maiores e o ácido butírico menor quando se utilizou *L. buchneri* como inoculante na ensilagem. O tempo de armazenamento não interferiu nos valores de etanol, 1,2 propanodiol, ácido lático, ácido acético e NNH₃. Contudo, o ácido propiônico, ácido butírico, pH, perdas de MS e produção de efluentes foram afetadas quando armazenadas por diferentes tempos. Na estabilidade aeróbia e ADITE houve interação entre a inoculação e o tempo de armazenamento. A temperatura máxima e perdas de MS durante o tempo de estabilidade, não diferiram entre os tratamentos. Por outro lado, essas variáveis apresentaram diferenças quando avaliado em relação ao tempo de armazenamento. O KPS e as proporções retidas nas peneiras de 19, 8, 4 mm e fundo não foram afetadas pelo tempo de armazenamento. A DIS da MS (12h), apresentou interação entre o tempo de armazenamento e a inoculação. Na DIS da MS (24h) e na DIS do amido (24h) observamos diferenças nos tempos diferentes de armazenamento, contudo, a inoculação não afetou essas variáveis. A inoculação e o tempo de armazenamento não afetaram a DIS do amido (12h). Conclui-se que o tempo mais prolongado de armazenamento melhorou a DIS (24 h) da MS e amido. As variáveis relacionadas com a estabilidade aeróbia responderam positivamente ao tratamento utilizando inoculante até os 150 dias de armazenamento, após 150 dias de armazenamento a utilização ou não de *L. buchneri* foi indiferente considerando essas variáveis. A inoculação com *L. buchneri* na ensilagem melhorou a qualidade fermentativa da massa ensilada.

Palavras-chave: estabilidade aeróbia, *Lentilactobacillus buchneri*, qualidade fermentativa

3.1 Introdução

A silagem de milho é o alimento mais utilizado como volumoso na alimentação de bovinos confinados no Brasil (Silvestre e Millen, 2021) e bovinos leiteiros em todo o mundo (Bernardes & Rêgo, 2015; Ferraretto et al., 2017). Devido a importância da silagem de milho para a agropecuária em âmbito mundial, se faz necessário a busca por ferramentas que otimizem a utilização desse alimento.

Estudos têm apontado que a utilização de inoculantes bacterianos (Hu et al., 2009; Saylor et al., 2020) e o tempo de armazenamento da silagem (Daniel et al., 2015; Der Bedrosian et al., 2012; Hoffman et al., 2011; Hristov et al., 2020) podem alterar o processo fermentativo e podem ter efeito direto sobre a disponibilidade do amido da silagem de milho.

A adição de inoculantes bacterianos, destacadamente o *Lentilactobacillus buchneri* (bactéria ácido-lática heterofermentativa), pode afetar os produtos da fermentação e a disponibilidade do amido quando a silagem é armazenada por longos tempos (acima de 120 dias; Kleinschmit & Kung, 2006). Esta hipótese foi primariamente suportada pelo contínuo aumento na concentração de 1,2-propanodiol (produto do metabolismo do ácido láctico pelo *L. buchneri*) e nitrogênio amoniacal (N-NH₃) devido ao crescente tempo de armazenamento da silagem de milho (Kleinschmit & Kung, 2006). Posteriormente, a maior disponibilidade do amido foi atribuída à degradação das zeínas hidrofóbicas (prolaminas) causada pelo aumento da atividade proteolítica em tempos prolongados de armazenamento, observada em silagens de grãos úmidos de milho (Hoffman et al., 2011; Gervásio, 2021).

No entanto, existe resultados controversos em relação a digestibilidade utilizando esse inoculante em silagem de milho, onde a digestibilidade da MS pode não ser afetada ao se utilizar o *L. buchneri*, como relataram Rabelo et al. (2017), contrário a Basso et al. (2014) onde a digestibilidade da MS foi menor. Já Salvo et al. (2013), observaram que a digestibilidade aparente da MS foi maior em resposta a inoculação.

Com o intuito de elucidar essas interações entre a utilização de *L. buchneri* e o tempo de armazenamento, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da inoculação bacteriana sobre o processo fermentativo, composição química, características físicas e degradabilidade *in situ* da MS e amido em silagens de milho armazenadas por diferentes tempos.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Tratamentos e processo de ensilagem

A área de produção era localizada próximo as coordenadas geodésicas 21°14' latitude Sul e 48°16' longitude Oeste, com altitude média de 593 metros, declividade 5,8%, apresentando clima Aw de acordo com classificação de Köppen. O solo é classificado como Oxisols (Soil Taxonomy, 2006) com relevo suave ondulado (EMBRAPA, 1999).

A semeadura do híbrido de milho 2B710PW (híbrido simples, ciclo precoce, semi-duro), ocorreu em 17 de novembro de 2017 com espaçamento entre linhas de 0,90 metros com 6 sementes por metro, com população de 66.666 sementes ha⁻¹. Na adubação de semeadura foram utilizados 350 kg ha⁻¹ da fórmula 08-28-16 NPK. Na adubação de cobertura foi feita a aplicação de 200 kg de ureia e 200 kg ha⁻¹ da fórmula 30-00-10 NPK em 28 de novembro de 2017. A colheita foi realizada aos 84 dias após a semeadura, com produção média de 16,2 t MS/ha.

Durante a safra, a temperatura média atingida foi de 24°C, sendo 35°C a máxima e 14°C a temperatura mínima. A umidade relativa média foi de 77%, sendo a máxima de 100% e a mínima de 20%. A radiação média foi 27 MJm² dia e a precipitação média diária foi de 7 mm. Os dados climatológicos apresentaram-se dentro das condições ideais de desenvolvimento da cultura (Embrapa, 2021).

O milho foi colhido com aproximadamente 30% de MS em toda a planta. A colheita do milho foi realizada de forma mecanizada, com a colhedora JF 92 Z4 Serie 3, visando obter partículas com tamanho médio próximo a 10 mm. Após a colheita, o milho foi ensilado sem (controle) e com *L. buchneri* CNCM I-4323 (Lallemand Animal Nutrition, Goiânia, GO, Brasil) em uma concentração de 1 × 10⁵ ufc / g de forragem. O inoculante foi diluído em água destilada (5 L/t) e aplicado sobre a forragem de todos os tratamentos com auxílio de borrifador manual sob constante homogeneização da forragem. A mesma quantidade de água destilada (5 L/t) foi aplicada no tratamento controle.

Tubos de PVC com capacidade de 5 L foram utilizados como silos experimentais em quadruplicata por tratamento. A compactação da forragem foi realizada com auxílio de soquetes de madeira visando obter uma massa específica próxima a 600

kg/m³ de matéria natural. Posteriormente, os silos foram lacrados com fita adesiva, pesados e armazenados em temperatura ambiente por 90, 150, 240 e 360 dias. No momento da ensilagem (tempo 0), a forragem foi amostrada para determinação da composição química. Em todos os tempos de armazenamento, uma amostra (~300 g) de cada repetição em cada tratamento foi colhida e armazenada a -20°C em freezer para posteriores análises químicas.

3.2.2 *Determinação das perdas fermentativas e estabilidade aeróbia*

Decorridos os dias de armazenamento pré-determinados, os silos foram novamente pesados para a quantificação de perda total de MS e produção de efluentes, conforme proposto por Jobim et al. (2007).

Na avaliação da estabilidade aeróbia, uma porção (~1,2 kg) de silagem de cada repetição em cada tratamento foi removida dos silos, revolvida e homogeneizada em bandejas plásticas para haver maior penetração de oxigênio e colocada em baldes plásticos (capacidade de 5 L) em uma sala sob temperatura controlada ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Durante 10 dias, a temperatura de cada silagem foi mensurada a cada meia hora por meio de um 'datalogger' inserido no centro da massa presente no balde. A temperatura ambiente também foi mensurada por meio de um 'datalogger' alocado próximo aos baldes contendo as silagens. A estabilidade aeróbia foi definida como o número de horas que a temperatura da silagem permaneceu estável antes de aumentar 2°C acima da temperatura ambiente (Moran et al. 1996). A temperatura diária acumulada (ADITE) foi calculada como a soma das médias diárias da diferença entre a temperatura da silagem e a temperatura ambiente durante os 5 primeiros dias de exposição aeróbia. Os baldes foram pesados antes e depois do tempo de estabilidade aeróbia e calculado as perdas de MS durante o processo.

3.2.3 *Análises químicas*

Um extrato aquoso contendo 25 g de silagem e 225 mL de água destilada foi preparado (Kung et al., 1984) utilizando um liquidificador Philips Walita (Walita, Varginha, MG, Brasil) misturando por 1 min na configuração mais alta e filtrado em filtros de TNT, para determinar os valores de pH e nitrogênio amoniacal (N-NH₃). O pH do

filtrado foi medido imediatamente por meio de um medidor de pH (modelo MA522, Marconi Laboratory Equipment, Piracicaba, SP, Brasil). O N-NH₃ foi determinado por destilação em aparelho micro-Kjeldahl (AOAC, 1996; método nº. 941.04) e expressado em relação ao N total (N-NH₃/NT). O extrato aquoso produzido com a silagem foi filtrado e centrifugado a 10.000 × g por 15 minutos a -4°C e posteriormente utilizado na determinação da concentração dos produtos da fermentação, ácido láctico, AGCC (ácido acético, propiônico e butírico), etanol e 1,2 – propanodiol. Para isso, foi utilizado cromatógrafo gasoso com detector de massas (GCMS) (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), usando coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, USA; 60m, 0,25 mm ø, 0,25 µm crossbond carbowax polyethylene glycol) e parâmetros analíticos conforme as recomendações do fabricante.

Após passarem pelo processo de secagem em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas, as amostras da planta e silagem foram moídas em moinho de faca (peneira de 1 mm). Para determinação da MS, as amostras foram secas em estufa a 105°C por 12 horas (AOAC, 1996; método nº. 930.15). A MS foi corrigida (MSc) para compostos voláteis, usando uma equação (Eq. 1) proposta por Weissbach e Strubelt, (2008):

$$\text{MSc (g/kg)} = \text{MS} + (0,95 \times \text{AGCC}) + (0,08 \times \text{Ácido láctico}) + (0,77 \times \text{1,2-propanodiol}) + (1 \times \text{outros álcoois}) \quad (1)$$

Onde todos os compostos voláteis são expressos em g / kg de matéria verde (MV).

A matéria mineral foi determinada após queima na mufla a 500°C por 5 horas (AOAC, 1996; método nº. 923.03). O NT foi determinado por destilação em aparelho micro-Kjeldahl (AOAC, 1996; método nº. 941.04), e a proteína bruta (PB) foi calculada como NT × 6,25. A proteína solúvel (PS) foi determinada com a utilização de ácido tricloracético (Licitra et al., 1996) seguindo os procedimentos descritos no INCT (Detmann et al., 2012) e expressa em relação a PB.

A fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas em autoclave, e posteriormente foi analisado a lignina, utilizando sacos de ANKON F57, seguindo os procedimentos descritos no INCT (Detmann et al., 2012).

O FDN foi determinado utilizando-se amilase termoestável sem adição de sulfito de sódio e, ambos FDN e FDA foram corrigidos para cinzas. A lignina foi determinada com a utilização de ácido sulfúrico seguindo os procedimentos descritos no INCT (Detmann et al., 2012) e foi corrigida para cinzas.

Os carboidratos solúveis foram analisados a partir do método de antrona (Dische, 1962). O teor de amido foi determinado utilizando o método de hidrólise enzimática, de acordo com Hall, (2009). A prolamina foi analisada por meio de colorimetria descritos por Nellis, Hoffman e Shaver, (2013).

3.2.4 Degradabilidade *in situ*

Na análise de degradabilidade *in situ* da MS (DISMS) e amido (DISAmido) foram utilizadas amostras frescas das silagens com o tamanho de partícula original de cada tratamento nos diferentes tempos de armazenamento, e foram pesadas proporcionalmente a 5 g de matéria seca. Foram incubadas por 12 horas e 24 horas em sacos para degradabilidade (modelo R1020, Ankon, 50±15 micras) conforme descrito por Nocek (1988), sendo colocados primeiro os sacos de 24 horas e, após 12 horas, os sacos de 12 horas, todos foram retirados ao mesmo tempo, lavados e secos por 72 horas em estufa de circulação forçada a 55°C para posterior pesagem.

Foram utilizados 2 bovinos Nelore canulados no rúmen recebendo dieta com silagem de milho, concentrado e sal mineral, relação V:C de 80:20, com quinze dias de adaptação e um de incubação. Em cada animal foram incubados todos os tratamentos, foram usados quatro saquinhos para cada tratamento. Após as 12 horas os sacos foram lavados e secos por 72 horas em estufa de circulação forçada a 55°C para pesar posteriormente. Após a pesagem, os resíduos da incubação foram moídos em moinho de faca (peneira de 1 mm), para posterior análise de MS e Amido, seguindo as metodologias citadas anteriormente para determinação de MS e amido (AOAC, 1996; método nº. 930.15; Hall, 2009). A DISMS e DISAmido (%) foram obtidas como a diferença entre 100 e a MS e Amido indigestível, respectivamente.

Na tabela 1 observamos a composição química, pH e degradabilidade *in situ* das plantas de milho antes da ensilagem, utilizando ou não *L. buchneri* como inoculante, no momento da ensilagem.

Tabela 1. Composição química, pH e degradabilidade *in situ* da planta de milho antes da ensilagem.

	C ¹	LB	DP
Composição química (% MS)			
MS	30,7	31,3	0,257
MM	4,50	4,45	0,092
FDN	57,1	58,0	0,772
FDA	27,0	27,9	0,623
Lignina	3,64	3,79	0,217
PB	9,40	9,30	0,203
NNP (NT)	15,7	15,4	1,93
Amido	14,5	14,6	0,281
Prolamina	2,80	2,43	0,100
CS	16,7	15,5	0,470
N-NH ₃ (NT)	1,20	0,857	0,180
pH	6,13	6,10	0,032
DISMS % (12h)	30,7	30,5	2,58
DISMS % (24h)	42,6	39,5	2,50
DISAmido % (12h)	29,7	28,0	5,93
DISAmido % (24h)	43,5	44,5	10,3

MS= matéria seca; MM= matéria mineral; FDN=Fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; PB= proteína bruta; NNP (NT)= nitrogênio não proteico em relação ao N total; CS = Carboidratos solúveis; N-NH₃ (NT)= nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total; C= Controle; LB= *Lentilactobacillus buchneri*; DP= desvio padrão; ¹A silagem de milho não foi tratada com *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323 a 1×10^5 ufc/g matéria verde.

3.2.5 Características físicas

A extensão da fragmentação dos grãos da silagem de milho foi analisada utilizando a metodologia de KPS, segundo Ferreira e Mertens (2005). Para analisar a distribuição do tamanho de partícula foi utilizado o conjunto de peneiras com grama-tura de 19, 8 e 4 mm mais um fundo, seguindo as instruções de Heinrichs, (2013).

Na tabela 2 observamos as características físicas da planta de milho antes da ensilagem.

Tabela 2. Características físicas (%) da planta de milho antes da ensilagem.

	C ¹	LB	DP
KPS	42,2	42,4	0,716
Peneira 19 mm	6,26	7,30	0,567
Peneira 8 mm	47,8	47,2	1,96
Peneira 4 mm	33,6	32,7	0,967
Fundo	12,43	12,83	0,726

KPS = Processamento de grãos; C= Controle; LB= *Lentilactobacillus buchneri*; DP= desvio padrão; ¹A silagem de milho não foi tratada com *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323 a 1×10^5 ufc/g matéria verde.

3.2.6 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado como medidas repetidas no tempo, com quatro repetições por tratamento. Foi utilizado o seguinte modelo: $Y_{ijk} = \mu + l_i + T_k + IT_{ik} + e_{ijk}$, em que efeitos fixos são μ = média geral; P_i = efeito de inoculação (i = sem e com utilização de inoculante); T_k = tempos de armazenamento dos silos (k = 90, 150, 240 e 360 dias); IT_{ik} = interação entre inoculações e tempos de armazenamento, e e_{ijk} = erro experimental como fator aleatório.

Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento MIXED do SAS (SAS® Studio, SAS Institute Inc., Cary, NC). Em todos os testes, médias foram comparadas pelo teste Tukey e diferenças significativas foram consideradas a 5% de probabilidade.

3.3 Resultados

Comparando a composição química das silagens de milho armazenadas por 90, 150, 240 e 360 dias, nas proporções de NNP e CS houve interação entre inoculação e tempo de armazenamento ($p < 0,05$; Tabela 3; Figura 1).

Os valores de NNP das silagens inoculadas com *L. buchneri* nos tempos de abertura de 90 e 150 dias foram superiores aos do tratamento controle, no entanto, foram iguais nos tempos de 240 e 360 dias (Figura 1).

O teor de CS, no tratamento utilizando inoculante, foi superior aos 90 dias de armazenamento, intermediário nos tempos de 150 e 240 dias, e inferior em 360 dias (Figura 1). Já no tratamento controle, os tempos 90, 150 e 240 dias foram iguais entre si e superiores aos valores encontrados no tempo de 360 dias (Figura 1).

A MS, FDN, Lignina, PB, amido e prolamina não foram afetadas pelo uso de inoculante ($p > 0,05$; Tabela 3). Contudo a proporção de MM e FDA foram menores quando se utilizou o *L. buchneri* como inoculante na ensilagem ($p < 0,05$; Tabela 3).

O tempo de armazenamento não interferiu na lignina, PB e prolamina ($p > 0,05$; Tabela 3). Entretanto, as proporções de MM, FDN e FDA diminuíram quando armazenadas por 90, 150, 240 e 360 dias, diferentemente do amido o qual foi maior no tempo de 360 dias comparados aos demais tempos que foram iguais entre si ($p < 0,05$; Tabela 3). Já o teor de MS foi maior no tempo de 90 dias e menor no tempo de 150 dias ($p < 0,05$; Tabela 3).

Tabela 3. Composição química de silagem de milho utilizando ou não inoculante na ensilagem e diferentes tempos de aberturas.

	Tempos de aberturas (dias)					Inoculação			P-valor		
	90	150	240	360	SEM	C ¹	LB	SEM	I	T	I X T
Composição química (% MS)											
MS	33,9 ^a	32,9 ^b	33,7 ^{ab}	33,4 ^{ab}	0,224	33,4	33,6	0,187	0,324	0,036	0,180
MM	3,94 ^a	3,92 ^a	3,73 ^{ab}	3,46 ^b	0,065	3,86 ^a	3,66 ^b	0,041	0,012	<0,001	0,337
FDN	41,9 ^a	42,3 ^a	40,6 ^{ab}	37,9 ^b	0,534	41,3	40,1	0,300	0,057	<0,001	0,052
FDA	21,0 ^a	21,3 ^a	20,6 ^{ab}	19,4 ^b	0,305	21,0 ^a	20,1 ^b	0,178	0,012	0,006	0,183
Lignina	2,21	2,48	2,41	2,36	0,131	2,47	2,26	0,097	0,108	0,484	0,649
PB	8,18	8,17	7,98	7,77	0,162	7,92	8,12	0,109	0,252	0,309	0,073
NNP (NT)	48,9	49,7	55,5	61,1	1,82	49,8	57,8	1,24	<0,001	<0,001	0,023
Amido	27,2 ^b	26,0 ^b	27,0 ^b	29,8 ^a	0,694	28,1	26,9	0,694	0,071	0,003	0,731
Prolamina	2,55	2,94	2,82	2,81	0,147	2,67	2,88	0,077	0,061	0,090	0,147
CS	7,07	6,52	6,50	5,02	0,212	5,91	6,64	0,162	0,001	<0,001	0,005

MS= matéria seca; MM= matéria mineral; FDN=Fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; PB= proteína bruta; NNP (NT)= nitrogênio não proteico em relação ao N total; CS = Carboidratos solúveis; C= Controle; LB= *Lentilactobacillus buchneri*; SEM= erro padrão da média; I= inoculação; T= tempo; I x T = Interação entre inoculação e tempo. ¹A silagem de milho não foi tratada com *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323 a 1×10^5 ufc/g matéria verde. * Médias seguidas de mesma letra na linha não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

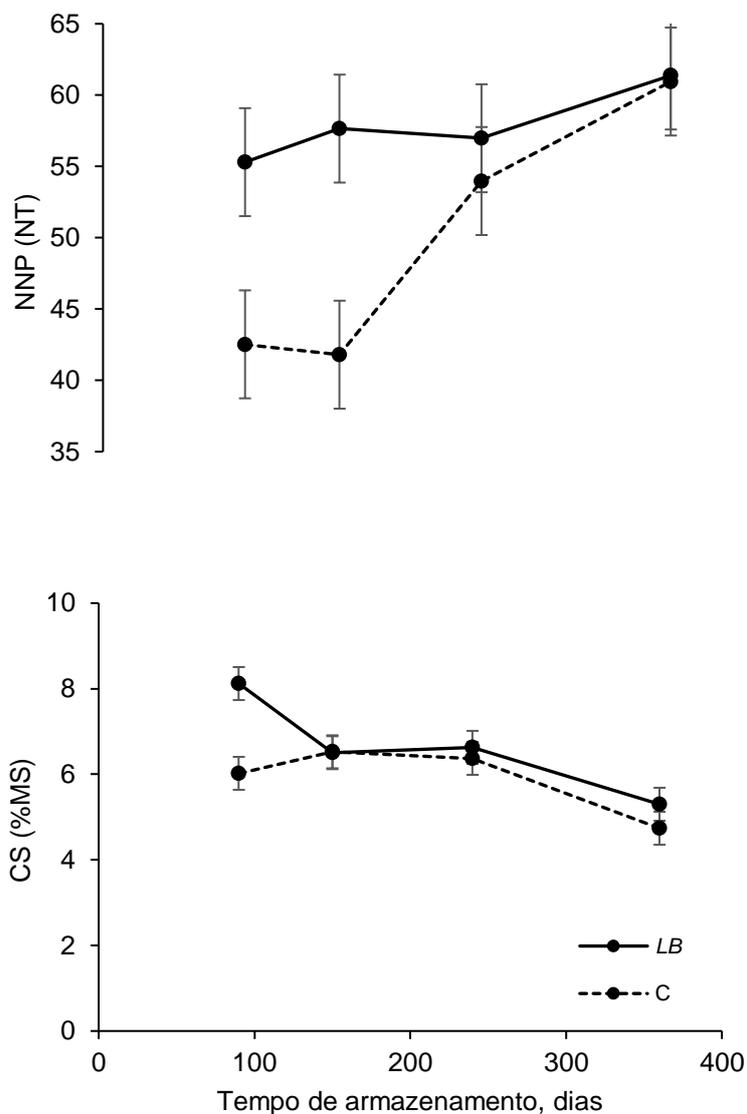


Figura 1. Nitrogênio não proteico (NNP) e carboidratos solúveis (CS) de silagem de milho utilizando (LB) ou não (C) inoculante na ensilagem e diferentes tempos de aberturas.

Dos produtos da fermentação das silagens de milho armazenadas por 90, 150, 240 e 360 dias, o etanol não foi afetado pela inoculação, assim como os valores de pH, NNH_3 , perdas de MS e produção de efluentes ($p > 0,05$; Tabela 4). Contudo, o 1,2 propanodiol, o ácido láctico, o ácido acético e o ácido propiônico foram maiores e o ácido butírico menor quando se utilizou *L. buchneri* como inoculante na ensilagem ($p < 0,05$; Tabela 4).

Tabela 4. Compostos orgânicos, pH, N-NH₃, perdas de MS e produção de efluentes de silagem de milho utilizando ou não inoculante na ensilagem e diferentes tempos de aberturas.

	Tempos de aberturas (dias)					Inoculação			P-valor		
	90	150	240	360	SEM	C ¹	LB	SEM	I	T	I x T
Compostos orgânicos (% MS)											
Etanol	0,395	0,278	0,316	0,271	0,029	0,316	0,293	0,017	0,510	0,052	0,387
1,2 Propanodiol	0,001	0,002	0,002	0,002	0,0005	0,001 ^b	0,002 ^a	0,0003	0,039	0,521	0,446
Ácido láctico	4,45	5,31	5,41	4,84	0,443	3,52 ^b	6,48 ^a	0,294	<0,001	0,464	0,059
Ácido acético	0,532	0,474	0,726	0,720	0,062	0,543	0,683	0,036	0,067	0,051	0,257
Ácido propiônico	0,005 ^b	0,007 ^b	0,012 ^a	0,014 ^a	0,001	0,009 ^b	0,011 ^a	0,0006	0,038	<0,001	0,395
Ácido butírico	0,026 ^b	0,021 ^b	0,065 ^a	0,076 ^a	0,008	0,055 ^a	0,039 ^b	0,006	0,047	<0,001	0,187
pH	3,73 ^c	3,75 ^{bc}	3,80 ^a	3,78 ^{ab}	0,014	3,78	3,76	0,010	0,169	0,002	0,176
N-NH ₃ (NT)	2,62	2,98	2,34	2,94	0,177	2,58	2,86	0,125	0,124	0,058	0,366
Perdas MS (% MS)	5,18 ^b	8,87 ^a	9,77 ^a	9,46 ^a	0,721	7,74	8,90	0,403	0,104	0,001	0,581
Efluentes (kg/t MV)	36,1 ^b	30,0 ^b	50,9 ^a	55,5 ^a	3,36	41,4	44,8	1,88	0,230	<0,001	0,625

N-NH₃ (NT)= nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total; MV = matéria verde; C= Controle; LB= *Lentilactobacillus buchneri*; SEM= erro padrão da média; I= inoculação; T= tempo; I x T = Interação entre inoculação e tempo. ¹A silagem de milho não foi tratada com *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323 a 1×10^5 ufc/g matéria verde. * Médias seguidas de mesma letra na linha não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

O tempo de armazenamento não interferiu nos valores de etanol, 1,2 propanodiol, ácido láctico, ácido acético e NNH_3 ($p > 0,05$; Tabela 4). Contudo, o ácido propiônico, ácido butírico, pH, perdas de MS e produção de efluentes foram afetadas quando armazenadas por diferentes tempos ($p < 0,05$; Tabela 4). O ácido propiônico e butírico, assim como a produção de efluentes, foram iguais entre si e apresentaram maiores valores nos tempos de 240 e 360 dias de abertura comparados aos tempos de 90 e 150 dias, que também foram iguais entre si (Tabela 4). O pH apresentou pequenas variações entre os tempos de abertura, apresentando maiores valores em silagens abertas com 240 dias comparadas ao tempo de 90 dias (Tabela 4). As perdas de MS foram menores no tempo de abertura de 90 dias comparadas aos demais tempos, que não diferiram entre si (Tabela 4).

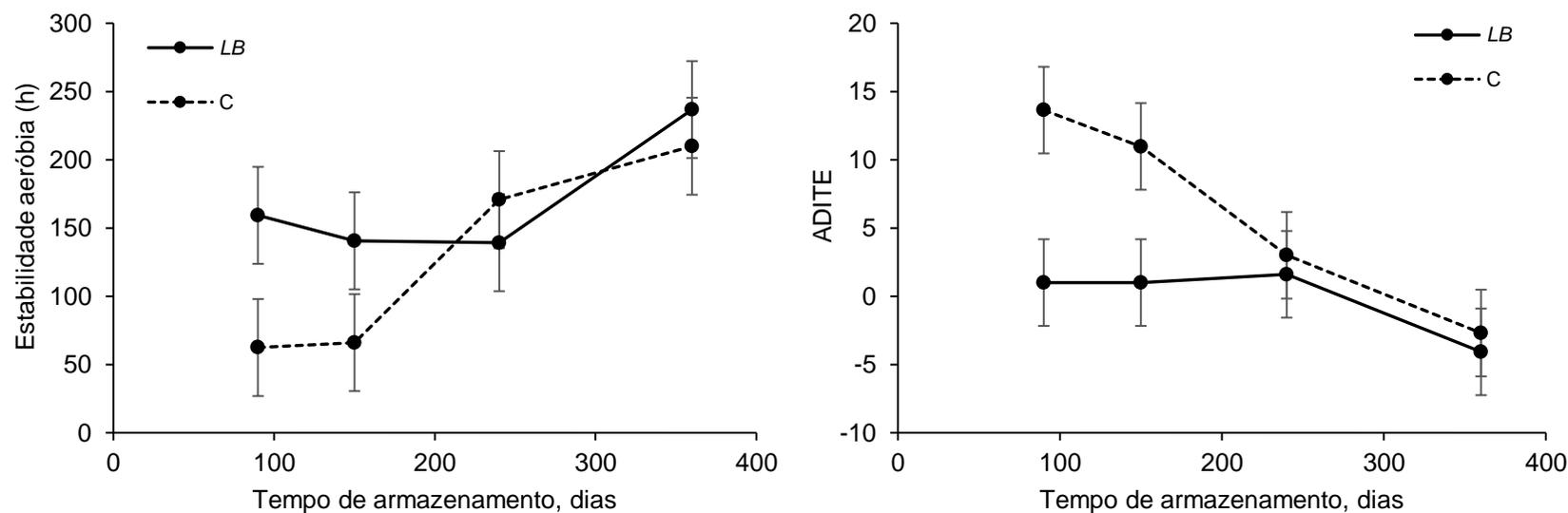
Nas variáveis relacionadas com a estabilidade aeróbia das silagens, na EA (h) e ADITE houve interação entre a inoculação e o tempo de armazenamento ($p < 0,05$; Tabela 5; Figura 2). A EA (h) das silagens aumentou com o tempo em ambos os tratamentos (Figura 2). Nos tratamentos utilizando *L. buchneri*, nas aberturas que ocorreram com 90, 150 e 240 dias, as EA foram menores e iguais entre si, comparadas à aberta com 360 dias (Figura 2). No tratamento controle, a abertura que ocorreu com 90 e 150 dias apresentaram menores valores de EA comparado aos tempos 240 e 360 dias (Figura 2). Já no tratamento com *L. buchneri*, a abertura com 360 dias foi superior, nessa variável, aos demais tempos, que não diferiram entre si (Figura 2).

O ADITE das silagens diminuiu com o tempo no tratamento controle, entretanto não diferiu nos tempos do tratamento que utilizou *L. buchneri* (Figura 2). No tratamento controle, nas aberturas que ocorreram com 90, 150 e 240 dias, as EA foram menores e iguais entre si, comparadas à aberta com 360 dias (Figura 2). No tratamento controle, a abertura que ocorreu com 360 dias apresentou os menores valores de ADITE comparadas a todos os outros tempos, posteriormente as abertas com 240 dias, e os tempos de 90 e 150 dias apresentaram os maiores valores nessa variável e foram iguais entre si (Figura 2).

Tabela 5. Estabilidade aeróbia de silagens de milho utilizando ou não inoculante na ensilagem e diferentes tempos de aberturas.

	Tempos de abertura (dias)					Inoculação				P-valor	
	90	150	240	360	SEM	C ¹	LB	SEM	I	T	I X T
EA (h)	110	103	155	223	16,8	127	169	10,3	0,021	0,001	0,037
T máx (°C)	30,2 ^a	29,6 ^a	26,4 ^b	23,1 ^b	1,09	27,7	27,0	0,735	0,454	0,001	0,894
ADITE	6,82	5,99	2,34	-3,39	1,71	6,23	-0,350	1,01	<0,001	<0,001	0,011
PMSE (% MS)	18,7 ^a	8,85 ^b	7,62 ^b	6,89 ^b	0,977	11,0	10,0	0,590	0,281	<0,001	0,199

EA = estabilidade aeróbia; T máx = temperatura máxima; ADITE = média das somas das temperaturas acumuladas durante 5 dias; PMSE = perdas de matéria durante o tempo de estabilidade; C= Controle; LB= *Lentilactobacillus buchneri*; SEM= erro padrão da média; I= inoculação; T= tempo; I x T = Interação entre inoculação e tempo. ¹A silagem de milho não foi tratada com *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323 a 1×10^5 ufc/g matéria verde. * Médias seguidas de mesma letra na linha não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

**Figura 2.** Estabilidade aeróbia (h) e ADITE de silagens de milho utilizando (LB) ou não (C) inoculante na ensilagem e diferentes tempos de aberturas.

A temperatura máxima (T máx) e perdas de MS durante o tempo de estabilidade (PMSE), não diferiram entre os tratamentos ($p > 0,05$; Tabela 5). Por outro lado, essas variáveis apresentaram diferenças quando avaliado em relação ao tempo de armazenamento ($p < 0,05$; Tabela 5). Maiores valores de T máx foram encontradas nos tempos de aberturas de 90 e 150 dias, comparados com os tempos de 240 e 360 dias, e ambos os tempos foram iguais entre si (Tabela 5). Nas PMSE maiores valores foram encontrados no tempo de 90 dias comparados aos demais tempos (Tabela 5).

Todas as variáveis relacionadas as características físicas das silagens não foram afetadas pelo tempo de armazenamento ($p > 0,05$; Tabela 6). No entanto, maiores valores nas proporções retidas na peneira de 8 mm e no fundo, foram encontradas no tratamento que utilizou *L. buchneri* ($p < 0,05$; Tabela 6). O oposto foi encontrado nas proporções retidas na peneira de 4 mm ($p < 0,05$; Tabela 6).

Tabela 6. Características físicas de silagem de milho utilizando ou não inoculante na ensilagem e diferentes tempos de aberturas.

	Tempos de aberturas (dias)					Inoculação			P-valor		
	90	150	240	360	SEM	C ¹	LB	SEM	I	T	I X T
KPS	45,7	46,1	46,2	43,1	2,22	44,7	45,9	1,34	0,635	0,797	0,796
Peneira 19 mm	5,42	7,04	6,53	5,98	0,606	6,22	6,27	0,398	0,923	0,241	0,291
Peneira 8 mm	63,6	61,9	61,7	64,7	0,861	61,0 ^b	64,6 ^a	0,594	<0,001	0,099	0,114
Peneira 4 mm	24,2	24,0	24,9	23,1	0,468	25,2 ^a	22,9 ^b	0,286	<0,001	0,123	0,127
Fundo	6,83	7,11	6,99	6,69	0,268	6,25 ^b	7,56 ^a	0,175	<0,001	0,722	0,090

KPS = Processamento de grãos; C= Controle; LB= *Lentilactobacillus buchneri*; SEM= erro padrão da média; I= inoculação; T= tempo; I x T = Interação entre inoculação e tempo. ¹A silagem de milho não foi tratada com *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323 a 1×10^5 ufc/g matéria verde. * Médias seguidas de mesma letra na linha não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Nas variáveis relacionadas com a degradabilidade *in situ* das silagens, a DISMS (12h), apresentou interação entre o tempo de armazenamento e a inoculação ($p < 0,05$; Tabela 7; Figura 3). Na DISMS (24h) e na DISAmido (24h) observamos diferenças nos tempos diferentes de armazenamento ($p > 0,05$), contudo, a inoculação não afetou essas variáveis ($p > 0,05$; Tabela 7; Figura 3). A DIS do amido (12h) não apresentou diferenças estatísticas quando comparadas quanto a utilização de inoculante na ensilagem, tempo de armazenamento e a interação desses fatores (12h; $p > 0,05$; Tabela 7; Figura 3).

Tabela 7. Análise de variância da degradabilidade *in situ* da MS (DISMS %) e amido (DISAmido %), de silagens de milho utilizando ou não inoculante na ensilagem e diferentes tempos de aberturas, incubadas por 12 e 24 horas.

	P-valor		
	I	T	I X T
DISMS % (12h)	0,044	0,003	0,013
DISMS % (24h)	0,066	0,008	0,168
DISAmido % (12h)	0,984	0,615	0,948
DISAmido % (24h)	0,061	0,022	0,418

C= Controle; LB= *Lentilactobacillus buchneri*; SEM= erro padrão da média; I= inoculação; T= tempo; I x T = Interação entre inoculação e tempo. ¹A silagem de milho não foi tratada com *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323 a 1×10^5 ufc/g matéria verde.

Na avaliação dos dados de DISMS (12h) foi observado que o tratamento utilizando *L. buchneri* foi superior ao tratamento controle no tempo de 90 dias (Figura 3). Além disso, comparando os tempos dentro do tratamento que utilizou o inoculante, os tempos de 150 e 240 dias apresentaram menores valores comparado com os tempos de 90 e 360 dias (Figura 3). Já no tratamento controle não foi observado diferenças entre os tempos (Figura 3).

A DISMS (24h) e DISAmido (24h) apresentaram valores superiores no tempo de abertura de 360 dias, comparado aos demais tempos, sendo que os demais tempos não diferiram entre si (Figura 3).

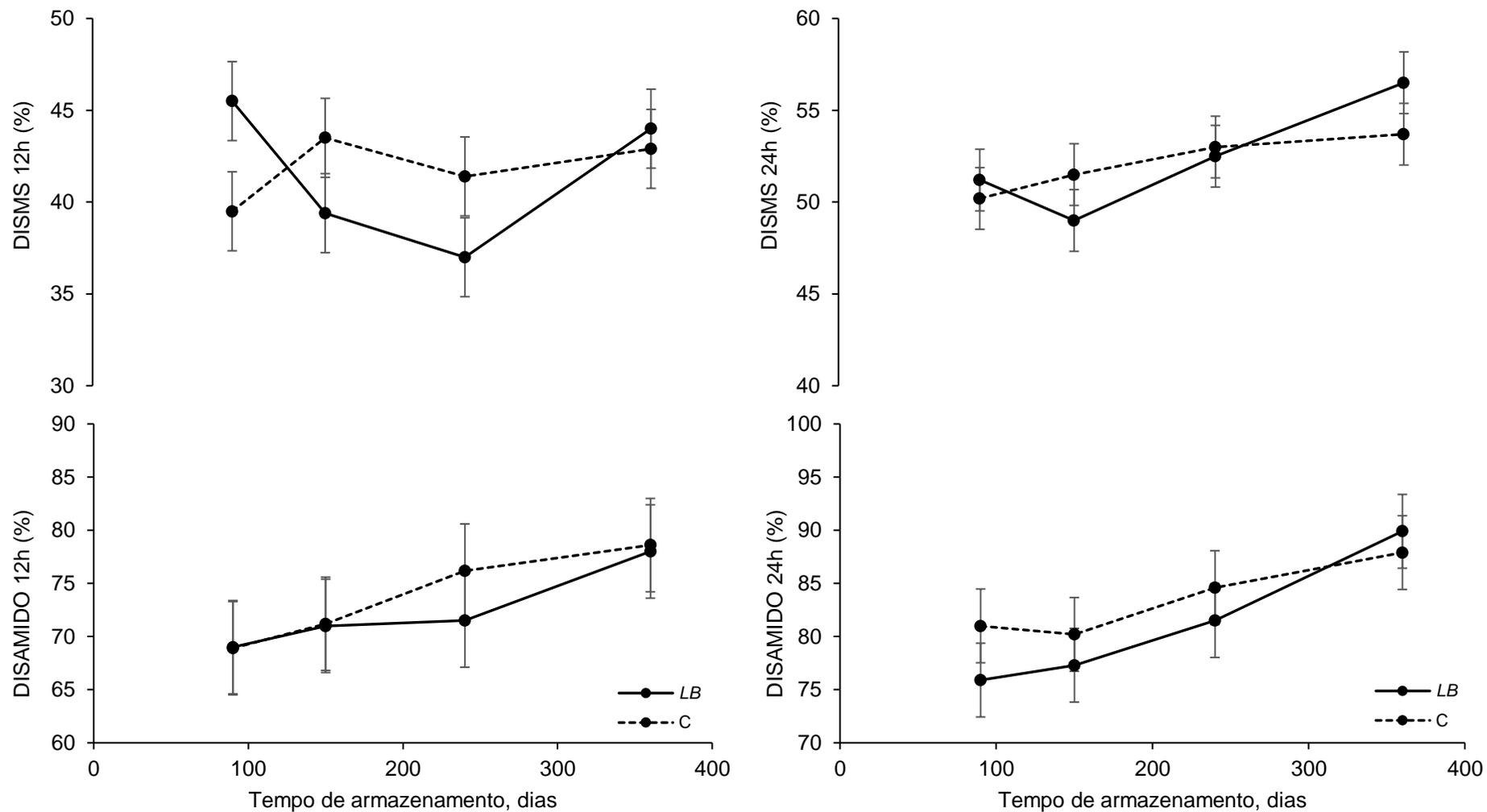


Figura 3. Degradabilidade *in situ* da MS (DISMS %), amido (DISAmido %), de silagens de milho utilizando (LB) ou não (C) inoculante na ensilagem e diferentes tempos de aberturas, incubadas por 12 e 24 horas.

3.4 Discussão

O tempo de armazenamento afetou diretamente a fração fibrosa das silagens, apresentando menores proporções nos tempos mais longos de armazenamento. Isso pode ter ocorrido devido à solubilização da fibra durante a ensilagem. Sabe-se que durante o processo fermentativo, alguma degradação da hemicelulose é esperada devido à hidrólise ácida e/ou ação enzimática de alguns microrganismos (McDonald et al., 1991). Ademais, essa solubilização fez que proporcionalmente o teor de amido apresentasse maior valor no tempo de 360 dias em que a FDN foi menor.

A adição de *L. buchneri* como inoculante, pode afetar os produtos da fermentação e a disponibilidade do amido quando a silagem é armazenada por longos tempos (acima de 120 dias; Kleinschmit & Kung, 2006). Esta hipótese foi primariamente suportada pelo contínuo aumento na concentração de 1,2-propanodiol (produto do metabolismo do ácido láctico pelo *L. buchneri*), N-NH₃ e proteína solúvel devido ao crescente tempo de armazenamento da silagem de milho (Kleinschmit & Kung, 2006; Daniel et al., 2015; Der Bedrosian et al., 2012; Hoffman et al., 2011; Windle et al., 2014). Posteriormente, a maior disponibilidade do amido foi atribuída à degradação das zeínas hidrofóbicas (prolamina) causada pelo aumento da atividade proteolítica em tempos prolongados de armazenamento, observada em silagens de grãos úmidos de milho (Hoffman et al., 2011; Gervásio, 2021). Apesar da prolamina, NNH₃ e NNP não sofrer alteração em seus valores no decorrer dos tempos de armazenamento como esperado, o NNP utilizando *L. buchneri* como inoculante, já apresentava um valor maior que o tratamento controle nos tempos de armazenamento de 90 e 150 dias e manteve esse padrão nos demais tempos. O tratamento utilizando inoculante apresentou maiores valores de 1,2 propanodiol, comparado ao controle. Ademais, a DIS da MS e Amido (24h) foi maior em tempos prolongados de armazenamento (360 dias).

As variáveis relacionadas com a estabilidade aeróbia responderam positivamente ao tratamento utilizando inoculante até os 150 dias de armazenamento, após 150 dias de armazenamento a utilização ou não de *L. buchneri* foi indiferente no comportamento destas variáveis. Provavelmente, pelo acúmulo de ácidos, principalmente ácido acético, pela atividade bacteriana que continua

mesmo após a fermentação atingir a fase estável (Lugão et al., 2011). Observamos que o ácido acético aumentou numericamente sua concentração em resposta ao prolongamento do armazenamento. Tem-se que esse ácido está diretamente relacionado com a melhoria na estabilidade aeróbica e inibição do crescimento de leveduras após a abertura dos silos (Driehuis et al., 1999; Checoli, 2015), o que pode explicar o comportamento observado nas variáveis relacionadas com a estabilidade aeróbia no presente estudo.

Apesar de ambos os tratamentos estarem dentro da faixa recomendada de distribuição de partículas (Heinrichs, 2013). O KPS das silagens de ambos os tratamentos, segundo a caracterização de Shinnars e Holmes (2013) foram classificados como ruins (<50%). Essa variável permite avaliar quantitativamente a extensão da fragmentação dos grãos da silagem de milho e essa menor fragmentação pode indicar uma maior dificuldade dos microrganismos em acessar os grânulos de amido afetando a taxa e a extensão da digestão do amido pelos ruminantes (Carbonare, 2020). Fator esse que pode ter influenciado nas respostas da DIS de amido, que apresentou diferenças apenas em 24 horas de incubação e não em 12 horas, apresentando o maior valor em tempos prolongados de armazenamento (360 dias).

3.5 Conclusões

O tempo mais prolongado de armazenamento melhorou a degradabilidade *in situ* (24 h) da MS e amido. As variáveis relacionadas com a estabilidade aeróbia responderam positivamente ao tratamento utilizando inoculante até os 150 dias de armazenamento, após 150 dias de armazenamento a utilização ou não de *L. buchneri* foi indiferente considerando essas variáveis. A inoculação com *L. buchneri* na ensilagem melhorou a qualidade fermentativa da massa ensilada.

3.6 Referências Bibliográficas

AOAC - Association of official analytical chemist (1996) **Official methods of analysis**. 16th edition. AOAC International, Washington, D.C: Association of Official Analytical Chemists.

Basso FC, Adesogan, AT, Lara EC, Rabelo CHS, Berchielli TT, Teixeira IAMA, Siqueira GR, Reis, R.A. (2014) Effects of feeding corn silage inoculated with microbial additives on the ruminal fermentation, microbial protein yield, and growth performance of lambs. **Journal of Animal Science** 92: 5640 - 5650

Bernardes TF, Rêgo AC (2014) Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science** 97: 1852-1861

Carbonare MSD (2020) **Processamento de grãos (KPS) da silagem de milho e aproveitamento do amido por vacas em lactação em fazendas comerciais**. 205 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba.

Checoli MB. **Silagens de cana-de-açúcar tratadas com *Lactobacillus kefir* e *L. brevis*: efeitos no perfil fermentativo e na estabilidade aeróbia**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Viçosa, MG, 2015.

Daniel JLP, Junges D, Nussio LG (2015) A meta-analysis of the effects of length of storage on starch digestibility and aerobic stability of corn silages. In: XVII International Silage Conference, **Resumos...**Piracicaba, 2015: 306-307.

Der Bedrosian MC, Nestor KE, Kung Jr. L (2012) The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science** 95: 5115-5126.

Detmann, E.; Souza, M. A.; Valadares Filho, S. C.; Queiroz, A. C.; Berchielli, T. T.; Saliba, E. O. S.; Cabral, L. S.; Pina, D. S.; Ladeira, M. M.; Azevêdo, J. A. G. (Eds.) **Métodos para análise de alimentos. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 214p., 2012.**

Dische, Z. (1962). Color reactions of carbohydrates. In: Methods in carbohydrate chemistry, Vol. 1 (Whistler, R. L. & Wolfrom, M. L. (Eds)). **Academic Press**, New York and London, 478-512.

Driehuis F, Oude Elferink, SJWH, Spoelstra SF, (1999). Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology** 87: 583-594.

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (1999). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 412p. ISBN: 85-7383-056-5.

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2021) Clima e solo. Embrapa Milho e Sorgo. **Sistema de Produção, 1**. 8ª edição. ISSN 1679-012X.

Ferraretto LF, Shaver RD, Luck BD (2017). Silage review: Recent advances and future technologies for whole-plant and fractionated corn silage harvesting. **Journal of Dairy Science** 101: 3937-3951.

Ferreira G, Mertens DR (2005) Chemical and Physical Characteristics of Corn Silages and Their Effects on In Vitro Disappearance. **Journal of Dairy Science** 88: 4414–4425.

Gervásio JRS (2021) **Reidratação e ensilagem de grãos de milho com diferentes granulometrias e inclusões na dieta para bovinos de corte**. Tese (doutorado) 70p. – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

Hall MB (2009) Analysis of starch, including malto oligosaccharides in animal feeds: a comparison of methods and a recommended method for AOAC collaborative study. **Journal – Association of Official Analytical Chemists** 92:42-49.

Heinrichs J, The Penn State Particle Separator. **Penn State Cooperative Extension**, v.13, n.183, 2013.

Hoffman PC, Esser NM, Shaver, R.D, Coblenz W, Scott MP, Bodnar AL, Schmidt R, Charley B. (2011) Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science** 94: 2465-2474.

Hristov AN, Harper MT, Roth G, Canale C, Huhtanen P, Richard TL e DiMarco K (2020) Effects of ensiling time on corn silage neutral content fiber degradability and relationship between laboratory fiber analyses and in vivo digestibility. **Journal of Dairy Science** 103: 2333-2346.

Hu W, Schmidt RJ, McDonnell EE, Klingerman CM, Kung Jr L (2009) The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. **Journal of Dairy Science** 92: 3907-3914.

Jobim CC, Nussio LG, Reis RA, Schmidt P (2007) Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia** 36, suplemento especial, p. 101-119.

Kleinschmit, DH, Kung Jr L. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage during various stages of ensiling. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3999-4004, 2006.

Kung LJr., Grieve DB, Thomas JW, Huber JT (1984) Added ammonia or microbial inoculant for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science** 67, 299–306.

Licitra G, Hernandez TM, Van Soest PJ (1996) Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminants feeds. **Animal Feed Science and Technology** 57: 347-358.

McDonald, P.; Henderson, A.R.; Heron, S.J.E. **The Biochemistry of Silage**. Marlow: Chalcomb Publications, 1991. 340 p.

Lugão SMB, Bett V, Moro V, Lançanova JAC (2011) Silagem de milho de planta inteira. In: Kiyota N, Vieira JAN, Yagi R, Lugão, SMB. **Silagem de milho na atividade leiteira do sudoeste do Paraná: do manejo do solo e de seus nutrientes à ensilagem de planta inteira e grãos úmidos**. Londrina: IAPAR, p.47-42, 2011.

Moran JP, Weinberg ZG, Ashbell G, Hen Y, Owen TR (1996) A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In '**Proceedings** of the 11th International Silage Conference'. pp. 162–163.

Nellis SE, Hoffman PC, Shaver RD (2013) Technical note: a modified method to quantify prolamin proteins in dry and high-moisture. **Journal of Dairy Science** 96: 4647–4652. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6575>

Nocek JE (1988) In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. **Journal of Dairy Science** 71: 2051 - 2069

Rabelo CHS, Basso FC, Lara EC, Jorge LGO, Harter CJ, Mesquita LG, Silva LFP, Reis RA (2017) Effects of *Lactobacillus buchneri* as a silage inoculant and as a probiotic on feed intake, apparent digestibility and ruminal fermentation and microbiology in wethers fed low-dry-matter whole-crop maize silage. **Grass and Forage Science** 1:1 - 11.

Salvo PAR, Basso FC, Rabelo CHS, Oliveira AA, Sader AP, Casagrande DR, Berchielli TT, Reis RA (2013) Características de silagens de milho inoculadas com *Lactobacillus buchneri* e *L. plantarum*. **Archivos de Zootecnia** 62:1 – 12.

Saylor BA, Casale F (2020) Effect of microbial inoculation and particle size on fermentation profile, aerobic stability, and ruminal in situ starch degradation of high-moisture corn ensiled for a short period. **Journal of Dairy Science** 1:379-395.

Shinners, KJ, Holmes BJ (2013) Making Sure Your Kernel Processor Is Doing Its Job. **Focus on Forage** 15:.4.

Silvestre AM, Millen DD (2021) The 2019 Brazilian survey on nutritional practices provided by feedlot cattle consulting nutritionists. **Revista Brasileira de Zootecnia** 50: e20200189. DOI: 10.37496/rbz5020200189

Soil Survey Staff (2006) **Soil taxonomy: Keys to Soil Taxonomy**. 10ed. US Department of Agriculture (USDA), Natural Resources Conservation Service (NRCS). Government Printing Office, Washington, DC, USA.

Weissbach F, Strubelt C (2008) Correcting the dry matter content of maize silages as a substrate for biogas production. **Landtechnik** 63: 82–83.

Windle MC, Walker N, Kung Jr L. (2014) Effects of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of corn silage harvested at different dry matter contents and ensiled for various lengths of time. **Journal of Dairy Science** 97: 3053-3060.

CAPÍTULO 4 - Impacto da inoculação bacteriana em silagens de milho armazenada por longo tempo sobre o desempenho de ovinos

RESUMO – O objetivo desse estudo foi avaliar a inoculação com *Lentilactobacillus buchneri* em silagens de milho armazenadas por 360 dias e seus efeitos sobre o desempenho de ovinos terminados em confinamento. O estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, utilizando dois tratamentos (sem e com utilização de *L. buchneri* CNCM I-4323 em uma concentração de 1×10^5 ufc / g de forragem na ensilagem). Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento MIXED do SAS (SAS® Studio, SAS Institute Inc., Cary, NC). Em todos os testes, médias foram comparadas pelo teste Tukey e diferenças significativas foram consideradas a 5% de probabilidade. No estudo 3, não foram encontradas diferenças na composição química das silagens de milho armazenadas por 360 dias, utilizando ou não *L. buchneri* como inoculante no momento da ensilagem. Igualmente, o consumo de nutrientes, ganho de peso médio diário, eficiência alimentar, rendimento de carcaça e as perdas por resfriamento dos cordeiros durante o confinamento, não apresentaram diferenças estatísticas. Já dentre os produtos da fermentação, os valores de 1,2 propanodiol, ácido acético e propiônico foram maiores quando se utilizou *L. buchneri* como inoculante, e menores no ácido butírico e N-NH₃. Conclui-se que a inoculação com *L. buchneri*, aliada ao longo tempo de armazenamento, modificou o padrão fermentativo das silagens, contudo essas mudanças não foram suficientes para alterar o consumo de matéria seca e de nutrientes pelos cordeiros, como também não afetou o desempenho.

Palavras-chave: consumo de MS, *Lentilactobacillus buchneri*, processo fermentativo

4.1 Introdução

A silagem de milho tem sido amplamente estudada por décadas, buscando ferramentas que aumentem a sua qualidade e eficiência de utilização, visto a sua importância para a agropecuária mundial, sendo uma das principais fontes de volumoso na alimentação de bovinos de corte confinados no Brasil (Silvestre e Millen, 2021) e bovinos leiteiros em todo mundo (Bernardes & Rêgo, 2014; Ferraretto et al., 2017).

A utilização de inoculantes bacterianos (Hu et al., 2009; Saylor et al., 2020) e maiores tempos de armazenamento (Daniel et al., 2015; Der Bedrosian et al., 2012; Hoffman et al., 2011; Hristov et al., 2020) tem apresentado resultados positivos em estudos com silagens de milho. Estes estudos mostram que o *Lentilactobacillus buchneri* pode atuar em tempos prolongados de fermentação, alterar o processo fermentativo (Kleinschmit & Kung, 2006) e, conseqüentemente, melhorar a digestibilidade do amido e da matéria seca (MS).

Weinberg et al. (2004), citam um possível aumento no ganho de peso em animais alimentados com silagens inoculadas, e pode ocorrer devido à melhora na digestão da fibra por uma interação entre microrganismos da silagem e do rúmen, ou até mesmo por um efeito probiótico do inoculante. Contudo, Rabelo et al. (2017) não observaram o efeito probiótico da inoculação com *L. buchneri*, e observaram que o seu uso alterou a fermentação dentro do silo, melhorou a qualidade da silagem e possibilitou alguns benefícios para a fermentação ruminal. Já Basso et al. (2018) encontraram um aumento no consumo e maior ganho de peso nos cordeiros alimentadas com dietas contendo silagens inoculadas com *L. buchneri* associadas a baixa utilização de concentrado. Com isso, os mecanismos relacionados a utilização de bactérias ácidos-láticas, especificamente a *L. buchneri*, sobre o desempenho animal ainda não estão totalmente claros.

Com isso, o objetivo desse estudo foi avaliar a inoculação com *L. buchneri* em silagens de milho armazenadas por 360 dias e seus efeitos sobre o desempenho de ovinos terminados em confinamento.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Tratamentos e processo de ensilagem

A área de produção era localizada próximo as coordenadas geodésicas 21°14' latitude Sul e 48°16' longitude Oeste, com altitude média de 593 metros, declividade 5,8%, apresentando clima Aw de acordo com classificação de Köppen. O solo é classificado como Oxisols (Soil Taxonomy, 2006) com relevo suave ondulado (EMBRAPA, 1999).

A semeadura do híbrido de milho 2B710PW (híbrido simples, ciclo precoce, semi-duro), ocorreu em 17 de novembro de 2017 com espaçamento entre linhas de 0,90 metros com 6 sementes por metro, com população de 66.666 sementes ha⁻¹. Na adubação de semeadura foram utilizados 350 kg ha⁻¹ da fórmula 08-28-16 NPK. Na adubação de cobertura foi feita a aplicação de 200 kg de ureia e 200 kg ha⁻¹ da fórmula 30-00-10 NPK em 28 de novembro de 2017. A colheita foi realizada aos 82 dias após a semeadura, com produção média de 16,2 t MS/ha.

Durante a safra, a temperatura média atingida foi de 24°C, sendo 35°C a máxima e 14°C a temperatura mínima. A umidade relativa média foi de 77%, sendo a máxima de 100% e a mínima de 20%. A radiação média foi 27 MJm² dia e a precipitação média diária foi de 7 mm. Os dados climatológicos apresentaram-se dentro das condições ideais de desenvolvimento da cultura (Embrapa, 2021).

O milho foi colhido com aproximadamente 30% de MS em toda a planta. A colheita do milho foi realizada de forma mecanizada, com a colhedora New Pecos®, Nogueira Máquinas, com processador de grãos, visando obter partículas com tamanho médio próximo a 10 mm. Após a colheita, o milho foi ensilado sem (controle) e com *L. buchneri* CNCM I-4323 (Lallemand Animal Nutrition, Goiânia, GO, Brasil) em uma concentração de 1×10^5 ufc / g de forragem. O inoculante foi diluído em água destilada (5 L/t) e aplicado sobre a forragem de todos os tratamentos com auxílio de borrifador manual sob constante homogeneização da forragem. A mesma quantidade de água destilada (5 L/t) foi aplicada no tratamento controle.

Tambores plásticos (n = 24 repetições por tratamento) com capacidade unitária de 150 kg de forragem na matéria natural foram utilizados para armazenar a silagem. A compactação da forragem foi realizada por meio de pressão humana visando obter-se uma massa específica próxima a 600 kg/m³ de matéria natural. Posteriormente, os silos foram vedados com lona dupla face (200 µm de espessura) (Electro Plastic, São Paulo, SP, Brasil), permanecendo fechados por 360 dias. No momento da ensilagem, quatro amostras (~300 g) de cada tratamento foram colhidas e armazenadas a -20°C em freezer para caracterização química da planta. Similarmente, após abertura dos silos, duas amostras (~350 g) de cada tratamento foram colhidas semanalmente durante o tempo de utilização da silagem e armazenadas a -20°C em freezer para caracterização química da silagem, bem como dos produtos da fermentação.

4.2.2 Desempenho animal e dietas

Quarenta ovinos machos Dorper x Santa Inês (peso vivo inicial (PVi) médio de $20,3 \pm 2,21$ kg e 4 meses de idade) foram utilizados no ensaio de desempenho e alocados em confinamento coberto contendo baias individuais (0,5 m²).

O ensaio de desempenho foi conduzido por 65 dias, incluindo um tempo inicial de adaptação de 15 dias dos animais às dietas e confinamento. No tempo de adaptação, a inclusão de concentrado na dieta total foi realizada de maneira lenta e gradual até que se atingiu a relação volumoso:concentrado desejada (35:65). As dietas avaliadas foram compostas de 35% das respectivas silagens descritas anteriormente e 65% de concentrado (milho moído, farelo de soja, ureia e núcleo mineral) e balanceadas para que os animais pudessem ganhar 0,2 kg/dia (NRC, 2007).

Os animais foram alimentados *ad libitum* (as sobras foram restringidas em 5% em relação ao total fornecido, no intuito de reduzir a seleção da dieta por parte dos animais) duas vezes ao dia (7:00 e 16:00 horas). As sobras foram pesadas diariamente antes da alimentação pela manhã e a quantidade de alimento fornecida foi ajustada a partir do consumo observado no dia anterior. Amostras da dieta oferecida e sobra foram colhidas semanalmente e estocadas a -20°C para posteriores análises químicas e cálculos de consumo de nutrientes. O consumo de matéria seca (CMS) em relação ao peso corporal foi calculado dividindo o CMS pelo peso médio dos animais multiplicado por 100.

Após 65 dias de confinamento, os animais foram abatidos no frigorífico Dom Pig, localizado no distrito de São Miguel, SP. O PVi e PVf (peso vivo final) foram obtidos após um jejum de 16 horas, e o ganho de peso médio diário (GPMD) foi calculado subtraindo-se o PVi do PVf e dividindo-se pelo número de dias em que os animais permaneceram confinados. A eficiência alimentar (EA) foi calculada dividindo-se o GPMD pelo CMS no tempo estabelecido.

4.2.3 *Rendimento de carcaça*

Os animais foram abatidos para análise do rendimento de carcaça (RC). Posteriormente ao abate dos animais, todas as carcaças foram divididas em duas (esquerda e direita) pesadas e refrigeradas a 4°C por 24 horas para calcular o peso de carcaça fria. A diferença entre o peso de carcaça fria e peso de carcaça quente foi usado para estimar as perdas por resfriamento (PR). O rendimento de carcaça foi calculado dividindo-se o peso de carcaça quente pelo PVf após 16 horas de jejum e multiplicado por 100.

4.2.4 Análises químicas

Um extrato aquoso contendo 25 g de silagem e 225 mL de água destilada foi preparado (Kung et al., 1984) utilizando um liquidificador Philips Walita (Walita, Varginha, MG, Brasil) misturando por 1 min na configuração mais alta e filtrado em filtros de TNT, para determinar os valores de pH e nitrogênio amoniacal (N-NH₃). O pH do filtrado foi medido imediatamente por meio de um medidor de pH (modelo MA522, Marconi Laboratory Equipment, Piracicaba, SP, Brasil). O N-NH₃ foi determinado por destilação em aparelho micro-Kjeldahl (AOAC, 1996; método n^o. 941.04) e expressado em relação ao N total (N-NH₃/NT). O extrato aquoso produzido com a silagem foi filtrado e centrifugado a 10.000 × g por 15 minutos a -4°C e posteriormente utilizado na determinação da concentração dos produtos da fermentação, ácido láctico, AGCC (ácido acético, propiônico e butírico), etanol e 1,2 – propanodiol. Para isso, foi utilizado cromatógrafo gasoso com detector de massas (GCMS) (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), usando coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, USA; 60m, 0,25 mm ø, 0,25 µm crossbond carbowax polyethylene glycol) e parâmetros analíticos conforme as recomendações do fabricante.

Após passarem pelo processo de secagem em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas, as amostras da planta e silagem foram moídas em moinho de faca (peneira de 1 mm). Para determinação da MS, as amostras foram secas em estufa a 105°C por 12 horas (AOAC, 1996; método n^o. 930.15). A MS foi corrigida (MSc) para compostos voláteis, usando uma equação (Eq. 1) proposta por Weissbach e Strubelt, (2008):

$$\text{MSc (g/kg)} = \text{MS} + (0,95 \times \text{AGCC}) + (0,08 \times \text{Ácido láctico}) + (0,77 \times \text{1,2-propanodiol}) + (1 \times \text{outros álcoois}) \quad (1)$$

Onde todos os compostos voláteis são expressos em g / kg de matéria verde (MV).

A matéria mineral foi determinada após queima na mufla a 500°C por 5 horas (AOAC, 1996; método n^o. 923.03). O NT foi determinado por destilação em aparelho micro-Kjeldahl (AOAC, 1996; método n^o. 941.04), e a proteína bruta (PB) foi calculada como NT × 6,25. A proteína solúvel (PS) foi determinada com

a utilização de ácido tricloracético (Licitra et al., 1996) seguindo os procedimentos descritos no INCT (Detmann et al., 2012) e expressa em relação a PB.

A fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas em autoclave, e posteriormente foi analisado a lignina, utilizando sacos de ANKON F57, seguindo os procedimentos descritos no INCT (Detmann et al., 2012). O FDN foi determinado utilizando-se amilase termoestável sem adição de sulfito de sódio e, ambos FDN e FDA foram corrigidos para cinzas. A lignina foi determinada com a utilização de ácido sulfúrico seguindo os procedimentos descritos no INCT (Detmann et al., 2012) e foi corrigida para cinzas.

Os carboidratos solúveis foram analisados a partir do método de antrona (Dische, 1962). O teor de amido foi determinado utilizando o método de hidrólise enzimática, de acordo com Hall, (2009). A prolamina foi analisada por meio de colorimetria descritos por Nellis, Hoffman e Shaver, (2013).

Na tabela 1 está descrito a composição química da planta de milho antes da ensilagem.

Tabela 1. Composição química da planta de milho antes da ensilagem.

	C ¹	LB	DP
Composição química (% MS)			
MS	30,3	30,2	0,689
MM	4,45	4,47	0,090
FDN	58,0	57,2	0,728
FDA	27,9	27,0	0,623
Lignina	3,79	3,64	0,217
PB	9,30	9,40	0,203
NNP (NT)	15,43	15,73	1,93
Amido	14,6	14,0	0,426
Prolamina	2,43	2,46	0,116
CS	15,5	16,4	0,475
pH	6,10	6,06	0,038
N-NH ₃ (NT)	1,00	1,20	0,132

MS= matéria seca; MM= matéria mineral; FDN=Fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; PB= proteína bruta; NNP (NT)= nitrogênio não proteico em relação ao N total; CS = Carboidratos solúveis; N-NH₃ (NT)= nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total; C= Controle; LB= *Lentilactobacillus buchneri*; DP= desvio padrão; ¹A silagem de milho não foi tratada com *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323 a 1×10^5 ufc/g matéria verde.

Na tabela 2 se apresenta a proporção de ingredientes utilizados durante o estudo, assim como a composição química das dietas oferecidas aos cordeiros durante o confinamento.

Tabela 2. Proporção de ingredientes e composição química das dietas oferecidas aos cordeiros durante o confinamento.

	C ¹	LB	DP
Proporção ingredientes (%)			
Silagem de milho	35	35	
Concentrado ²	65	65	
Composição química (% MS)			
MS	72,4	72,5	0,150
MM	9,71	9,78	0,063
FDN	30,5	30,6	0,411
FDA	10,1	9,95	0,286
PB	19,0	19,1	0,071
Amido	32,6	33,0	0,178

¹A silagem de milho não foi tratada com *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323 a 1×10^5 cfu/g matéria verde. ² Foi utilizado um concentrado comercial (Bell Peso Ovinos; Trouw Nutrition, Mirassol, SP, Brasil) composto (com base na MS) por: 208,5 g PB/kg; 386,9 g Amido/kg; 42,7 g NNP/kg; 30,5 g EE/kg; 51,7 g cinzas/kg; 29 g Fibra Bruta/kg; 8 g Ca/kg; 5,8 g P/kg; 1,5 g Na/kg; 3,2 g Cl/kg; 7,9 g K/kg; 1,5 g Mg/kg; 5,4 g S/kg; 130 mg Fe/kg; 11 mg Cu/kg; 31 mg Mn/kg; 33 mg Zn/kg; 0,53 mg Co/kg; 0,15 mg I/kg; 0,15 mg Se/kg; 31 mg F/kg. DP = Desvio padrão; MS= matéria seca; MM= matéria mineral; FDN=Fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; PB= proteína bruta.

4.2.5 Delineamento experimental e análise estatística

O ensaio de desempenho foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, utilizando dois tratamentos (inoculação bacteriana ou não), com 20 animais por tratamento. Foi utilizado o seguinte modelo: $Y_{ij} = \mu + l_i + e_{ij}$, em que efeitos fixos são μ = média geral; l_i = efeito de inoculação (i = sem e com utilização de inoculante); e e_{ij} = erro experimental como fator aleatório.

Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento MIXED do SAS (SAS® Studio, SAS Institute Inc., Cary, NC). Médias oriundas do efeito de inoculação foram comparadas pelo teste Tukey, em todos os testes, diferenças significativas foram consideradas a 5% de probabilidade.

4.3 Resultados

A composição química de silagens de milho armazenadas por 360 dias, utilizando ou não *L. buchneri* como inoculante no momento da ensilagem, não diferiram entre si estatisticamente ($p > 0,05$; Tabela 3).

Tabela 3. Composição química de silagem de milho utilizando ou não inoculante na ensilagem armazenadas por 360 dias.

	C ¹	LB	SEM	P-valor
Composição química (% MS)				
MS	31,9	32,0	0,443	0,955
MM	4,18	4,41	0,185	0,388
FDN	47,3	47,4	1,21	0,950
FDA	25,8	25,3	0,835	0,689
Lignina	2,90	2,73	0,217	0,573
PB	8,62	8,78	0,200	0,573
NNP (NT)	47,3	48,2	2,04	0,741
Amido	21,2	22,1	0,547	0,244
Prolamina	3,02	2,91	0,137	0,585
CS	5,53	5,84	0,360	0,542

MS= matéria seca; MM= matéria mineral; FDN=Fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; PB= proteína bruta; NNP (NT)= nitrogênio não proteico em relação ao N total; CS = Carboidratos solúveis; C= Controle; LB= *Lentilactobacillus buchneri*; SEM= erro padrão da média. ¹A silagem de milho não foi tratada com *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323 a 1×10^5 ufc/g matéria verde.

Em relação aos compostos orgânicos das silagens de milho armazenadas por 360 dias, utilizando ou não inoculante, não observamos diferenças estatísticas no etanol e o ácido láctico, assim como nos valores de pH ($p > 0,05$; Tabela 4). No entanto, os valores de 1,2 propanodiol, ácido acético e propiônico foram maiores quando se utilizou *L. buchneri* como inoculante no momento da ensilagem, e menores no ácido butírico e N-NH₃ ($p < 0,05$; Tabela 4).

Tabela 4. Compostos orgânicos, pH, e N-NH₃ de silagem de milho utilizando ou não inoculante na ensilagem armazenadas por 360 dias.

	C ¹	LB	SEM	P-valor
Compostos orgânicos (% MS)				
Etanol	0.438	0.321	0.076	0.338
1,2 Propanodiol	0.003 ^b	0.010 ^a	0.001	0.042
Ácido láctico	7.48	6.97	0.392	0.410
Ácido acético	0.543 ^b	0.738 ^a	0.029	0.009
Ácido propiônico	0.005 ^b	0.007 ^a	0.0002	0.028
Ácido butírico	0.015 ^a	0.005 ^b	0.002	0.047
pH	3,75	3,72	0,017	0,284
N-NH ₃ (NT)	2,42 ^a	1,78 ^b	0,203	0,030

N-NH₃ (NT)= nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total; MV = matéria verde; C= Controle; LB= *Lentilactobacillus buchneri*; SEM= erro padrão da média; I= inoculação; T= tempo; I x T = Interação entre inoculação e tempo. ¹A silagem de milho não foi tratada com *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323 a 1×10^5 ufc/g matéria verde. * Médias seguidas de mesma letra na linha não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

O consumo de MS, MS em relação ao peso corporal (CMS PC), MO, FDN, PB e amido dos cordeiros durante o confinamento, recebendo dietas contendo silagens de milho armazenadas por 360 dias, utilizando ou não *L. buchneri* como inoculante no momento da ensilagem, não diferiram entre si estatisticamente ($p > 0,05$; Tabela 5).

Tabela 5. Consumo e desempenho de cordeiros alimentados com dietas contendo silagem de milho utilizando ou não inoculante na ensilagem armazenadas por 360 dias.

	C ¹	LB	SEM	P-valor
Consumo (kg/d)				
MS	1,31	1,32	0,050	0,978
MO	1,18	1,19	0,045	0,988
FDN	0,391	0,393	0,015	0,972
PB	0,282	0,280	0,011	0,910
Amido	0,442	0,435	0,016	0,770
CMS PC (%)	4,26	4,29	0,111	0,832
GPMD (Kg)	0,259	0,253	0,009	0,621
EA	0,199	0,195	0,005	0,564
RC (%)	45,2	45,5	0,488	0,606
PR (%)	2,04	1,097	0,302	0,858

¹A silagem de milho não foi tratada com *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323 a 1×10^5 cfu/g matéria verde. MS= matéria seca; MO= matéria orgânica; FDN=Fibra em detergente neutro; PB= proteína bruta; CMS PC= consumo de matéria seca em relação ao peso corporal; GPMD= ganho de peso médio diário; EA= eficiência alimentar; RC= rendimento de carcaça; PR= Perdas por resfriamento.

O GPMD, eficiência alimentar (EA), rendimento de carcaça (RC) e as perdas por resfriamento (PR) dos cordeiros durante o confinamento, recebendo dietas contendo silagens de milho armazenadas por 360 dias, utilizando ou não *L. buchneri* como inoculante no momento da ensilagem, não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$; Tabela 5).

4.4 Discussão

A inoculação em silagens armazenadas por longos tempos afetou os produtos da fermentação dessas silagens, isso é evidenciado pelo aumento do 1,2 propanodiol, ácido acético e propiônico e diminuição do ácido butírico e N-NH₃, nesse tratamento (Tabela 4). Esse perfil fermentativo pode trazer melhorias na estabilidade aeróbia e inibir o crescimento de leveduras após a abertura do silo (Driehuis et al., 1999), afetando positivamente a qualidade dessas silagens durante a sua utilização. A estabilidade aeróbia da silagem nada mais é do que a velocidade com que a massa deteriora após a abertura dos silos (Jobim e Nussio, 2013), e nesse processo ocorre degradação dos nutrientes pela ação de bactérias aeróbias e fungos filamentosos, o que pode afetar o consumo e desempenho animal (Salvo et al., 2013).

Estudos mostram que o *L. buchneri* pode atuar em tempos prolongados de fermentação, alterar o processo fermentativo (Kleinschmit & Kung, 2006), e conseqüentemente, melhorar a digestibilidade do amido e da matéria seca da silagem de milho (Salvo et al., 2013). Todavia, não foi observado que o inoculante melhorou a qualidade da silagem nutricional ao ponto de afetar o consumo e desempenho dos animais.

Rossi (2020) comparou três tratamentos utilizando silagens de milho com 120, 240 e 360 dias de armazenamento, e observou que o GPMD dos cordeiros tendeu a aumentar com o tempo de armazenamento em até 10,2%, e a eficiência alimentar aumentou em até 14%, e ambas as variáveis apresentaram valores similares aos encontrados no presente estudo. Evidenciando que silagens armazenadas por longos tempos podem apresentar os nutrientes mais disponíveis comparadas a silagens armazenadas por curtos tempos.

4.5 Conclusões

A inoculação das silagens de milho com *L. buchneri*, aliada ao longo tempo de armazenamento, modificou o padrão fermentativo das silagens, contudo essas mudanças não foram suficientes para alterar o consumo de matéria seca e de nutrientes pelos cordeiros, como também não afetou o desempenho.

4.6 Referências Bibliográficas

AOAC - Association of official analytical chemist (1996) **Official methods of analysis**. 16th edition. AOAC International, Washington, D.C: Association of Official Analytical Chemists.

Basso FC, Rabelo, CHS, Lara EC, Siqueira GR, Reis RA (2018) Effects of *Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788 and forage: Concentrate ratio on the growth performance of finishing feedlot lambs fed maize silage. **Animal Feed Science and Technology** 244: 104 - 115.

Bernardes TF, Rêgo AC (2014) Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science** 97: 1852-1861

Daniel JLP, Junges D, Nussio LG (2015) A meta-analysis of the effects of length of storage on starch digestibility and aerobic stability of corn silages. In: XVII International Silage Conference, **Resumos...**Piracicaba, 2015: 306-307.

Der Bedrosian MC, Nestor KE, Kung Jr. L (2012) The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science** 95: 5115-5126.

Detmann, E.; Souza, M. A.; Valadares Filho, S. C.; Queiroz, A. C.; Berchielli, T. T.; Saliba, E. O. S.; Cabral, L. S.; Pina, D. S.; Ladeira, M. M.; Azevêdo, J. A. G. (Eds.) **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 214p., 2012.

Driehuis F, Oude Elferink, SJWH, Spoelstra SF, (1999). Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology** 87: 583-594.

Dische, Z. (1962). Color reactions of carbohydrates. In: Methods in carbohydrate chemistry, Vol. 1 (Whistler, R. L. & Wolfrom, M. L. (Eds)). **Academic Press**, New York and London, 478-512.

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2021) Clima e solo. Embrapa Milho e Sorgo. **Sistema de Produção**, 1. 8ª edição. ISSN 1679-012X.

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (1999). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 412p. ISBN: 85-7383-056-5.

Ferraretto LF, Shaver RD, Luck BD (2017). Silage review: Recent advances and future technologies for whole-plant and fractionated corn silage harvesting. **Journal of Dairy Science** 101: 3937-3951.

Ferreira G, Mertens DR (2005) Chemical and Physical Characteristics of Corn Silages and Their Effects on In Vitro Disappearance. **Journal of Dairy Science** 88: 4414–4425.

Hall MB (2009) Analysis of starch, including malto oligosaccharides in animal feeds: a comparison of methods and a recommended method for AOAC collaborative study. **Journal – Association of Official Analytical Chemists** 92:42-49.

Hoffman PC, Esser NM, Shaver, R.D, Coblenz W, Scott MP, Bodnar AL, Schmidt R, Charley B. (2011) Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science** 94: 2465-2474.

Hristov AN, Harper MT, Roth G, Canale C, Huhtanen P, Richard TL e DiMarco K (2020) Effects of ensiling time on corn silage neutral content fiber degradability and relationship between laboratory fiber analyses and in vivo digestibility. **Journal of Dairy Science** 103: 2333-2346.

Hu W, Schmidt RJ, McDonnell EE, Klingerman CM, Kung Jr L (2009) The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. **Journal of Dairy Science** 92: 3907-3914.

Jobim CC, Nussio LG (Eds.) (2013) Princípios Básicos da Fermentação na Ensilagem. **Forragicultura: Ciência, Tecnologia e Gestão dos recursos forrageiros**. Jaboticabal, 649p.

Kleinschmit, DH, Kung Jr L. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage during various stages of ensiling. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3999-4004, 2006.

Kung LJr., Grieve DB, Thomas JW, Huber JT (1984) Added ammonia or microbial inoculant for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science** 67, 299–306.

Licitra G, Hernandez TM, Van Soest PJ (1996) Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminants feeds. **Animal Feed Science and Technology** 57: 347-358.

Nellis SE, Hoffman PC, Shaver RD (2013) Technical note: a modified method to quantify prolamin proteins in dry and high-moisture. **Journal of Dairy Science** 96: 4647–4652. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6575>

National Research Council – NRC. **Nutrient requirements of small ruminants. Sheep, goats, cervids and New World camelids.** National Academy Press, Washington, DC. 2007. 384p.

Rabelo CHS, Basso FC, Lara EC, Jorge LGO, Harter CJ, Mesquita LG, Silva LFP, Reis RA (2017) Effects of *Lactobacillus buchneri* as a silage inoculant and as a probiotic on feed intake, apparent digestibility and ruminal fermentation and microbiology in wethers fed low-dry-matter whole-crop maize silage. **Grass and Forage Science** 1:1 - 11.

Rossi LG (2020) **Impacto do estágio de maturidade, do uso de inoculante bacteriano e do tempo de armazenagem sobre a qualidade da silagem de milho.** Tese (doutorado) 98p. – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

Salvo PAR, Basso FC, Rabelo CHS, Oliveira AA, Sader AP, Casagrande DR, Berchielli TT, Reis RA (2013) Características de silagens de milho inoculadas com *Lactobacillus buchneri* e *L. plantarum*. **Archivos de Zootecnia** 62:1 – 12.

Saylor BA, Casale F (2020) Effect of microbial inoculation and particle size on fermentation profile, aerobic stability, and ruminal in situ starch degradation of high-moisture corn ensiled for a short period. **Journal of Dairy Science** 1:379-395.

Silvestre AM, Millen DD (2021) The 2019 Brazilian survey on nutritional practices provided by feedlot cattle consulting nutritionists. **Revista Brasileira de Zootecnia** 50: e20200189. DOI: 10.37496/rbz5020200189

Soil Survey Staff (2006) **Soil taxonomy: Keys to Soil Taxonomy.** 10ed. US Department of Agriculture (USDA), Natural Resources Conservation Service (NRCS). Government Printing Office, Washington, DC, USA.

Weissbach F, Strubelt C (2008) Correcting the dry matter content of maize silages as a substrate for biogas production. **Landtechnik** 63: 82–83.

Weinberg ZG, Muck RE, Weimer PJ, Chen Y, Gamburg M (2004) Lactic acid bacteria used in inoculants for silage as probiotics for ruminants. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 118, p. 1-9.