



YASMIM ALVARENGA SILVA

**AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS EPIFÍTICAS PARA
SILAGEM DE GRÃO DE MILHO MOÍDO E
REIDRATADO**

**LAVRAS – MG
2022**

YASMIM ALVARENGA SILVA

**AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS EPIFÍTICAS PARA SILAGEM DE GRÃO DE
MILHO MOÍDO E REIDRATADO**

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

Prof. Dra. Carla Luiza da Silva Ávila – DZO/UFLA
Orientadora

LAVRAS – MG
2022

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

Silva, Yasmim Alvarenga.

Avaliação de bactérias epifíticas para silagem de grão de milho
moído e reidratado / Yasmim Alvarenga Silva. - 2022.

49 p. : il.

Orientador(a): Carla Luiza da Silva Ávila.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Milho reidratado. 2. Inoculante. 3. Fermentação. I. Ávila,
Carla Luiza da Silva. II. Título.

YASMIM ALVARENGA SILVA

**AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS EPIFÍTICAS PARA SILAGEM DE GRÃO DE
MILHO MOÍDO E REIDRATADO**

**EVALUATION OF EPIPHYTIC BACTERIA FOR REHYDRATED CORN
KERNEL SILAGE**

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

APROVADA em 31 de maio de 2022.
Dra. Carla Luiza da Silva Ávila - UFLA
Dr. Valdir Botega Tavares - IFSM
Dr. Marcos Neves Pereira - UFLA
Dra. Beatriz Ferreira Carvalho - UFLA

Prof. Dra. Carla Luiza da Silva Ávila – DZO/UFLA
Orientadora

LAVRAS – MG
2022

*À minha família pelo apoio e amor incondicional.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À UFLA e a Pós-graduação em Zootecnia por ter oferecido a grande oportunidade de crescimento intelectual e pessoal.

À Prof. Doutora Carla Luíza da Silva Ávila pela orientação, sempre com muita paciência e disposição para ajudar.

Aos meus amigos da microbiologia Marcus, Viviane, Rafael, Laura, Marcos Paulo e Beatriz por sempre estenderem a mão quando precisava de ajuda. E também aos bons momentos passados juntos, o trabalho, as risadas, as conversas e trocas de experiência.

Ao NEFOR pelo conhecimento adquirido neste tempo e seus membros que também sempre estavam dispostos a ajudar no que precisasse.

Aos meus pais Julieta e Edésio pelo exemplo de amor e apoio incondicional. Às minhas irmãs Tatiana e Vanessa, meus cunhados Marcelo e Vinícius, e minha sobrinha Alice por sempre estarem presentes e torcendo por mim. Ao Paulo pelo companheirismo e sempre segurar a minha mão nos momentos que mais precisei.

E por fim, à Deus por sempre estar iluminando meu caminho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito de cepas epifíticas previamente isoladas de silagem de grão de milho moído e reidratado (GMR) e selecionadas com base em características desejáveis ao processo sobre as características químicas e microbiológicas da silagem. Foram pré-selecionadas 21 cepas de silagem de GMR. O milho moído (6 mm) foi reidratado até 64% de matéria seca (MS) e inoculado a uma taxa mínima de 10^8 UFC/kg de GMR. A compactação (5,03 kg) foi em baldes de 5L (densidade média de 1005 kg.m^{-3}). Os mini-silos foram vedados e pesados, a abertura ocorreu após 60 dias de armazenamento. O experimento foi conduzido DBC com 22 tratamentos, 21 cepas e 1 controle (sem inoculantes) com 3 repetições, representando 3 blocos. Os dados foram submetidos à análise de variância através do pacote computacional SISVAR®. As médias foram comparadas usando o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. Houve efeito das cepas para as características de pH, estabilidade aeróbia, MS, perdas de MS, amido, perdas de amido, proteína bruta, nitrogênio amoniacal (N-NH₃), contagem de microrganismos e produtos da fermentação. O grupo do controle, 221, 110, 189, 210, 185, 116, 7, 82 e 75 tiveram maior N-NH₃ (0,1 % da MS em média). As menores perdas de MS (%) foram para silagens inoculadas com os isolados 221 e 116 (1,95 % em média para o grupo). As silagens com as menores perdas de amido foram as inoculadas com as cepas do grupo 77, 190, 110, 79 e 52 (médias: 8,22%). Os menores valores de pH foram registrados para as silagens tratadas com os isolados 180 e 190 (média: 3,69). As cepas 180, 190 e o controle apresentaram maiores valores de ácido láctico, com média de 4,72% da MS. A inoculação com as cepas 52, 189 e 185 aumentaram a concentração de ácido propiônico nas silagens (média: 1,78 %). Os menores valores de ácido butírico foram observados nos tratamentos 180, 221 e 190 (0,09 % da MS em média). O etanol foi maior na silagem tratada com a cepa 84 (1,04 % da MS). As cepas 7, 52, 75, 77, 79, 82, 106, 110, 114, 126, 180, 190, 210 e 221 tiveram maior contagem de bactérias do ácido láctico. As cepas 82, 84, 104, 110 e 180 (média: 1,71 log UFC/g) tiveram as menores contagens de bactérias aeróbias esporulantes. Os inoculantes mais eficientes para reduzir a contagem de leveduras foram 82 e 108 (< 2,00 log UFC/g silagem) e fungos filamentosos a cepa 106. As cepas que obtiveram maior número de horas até a quebra de sua estabilidade foram do grupo 126 e 185 (média: 92,3 h), seguidas do grupo das cepas 52, 26 e 114 (média: 75,3 h). Cepas isoladas de GMR tem potencial para serem utilizadas como inoculantes e melhorarem características químicas, fermentativas e a estabilidade aeróbia das silagens.

Palavras chave: inoculante, fermentação, *Lactobacillus*.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of epiphytic strains previously isolated from rehydrated corn kernel silage (GMR) and selected based on desirable characteristics of the process on the chemical and microbiological characteristics of the silage. For the silage process, 21 strains were pre-selected from GMR. Ground corn (6 mm) was rehydrated to 64% dry matter (DM) and inoculated at a minimum rate of 10^8 CFU/kg of GMR. The corn kernel was compacted (5.03 kg) in 5L buckets until reaching an average density of 1005 kg.m^{-3} . After compaction, mini-silos were sealed and weighed and it was opened after 60 days of storage. The experiment was conducted randomized block design (RBD) with 22 treatments, 21 strains and 1 control (without inoculants) with 3 replications, representing 3 blocks. Data were submitted to analysis of variance using the SISVAR® computational package. The means were compared using the Scott-Knott test at a 5% of significance. There was an effect of strains for the characteristics of pH, aerobic stability, DM, DM losses, starch, starch losses, crude protein, ammonia nitrogen (N-NH₃), microorganism count and fermentation products. The control group, 221, 110, 189, 210, 185, 116, 7, 82 and 75 had higher N-NH₃ (average: 0.1% MS). The lowest DM losses (%) were for silages inoculated with isolates 221 and 116 (1.95% on average for the group). The silages with the lowest starch losses were those inoculated with strains from group 77, 190, 110, 79 and 52 (average: 8.22%). The lowest pH values were recorded for silages treated with isolates 180 and 190 (average: 3.69). Strains 180, 190 and the control showed higher values of lactic acid, with an average of 4.72% of DM. Inoculation with strains 52, 189 and 185 increased the concentration of propionic acid in the silages (1.78% of DM on average). The lowest values of butyric acid were observed in treatments 180, 221 and 190 (0.09% of DM on average). Ethanol was higher in silage treated with strain 84 (1.04% DM). Strains 7, 52, 75, 77, 79, 82, 106, 110, 114, 126, 180, 190, 210 and 221 had higher lactic acid bacteria counts. Strains 82, 84, 104, 110 and 180 (1.71 log CFU/g silage on average) had the lowest counts of aerobic sporulating bacteria. The most efficient inoculants to reduce the yeast count were 82 and 108 (< 2.00 log CFU/g silage) and filamentous fungi strain 106. The strains that had the highest number of hours until their stability was broken were in groups 126 and 185 (92.3 h on average), followed by the group of strains 52, 26 and 114 (average: 75.3 h). Strains isolated from GMR silages have the potential to be used as inoculants and improve chemical and fermentative characteristics and aerobic stability.

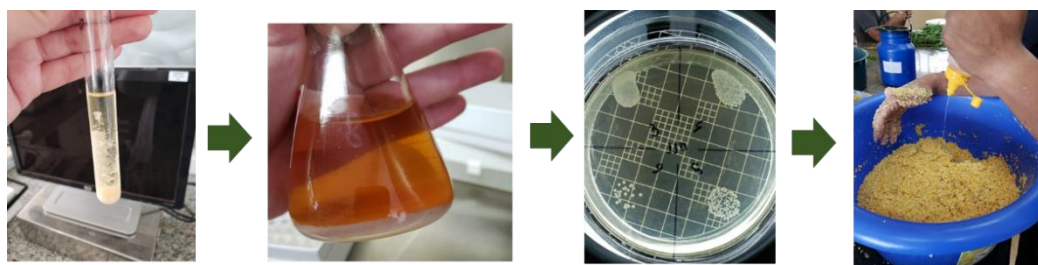
Keywords: inoculant, fermentation, *Lactobacillus*.

RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO

AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS EPIFÍTICAS PARA SILAGEM DE GRÃO DE MILHO MOÍDO E REIDRATADO

Elaborado por **Yasmim Alvarenga Silva**, orientado por **Carla Luiza da Silva Ávila**

Inoculantes podem atuar na melhoria do processo fermentativo e estabilidade aeróbica da silagem de grão de milho reidratado (GMR). No entanto, no mercado atual, não há uma cepa específica para este tipo de silagem. Objetivou-se avaliar o efeito de cepas epifíticas previamente isoladas de silagem GMR e selecionadas com base em características desejáveis ao processo sobre as características químicas e microbiológicas dessas silagens. As cepas foram isoladas de MRS (MAN, ROGOSA and SHARPE, Merck KGaA) padrão comercial (MP) e MRS modificado com caseína como substrato para o crescimento dos microrganismos (MM). Posteriormente, foram testadas quanto ao abaixamento do pH, crescimento em extrato de grãos, inibição de *Bacillus* spp. e inibição de *Escherichia coli*. Os tratamentos foram constituídos por 21 selecionadas desses testes e um tratamento controle. As silagens inoculadas foram submetidas a testes para agrupar as cepas que demonstraram características favoráveis ao processo.



Cultivo em tubo de 10 ml de MRS > Cultivo em 100 ml de MRS > Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) > Inoculação

Processo de confecção dos inoculantes e silagens

	Características de maior interesse e agrupamento de cepas promissoras					
	Menores perdas de Matéria seca	Menores perdas de amido	Menores valores de pH	Maior teor de ácido lático	Maior teor de ácido propiônico	Maior estabilidade aeróbia
Cepas	221 e 116	77, 190, 110, 79 e 52	180 e 190	180, 190 e controle	52, 189 e 185	126 e 185
Média do Grupo	1,95 %	8,22 % da MS	3,69	4,72 % da MS	1,78 % da MS	92,3 h

A adição de cepas epifíticas previamente selecionadas de silagem de GMR se mostrou eficaz para a melhora de características químicas e microbiológicas nas silagens. No entanto, a maior parte das cepas se mostrou eficaz para características isoladas, não estabelecendo relações entre as características de interesse.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - a) Matéria seca ($p < 0,001$); b) Teor de amido ($p < 0,01$); c) Teor de proteína ($p < 0,001$); e d) Teor de N-NH₃ ($p < 0,001$) de silagem de grão de milho moído e reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas ou não aos 60 dias de ensilagem.... 30
- Figura 2 - Perdas de matéria seca (MS) da silagem de grão de milho moído e reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas ou não e armazenada por 60 dias ($p < 0,001$). 31
- Figura 3 - Perdas de amido (% do total ensilado) da silagem de grão de milho moído e reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas ou não e armazenada por 60 dias ($p < 0,001$)..... 31
- Figura 4 - pH da silagem de grão de milho moídos e reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas ou não e armazenada por 60 dias ($p < 0,001$). 32
- Figura 5 - a) Teor de ácido láctico ($p < 0,001$); b) Teor de ácido acético ($p < 0,001$); c) Teor de ácido propiônico ($p < 0,001$); e d) Teor de 1,2-propanodiol ($p < 0,001$) em porcentagem da MS de silagem de grão de milho moído e reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas ou não aos 60 dias de ensilagem. 33
- Figura 6 - a) Teor de ácido succínico ($p < 0,001$); b) Teor de ácido butírico ($p < 0,001$); c) Teor de etanol ($p < 0,001$) em porcentagem da MS de silagem de grão de milho moído e reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas ou não aos 60 dias de ensilagem. 34
- Figura 7 - a) Contagem de BAL ($p < 0,001$); b) Contagem de BAE ($p < 0,001$); c) Contagem de leveduras ($p < 0,001$); d) Contagem de fungos ($p < 0,001$) em log UFC/g de silagem para grão de milho moído e reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas ou não aos 60 dias de ensilagem..... 35
- Figura 8 - Estabilidade aeróbia da silagem de grão de milho moído e reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas ou não e armazenada por 60 dias ($p < 0,001$)..... 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cepas isoladas de silagem de silagem de grão de milho moído e reidratado (GMR), meio utilizado para o isolamento, tempo de estocagem das silagens, forma das células e produção de gás	24
Tabela 2 - Contagem do inoculante (log UFC/ml) e volume aplicado no momento da ensilagem (ml)	25

LISTA DE SIGLAS

1,2-PRO	1,2-propanodiol
AS	Ácido succínico
AL	Ácido láctico
AC	Ácido acético
BAE	Bactérias aeróbias esporulantes
BAL	Bactérias do ácido láctico
BAP	Bactérias do ácido propiônico
BUT	Ácido butírico
ETA	Etanol
GMR	Grão de milho moído e reidratado
LB	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>
MS	Matéria seca
PMS	Perda de matéria seca

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	HIPÓTESE.....	14
3.	OBJETIVO.....	15
4.	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
4.1.	Silagem de grão de milho reidratado.....	15
4.2.	Microbiologia da silagem de grão de milho reidratado.....	17
4.3.	Ação dos inoculantes na silagem de milho reidratado.....	19
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5.1.	Origem das cepas avaliadas.....	23
5.2.	Ensilagem.....	24
5.3.	Análises químicas.....	26
5.4.	Análises microbiológicas.....	27
5.5.	Avaliação da estabilidade aeróbia.....	27
5.6.	Análise estatística.....	28
6.	RESULTADOS.....	28
6.1.	Características químicas.....	28
6.1.	Produtos da fermentação.....	32
6.2.	Características microbiológicas.....	34
6.3.	Estabilidade aeróbia.....	35
7.	DISCUSSÃO.....	36
8.	CONCLUSÃO.....	43
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

A expansão do uso de silagem de grão de milho reidratado (GMR) nas fazendas brasileiras é relacionada principalmente a fatores logísticos e nutricionais. Dentre os fatores logísticos estão as implicações no momento da colheita do grão úmido que impedem a confecção imediata desse tipo de silagem e a possibilidade de aquisição dos grãos quando o preço é mais vantajoso para o produtor (BITENCOURT, 2012). Outro motivo ligado ao aumento da utilização de silagem de GMR é a predominância do cultivo de milho de endosperma vítreo no Brasil. Este tipo de híbrido é menos digestível que híbridos de endosperma farináceo pela característica de adensamento da matriz amido-proteína. A adição de água ao grão de milho aumenta a umidade para que o grão possa fermentar de forma correta (OWENS et al., 1986), o que conseqüentemente leva a quebra das prolaminas e resulta em aumento da digestibilidade do alimento (FERRARETTO et al., 2014).

Apesar das vantagens de se ensilar GMR, alguns problemas são observados no processo de fermentação e pós-abertura. A fermentação do GMR é caracterizada por uma queda lenta do pH em função da quantidade limitada de carboidratos solúveis, cerca de 20 g/kg de matéria seca (MS). A produção de ácidos e a redução do valor do pH começa após 15 dias de fermentação, com a redução do pH ocorrendo lentamente (CARVALHO et al., 2016). Esta característica pode vir a favorecer o crescimento de bactérias produtoras de esporos como aquelas do gênero *Bacillus* (CARVALHO et al., 2016) e do gênero *Clostridium* (CARVALHO-ESTRADA et al., 2020) nesse tipo de silagem.

Problemas na estabilidade aeróbia também são observados neste tipo de silagem, prejudicando seu valor nutritivo. Silva et al. (2018) e Silva et al. (2019) observaram uma estabilidade aeróbia próximo a 70 h para silagens não inoculadas com inoculantes bacterianos. Este fenômeno está relacionado principalmente a ação de leveduras capazes de assimilar o ácido láctico em seu metabolismo (WOOLFORD, 1990), elevando o pH e propiciando o crescimento de outros microrganismos deterioradores.

Inoculantes podem atuar na melhoria do processo fermentativo e estabilidade aeróbica da silagem (MORAIS, 2016). Os inoculantes microbianos disponíveis no mercado que podem ser utilizados para a inibição de problemas no processo fermentativo das silagens são classificados como: estimuladores de fermentação desejável e inibidores de deterioração aeróbia. O primeiro é constituído principalmente por BAL homofermentativas e o segundo por BAL heterofermentativas e/ou bactérias do ácido propiônico.

34 Trabalhos utilizando cepas de *Lentilactobacillus buchneri* (SILVA et al., 2018; SILVA
35 et al., 2019); *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei* (*Lactobacillus casei*),
36 *Enterococcus faecium*, e *Pediococcus* sp. (FERRARETTO et al., 2015), são exemplos de
37 utilização de inoculantes para silagem de grãos. Ferraretto et al. (2015) e Souza et al. (2020)
38 observaram melhora no perfil fermentativo de silagens de GMR inoculadas com aditivos
39 microbianos, manifestadas pela diminuição do pH, aumento da produção de ácidos e
40 diminuição de perdas fermentativas. Silva et al. (2018), demonstraram que a inoculação com *L.*
41 *buchneri* elevou a estabilidade aeróbia de suas silagens de 71 horas para as silagens controle
42 para 288 h quando houve a inoculação.

43 Há evidências que os inoculantes interferem na digestibilidade da silagem (KUNG JR
44 et al., 2007; SILVA et al., 2018; TAYLOR; KUNG JR, 2002), visto que a maior parte das
45 enzimas que degradam as prolaminas que envolvem os grânulos de amido são de origem
46 microbiana (JUNGES et al., 2017). Segundo Junges et al. (2017) a contribuição de
47 microrganismos na proteólise é de 60,4%, sendo possível que a adição de bactérias com
48 capacidade conhecida de expressar atividade proteolítica durante a ensilagem seja interessante,
49 pois haverá maior disponibilização de amido para a posterior digestão no trato ruminal.

50 No mercado atual, não há uma cepa específica para silagem de GMR. Alguns trabalhos
51 têm demonstrado que cepas adaptadas ao ambiente onde serão inoculadas podem ter maior
52 chance de sucesso na melhora das características desejáveis à silagem (ÁVILA et al., 2009;
53 DUFFNER; O'CONNELL, 1995). O perfil fermentativo em questão e o tipo de substrato é um
54 grande determinante do processo de seleção, que deve ser sempre feita com rigor e seguir
55 critérios específicos (CARVALHO et al., 2020). Uma das etapas cruciais do processo de
56 seleção de inoculantes é a avaliação de isolados em silos experimentais e essa etapa é iniciada
57 após a seleção das cepas por meio de testes em laboratório (CARVALHO et al., 2020).

58

59 **2. HIPÓTESE**

60

61 A adição de cepas isoladas da silagem de grão de milho e reidratado nestas silagens,
62 melhora a qualidade da fermentação no silo, acelerando a queda do pH, reduzindo o crescimento
63 de microrganismos indesejáveis e aumentando a estabilidade aeróbia.

64

65

66 **3. OBJETIVO**

67

68 O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de cepas epifíticas previamente isoladas de
69 silagem de grão de milho reidratado e selecionadas com base em características desejáveis ao
70 processo sobre as características químicas e microbiológicas dessas silagens.

71 Objetivos específicos foram:

72 a) Avaliar a capacidade das cepas de acidificar o meio de forma efetiva,
73 consequentemente reduzir o pH, e inibir bactérias indesejáveis;

74 b) Avaliar características químicas e microbiológicas da silagem de grãos de milho
75 reidratado com e sem inoculação de cepas isoladas desse tipo de silagem;

76 c) Relacionar o efeito das diferentes cepas com a melhoria da estabilidade aeróbia.

77

78 **4. REVISÃO DE LITERATURA**

79 **4.1. Silagem de grão de milho reidratado**

80

81 A confecção da silagem de grão de milho reidratado é uma técnica que tem sido
82 amplamente difundida no Brasil, devido ao aumento da degradabilidade ruminal do amido em
83 grãos de milho com alta proporção de endosperma vítreo, como os híbridos utilizados no país
84 (CORREA et al., 2002). Outros fatores que contribuem com a adoção dessa técnica, é o atraso
85 que pode ocorrer na colheita do grão úmido, devido a disponibilidade limitada de máquinas e o
86 excesso de chuvas durante esse período (BITENCOURT, 2012). Essa técnica também diminui
87 o risco de perdas de armazenamento (pragas, mudanças de temperatura, umidade, etc.), reduz
88 os gastos com transporte e minimiza os efeitos das flutuações do preço do milho para o produtor
89 (ARCARI et al., 2016).

90 Em uma visão geral do grão de milho, o endosperma compõe a maior parte, cerca de 75
91 a 80% (BUCHANAN et al., 2015), sendo que 88% do peso seco do endosperma é composto
92 por amido (PAES, 2006). É também no endosperma que estão presentes as proteínas do tipo
93 prolaminas, que no milho são denominadas de zeínas, que compõem a matriz amido-proteína
94 que envolve os grânulos de amido dentro das células.

95 Com base nessa distribuição dos grânulos de amido e da matriz de proteína, o
96 endosperma é classificado em farináceo ou vítreo. Os grânulos de amido no milho do tipo
97 farináceo estão dispersos e a matriz proteica é esparsa e fragmentada. No grão de milho com
98 endosperma vítreo, o amido está envolvido por uma matriz hidrofóbica de amido-proteína densa

99 (REMOND et al., 2004). Essa característica provoca um adensamento que dificulta a
100 penetração de água, prejudicando a hidrólise enzimática e a colonização por parte das bactérias
101 do rúmen, o que resulta em menor digestibilidade do amido (PAES, 2006; SILVA, 2016).

102 A reidratação de cereais para produção de silagem se baseia em devolver ao grão a
103 umidade necessária para que ocorra fermentação (OWENS et al., 1986) e, conseqüentemente,
104 melhoria da digestibilidade do alimento (FERRARETTO et al., 2014; OWENS et al., 1986).
105 Durante a fermentação da silagem, diversos processos estão envolvidos na degradação das
106 proteínas denominadas zeínas, por meio da ação das proteases do próprio grão, microrganismos
107 e pela solubilização ácida dos produtos de fermentação (JUNGES et al., 2017). A zeína,
108 principal proteína presente no milho, é dividida em 4 subclasses (α , β , γ e δ) e representa de 30
109 a 60% de toda a proteína do grão (SILVA, 2016). De acordo com os estudos de Hoffman et al.
110 (2011), a γ -zeína é altamente degradada no processo fermentativo da silagem de grão úmido de
111 milho e essa informação gera implicações importantes quanto a digestão do amido. O trabalho
112 de Hoffman et al. (2011) demonstra uma redução de 42,2 a 73,2% da γ -zeína com a ensilagem.
113 A maior degradação de γ -zeína é explicada pela sua localização superficial na matriz proteica
114 e sua degradação é um fator que contribuí para tornar acessível os grãos de amido.

115 Existem poucos trabalhos estudando a origem e ação destas enzimas, contudo, Junges
116 et al. (2017) concluíram que a atividade proteolítica bacteriana é o principal mecanismo de
117 degradação de proteínas nas silagens de grãos de milho (60,4% da proteólise). Ainda segundo
118 os autores, as proteases vegetais também contribuem significativamente para a quebra de
119 proteínas (29,5%), enquanto os fungos (5,3%) e produtos finais da fermentação (4,8%) tem
120 apenas pequenas contribuições para a proteólise.

121 A limitada quantidade de carboidratos solúveis presente no grão de milho pode limitar
122 a atividade desses microrganismos, conseqüentemente prejudicando sua atividade enzimática.
123 Os carboidratos solúveis são o principal substrato para o crescimento de BAL (bactérias do
124 ácido lático; MCDONALD et al., 1991), no entanto, a maior parte dos carboidratos são
125 polimerizados como amido no endosperma do milho durante seu desenvolvimento. A literatura
126 relata uma concentração de carboidratos solúveis mínima de 25 g kg⁻¹ de MS como ideal para
127 o crescimento e estabelecimento das BAL (PILTZ; KAISER, 2004). No estudo de Carvalho et
128 al. (2016), foi observado que a quantidade 20 g kg⁻¹ de MS não foi limitante para o
129 estabelecimento do BAL ou para o processo de fermentação. A redução significativa no valor
130 do pH foi detectada aos 30 dias de fermentação, demonstrando que a limitação de açúcares
131 solúveis pode ter uma implicação maior no pH, que decai lentamente.

132 A deterioração é o principal problema associado à manutenção do valor nutritivo da
133 silagem após a abertura dos silos e o processo se inicia através de leveduras, que são capazes
134 de assimilar o ácido lático (WOOLFORD, 1990), resultando em baixa estabilidade aeróbia após
135 a abertura. Silva et al. (2018) relataram estabilidade de 74h para silagens de GMR não
136 inoculadas, podendo alcançar 288h quando inoculadas com *Lentilactobacillus buchneri*
137 (*Lactobacillus buchneri*; LB).

138 A estabilidade aeróbia da silagem de GMR pode ser influenciada de acordo com alguns
139 aspectos de sua confecção. Silva et al. (2019) observaram que a estabilidade aeróbia era
140 incrementada com o aumento do tempo de estocagem da silagem de GMR. E essa estabilidade
141 foi maior para silagem inoculadas com LB, do que as silagens não inoculadas. Rezende et al.
142 (2014) relataram que outra característica ligada a estabilidade aeróbia seria a taxa de reidratação
143 dessas silagens. Estes autores relatam que silagens de grãos de milho reidratadas a 300 mL/kg
144 apresentaram maior estabilidade após a abertura dos silos.

145

146 **4.2. Microbiologia da silagem de grão de milho reidratado**

147

148 A ensilagem é um processo fermentativo conduzido principalmente por bactérias lácticas
149 (MUCK et al., 2018), desde o material fresco até o produto final há uma intensa sucessão de
150 microrganismos (KESHRI et al., 2018). Portanto, a dinâmica dos microrganismos influencia
151 diretamente na qualidade da silagem. Apesar da importância do assunto, poucos estudos têm
152 sido feitos com o objetivo de entender a sucessão natural que ocorre na comunidade bacteriana
153 de silagem de GMR.

154 Segundo o estudo de Carvalho et al. (2016), as BAL responsáveis pelo início do
155 processo da fermentação láctica em silagem de milho reidratado seriam *Enterococcus*
156 *casseliflavus* e *Pediococcus pentosaceus*, apenas após os 15 dias de fermentação que ocorreriam
157 maiores populações e diversidade de espécies. Após 30 dias de fermentação, *Ligilactobacillus*
158 *acidipiscis* (*Lactobacillus acidipiscis*), *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lactobacillus paracasei*)
159 e *Lactobacillus* sp. seriam as BAL dominantes no processo de fermentação. Bactérias do gênero
160 *Lactobacillus* dominam os processos finais de fermentação, quando o pH está mais baixo, dessa
161 forma, nestas silagens eles são dominantes em períodos mais longos de estocagem.

162 Carvalho-Estrada et al. (2020) ao estudarem as populações presentes em silagens de
163 milho úmido e grão reidratado, verificaram que os *Enterococcus* estiveram presentes no início
164 do processo fermentativo, com abundância relativa (AR) de 31,86% no dia 0 e 36,14% aos 7

165 dias. Reafirmando os achados de Carvalho et al. (2016), que observaram a presença de
166 *Enterococcus* nas etapas iniciais do processo.

167 Fernandes et al. (2022) identificaram a presença de *Lactobacillus acidophilus*, *L.*
168 *buchneri*, *L. plantarum*, *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus* aos 30 dias de
169 armazenamento, *Levilactobacillus brevis* (*Lactobacillus brevis*) aos 30 e 180 dias,
170 *Lentilactobacillus parabuchneri* (*Lactobacillus parabuchneri*) aos 180 dias. Aos 180 dias, a
171 população de *L. plantarum* e *P. acidilactici* permaneceram abaixo do nível detectável (2 log
172 UFC/g).

173 Apesar da predominância das BAL, outros microrganismos estão presentes no processo.
174 Os microrganismos do gênero *Clostridium* têm grande impacto na silagem, principalmente o
175 grupo de clostrídios proteolíticos por sua capacidade de fermentar aminoácidos. O resultado de
176 sua atividade é a produção de NH₃ e uma mistura de ácidos orgânicos e outros produtos, como
177 álcoois. Os ácidos formados incluem os ácidos graxos voláteis acético, propiônico e butírico.
178 Alguns desses produtos são relacionados a baixa qualidade da silagem, causando perdas no
179 valor nutritivo e baixa palatabilidade (PAHLOW et al., 2003).

180 É relatado na literatura que em silagens com MS acima de 30% e baixo pH, não há
181 condições ideais para o crescimento de *Clostridium* (ÁVILA; CARVALHO, 2020; PAHLOW
182 et al., 2003) . Essas condições não são presentes em silagens de GMR, pois possuem MS
183 geralmente em torno de 60% a 70% e, apesar da lenta queda de pH inicial, após os 30 dias de
184 ensilagem há uma queda significativa (CARVALHO et al., 2016). Altas contagens de
185 clostrídeos podem estar relacionados principalmente aos cuidados sanitários no momento de
186 confecção (CARVALHO-ESTRADA et al., 2020).

187 Carvalho-Estrada et al. (2020) observaram que as amostras de milho reidratado no dia
188 0 apresentaram uma AR para *Clostridium* de 26,87% e valores para *Lactobacillus* de 6,26%.
189 Aos sete dias de armazenamento, houve um leve aumento na abundância relativa de
190 *Lactobacillus*, mas esses valores decaíram até os 120 dias de armazenamento. Ao final de 120
191 dias de armazenamento *Clostridium* representou em média 26,69% das sequências encontradas
192 nas amostras milho reidratado, enquanto *Lactobacillus* representou apenas 2,66%.

193 Outro microrganismo de interesse são os *Bacillus*, que são bactérias formadoras de
194 endósporos com células em forma de bastonete, Gram-positivas (para a maioria das espécies)
195 e crescem aerobiamente, podendo ser anaeróbios facultativos (PAHLOW et al., 2003). Os
196 problemas relacionados a essas bactérias são a baixa queda de pH, início da deterioração
197 aeróbia, a contaminação do leite dos animais que consomem as silagens contaminadas com os
198 endósporos e a produção de enterotoxinas (ÁVILA; CARVALHO, 2019). Apesar disso,

199 algumas espécies de *Bacillus* têm sido investigadas nos últimos anos como novos inoculantes
200 de silagem (LI et al, 2018), principalmente pela produção de antimicrobianos que podem inibir
201 bactérias indesejáveis (ÁVILA; CARVALHO, 2019). Fernandes et al. (2022) encontraram uma
202 contagem de bactérias aeróbias esporulantes (BAE) de 1,92 log UFC/g de material ensilado em
203 silagens de GMR. Dentre as BAE identificadas nas silagens estavam: *Bacillus pumilus*,
204 *Brevibacillus invocatus* (*Bacillus invocatus*) e *Pae. glucanolyticus* (*Bac. glucanolyticus*) e
205 *Brevibacillus brevis* (*Bacillus brevis*).

206 As enterobactérias são geralmente o segundo grupo bacteriano mais numeroso da
207 microflora epifítica ativa no silo e, portanto, o mais importante em sua competição com as BAL.
208 Essas bactérias produzem principalmente ácido acético, mas também são importantes na
209 redução do NO₃, resultando na produção de nitritos e gases de óxido de nitrogênio (PAHLOW
210 et al., 2003). Carvalho et al (2016) isolaram enterobactérias em meio MRS em amostras antes
211 da ensilagem, eram elas *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cowanii*, *K. pneumoniae* e *S.*
212 *saprophyticus*. Após a ensilagem, a contagem dessas bactérias caiu para menos de 2 log UFC/g
213 de silagem. Assim como os clostrídeos, a acidificação inicial rápida é a chave para controlar o
214 crescimento desses microrganismos indesejáveis (PAHLOW et al., 2003).

215 Os fungos e as leveduras, são os microrganismos mais importantes implicados no início
216 da deterioração aeróbia (PAHLOW et al., 2003). As leveduras estão associadas a perdas
217 fermentativas anaeróbias e deterioração aeróbia. Carvalho et al. (2016) observaram uma
218 sucessão de espécies de leveduras na silagem de grãos de milho reidratados. No início da
219 fermentação havia a presença de *Meyerozyma guilliermondii* e *H. burtonii*, enquanto *W.*
220 *anomalous* e *I. orientalis* foram dominantes no final. Os fungos podem estar presentes na silagem
221 durante todas as fases da fermentação (ÁVILA; CARVALHO, 2019) e sua relevância está na
222 geração de perdas, reduções de palatabilidade e a produção de micotoxinas (PAHLOW et al.,
223 2003). Carvalho et al. (2016) relatam que a partir dos 30 dias de ensilagem, a população de
224 fungos fica abaixo de 2 log UFC/g.

225

226 **4.3. Ação dos inoculantes na silagem de milho reidratado**

227

228 O inoculante é um produto composto por cepas de uma ou mais espécies de
229 microrganismos viáveis no momento do uso. Para a seleção de um microrganismo a ser
230 inoculado, as características específicas do substrato alvo, bem como as condições gerais do
231 ambiente de ensilagem, devem ser consideradas para garantir os melhores efeitos
232 (CARVALHO et al., 2020).

233 No mercado atual, existem dois grupos principais de inoculantes: estimuladores de
234 fermentação e os inibidores de deterioração aeróbia. A principal diferença entre eles é seu
235 metabolismo. Inoculantes microbianos classificados como estimuladores da fermentação, como
236 por exemplo *Lactiplantibacillus plantarum* (*Lactobacillus plantarum*), *Pediococcus*
237 *acidilactici* e *Enterococcus faecium*, aceleram a acidificação da silagem através da produção
238 mais rápida de ácido lático, característica de um processo homofermentativo (PAHLOW et al.,
239 2003).

240 Os inoculantes microbianos classificados como inibidores de deterioração aeróbia tem
241 demonstrado resultados positivos no controle da deterioração aeróbia, principalmente em
242 silagens de planta inteira de milho. A espécie mais utilizada para esse fim é o *Lentilactobacillus*
243 *buchneri* (SILVA et al, 2018). O tipo de metabolismos dos inibidores de deterioração aeróbia,
244 denominado heterofermentativo, leva a produção de outros compostos além do ácido lático,
245 como etanol, acetato e CO₂ (PAHLOW et al., 2003). A classificação das bactérias em três
246 grupos - homofermentativa, obrigatoriamente heterofermentativa e facultativamente
247 heterofermentativa - está bem estabelecida pela comunidade científica e define as principais
248 rotas metabólicas utilizadas, bem como os produtos da fermentação (ÁVILA; CARVALHO,
249 2020).

250 A utilização de inoculantes para a silagem de GMR se justifica pela melhoria no
251 processo fermentativo, a inibição do crescimento de microrganismos indesejáveis (MORAIS,
252 2016) e o aumento da estabilidade aeróbia (SILVA et al, 2018). Dentre alguns exemplos de
253 espécies de bactérias e suas combinações já estudadas e utilizadas como inoculantes em silagens
254 de grãos úmidos estão: *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788 (SILVA et al., 2018;
255 SILVA et al., 2019); combinação de *Lactiplantibacillus plantarum* MA18 e *Pediococcus*
256 *acidilactici* MA18 (SILVA et al., 2018); combinação de *Lactiplantibacillus plantarum* e
257 *Propionibacterium acidipropionici* (LALSIL® Milho; SOUZA ET AL., 2020); combinação de
258 *Lactiplantibacillus plantarum* e *Enterococcus faecium* (Brand 1189, Pioneer Hi-Bred
259 International, Des Moines, IA; SEBASTIAN et al., 1996); *Lactiplantibacillus plantarum*,
260 *Lacticaseibacillus casei* (*Lactobacillus casei*), *Enterococcus faecium*, e *Pediococcus* sp. (Silo
261 Charger “D,” NU-AG Bosko Inc., Oskaloosa, IA; FERRARETTO et al., 2015).

262 Resultados positivos são relatados em diversos trabalhos com a utilização de inoculantes
263 para este tipo de silagem. Ferraretto et al. (2015) observaram que a inoculação microbiana (*L.*
264 *plantarum*, *L. casei*, *E. faecium* e *Pediococcus* sp) diminuiu o pH e o acetato, e aumentou as
265 concentrações de lactato e ácidos totais nas silagens. Souza et al. (2020) ao avaliarem a
266 reidratação dos grãos de milho com soro de leite associada ao uso de inoculantes bacterianos

267 (*L. plantarum* e *P. acidipropionici*), também observaram melhora no perfil fermentativo da
268 silagem, com menores valores de pH e perdas fermentativas.

269 Silva et al. (2018) ao estudarem *Lentilactobacillus buchneri* ou a combinação de
270 *Lactiplantibacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici* em diferentes taxas de aplicação para
271 a silagem de milho reidratado, observaram que as silagens tratadas com LB tiveram contagens
272 mais altas de BAL do que a silagem controle (6,46, 6,35 e 6,31 log UFC/g em cada taxa de
273 aplicação vs 3,36 em controle). A estabilidade aeróbia para silagens tratadas com LB foi de 288
274 h e para *Lactiplantibacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici* foi de 57, 49 e 51 h para as
275 diferentes dosagens testadas. Outra vantagem da utilização do LB nessas silagens foi a redução
276 nas perdas de MS durante a exposição aeróbia.

277 Enquanto que Silva et al. (2019) encontraram que a inoculação com LB reduziu a
278 concentração de ácido láctico (23,7 vs 22,4 g/kg MS, para controle e LB respectivamente) e
279 aumentou o pH (6,77 vs 6,79), ácido acético (4,23 vs 10,8 g/kg de MS) e a contagem de
280 bactérias do ácido láctico (4,16 vs 4,30 log UFC/g de matéria natural). Como consequência, a
281 inoculação com LB proporcionou maior estabilidade aeróbia para a silagem de milho
282 reidratado.

283 O aumento da perda de MS durante a fermentação da silagem pode resultar do
284 metabolismo heterofermentativo por BAL, fermentação etanoica por leveduras ou metabolismo
285 de outros microrganismos indesejáveis como bactérias aeróbias esporulantes ou *Clostridium*,
286 com metabolismo resultando na formação de CO₂ (ÁVILA; CARVALHO, 2019). Carvalho et
287 al. (2016) observaram que as perdas de matéria seca chegaram a alcançar o valor máximo de
288 7,6%. Essa alta perda de matéria seca também pode ser observada em outros estudos em que
289 não houve utilização de inoculantes microbianos. Gomes et al. (2020) observaram perdas de
290 MS aos 180 dias em torno de 6%, enquanto que Fernandes (2014), observaram aos 120 dias
291 que as silagens tiveram em média 6,59% de perda de MS. Outro estudo, de Fernandes et al.
292 (2022), apontou que suas silagens tiveram uma perda de MS de 6,8 % do total ensilado, além
293 disso, a perda de amido em silagens de grão reidratado pode chegar aos 23,9% do total ensilado.

294 Em relação a digestibilidade do amido, a inoculação microbiana tem se mostrado
295 eficiente na degradação das prolaminas que envolvem os grânulos de amido. Silva et al. (2018)
296 observaram uma redução no teor de prolamina nas silagens tratadas com LB associado a um
297 aumento de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) em comparação ao controle, o que resultou na maior
298 degradabilidade ruminal *in situ* da MS. A maior degradabilidade da MS *in situ* ruminal
299 provavelmente foi desencadeada pela maior disponibilidade de amido, que por sua vez foi
300 induzida pela proteólise.

301 As prolaminas podem ser quebradas durante a ensilagem por enzimas da planta e
302 microrganismos da silagem por meio de proteólise e solubilização por ácidos produzidos
303 durante o processo de fermentação (HOFFMAN et al., 2011). Junges et al. (2017) deduziram
304 que as bactérias epífitas e/ou inoculadas são os principais determinantes da degradação da
305 matriz proteica ao redor do amido, representando 60,4% da proteólise. Neste trabalho, silagens
306 que não tiveram o crescimento microbiano reduzido apresentaram as maiores concentrações de
307 proteína solúvel e N-NH₃. Pode ser por isso que a inoculação com LB aumenta a concentração
308 de N-NH₃ e a diminuição do teor de prolaminas (SILVA et al., 2018).

309 Nos trabalhos anteriormente citados, cepas selecionadas para outras culturas foram
310 utilizadas e demonstraram melhoras na qualidade da silagem, no entanto, não existe atualmente
311 no mercado uma cepa isolada de silagem de GMR e selecionada especificamente para essas
312 silagens. Alguns trabalhos foram conduzidos com objetivos de selecionar cepas bacterianas
313 para a utilização como culturas iniciadoras em silagens de milho (SANTOS et al., 2013),
314 silagem de gramíneas (SAARISALO et al., 2007) e cana-de-açúcar (ÁVILA et al., 2009).
315 Santos et al. (2013) ao avaliarem o efeito da adição de BAL isoladas do milho, verificaram
316 efeitos positivos na estabilidade aeróbia. Enquanto que Ávila et al. (2014) selecionaram cepas
317 de BAL isoladas da cana-de-açúcar e avaliaram seus efeitos como inoculantes na silagem dessa
318 mesma planta. Dentre as selecionadas, duas cepas da espécie *Lentilactobacillus hilgardii*
319 (*Lactobacillus hilgardii*) apresentaram melhores resultados com a produção de maiores
320 concentrações de ácidos acético e propiônico, menor concentração de etanol, redução da
321 população de leveduras e queda nas perdas de MS.

322 Nesses trabalhos, os autores seguiram procedimentos semelhantes: isolamento ou
323 obtenção de cepas, seguido de uma etapa inicial em laboratório, com avaliação do maior número
324 de cepas. A importância da correta seleção e escolha de um inoculante é evidenciada pelo fato
325 de que um inoculante microbiano pode reduzir a qualidade das silagens se não for adequado
326 para aquele processo de fermentação. Além disso, as diferenças entre cepas pertencentes a uma
327 mesma espécie devem ser consideradas (CARVALHO et al., 2020).

328

329

330

331

332

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Origem das cepas avaliadas

Este projeto é parte de um projeto maior intitulado "Seleção de inoculantes para silagem de grãos de milho moído e reidratado (GMR)", que visa selecionar a partir de uma coleção de cepas de bactérias do ácido lático (BAL) isoladas de silagem de GMR, aquelas que são promissoras como inoculantes. Resumidamente, 150 cepas de bactérias foram isoladas de GMR, com diferentes tempos de fermentação utilizando os meios de cultivo: MRS (MAN, ROGOSA and SHARPE, Merck KGaA) padrão comercial (MP) e MRS modificado (MM). A diferença do meio considerado padrão para o modificado, foi a substituição das fontes de carboidratos por proteína (caseína), como substrato para promover o crescimento de bactérias proteolíticas.

As cepas foram avaliadas quanto ao crescimento, redução do pH e produtos da fermentação em meio de extrato de grãos de milho, e inibição de microrganismos indesejáveis na silagem (*Bacillus* sp e *E. coli*). Do total de isolados, 21 cepas que mostraram as melhores características quanto ao abaixamento do pH, melhor crescimento em extrato de grãos (SAARISALO et al., 2007), inibição de *Bacillus spp.* e inibição de *Escherichia coli* (MAIA et al., 2001) foram incluídas para esta etapa (Tabela 1).

364 Tabela 1 - Cepas isoladas de silagem de silagem de grão de milho moído e reidratado (GMR),
 365 meio utilizado para o isolamento, tempo de estocagem das silagens, forma das células e
 366 produção de gás

Isolado	Meio	Tempo de ensilagem (dias)	Forma das células	Produção de gás
7	MP*	1	Cocos	Negativo
26	MM**	1	Bastonete	Positivo
52	MM	3	Cocos	Negativo
75	MP	5	Bastonete	Negativo
77	MP	5	Cocos	Negativo
79	MP	5	Cocos	Negativo
82	MM	5	Cocos	Negativo
84	MM	15	Cocos	Negativo
104	MP	15	Bastonete	Positivo
106	MP	15	Bastonete	Positivo
108	MP	15	Bastonete	Positivo
110	MP	15	Bastonete	Positivo
114	MP	15	Bastonete	Positivo
116	MP	15	Bastonete	Positivo
126	MM	15	Bastonete	Positivo
180	MM	30	Bastonete	Negativo
185	MM	30	Bastonete	Negativo
189	MM	30	Bastonete	Negativo
190	MM	30	Bastonete	Negativo
210	MP	60	Cocos	Negativo
221	MM	60	Bastonete	Negativo

367 *MP: meio de cultura MRS padrão

368 **MM: meio de cultura MRS modificado com caseína como substrato principal de crescimento

369

370 5.2. Ensilagem

371

372 O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal
 373 de Lavras, Brasil (21°13'49" S, 44°58'10" W). Os grãos de milho seco foram adquiridos na
 374 fábrica de ração e moídos com moinho tipo martelo com peneira de crivo com 6 mm. O tamanho
 375 médio geométrico das partículas foi realizado através de um conjunto de peneiras para grãos,
 376 os calculos foram baseados de acordo com a porcentagem da retenção de partículas de cada
 377 peneira (BAKER; HERMAN, 2002). A distribuição de partículas foi a seguinte: 11,4% para a
 378 peneira de 3,25 mm, 31,57% para a peneira de 2 mm, 38,59 para a peneira de 1,25 mm e 18,44%
 379 para o fundo. As silagens foram preparadas no setor de Forragicultura, em área coberta e
 380 distante de fontes de contaminação. A concentração de matéria seca (MS) do milho moído foi
 381 medida através da utilização de um microondas (LACERDA; FREITAS; SILVA, 2009; MS =
 382 88%) e, posteriormente, água suficiente foi adicionada para aumentar a umidade para 36%.

383 A inoculação microbiana ocorreu no momento da reidratação dos grãos e o material foi
 384 homogeneizado de forma a incorporar igualmente a umidade. Foram avaliadas cepas isoladas
 385 conforme descrito no ítem (5.1). As cepas foram cultivadas em laboratório conforme Ávila et
 386 al. (2009). Após o cultivo avaliou-se a população de células viáveis no meio de plaqueamento
 387 antes da ensilagem. Os inoculantes contendo cada uma das cepas foram adicionados com uma
 388 taxa de inoculação próxima de 10^8 UFC/kg de material ensilado. Para as cepas que tiveram
 389 contagem de 10^8 UFC/ml, foi utilizado 30 ml do inoculante preparado (Tabela 2). Enquanto que
 390 as cepas que tiveram contagem de 10^9 UFC/ml, se utilizou 5 ml de inoculante. O tratamento
 391 controle foi misturado com um volume de água igual ao dos inoculantes aplicados, porém sem
 392 a presença do inóculo.

393

394 Tabela 2 - Contagem do inoculante (log UFC/ml) e volume aplicado no momento
 395 da ensilagem (ml)

Isolado	Contagem pré-ensilagem (log UFC/ml)	Volume de inoculante (ml)	Taxa inoculada (log UFC/kg)
7	9,4	5	9,4
26	8,8	30	9,7
52	8,5	30	9,6
75	9,5	5	9,5
77	9,4	5	9,4
79	9,4	5	9,4
82	8,9	30	9,8
84	9,0	5	8,9
104	8,1	30	9,3
106	9,0	5	8,6
108	8,7	30	9,7
110	9,4	5	9,2
114	8,4	30	9,5
116	8,7	30	9,4
126	8,5	30	9,5
180	8,3	30	9,0
185	8,9	30	9,5
189	9,1	5	8,9
190	8,6	30	9,4
210	9,2	5	9,4
221	8,8	30	9,4

396

397 Como mini silos experimentais foram utilizados baldes plásticos com capacidade de 5
 398 litros. O milho reidratado (5,03 kg) foi compactado manualmente até atingir a uma densidade
 399 média aproximada de 1005 kg.m^{-3} ($\pm 9,5$). Cada tratamento consistiu de 3 repetições,

400 totalizando 66 unidades experimentais. Após a compactação os mini silos foram vedados com
401 tampa de rosca e pesados. No dia seguinte, as tampas foram vedadas com cola de silicone por
402 toda da rosca para impedir a entrada de ar. A ensilagem da primeira repetição foi realizada dia
403 19/11/2021 na parte da tarde. As repetições 2 e 3 foram ensiladas no dia 30/11/2021 na parte
404 da manhã e da tarde, respectivamente. Para não haver efeito dos dias da ensilagem, cada
405 repetição representou um bloco.

406 Após 60 dias de ensilagem, os silos foram novamente pesados e abertos. A camada
407 superficial de 5 cm de cada unidade experimental foi completamente removida e descartada, a
408 silagem remanescente foi homogeneizada para posterior coleta de amostras.

409

410 **5.3. Análises químicas**

411

412 O milho moído e reidratado antes da ensilagem e as silagens obtidas foram pré-secos
413 em estufa com circulação de ar forçado a 55 °C por 72 horas para determinação da concentração
414 de MS. Após secagem foram pesadas e moídas em moinho de facas tipo Willey, com peneira
415 de 1 mm. As amostras secas e moídas foram levadas a estufa 105 °C por 16 horas para
416 quantificação de MS a 105 °C. A amostra moída foi analisada para nitrogênio total (PB =
417 nitrogênio total x 6,25) pelo método de Kjeldhal, de acordo com a AOAC (1990). O teor de
418 amido foi quantificado pelo método de Hall (2009) com modificações. Resumidamente, o
419 volume de tampão acetato foi modificado para 10 ml e o fator de diluição utilizado foi 2 para
420 manter a proporção de tampão e água. As perdas de MS por fermentação foram calculadas pela
421 diferença entre o peso do milho reidratado colocado em cada silo no momento da ensilagem e
422 o peso da silagem no final da conservação, corrigido para o teor de MS do milho reidratado e
423 sua respectiva silagem (JOBIM et al, 2007). As perdas de amido foram calculadas considerando
424 a diferença do amido ensilado, com base na MS, e o teor de amido presente nas silagens
425 (FERNANDES et al., 2022).

426 Para a obtenção do extrato aquoso, uma amostra de 25 g de silagem foi misturada em
427 225 mL de água destilada, os frascos foram homogeneizados por 20 minutos a 120 rpm em
428 agitador orbital (Shaker). O pH de cada amostra foi então determinado por meio de um medidor
429 de pH (Potenciômetro DIGIMED® DM 20, Digirom Instrumentos, SP, Brasil).
430 Posteriormente, 1 ml do extrato aquoso foi congelado para análise de nitrogênio amoniacal pelo
431 método de Chaney e Marbach (1962).

432 Para a análise dos produtos da fermentação, 2 mL do extrato aquoso foi acidificado com
433 10 µL de ácido sulfúrico 50% (v/v) e congelado para posterior análise cromatográfica (HPLC)

434 dos ácidos succínico, láctico, acético, propiônico e butírico e dos álcoois: etanol e 1,2-
435 propanodiol de acordo com Santos et al. (2014). Foi utilizado um cromatógrafo da Shimadzu,
436 modelo LC-10Ai (Shimadzu Corporation - Tokio, Japão) equipado com um sistema de detecção
437 duplo, composto por um detector de radiação ultravioleta (UV) (UV - Vis/SPD - 10Ai) e um
438 detector de índice de refração (RID 10A). Na separação cromatográfica dos ácidos, foi utilizada
439 uma coluna de exclusão de íons (Shim-pack SCR-101H, 7.9 mm×30 cm) operada à 50 °C. A
440 fase móvel foi constituída de uma solução de ácido perclórico com pH 2,1 e foi utilizado um
441 fluxo de 0,6 mL min⁻¹. A detecção dos álcoois foi feita por índice de refração e a detecção dos
442 ácidos orgânicos por radiação UV com comprimento de onda de 210 nm.

443

444 **5.4. Análises microbiológicas**

445

446 Um segundo extrato aquoso foi preparado por meio da adição de 25 g dos grãos antes
447 da ensilagem e a silagem em 225 ml de água peptonada (0,1%) estéril. Esse extrato foi
448 homogeneizado durante 20 minutos a 120 rpm em agitador orbital (Shaker). Para a contagem
449 dos microrganismos, o extrato foi submetido a diluições decimais seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁶, e
450 posteriormente, alíquotas de 0,1 ml de cada diluição foram espalhadas em superfície e em
451 duplicata nos meios de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalski. A contagem de BAL foi
452 feita em meio MRS (Man Rogosa and Sharpe – Titan Media® - Nova Deli, Índia), a contagem
453 de leveduras e fungos filamentosos foi feita em meio DRBC (Dicloran Rosa de Bengala
454 Cloranfenicol - HIMEDIA® - Maharashtra, Índia), sendo a diferenciação entre fungos
455 filamentosos e leveduras feita com base na morfologia das colônias. A contagem de esporos de
456 bactérias aeróbias foi feita em Ágar nutriente (KASVI® - São José do Pinhais, Brasil), sendo
457 as amostras previamente pasteurizados a 80 °C por 10 minutos para causar a morte das células
458 vegetativas e manter apenas os endósporos. A contagem de enterobactérias foi feita em meio
459 EMB Levine Agar (KASVI® - São José do Pinhais, Brasil). As BAL foram incubadas a 32 °C
460 por 48 horas, as leveduras incubadas a 28 °C por 48 horas, os fungos filamentosos foram
461 incubados a 28 °C por 120 horas, e as enterobactérias foram incubadas a 37 °C por 24 h.

462

463 **5.5. Avaliação da estabilidade aeróbia**

464

465 A estabilidade aeróbia foi avaliada a partir de amostras de 3 kg de silagem, que foram
466 colocadas em sacos plásticos pretos, sem que as mesmas fossem compactadas. Para evitar
467 contaminação, uma camada de gaze foi colocada sobre a silagem e os sacos foram mantidos em

468 sala fechada por 5 dias sem controle de temperatura. Sensores data-logger foram inseridos no
469 centro da massa para o registro de temperatura a cada 15 minutos. A temperatura ambiente
470 também foi registrada. A perda de estabilidade aeróbia foi considerada quando a temperatura
471 da silagem ultrapassa em 2 °C a temperatura do ambiente (MORAN et al., 1996).

472

473 **5.6. Análise estatística**

474

475 O experimento foi conduzido DBC com 22 tratamentos, 21 cepas e 1 controle (sem
476 inoculantes), com três repetições divididas em 3 blocos, totalizando 66 unidades experimentais.
477 Os dados foram submetidos à análise de variância através do pacote computacional SISVAR®
478 (Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados) (FERREIRA, 2008). O modelo
479 utilizado foi $Y_j = \mu + P_j + b_j + e_j$, onde, μ é a média geral; P_j é o efeito dos tratamentos (não
480 inoculado e cepas); b_j é o efeito dos blocos; e_j é o erro experimental. As médias foram
481 comparadas usando o teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade no caso de
482 significância no teste F.

483

484 **6. RESULTADOS**

485 **6.1. Características químicas**

486

487 O milho antes da reidratação apresentou matéria seca de 80,9%, após a reidratação, a
488 MS seca do milho foi de 62,4 % (Tabela 3). O teor de amido foi 72,79% da MS. A população
489 de BAL, Bactérias aeróbias esporulantes (BAE), leveduras e fungos filamentosos foram de
490 3,92; 2,93; 3,38 e 3,25 log UFC/g de matéria fresca respectivamente. Não foi detectado o
491 crescimento de enterobactérias no meio EMB.

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

Tabela 3 - Caracterização do milho utilizado para ensilagem

Itens	
Matéria seca milho (MS; %)	80,9
MS pós-reidratação (%)	62,4
Amido (% MS)	72,79
Contagem de microrganismos (log UFC/g)	
BAL	3,92
BAE	2,93
Leveduras	3,38
Fungos filamentosos	3,25
Enterobactérias	nd

502

503

504

MS = Matéria seca; BAL = Bactérias do ácido lático; BAE = Bactérias aeróbias esporulantes.

505

506

Houve efeito das cepas para o teor de MS ($p < 0,001$), Amido ($p < 0,01$), Proteína ($p < 0,001$) e Nitrogênio amoniacal (N-NH₃; $p < 0,001$) (Tabela 6.2).

507

508

509

510

511

512

513

514

515

Os menores teores de MS das silagens foram para as silagens não tratadas (CON) ou tratadas com os isolados 26, 82, 84, 106, 108 e 126, sendo que estes pertencentes ao grupo “b” (Fig. 1a; $p < 0,05$). Os maiores valores de MS foram para as silagens do grupo “a” tratadas com as cepas 7, 52, 75, 77, 79, 104, 110, 114, 116, 180, 185, 189, 190, 210 e 221 ($p < 0,05$). Em relação ao teor amido da silagem os menores valores foram obtidos do grupo “b” representado pelas cepas 75, 82, 104, 106, 114, 126, 180, 185, 210 e 221 (Fig. 1b; $p < 0,05$), com 62,12% da MS em média. A silagem controle ou tratadas com as cepas 7, 26, 52, 77, 79, 84, 104, 108, 110, 116, 189 e 190 perteceram ao grupo com valores maiores de amido ($p < 0,05$), com média do grupo de 66,72% da MS.

516

517

518

519

520

521

522

523

A silagem controle (12,98% da MS) ou tratadas com as cepas 7 (13,08% da MS), 52 (12,69% da MS), 75 (13,41% da MS), 77 (13,45% da MS), 84 (13,44 % da MS), 104 (12,64 % da MS) e 114 (12,57 % da MS), foram agrupadas em “a”, com maiores teores de proteína bruta (PB) (Fig. 1c; $p < 0,05$). As demais cepas (26, 79, 82, 106, 108, 110, 116, 126, 180, 185, 189, 190, 210, 221) tiveram menores teores de PB ($p < 0,05$). Os tratamentos controle, 221 (0,1 % da MS), 110, 189, 210, 185, 116, 7 (0,103 % da MS), 82 e 75 (0,107 % da MS) foram alocados no grupo “a” de maior N-NH₃ comparados ao grupo “b”, que obteve menor valor (Fig. 1d; $p < 0,05$).

524

525

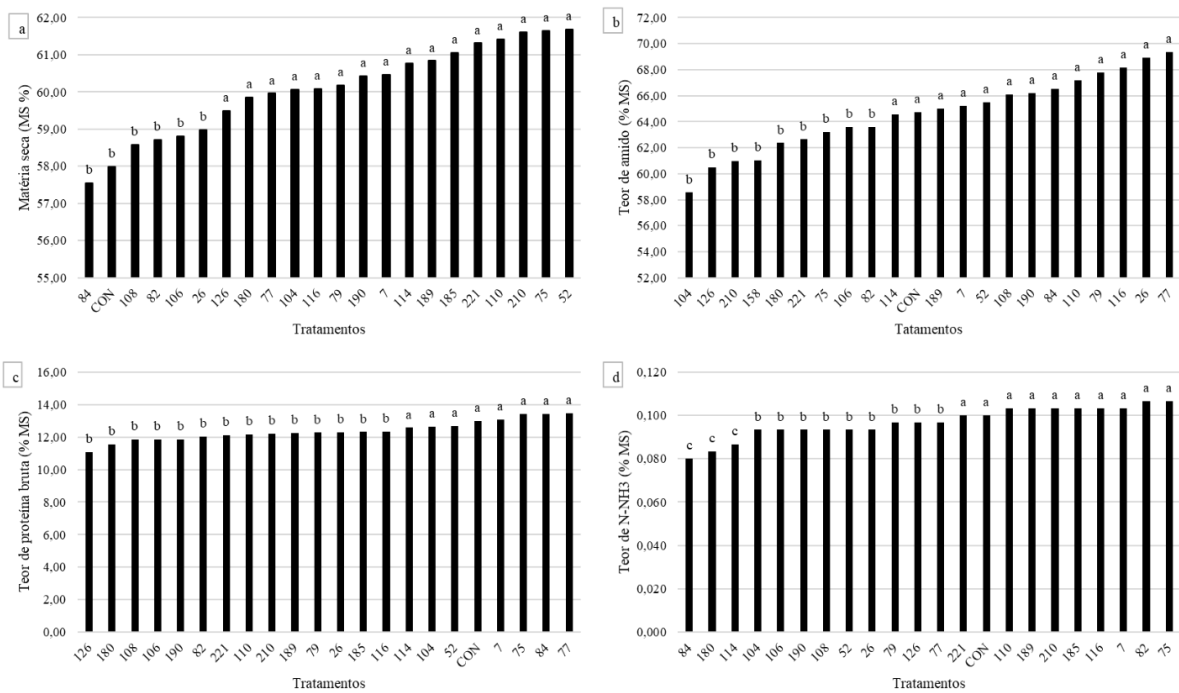
526

As diferentes cepas influenciaram nas perdas de MS ($p < 0,001$) e nas perdas de amido (Fig. 2; $p < 0,001$). As menores perdas de MS (%) foram para silagens inoculadas com os isolados 221 (2,04 %) e 116 (1,86 %), pertencentes ao grupo “f” ($p < 0,05$). Enquanto que as

527 maiores perdas foram para o grupo a que incluiu as silagens não tratadas (8,68 %) e as
 528 inoculadas com as cepas 52 (8,63 %), 79 (8,88%) e 75 (9,32 %).

529 O grupo de cepas que apresentou as menores perdas de amido (grupo d) foram as
 530 inoculadas com as cepas 77 (6,75% do total ensilado), 190 (7,26 % do total ensilado), 110
 531 (8,47% do total ensilado), 79 (9,22% do total ensilado) e 52 (9,42% do total ensilado) (Fig. 3;
 532 $p < 0,05$). Enquanto que as maiores perdas de amido ocorreram no grupo “a”, que incluíam as
 533 silagens controle e inoculadas com 106, 75, 185, 7, 82, 104, 180 e 126, com média de grupo
 534 de 19,53% do total ensilado.

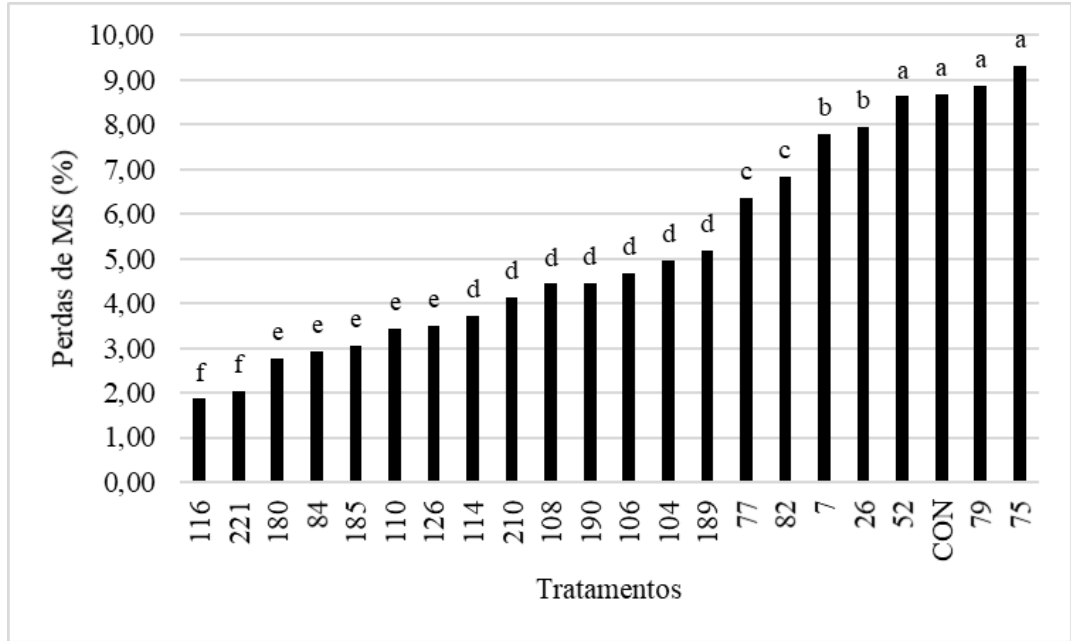
535



536

537 Figura 1 - a) Matéria seca ($p < 0,001$); b) Teor de amido ($p < 0,01$); c) Teor de proteína ($p <$
 538 $0,001$); e d) Teor de N-NH₃ ($p < 0,001$) de silagem de grão de milho moído e reidratado (GMR)
 539 inoculada com diferentes cepas ou não aos 60 dias de ensilagem.

540



541

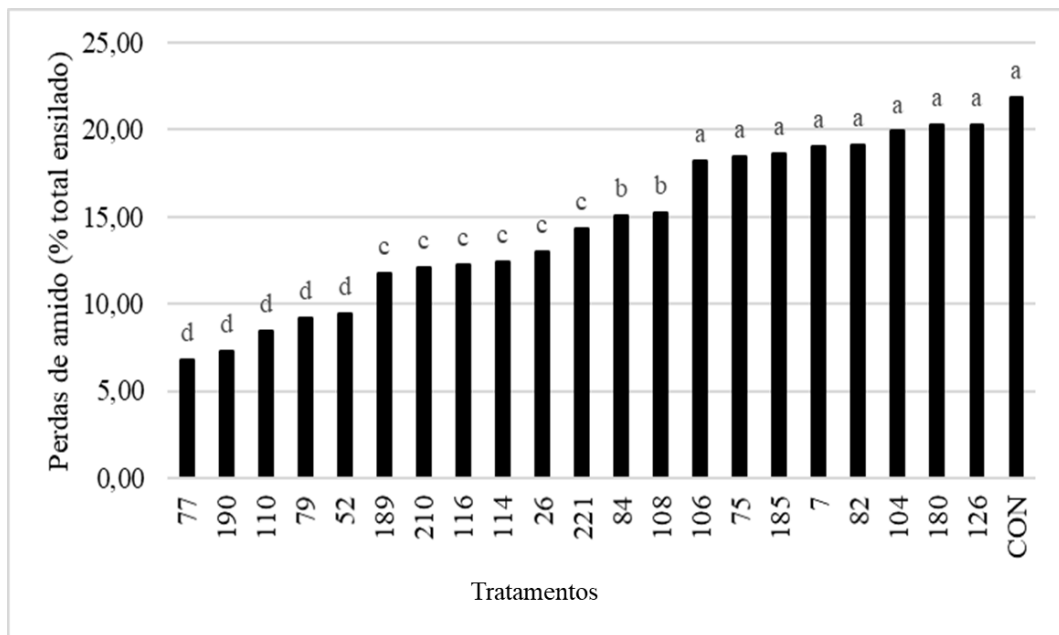
542

543

544

Figura 2 - Perdas de matéria seca (MS) da silagem de grão de milho moído e reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas ou não e armazenada por 60 dias ($p < 0,001$).

545



546

547

548

549

Figura 3 - Perdas de amido (% do total ensilado) da silagem de grão de milho moído e reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas ou não e armazenada por 60 dias ($p < 0,001$).

550

551

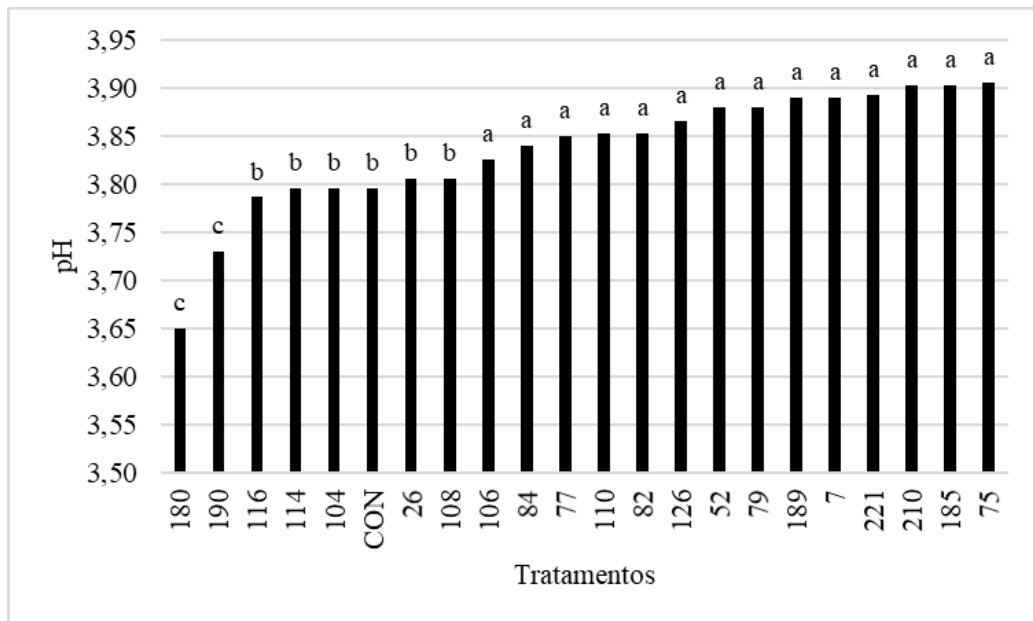
552

553

554

Os valores de pH foram influenciados pelas cepas ($p < 0,001$). Os menores valores de pH foram registrados para as silagens do grupo “c”, que incluíram os isolados 180 (3,65) e 190 (3,73) (Figura 4; $p < 0,05$). O grupo “b” (isolados 116, 114, 104, 26, 108 e a silagem controle) seguiram o grupo “c”, com a segunda menor média de pH das silagens.

555



556

557

558

Figura 4 - pH da silagem de grão de milho moídos e reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas ou não e armazenada por 60 dias ($p < 0,001$).

559

560

561

6.1. Produtos da fermentação

562

Houve efeito significativo de tratamentos sobre as concentrações dos ácidos succínico

($p < 0,001$), láctico ($p < 0,001$), acético ($p < 0,001$), propiônico ($p < 0,001$), butírico ($p < 0,001$),

564

e também sobre etanol ($p < 0,001$) e 1,2 propanodiol ($p < 0,001$) (Tabela 6.3).

565

O grupo “a” (cepas 180, 190 e o tratamento controle) apresentaram maior média de

566

ácido láctico (Fig. 5a; $p < 0,05$), com o valor de 4,72 %. A menor concentração foi observado

567

para a cepa 221, incluída no grupo “d”, com o valor de 2,85% da MS.

568

As maiores concentrações de ácido succínico (Fig. 6a; $p < 0,05$) foram observadas para

569

as silagens de GMR inoculadas com a cepa 84 (0,84 % da MS; grupo a), seguida do grupo “b”

570

que incluiu as cepas 190, 114, 26 e 221 ($p < 0,05$), que tiveram valor médio de 0,23 % da MS.

571

As menores concentrações desse composto ($p < 0,05$) foram para as cepas do grupo “h”,

572

composto pelas cepas 210 (0,07% da MS), 52 (0,08 % da MS) e 185 (0,08 % da MS).

573

O teor ácido acético foi maior (Fig. 5a; $p < 0,05$) na silagem do grupo “a”, tratada com

574

a cepa 106. No grupo “b” ficou a silagem tratada com a cepa 82 (0,26 % da MS). Já a menor

575

média ($p < 0,05$) foi observado nas cepas do grupo “f”, 180 (0,08 % da MS), 190 (0,09 % da

576

MS) e 84 (0,09 % da MS).

577

578

A inoculação com as cepas 52 (1,72 % da MS), 189 (1,78 % da MS) e 185 (1,84 % da MS) aumentaram ($p < 0,05$) a média da concentração de ácido propiônico nas silagens (Fig.

579 5c). Enquanto que o grupo com a cepa 84 (0,86 % da MS) e 221 (0,89 % da MS) obtiveram as
580 menores concentrações do composto ($p < 0,05$).

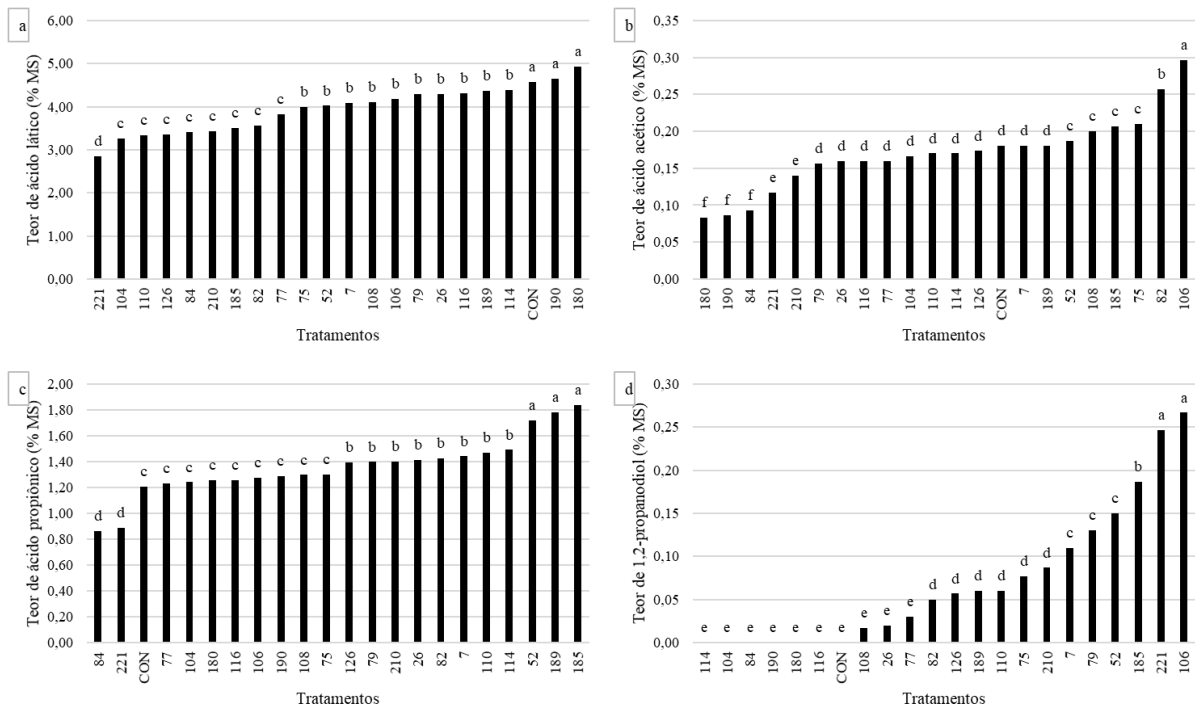
581 Os menores valores de ácido butírico (Fig. 6b; $p < 0,05$) foram observados no grupo “f”,
582 que incluiu os tratamentos 180 (0,09 % da MS), 221 (0,09 % da MS) e 190 (0,10 % da MS). A
583 concentração de ácido butírico foi maior ($p < 0,05$) para o grupo a das silagens inoculadas com
584 as cepas 114 (0,27 % da MS) e 126 (0,21 % da MS), seguidas do grupo “b” das cepas 52 (0,24
585 % da MS) e 7 (0,24 % da MS).

586 O etanol foi maior (Fig. 6c; $p < 0,05$) na silagens de GMR do grupo “a”, tratada com a
587 cepa 84 (1,04 % da MS). Em seguida, o grupo “b” com a cepa 75 (0,19% da MS) e o tratamento
588 controle (0,20% da MS), tiveram a segunda maior média ($p < 0,05$). Não foi detectado etanol
589 para as cepas 110, 116, 82, 180, 221, 104 e 26.

590 O 1,2-propanodiol não foi detectado nas cepas 114, 104, 84, 190, 180, 116 e no
591 tratamento controle (Fig. 6d). As maiores concentrações desse composto ($p < 0,05$) estavam
592 presentes no grupo “a” das silagens 221 e 106 nos valores de 0,25% da MS e 0,27% da MS
593 respectivamente.

594

595



596

597

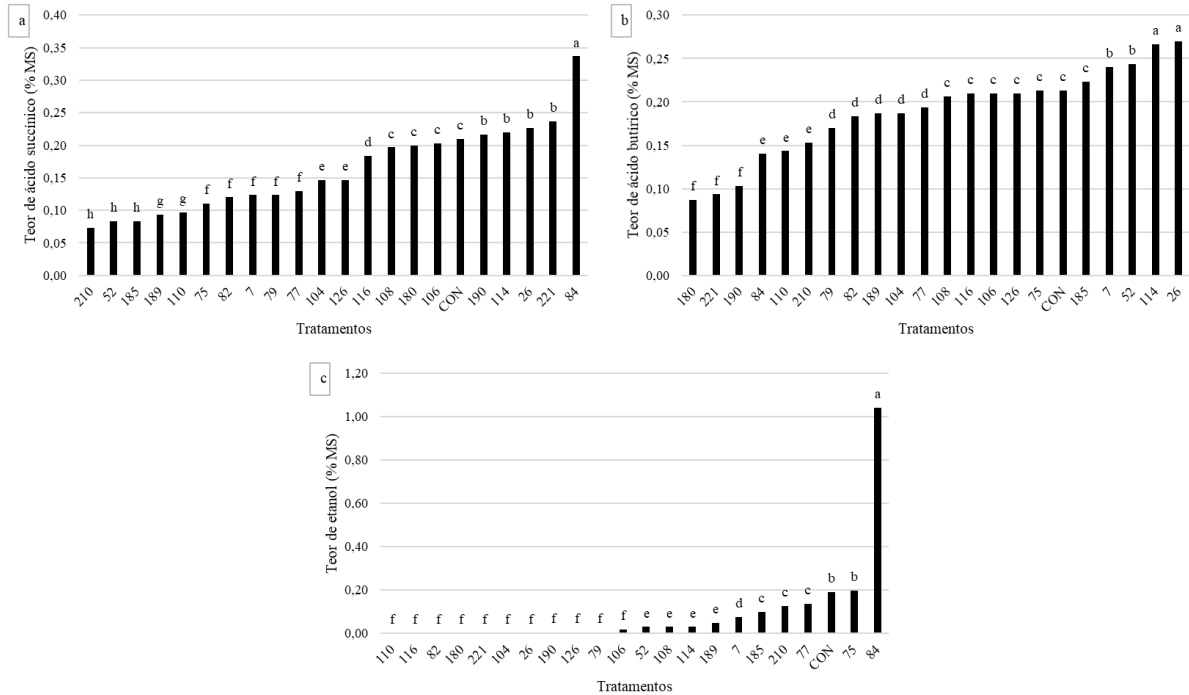
598

599

600

Figura 5 - a) Teor de ácido láctico ($p < 0,001$); b) Teor de ácido acético ($p < 0,001$); c) Teor de ácido propiônico ($p < 0,001$); e d) Teor de 1,2-propanodiol ($p < 0,001$) em porcentagem da MS de silagem de grão de milho moído e reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas ou não aos 60 dias de ensilagem.

601



602

603

604

605

Figura 6 - a) Teor de ácido succínico ($p < 0,001$); b) Teor de ácido butírico ($p < 0,001$); c) Teor de etanol ($p < 0,001$) em porcentagem da MS de silagem de grão de milho moído e reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas ou não aos 60 dias de ensilagem.

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

6.2. Características microbiológicas

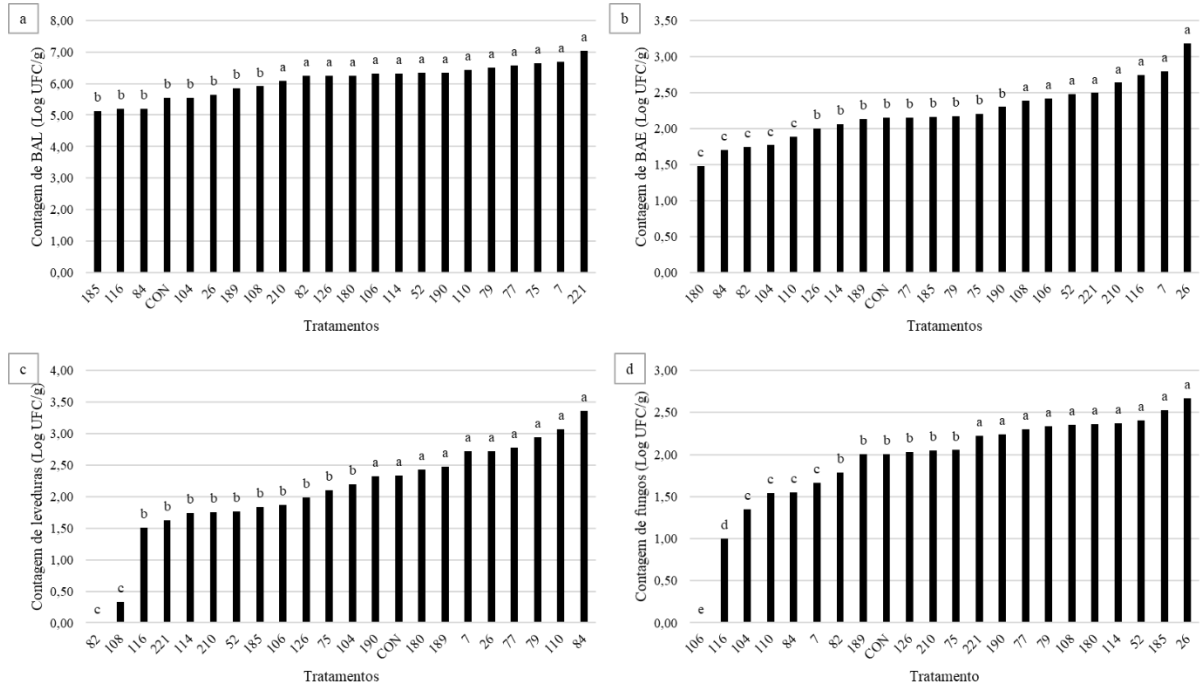
Houve efeito dos tratamentos sobre a população de BAL ($p < 0,001$), BAE ($p < 0,001$), leveduras ($p < 0,001$) e fungos filamentosos ($p < 0,001$) (Fig. 7).

As menores contagens de BAL (Fig. 7a; $p < 0,05$) foram para as silagens agrupadas em “b”, que incluiu a controle ou tratadas com as cepas 26, 84, 104, 108, 116, 185 e 189, com um valor médio de log 5,50 UFC/g de silagem. As cepas 7, 52, 75, 77, 79, 82, 106, 110, 114, 126, 180, 190, 210 e 221 foram agrupadas em “a”, em que a média de contagem de BAL foi maior ($p < 0,05$).

Para as bactérias aeróbias formadoras de esporos (BAE), as maiores contagens (Fig. 7b; $p < 0,05$) foram para o grupo “a”, que incluiu os tratamentos 7, 26, 52, 106, 108, 116, 210 e 221, com um valor médio de 2,64 log UFC/g de silagem. As cepas 82 (1,74 log UFC/g de silagem), 84 (1,70 log UFC/g de silagem), 104 (1,77 log UFC/g de silagem), 110 (1,88 log UFC/g de silagem) e 180 (1,48 log UFC/g de silagem) tiveram as menores contagens de BAE ($p < 0,05$).

O grupo “c” (cepas 82 e 108) reduziram a contagem de leveduras (Fig. 7c; $p < 0,05$), obtendo valores médios $< 2,00$ log UFC/g de silagem. A menor contagem de fungos filamentosos (Fig 7d; $p < 0,05$) foi para o grupo “e” (silagem inoculadas com a cepa 106) onde

625 não houve detecção de crescimento desse microrganismo. A segunda menor contagem foi para
 626 a cepa 116 (grupo “d”; 1 log UFC/g de silagem). Não foi observado crescimento de
 627 enterobactérias para nenhum tratamento ao utilizar o meio EMB para o cultivo.
 628



629
 630 Figura 7 - a) Contagem de BAL ($p < 0,001$); b) Contagem de BAE ($p < 0,001$); c) Contagem
 631 de leveduras ($p < 0,001$); d) Contagem de fungos ($p < 0,001$) em log UFC/g de silagem para
 632 grão de milho moído e reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas ou não aos 60 dias
 633 de ensilagem.

634

635 **6.3. Estabilidade aeróbia**

636

637 As diferentes cepas foram capazes de promover diferenças significativas ($p < 0,001$) na
 638 estabilidade aeróbia da silagem (Figura 8).

639

640 As cepas que obtiveram maior número de horas até a quebra de sua estabilidade foram
 641 agrupadas em “a” e incluíram 126 (89,1 h) e 185 (95,5 h; $p < 0,05$). Em seguida, as cepas
 642 (77,5 h), 26 (76,5 h) e 114 (71,8 h) obtiveram o maior número de horas no grupo “b”. As cepas
 643 189, 84, 190, 104, 116, 110, 180, 106, 221, 82 e 210 obtiveram o menor número de horas ($p <$
 644 0,05) até a quebra da estabilidade, sendo que a média de horas para o grupo “d” foi de 27 horas.

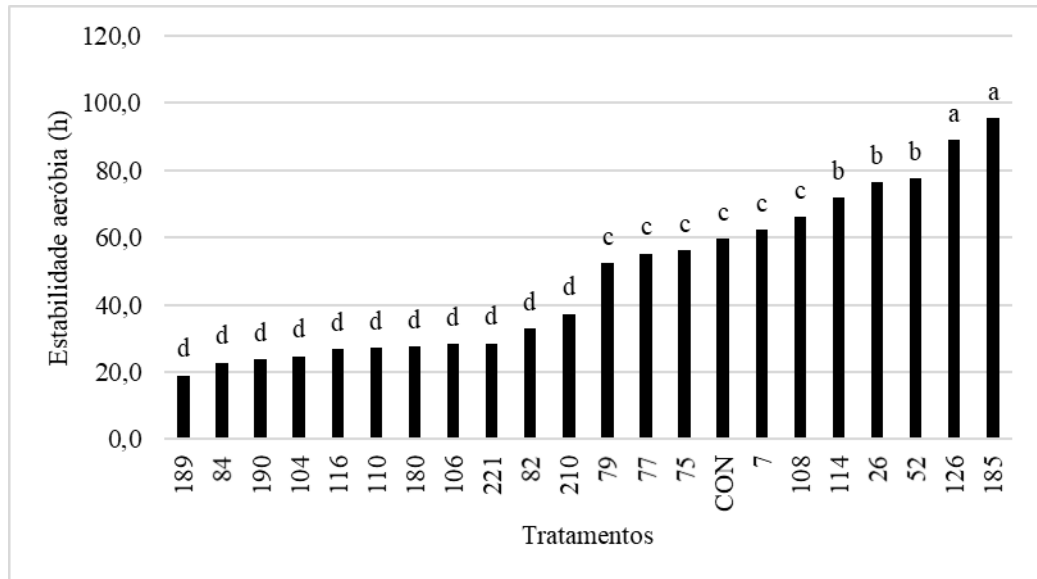


Figura 8 - Estabilidade aeróbia da silagem de grão de milho moído e reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas ou não e armazenada por 60 dias ($p < 0,001$).

7. DISCUSSÃO

Após a hidratação, o milho apresentou teor de MS de 62,4%, e o teor de MS das silagens após a fermentação variou de 57,55% a 61,68%, o que normalmente é utilizado neste tipo de silagens (MOMBACH et al., 2019; REZENDE et al, 2014). A fermentação das silagens é afetada pelo fator umidade (GOMES et al., 2020). Mombach et al. (2019) relatou um padrão de fermentação melhorado através do baixo pH associado a uma maior produção de ácido lático quando o teor de umidade em silagens de GMR foi de 30 a 40%, faixa em que as silagens do presente estudo se encontram.

Algumas das cepas proporcionaram silagens com maior teor de MS do que a silagem controle. Esse fato pode estar relacionado à melhoria do padrão fermentativo evitando a formação de água de fermentação. Alguns microrganismos presentes na silagem podem gerar água como produto de sua atividade e consequentemente reduzir o teor de MS. McDonald et al. (1991) relatou que as vias comuns de perdas de MS são: produção de efluentes e a perda por água resultante de reações metabólicas. *Acetobacter* são um exemplo de bactérias do ácido acético pertencentes à família *Acetobacteraceae* que são capazes de oxidar acetato e lactato em CO_2 e água (PAHLOW et al, 2003) gerando perda a perda de MS. A produção de etanol pelas leveduras também é acompanhada pela perda acentuada de MS na forma de CO_2 e H_2O (MCDONALD et al., 1991).

669 As silagens apresentaram pH dentro da faixa considerada adequada (3,8 a 4,2) para
670 inibir a maior parte dos microrganismos deterioradores (MUCK, 2010; PAHLOW et al., 2003;
671 ÁVILA; CARVALHO, 2020). Souza et al. (2020) observou interação entre os fatores
672 inoculante e tempo reduzir o pH, onde a inoculação promoveu maior queda no início e
673 manutenção dos menores valores ao longo da conservação, atingindo valores de 4,34 e 4,01
674 para os tratamentos sem inoculação e com *L. plantarum* mais *Propionibacterium*
675 *acidipropionici*, respectivamente, aos 64 dias de armazenamento. No presente estudo, as
676 silagens atingiram um valor máximo de pH de 3,90 aos 60 dias.

677 O valor de pH da silagem controle, atingiu um valor de 3,8 após os 60 dias de ensilagem.
678 Em silagens não inoculadas, Carvalho et al (2016) observou um pH em torno de 4,5 aos 60 dias
679 de ensilagem. Junges et al. (2017), por outro lado, obteve pH de 3,74 para as silagens controle
680 aos 90 dias de ensilagem. Fernandes et al. (2022) obteve valores de pH de 3,92 para silagem de
681 GMR. Algumas das cepas utilizadas foram capazes de promover diferenças ($p < 0,05$) nos
682 valores de pH em relação a silagem controle, sendo o grupo com as cepas 180 e 190, as mais
683 eficientes no processo de acidificação do meio. A fase fermentativa está associada
684 principalmente ao desenvolvimento de uma população de BAL dominante em silagens
685 fermentadas com sucesso. Essa mudança está principalmente relacionada com a produção de
686 ácido lático e declínio do pH (PAHLOW et al, 2003). O Ácido lático, que é maior responsável
687 para a queda do pH, também foi maior para essas cepas, no entanto, a silagem controle
688 pertenceu ao mesmo grupo das silagens inoculadas com as cepas 180 e 190. Quando se associa
689 a contagem de BAL dessas silagens, as cepas 180 e 190 pertenciam ao grupo com maior
690 contagem desses microrganismos, enquanto o tratamento controle pertenceu ao grupo com
691 segunda maior contagem.

692 Das cepas testadas, 14 estavam no grupo de pH superior ao grupo da silagem controle
693 ($p < 0,05$). Os ácidos propiônico e acético são ácidos fracos e assim menos eficiente em reduzir
694 o pH, mas que apresentam potencial antifúngico (ÁVILA; CARVALHO, 2020). Dentre as
695 cepas de maior pH, estão a 106 que mostrou maior teor de ácido acético. A cepa 82 teve o
696 segundo maior teor de ácido acético, e foi seguido pelas cepas 75, 185, 108 e 52, com o grupo
697 de terceiro maior valor desse ácido. O grupo de cepas 52, 185 e 189 mostraram a maior
698 concentração de ácido propiônico e estão entre as cepas cujo pH foi maior que o controle. O
699 comportamento de redução de pH e produção de ácidos das cepas 106 e 108 é explicado pelo
700 metabolismo heterofermentativo, visto que essas cepas apresentaram resultado positivo para a
701 produção de gás.

702 As perdas de MS foram muito variáveis (de 1,86 a 9,32%). No entanto, essa faixa foi
703 consistente com dados encontrados na literatura. O trabalho de Carvalho et al. (2016) observou
704 aos 60 dias de ensilagem perdas de 5,2% da MS e o máximo de perdas aos 280 dias de ensilagem
705 com 7,6% de MS. Fernandes et al. (2022), observou perdas de 6,8% de MS para suas silagens,
706 enquanto que Gomes et al. (2020) observaram perdas de por volta de 2 a 4,5% da MS aos 60
707 dias de ensilagem. Perdas de MS estão associadas ao metabolismo dos microrganismos que
708 atuam no processo e derivam principalmente das perdas de CO₂ (SALMINEN; WRIGHT;
709 OUWEHEAD, 2004). O tipo de inoculante utilizado interfere em função de como ele pode
710 inibir microrganismos, cujo metabolismo gera perdas, ou pelo seu próprio metabolismo. O
711 grupo de inoculantes responsáveis pelas maiores perdas de MS foram 52, 79, 75 e o tratamento
712 controle, e também estão relacionados ao grupo de maiores valores de pH, exceto o tratamento
713 controle que pertenceu a um grupo de pH intermediário entre as silagens. Além disso, a cepa
714 52 foi associada a maior contagem de fungos filamentosos e BAE e a cepa 79 a fungos
715 filamentosos e leveduras, o que podem ter causado essas perdas. A silagem controle estava no
716 grupo de maior contagem de leveduras e a segunda maior contagem para fungos filamentosos.
717 Enquanto que a cepa 75, esteve nos grupos de segundo maior teor de etanol, BAE, leveduras e
718 fungos.

719 As perdas podem também estar associadas ao metabolismo das BAL. As BAL são
720 frequentemente separadas pelos dois tipos básicos de fermentação de hexose em ácido lático. E
721 é importante salientar que ambos as vias podem ocorrer simultaneamente durante a produção
722 de silagem. O processo chamado de homofermentativo produz principalmente ácido lático, e o
723 outro heterofermentativo, são formados produtos adicionais como etanol ou acetato, além de
724 CO₂ (PAHLOW et al, 2003). As cepas 26, 104, 106, 108, 110, 114, 116, e 126 tiveram
725 resultados positivos para produção de gás, o que as caracteriza com metabolismo
726 heterofermentativo. Para as silagens estudadas, essas cepas não pertenceram ao grupo com
727 maior perda de MS.

728 As cepas 116 e 221 foram o grupo mais eficiente em reduzir a perda de MS, entretanto
729 suas características levam a crer que as perdas foram evitadas por mecanismos distintos. Em
730 relação ao pH das silagens inoculadas com essas cepas, a 116 pertenceu ao mesmo agrupamento
731 da silagem controle e a 221 pertenceu ao grupo de maior pH das silagens. A cepa 221 estava
732 no grupo com população de BAL maior que a cepa 116. Por outro lado, a cepa 116 teve
733 produção de gás positiva e a 221 não teve produção de gás, demonstrando diferenças entre seus
734 metabolismos. Quanto aos produtos do metabolismo, elas mostraram características distintas.

735 Os teores de amido encontrados para as silagens, apresentaram valores inferiores a 70%,
736 enquanto o milho antes da ensilagem apresentou 72,79% da MS de amido e das 21 cepas
737 avaliadas, 12 tiveram menor teor de amido das silagens em relação ao controle. Castro et al.
738 (2019) obteve valores de amido de 72,3 e 72,1 % da MS em silagens de milho reidratado moídos
739 a 3 e 9 mm respectivamente e com 35% de MS. Esses resultados vão de encontro com da Silva
740 et al. (2018), que relatou valores de 71,2 e 72% da MS de amido para milho moído finamente
741 e grosseiramente, respectivamente, presentes em silagens abertas aos 120 dias. Oliveira et al.
742 (2019) observou valores no teor de amido mais próximos aos encontrados: 65,7% para silagem
743 controle, 61,6 % para silagens tratadas com a enzima glucoamilase e 61,9% para silagens
744 tratadas com amilase.

745 Os maiores valores de perda de amido foram para o grupo que incluiu as silagens do
746 grupo controle, 106, 75, 185, 7, 82, 104, 180 e 126. Poucos estudos relacionam a ensilagem
747 com a perda de amido. Fernandes et al. (2022) relatou que as silagens de grãos de milho
748 reidratado avaliadas em seus estudos sofreram perda de 23% do total ensilado, um valor
749 próximo aos achados para as cepas citadas anteriormente. No entanto, os mecanismos
750 relacionados com essa maior perda de amido são incertos. BAL utilizam pentoses e/ou hexoses
751 em seu metabolismo (MUCK, 2010), sendo incapazes de fermentar açúcares complexos, como
752 é o caso do amido. Essa perda de amido pode estar relacionada a outros fatores que propiciaram
753 o aumento da glicose livre na silagem (FERNANDES et al, 2022). Esses açúcares livres podem
754 ter sido utilizadas por BAL.

755 O teor de proteína bruta teve um valor médio de 12,38% da MS. O teor de proteína bruta
756 encontrado por da Silva et al. (2018) foi de 9,09% da MS para milho moído finamente e 8,87%
757 da MS para milho moído grosseiramente. Rezende et al. (2014) e Silva et al. (2018) observaram
758 teores de PB semelhantes (em torno de 8 a 10% da MS) para silagem de GMR. Ambos os
759 achados ficaram abaixo dos valores observados no presente estudo. Silva et al. (2019) observou
760 em suas silagens que os valores de N-NH₃ aos 60 dias de ensilagem estavam próximos a 0,06%
761 da MS para silagens controle e inoculadas com LB. Silva et al. (2018) ao testar silagens
762 inoculadas e não inoculadas obteve valores de 0,1% da MS para silagens inoculadas com LB a
763 uma taxa de 1×10^5 UFC/g de silagem e para silagens inoculadas com *L. plantarum* mais *P.*
764 *acidilactici* a uma taxa de 1×10^6 UFC/g de silagem. Sendo esses valores mais próximos aos
765 encontrados nas silagens.

766 Os maiores valores de PB foram para o grupo do tratamento controle, 7, 52, 75, 77, 84,
767 104 e 114, enquanto que as demais cepas pertenceram ao grupo de menor PB. O grupo do
768 tratamento controle e as cepas 7, 75, 82, 110, 116, 185, 189, 210 e 221 tiveram os maiores

769 valores de N-NH₃, enquanto que as menores concentrações desse composto foram para o grupo
770 das cepas 84, 114 e 180. Mudanças nas concentrações de N-NH₃ e PB solúvel refletem a
771 proteólise das proteínas do grão de milho (GOMES et al., 2020). A maior degradação da matriz
772 proteica do grão e sugere uma maior digestibilidade do amido da silagem de GMR (HOFFMAN
773 et al., 2011).

774 As cepas 114, 26, 52, 126 e 185 perteceram ao grupo capaz de aumentar a estabilidade
775 aeróbia das silagens em relação ao grupo do tratamento controle. Em relação controle, essas
776 cepas perteceram a agrupamentos de maior concentração de ácido propiônico e as cepas 52,
777 126 e 185 ainda estavam no grupo com maior teor de ácido acético. O que pode ter contribuído
778 para o aumento da estabilidade.

779 A silagem controle pertenceu ao grupo de menor contagem de BAL ($p < 0,05$), enquanto
780 que 14 cepas perteceram ao grupo de maior contagem. Junges et al. (2017) observou contagens
781 de 5,30 log UFC/g de silagem para BAL em silagens de GMR não inoculadas, indo de encontro
782 ao valor das silagens controle do presente estudo, que foi de 5,55 log UFC/g de silagem. Silva
783 et al (2018) também observaram que as silagens tratadas com LB tiveram maiores contagens
784 de BAL. Esse aumento está relacionado ao inoculante aplicado.

785 Antes da ensilagem, o milho apresentava populações de 3,25 log UFC/g de milho
786 reidratado de fungos filamentosos, 3,38 log UFC/g de milho reidratado de leveduras e de 2,93
787 log UFC/g de milho reidratado de BAE. Carvalho et al (2016) observou que populações de
788 leveduras e fungos antes da ensilagem eram de aproximadamente 4,00 log UFC/g de milho
789 reidratado e a população bactérias formadoras de esporos eram de 3,32 log UFC/g de milho
790 reidratado. Após 60 dias de ensilagem, as bactérias formadoras de esporos, leveduras e fungos
791 foram de: 3,52, 6,02 e $< 2,00$ log UFC/g de silagem, respectivamente. A contagem de leveduras
792 nas silagens de GMR foram menores que observado por Carvalho et al (2016), enquanto que
793 os fungos filamentosos e BAE ficaram próximos as contagens observadas.

794 O valor de ácido succínico atingiu o valor máximo de 0,34% da MS para a cepa 84. O
795 ácido succínico, acetoína e 2,3-butanodiol são sinais da presença de enterobactérias no meio
796 (MUCK, 2010). Esse ácido também está relacionado a presença de Bactérias do ácido
797 propiônico (BAP), que além da produção de ácido propiônico, podem produzir ácido acético e
798 succínico, e dióxido de carbono (ÁVILA; CARVALHO, 2020). Apesar desse achado, não foi
799 observado crescimento de enterobactérias nas silagens ao se utilizar o EMB como meio de
800 cultivo e um estudo não foi feito para avaliação do crescimento de BAP. Carvalho et al. (2016)
801 observou apenas um pequeno número de bactérias gram-negativas identificadas como
802 *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cowanii* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas dos grãos de

803 milho reidratados antes da ensilagem, no entanto, populações significativas não foram obtidas
804 após 5 dias de ensilagem.

805 O ácido propiônico ocorre em menor escala nas silagens, e é produzido em sua maioria
806 por BAP e BAL heterofermentativas. Este ácido tem potencial antifúngico, durante a fase inicial
807 e final da ensilagem, e pode ser eficaz em inibir a atividade de microrganismos indesejáveis
808 (MUCK, 2010). As cepas 185 e 52, cuja a produção de ácido propiônico pertenceu ao grupo
809 de maior teor, também apresentaram uma boa estabilidade aeróbia, sendo a cepa 185
810 pertencente ao grupo com maior número de horas (95 h). No entanto, outros fatores estão
811 envolvidos para que a estabilidade seja aumentada, visto que a cepa 189 que estava no grupo a
812 para o teor de ácido propiônico, esteve no grupo com menor valor de estabilidade.

813 As bactérias do ácido lático também são capazes de produzir ácido acético. As BAL
814 heterofermentativas produzem um mol de ácido lático, um mol de dióxido de carbono e um mol
815 de etanol ou ácido acético a partir de glicose (MUCK, 2010). O maior valor de ácido acético
816 foi observado nas silagens inoculadas com a cepa 106, nessas silagens não foi detectado o
817 crescimento de fungos. Isso pode ser explicado porque os ácidos lático e acético juntamente
818 com pH baixo são inibidores de vários microrganismos aeróbicos (MUCK, 2010).

819 A concentração de etanol permaneceu abaixo dos achados da literatura (SILVA et al.,
820 2018; SILVA et al, 2019). E em grande parte das cepas esses valores foram abaixo do limite de
821 detecção. Outro fator importante é a menor contagem de leveduras em relação aos dados de
822 literatura, visto que os principais produtos de fermentação de leveduras são etanol e CO₂
823 (PAHLOW et al, 2003). Os valores de ácido butírico foram menores que os achados na
824 literatura (CARVALHO et al., 2016; SILVA et al., 2018; SILVA et al, 2019). Na literatura é
825 relatado que silagens com pH suficientemente baixo para evitar fermentações secundárias com
826 produção de ácidos butíricos e outros ácidos graxos voláteis são definidos como
827 "anaerobicamente estáveis" (PAHLOW et al., 2003).

828 Foi detectado pouca concentração de 1,2-propanodiol e em muitas das cepas, ficou
829 abaixo do limite de detecção. As cepas que promoveram um aumento, foram o grupo da 106
830 (0,27% da MS) e 221 (0,25% da MS). As concentrações de 1,2-propanodiol são respostas
831 típicas à atividade de LB (SILVA et al., 2018). No entanto, esse valor foi muito abaixo do que
832 é esperado na literatura para silagens inoculadas com LB (SILVA et al., 2018; SILVA et al,
833 2019).

834 De um modo geral, as cepas apresentaram distinções para os diferentes itens de seleção.
835 Cepas que apresentaram boas características fermentativas, não tiveram relações com cepas
836 que apresentaram menores perdas de MS ou maior EA. Sendo assim, é necessário a escolha de

837 uma característica predominante para a seleção. A cepa 190 apresentou uma silagem com
838 características favoráveis a fermentação. Esta cepa esteve nos grupo com maior MS, pH mais
839 baixo, maior amido e menores perdas de amido, contagem alta de BAL, maior teor de ácido
840 lático e menor teor de ácido butírico e etanol. A cepa 52 pertenceu aos grupos com maior MS,
841 maior amido e menores perdas de amido, maior proteína bruta, menor concentração de ácido
842 succínico, maior concentração de ácido propiônico e maior contagem de BAL. Essa cepa
843 também pertenceu aos grupos de maior estabilidade aeróbia em relação à silagem controle.

844 A cepa 110 teve maior MS, maior amido e menores perdas de amido, maior N-NH₃,
845 menor teor de etanol, maior contagem de BAL e menor contagem de BAE. A cepa 221 teve
846 maior MS, maior N-NH₃, menores perdas de matéria seca, menos ácido butírico e etanol, maior
847 teor de 1,2-propanodiol e maior contagem de BAL. Por terem aumentado o N-NH₃ e terem
848 apresentado menores valores de PB, essas cepas podem ter promovido maior proteólise nas
849 silagens, o que pode afetar na degradabilidade ruminal do amido.

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860

861

862

863

864

865

866

867

868

869

8. CONCLUSÃO

As cepas isoladas das silagens de GMR tem potencial para serem utilizadas como inoculantes e melhorarem características químicas, fermentativas e a estabilidade aeróbia dessas silagens. No entanto, a escolha da utilização de uma cepa depende das características de maior importância no momento de confecção das silagens. As cepas utilizadas foram capazes de acidificar o meio de forma efetiva, principalmente as cepas 180 e 190, e algumas demonstraram inibir o crescimento de bactérias indesejáveis na silagem, como o caso das cepas 110 e 180. Também foram capazes de aumentar a estabilidade aeróbia e melhorar outros aspectos da fermentação, como a cepa 52. E a maior concentração de N-NH₃ para cepas 110 e 221 sugerem maior proteólise, que pode estar relacionado ao aumento da degradabilidade ruminal do amido. No entanto, mais testes ainda são necessários para se entender a fundo a questão da proteólise e se essas cepas podem atuar no aumento da degradabilidade ruminal do amido.

911 **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

912

913 AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists:**
914 Association of official analytical chemists, Washington, DC, 1990.

915

916 AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists:**
917 Association of official analytical chemists, Washington, DC, 1995.

918

919 ARCARI, M. A.; MARTINS, C. M. M. R.; TOMAZI, T.; GONCALVES, J. L.; SANTOS, M.
920 V. Effect of substituting dry corn with rehydrated ensiled corn on dairy cow milk yield and
921 nutrient digestibility. **Animal Feed Science and Technology**, 221 v., 167-173 p., 2016.

922

923 ÁVILA, C. L. S.; PINTO, J. C.; FIGUEIREDO, H. C. P.; SCHWAN, R. F. Effects of an
924 indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage.
925 **Grass and Forage Science**, 64 v., 4 n., 384-394 p., 2009.

926

927 ÁVILA, C. L. S.; CARVALHO, B. F.; PINTO, J. C.; DUARTE, W. F.; SCHWAN, R. F. The
928 use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage.
929 **Journal of Dairy Science**, 97 v., 2 n., 940-951 p., 2014.

930

931 ÁVILA, C. L. S.; CARVALHO, B. F. Silage fermentation—updates focusing on the
932 performance of micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, 128 v., 4 n., 966-984 p.,
933 2020.

934

935 BAKER, S.; HERMAN, T.. **Evaluating particle size**. Kansas State: University, 2002.

936

937 BASSO, F. C.; LARA, E. C.; ASSIS, F. B. D.; RABELO, C. H. S.; MORELLI, M.; Reis, R. A.
938 Características da fermentação e estabilidade aeróbia de silagens de milho inoculadas com
939 *Bacillus subtilis*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 13 v., 4 n., 1009-1019 p.,
940 2012.

941

942 BITENCOURT, L. L. **Substituição de milho moído por milho reidratado e ensilado ou**
943 **melaço de soja em vacas leiteiras**. 2012. 131 p. Tese (Doutorado em Nutrição e Produção de
944 ruminantes), Universidade Federal de Lavras, MG, Brazil, 2012.

945

946 BONALDI, D. S.; CARVALHO, B. F.; ÁVILA, C. L. D. S.; SILVA, C. F. Effects of *Bacillus*
947 *subtilis* and its metabolites on corn silage quality. **Letters in Applied Microbiology**, 2021.

948

949 BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology**
950 **of plants**: John wiley & sons, 2015.

951

952 BUENO, A. V. I.; JOBIM, C. C.; DANIEL, J. L. P.; GIERUS, M. Fermentation profile and
953 hygienic quality of rehydrated corn grains treated with condensed tannins from quebracho plant
954 extract. **Animal Feed Science and Technology**, 267 v., 114559 p., 2020.

955

956 CARVALHO-ESTRADA, P. D. A.; FERNANDES, J.; DA SILVA, É. B.; TIZIOTO, P.;
957 PAZIANI, S. D. F.; DUARTE, A. P.; COUTINHO, L. L.; VERDI, M. C. Q.; NUSSIO, L. G.
958 Effects of hybrid, kernel maturity, and storage period on the bacterial community in high-

- 959 moisture and rehydrated corn grain silages. **Systematic and Applied Microbiology**, 43 v., 5
960 n., 126-131 p., 2020.
- 961
- 962 CARVALHO, B. F.; ÁVILA, C. L. S.; BERNARDES, T. F.; PEREIRA, M. N.; SANTOS, C.;
963 SCHWAN, R. F. Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of
964 rehydrated corn kernel silage. **Journal of Applied Microbiology**, 122 v., 3 n., 589-600 p.,
965 2016.
- 966
- 967 CARVALHO, B. F.; SALES, G. F. C.; SCHWAN, R. F.; ÁVILA, C. L. S. Criteria for lactic
968 acid bacteria screening to enhance silage quality. **Journal of Applied Microbiology**, 130v., 2
969 n., 341-355 p., 2020.
- 970
- 971 CASTRO, L. P.; PEREIRA, M. N.; DIAS, J. D.; LAGE, D. V.; BARBOSA, E. F.; MELO, R.
972 P.; FERREIRA, K.; CARVALHO, J. T. R.; CARDOSO, F. F.; PEREIRA, R. A.. Lactation
973 performance of dairy cows fed rehydrated and ensiled corn grain differing in particle size and
974 proportion in the diet. **Journal of dairy science**, 102 v., 11 n., 9857-9869 p., 2019.
- 975
- 976 CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia.
977 **Clinical chemistry**, 8 v., 2 n., 130-132 p., 1962.
- 978
- 979 CORREA, C. E. S.; SHAVER, R. D.; PEREIRA, M. N.; LAUER, J. G.; KOHN, K.
980 Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of**
981 **Dairy Science**, 85 v., 11 n., 3008-3012 p., 2002.
- 982
- 983 DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric
984 method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 28 v., 3 n.,
985 350-356 p., 1956.
- 986
- 987 DUFFNER, F.; O'CONNELL, M. Comparative evaluation of plasmid profiling and ribotyping
988 in the analysis of *Lactobacillus plantarum* strain heterogeneity in silage. **Journal of Applied**
989 **Bacteriology**, 78 v., 1 n., 20-27 p., 1995.
- 990
- 991 FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Produção de milho. **Guaíba: Agropecuária**, 18 v.,
992 360 p., 2000.
- 993
- 994 FERNANDES, J. **Influência de genótipo, maturidade e tempo de armazenamento na**
995 **qualidade de silagens de grãos de milho com alta umidade**. 2014. 98 p. Tese (Mestrado em
996 Ciência Animal e Pastagens) - Universidade de São Paulo, 2014.
- 997
- 998 FERNANDES, T.; SILVA, K. T.; CARVALHO, B. F.; SCHWAN, R. F.; PEREIRA, R. A. N.;
999 PEREIRA, M. N.; ÁVILA, C. L. S.. Effect of amylases and storage length on losses, nutritional
1000 value, fermentation, and microbiology of silages of corn and sorghum kernels. **Animal Feed**
1001 **Science and Technology**, 115227, 2022 p., 2022.
- 1002
- 1003 FERNANDES, T.; SILVA, K. T.; GOMIDE, D. R.; PEREIRA, R. A. N.; AVILA, C. L. S.;
1004 PEREIRA, M. N. Effect of glucoamylase and duration of silage storage on ruminal degradation
1005 and dry matter loss of corn and sorghum grain rehydrated and ensiled. **Journal of Animal**
1006 **Science**, 94 v., suppl_5 n., 673-674 p., 2016.
- 1007

- 1008 FERRARETTO, L. F.; TAYSOM, K.; TAYSOM, D. M.; SHAVER, R. D.; HOFFMAN, P. C.
1009 Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal in vitro
1010 starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science**, 97 v., 5 n., 3221-
1011 3227 p., 2014.
1012
- 1013 FERRARETTO, L. F.; FREDIN, S. M.; SHAVER, R. D. Influence of ensiling, exogenous
1014 protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and
1015 ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. **Journal of Dairy**
1016 **Science**, 98 v., 10 n., 7318-7327 p., 2015.
1017
- 1018 FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. In: **Revista**
1019 **symposium**. 36-41 p., 2008.
1020
- 1021 GOMES, A. L. M.; BUENO, A. V. I.; JACOVACI, F. A.; DONADEL, G.; FERRARETTO, L.
1022 F.; NUSSIO, L. G.; JOBIM, C. C.; DANIEL, J. L. P. Effects of processing, moisture, and
1023 storage length on the fermentation profile, particle size, and ruminal disappearance of
1024 reconstituted corn grain. **Journal of Animal Science**, 98 v., 11 n., 332 p., 2020.
1025
- 1026 HALL, M. B.; MERTENS, D. Technical Note: Effect of Sample Processing Procedures on
1027 Measurement of Starch in Corn Silage and Corn Grain. **Journal of Dairy Science**, 91 v., 1 n.,
1028 4830-4833 p., 2008.
1029
- 1030 HALL, MARY B. Determination of starch, including maltooligosaccharides, in animal feeds:
1031 Comparison of methods and a method recommended for AOAC collaborative study. **Journal**
1032 **of AOAC International**, 92 v., 1 n., 42-49 p., 2009.
1033
- 1034 HOFFMAN, P. C.; ESSER, N. M.; SHAVER, R. D.; COBLENTZ, W. K.; SCOTT, M. P.;
1035 BODNAR, A. L.; SCHMIDT, R. J.; CHARLEY, R. C. Influence of ensiling time and
1036 inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy**
1037 **Science**, 94 v., 5 n., 2465-2474 p., 2011.
1038
- 1039 JOBIM, C. C.; NUSSIO, L. G.; REIS, R. A.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na
1040 avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 36 v., 101-
1041 119 p., 2007.
1042
- 1043 JUNGES, D.; MORAIS, G.; SPOTO, M. H. F.; SANTOS, P. S.; ADESOGAN, A. T.; NUSSIO,
1044 L. G.; DANIEL, J. L. P. Influence of various proteolytic sources during fermentation of
1045 reconstituted corn grain silages. **Journal of Dairy Science**, 100 v., 11 n., 9048-9051 p., 2017.
1046
- 1047 KESHRI, J.; CHEN, Y.; PINTO, R.; KROUPITSKI, Y.; WEINBERG, Z. G.; SELA, S.
1048 Microbiome dynamics during ensiling of corn with and without *Lactobacillus plantarum*
1049 inoculant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 102 v., 9 n., 4025-4037 p., 2018.
1050
- 1051 KUNG JR, L.; SCHMIDT, R. J.; EBLING, T. E.; HU, W. The effect of *Lactobacillus buchneri*
1052 40788 on the fermentation and aerobic stability of ground and whole high-moisture corn.
1053 **Journal of Dairy Science**, 90 v., 5 n., 2309-2314 p., 2007.
1054
- 1055 LACERDA, M. J. R.; FREITAS, K. R.; SILVA, J. W. D. Determinação da matéria seca de
1056 forrageiras pelos métodos de microondas e convencional. **Bioscience Journal**, 25 v., 3 n., 185-
1057 190 p., 2009.

- 1058
1059 LI, D.; NI, K.; ZHANG, Y., LIN, Y.; YANG, F. Influence of lactic acid bacteria, cellulase,
1060 cellulase-producing *Bacillus pumilus* and their combinations on alfalfa silage quality. **J. Integr.**
1061 **Agric.** 17 v., 2768–2782 p., 2018.
1062
- 1063 MAIA, O. B.; DUARTE, R.; SILVA, A. M.; CARA, D. C.; NICOLI, J. R. Evaluation of the
1064 components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with
1065 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium. **Veterinary microbiology**, 79 v., 2 n.,
1066 183-189 p., 2001.
1067
- 1068 MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage:**
1069 **Chalcombe publications**, 1991.
1070
- 1071 MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds
1072 with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**,
1073 85 v., 6 n., 1217-1240 p., 2002.
1074
- 1075 MOMBACH, M. A.; PEREIRA, D. H.; PINA, D. S.; BOLSON, D. C.; PEDREIRA, B. C..
1076 2019. Silage of rehydrated corn grain. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootecnia**. 71 n., 959–966 p.,
1077 2019.
1078
- 1079 MORAIS, G. D. **A fermentação de grãos de milho reidratados influenciada pela aplicação**
1080 **de aditivos: aspectos da conservação e do valor nutritivo para vacas leiteiras**. 2016. 112 p.
1081 Tese (Doutorado em Ciência Animal e pastagens) - Universidade de São Paulo, 2016.
1082
- 1083 MORAN, J. P.; WEINBERG, Z. G.; ASHBELL, G.; HEN, Y.; OWEN, T. R. A comparison of
1084 two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In:
1085 *International Silage Conference*, 1996, 162-163 p.
1086
- 1087 MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de**
1088 **Zootecnia**, 39 v., 183-191 p., 2010.
1089
- 1090 MUCK, R. E.; NADEAU, E. M. G.; MCALLISTER, T. A.; CONTRERAS-GOVEA, F. E.;
1091 SANTOS, M. C.; KUNG JR, L. Silage review: Recent advances and future uses of silage
1092 additives. **Journal of Dairy Science**, 101 v., 5 n., 3980-4000 p., 2018.
1093
- 1094 NELLIS, S. E.; HOFFMAN, P. C.; SHAVER, R. D. A modified method to quantify prolamin
1095 proteins in dry and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, 96 v., 7 n., 4647-4652 p.,
1096 2013.
1097
- 1098 NOCEK, J. E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a
1099 review. **Journal of Dairy Science**, 71 v., 8 n., 2051-2069 p., 1988.
1100
- 1101 OLIVEIRA, E. R.; TAKIYA, C. S.; DEL VALLE, T. A.; RENNÓ, F. P.; GOES, R. H. T.;
1102 LEITE, R. S.; BATISTA, J. D. O.; OLIVEIRA, K. M. P.; ARAKI, H. M.C.; DAMIANI, J.;
1103 SILVA, M. S. J.; GANDRA, E. R. S.; PEREIRA, T. L.; GANDRA, J. R. Effects of exogenous
1104 amyolytic enzymes on fermentation, nutritive value, and in vivo digestibility of rehydrated
1105 corn silage. **Animal Feed Science and Technology**, 251 v., 86-95 p., 2019.
1106

- 1107 OWENS, F. L. N.; ZINN, R. A.; KIM, Y. K. Limits to starch digestion in the ruminant small
1108 intestine. **Journal of Animal Science**, 63 v., 5 n., 1634-1648 p., 1986.
1109
- 1110 PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Circular técnica:
1111 EMBRAPA. 2006.
1112
- 1113 PAHLOW, G.; MUCK, R. E.; DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S. J. W. H. O.; SPOELSTRA, S.
1114 F. Microbiology of ensiling. **Silage science and technology**, 42 v., 31-93 p., 2003.
1115
- 1116 PILTZ, J. W.; KAISER, A. G. Principles of silage preservation. **Successful silage'**.(Eds AG
1117 **Kaiser, JW Piltz, HM Burns, NW Griffiths**) pp, 25-56 p., 2004.
1118
- 1119 REMOND, D.; CABRERA-ESTRADA, J. I.; CHAMPION, M.; CHAUVEAU, B.;
1120 COUDURE, R.; PONCET, C. Effect of corn particle size on site and extent of starch digestion
1121 in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 87 v., 5 n., 1389-1399 p., 2004.
1122
- 1123 REZENDE, A. V.; RABELO, C. H.; VEIGA, R. M.; ANDRADE, L. P.; HÄRTER, C. J.;
1124 RABELO, F. H.; ...; REIS, R. A. Rehydration of corn grain with acid whey improves the silage
1125 quality. *Animal Feed Science and Technology*, 197 v., 213-221 p., 2014.
1126
- 1127 SAARISALO, E.; SKYTTÄ, E.; HAIKARA, A.; JALAVA, T.; JAAKKOLA, S. Screening and
1128 selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. **Journal of Applied
1129 Microbiology**, 102 v., 2 n., 327-336 p., 2007.
1130
- 1131 SALMINEN, N.; VON WRIGHT, S.; OUWEHAND, A.. **Lactic Acid Bacteria:
1132 Microbiological and Functional Aspects**. 3 rd ed., 633p., New York: Marcel Dekker, 2004.
1133
- 1134 SANTOS, A. O.; ÁVILA, C. L. S.; SCHWAN, R. F. Selection of tropical lactic acid bacteria
1135 for enhancing the quality of maize silage. **Journal of Dairy Science**, 96 v., 12 n., 7777-7789
1136 p., 2013.
1137
- 1138 SANTOS, J. S. D.; SANTOS, M. L. P. D.; AZEVEDO, A. D. S. Validação de um método para
1139 determinação simultânea de quatro ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência
1140 em polpas de frutas congeladas. **Química Nova**, 37 v., 3 n., 540-544 p., 2014.
1141
- 1142 SEBASTIAN, S.; PHILLIP, L. E.; FELLNER, V.; IDZIAK, E. S. Comparative assessment of
1143 bacterial inoculation and propionic acid treatment of aerobic stability and microbial populations
1144 of ensiled high-moisture ear corn. **Journal of Animal Science**, 74 v., 2 n., 447-456 p., 1996.
1145
- 1146 SEO, S.; TEDESCHI, L. O.; LANZAS, C.; SCHWAB, C. G.; FOX, D. G. Development and
1147 evaluation of empirical equations to predict feed passage rate in cattle. **Animal Feed Science
1148 and Technology**, 128 v., 1-2 n., 67-83 p., 2006.
1149
- 1150 SILVA, N. C. **Características das silagens de grãos de milho influenciadas pela reidratação
1151 e pela inoculação com *L. buchneri* sobre o desempenho de bovinos de corte confinados**.
1152 2016. 130 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
1153 Mesquita Filho", Jaboticabal, 2016.
1154
- 1155 SILVA, N. C.; NASCIMENTO, C. F.; NASCIMENTO, F. A.; RESENDE, F. D.; DANIEL, J.
1156 L. P.; SIQUEIRA, G. R. Fermentation and aerobic stability of rehydrated corn grain silage

- 1157 treated with different doses of *Lactobacillus buchneri* or a combination of *Lactobacillus*
1158 *plantarum* and *Pediococcus acidilactici*. **Journal of Dairy Science**, 101 v., 5 n., 4158-4167 p.,
1159 2018.
- 1160
- 1161 SILVA, N. C.; NASCIMENTO, C. F.; CAMPOS, V. M. A.; ALVES, M. A. P.; RESENDE, F.
1162 D.; DANIEL, J. L. P.; SIQUEIRA, G. R. Influence of storage length and inoculation with
1163 *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of high-
1164 moisture corn and rehydrated corn grain silage. **Animal Feed Science and Technology**, 251
1165 v., 124-133 p., 2019.
- 1166
- 1167
- 1168 SOUZA, P. M. D. **Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do**
1169 **centro-oeste brasileiro**. 2015. 133 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico
1170 Farmacêutica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- 1171
- 1172 SOUZA, W. L. D.; CIDRINI, I. A.; JÚNIOR, A. P. N.; SILVA, M. D.; GERVÁSIO, J. R. S.;
1173 ABREU, M. J. I. D.; NASCIMENTO, D. C. Effect of rehydration with whey and inoculation
1174 with *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium acidipropionici* on the chemical
1175 composition, microbiological dynamics, and fermentative losses of corn grain silage. **Semina:**
1176 **Ciências Agrárias**, v. 41, 6Supl2 n., 3351-3364 p., 2020.
- 1177
- 1178 TAYLOR, C. C.; KUNG JR, L. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation
1179 and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. **Journal of Dairy Science**, 85
1180 v., 6 n., 1526-1532 p., 2002.
- 1181
- 1182 VALENSUELA, S. D. S. **Tempo de armazenamento e ação de enzimas amilolíticas em**
1183 **silagem de grão úmido de milho reidratado: atividade enzimática, população microbiana**
1184 **e estabilidade aeróbia**. 2017. 42 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em
1185 Biotecnologia) - Universidade Federal Da Grande Dourados. Dourados, 2017.
- 1186
- 1187 WINDLE, M. C.; WALKER, N.; KUNG JR, L. Effects of an exogenous protease on the
1188 fermentation and nutritive value of corn silage harvested at different dry matter contents and
1189 ensiled for various lengths of time. **Journal of Dairy Science**, 97 v., 5 n., 3053-3060 p., 2014.
- 1190
- 1191 WOOLFORD, M. K. et al. The detrimental effects of air on silage. *Journal of Applied*
1192 *Microbiology*, 68 v., 2 n., 101-116 p., 1990.
- 1193
- 1194