



EDNA DA CRUZ MEDEIROS

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE DIFERENTES
MICRORGANISMOS SOBRE A DEGRADAÇÃO DO AMIDO
DE SILAGENS DE ESPIGAS E DE GRÃOS ÚMIDOS DE
MILHO**

LAVRAS- MG

2024

EDNA DA CRUZ MEDEIROS

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE DIFERENTES MICRORGANISMOS SOBRE A
DEGRADAÇÃO DO AMIDO DE SILAGENS DE ESPIGAS E DE GRÃOS ÚMIDOS
DE MILHO**

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

Prof. Dr. Thiago Fernandes Bernardes
Orientador

**LAVRAS – MG
2024**

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

Medeiros, Edna Da Cruz.

Efeito da associação de diferentes microrganismos sobre a
degradação do amido de silagens de espiga e de grãos úmidos de
milho / Edna Da Cruz Medeiros. - 2024.

48 p. : il.

Orientador(a): Thiago Fernandes Bernardes.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Silagem. 2. Inoculante. 3. Tempo de Estocagem. I. Bernardes,
Thiago Fernandes. II. Título.

EDNA DA CRUZ MEDEIROS

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE DIFERENTES MICRORGANISMOS SOBRE A
DEGRADAÇÃO DO AMIDO DE SILAGENS DE ESPIGA E DE GRÃOS ÚMIDOS DE
MILHO**

**EFFECTS OF THE ASSOCIATION OF DIFFERENT MICROORGANISMS ON THE
DEGRADATION OF STARCH IN SNAPPLAGE AND WET GRAINS SILAGE**

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

APROVADA em 29 de agosto de 2024.

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila UFLA
Dr . Anibal Coutinho do Rêgo UFC

Prof. Dr. Thiago Fernandes Bernardes
Orientador

**LAVRAS – MG
2024**

À minha prima Elaine (*in memoriam*), que nunca perdeu a esperança de cura e a vontade de viver!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me amparar em cada momento desta etapa e me mostrar que seguir em frente é sempre a chave para o crescimento!

Aos meus pais, Wilson Medeiros e Irani Martins, que na simplicidade me criaram livre para voar. Obrigada pelo dom da vida!

Ao meu irmão Silvano Pedro, meus tios, tias, primos, primas e afilhados, que mesmo de longe sempre estiveram orando por mim!

À Universidade Federal de Lavras, oportunidade de estudos, aprendizados e experiências com cada professor do departamento de Zootecnia.

Ao meu orientador Prof. Thiago Bernardes, pela oportunidade de orientação, paciência e conhecimentos transmitidos.

Ao meu eterno orientador Prof. Valdir Botega, por sempre ter acreditado em mim, pelos conselhos, orientações e carinho. Gratidão eterna! À Prof. Carla Ávila, pelas partilhas e conversas!

A todos os meus companheiros nessa trilha, vocês me ampararam nos dias tristes e felizes! Viviane, os “Marcos”, as “Gabis”, Beatriz, Rafa, Iza, Yolanda, Raiane, Leticia e Sara. Obrigada por cada abraço e cada gesto de humanidade. Vocês fizeram diferença na minha caminhada!

Aos técnicos do laboratório com quem eu convivi todos os dias nesse período!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À Lallemand pelo financiamento do projeto.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e finalização deste trabalho, obrigada!

“Se o meu futuro fosse determinado apenas pelo meu desempenho em provas e testes padronizados, eu não estaria aqui. Te garanto isso!” (Michelle Obama)

RESUMO

Objetivou-se avaliar a associação de diferentes microrganismos e taxas de inoculações sobre o perfil fermentativo, estabilidade aeróbia e degradação *in situ* do amido de silagem de espigas (snaplage) por 30, 60 e 120 dias de ensilagem e silagem de grãos úmidos por 30, 60, 120 e 150 dias. No experimento 1, os tratamentos consistiam em: controle e silagem inoculada com *L. buchneri* (LB) NCIMB 40788 (1k20757) + *L. hilgardii* (LH) CNCM I-4785 ($1,5 \times 10^{-5}$ /g para ambas as bactérias). No experimento 2, os tratamentos : tratamento 1(CON) sem aditivo, tratamento 2 (LB) adição de *L. buchneri* NCIMB 40788 (1k20739) ($6,0 \times 10^{-5}$ UFC /g), tratamento 3 (LBLH) adição de *L. buchneri* NCIMB 40788 (1k20757) e *L. hilgardii* CNCM I-4785 ($6,0 \times 10^{-5}$ UFC/g para ambas as bactérias), tratamento 4 (LBLHP) adição de *L. buchneri* NCIMB 40788 (1k20757), *L. hilgardii* CNCM I-4785 ($4,0 \times 10^{-5}$ UFC/g para ambas as bactérias) e *Pediococcus pentosaceus* NCIMB 12455 (1k2106) ($2,0 \times 10^{-5}$ UFC/g), tratamento 5 (LBLHPE) adição de *L. buchneri* NCIM 40788 (1k20757) e *L. hilgardii* CNCM I-4785 ($6,0 \times 10^{-5}$ UFC/g para ambas as bactérias), *Pediococcus pentosaceus* NCIMB 12455 (1k2106) ($\geq 2,0 \times 10^{-6}$ UFC/g), Xylanase (EC3.2.1.8) MUCL 39203 (1k) ($\geq 1,2 \times 10^{-1}$ IU/g) e Beta-glucanase (EC 3.2.1.6) MUCL 39199 (1k) ($\geq 2,3 \times 10^{-2}$ IU/g). Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. O experimento 1 em esquema fatorial 2 x 3 (dois tratamentos e 3 tempos de estocagem), totalizando 30 unidades experimentais. O experimento 2 em esquema fatorial 5 x 4 (cinco tratamentos e quatro tempos de estocagem), totalizando 100 unidades experimentais. Os dados foram analisados utilizando o PROC MIXED do SAS. As médias dos tratamentos foram estimadas pelo “LSMEANS” e comparadas pelo teste Tukey a 5% propabilidade. No Experimento 1, o uso de inoculante e os diferentes tempos de estocagem afetaram a estabilidade aeróbia em snaplage ($P < 0,001$). Na degradabilidade do amido (7h), foram observadas interações entre inoculante x tempo de estocagem para a fração A da proteína ($P = 0,023$). O tempo de estocagem afetou a fração B2 ($P = 0,012$), a fração B3 ($P < 0,001$) e a fração C ($P < 0,001$), onde maiores tempos de estocagem reduziram as respectivas frações da proteína. No Experimento 2, os inoculantes e tempos de estocagem afetaram as concentrações de ácido acético ($P < 0,001$ e $P < 0,001$) e de 1,2 propanodiol ($P < 0,002$ e $P = 0,002$), respectivamente. O uso de inoculante e os tempos de estocagem alteraram a fração A1 da proteína ($P < 0,001$ e $P = 0,023$, respectivamente). Silagens de grão úmido inoculada com LBLH, LBLHP e LB apresentaram maior fração A da proteína (0,10%; 0,13% e 0,10%, respectivamente). A degradabilidade do amido foi afetada apenas pelo tempo de estocagem ($P < 0,001$). O uso de inoculantes e tempos de estocagem modificam o perfil fermentativo da silagem de espigas e silagem de grãos úmidos, além de afetar positivamente as frações proteicas da silagem.

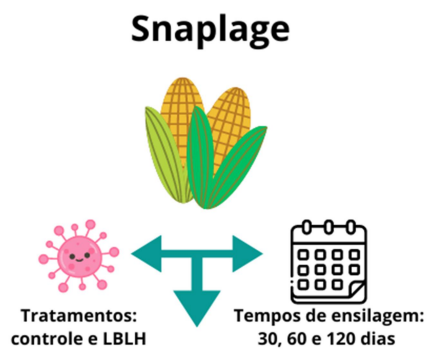
Palavras-chave: amido; BAL; degradação, inoculante.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the association of different microorganisms and inoculation rates on the fermentation profile, aerobic stability and *in situ* degradation of starch from snaplage for 30, 60 and 120 days of ensilage and wet grain silage for 30, 60, 120 and 150 days. In experiment 1, the treatments consisted of: control and silage inoculated with *L. buchneri* (LB) NCIMB 40788 (1k20757) + *L. hilgardii* (LH) CNCM I-4785 (1.5×10^{-5} /g for both bacteria). In experiment 2, the treatments consisted of: treatment 1 (CON) without additive, treatment 2 (LB) addition of *L. buchneri* NCIMB 40788 (1k20739) (6.0×10^{-5} CFU/g), treatment 3 (LBLH) addition of *L. buchneri* NCIMB 40788 (1k20757) + *L. hilgardii* CNCM I-4785 (6.0×10^{-5} CFU/g for both bacteria), treatment 4 (LBLHP) addition of *L. buchneri* NCIMB 40788 (1k20757) + *L. hilgardii* CNCM I-4785 (4.0×10^{-5} CFU/g for both bacteria) + *Pediococcus pentosaceus* NCIMB 12455 (1k2106) (2.0×10^{-5} CFU/g), treatment 5 (LBLHPE) addition of *L. buchneri* NCIM 40788 (1k20757) + *L. hilgardii* CNCM I-4785 (6.0×10^{-5} CFU/g for both bacteria), *Pediococcus pentosaceus* NCIMB 12455 (1k2106) ($\geq 2.0 \times 10^{-6}$ CFU/g) + Xylanase (EC3.2.1.8) MUCL 39203 (1k) ($\geq 1.2 \times 10^{-1}$ IU/g) + Beta-glucanase (EC 3.2.1.6) MUCL 39199 (1k) ($\geq 2.3 \times 10^{-2}$ IU/g). The experiments were carried out in a completely randomized design. Experiment 1, in a 2 x 3 factorial scheme (two treatments and 3 storage times), totaling 30 experimental units. Experiment 2 was conducted in a 5 x 4 factorial scheme (five treatments and four storage times), totaling 100 experimental units. Data were analyzed using PROC MIXED of the SAS statistical program. Treatment means were estimated by “LSMEANS” and comparison was performed by Tukey’s test at 5% probability. In Experiment 1, the use of inoculant and different storage times affected aerobic stability in snaplage ($P < 0.001$). In the starch degradability (7 h), interactions were observed between the use of inoculant x storage time ($P = 0.023$). Storage time affected fraction B2 ($P = 0.012$), fraction B3 ($P < 0.001$), and fraction C ($P < 0.001$), longer storage times reduced the respective protein fractions. In Experiment 2 inoculants and storage times affected the acetic acid concentrations ($P < 0.001$ and $P < 0.001$), as well as the 1,2-propanediol concentrations ($P < 0.002$ and $P = 0.002$), respectively. The use of inoculant and storage times altered the A1 fraction of the protein ($P < 0.001$ and $P = 0.023$, respectively). Wet grain silages inoculated with LBLH, LBLHP and LB presented higher values of the A fraction of the protein (0.10%; 0.13% and 0.10%, respectively). Starch degradability was altered only by storage time ($P < 0.001$). The use of inoculants and different storage times modify the fermentation profile of snaplage and wet grain silage and also positively affect protein fractionation.

Keywords: starch; BAL; degradation; inoculant.

RESUMO GRÁFICO



- Maior estabilidade aeróbia com o uso de LBLH;
- Mudanças no fracionamento proteico;
- Aumento na degradabilidade do amido.



- Mudança no perfil fermentativo e na fração A1 da proteína;
- A degradabilidade do amido foi alterada apenas pelo tempo de estocagem ($P < 0,001$).

INDICADORES DE IMPACTO

O uso de inoculantes microbianos em silagens de milho oferece uma gama de benefícios e impactos em diferentes esferas: social, tecnológica, econômica e cultural. Na esfera social, o uso impacta na manutenção da qualidade de alimentos conservados beneficiando pequenos e grandes produtores rurais. Com a adoção de tecnologias como os inoculantes, produtores têm mais condições de garantir uma alimentação de qualidade para o rebanho, o que fortalece a produção pecuária e, potencialmente, gera mais empregos no setor. Na esfera de impacto tecnológico, a utilização de inoculantes microbianos em silagens de milho representa um avanço biotecnológico, promovendo a conservação eficiente dos nutrientes da planta. Tecnologias associadas, como a seleção de cepas específicas para cada tipo de clima e condição de plantio, também incentivam inovações no setor de biotecnologia agrícola. Já em relação aos impactos econômicos, a utilização pode aumentar a rentabilidade dos produtores ao reduzir perdas e melhorar a qualidade do produto final. Na esfera cultural, a adoção de inoculantes microbianos reflete uma mudança na percepção dos produtores sobre práticas agrícolas e manejo nutricional. Esse avanço fomenta uma cultura de maior valorização da ciência e da tecnologia no campo, promovendo uma mentalidade mais voltada para a sustentabilidade e a inovação. O uso de inoculantes microbianos em silagens de milho representa uma inovação importante e impactante em diversos aspectos, desde a produção de alimentos até a sustentabilidade econômica e social do setor agropecuário. A introdução e disseminação dessa tecnologia no campo demonstram o potencial da biotecnologia em transformar práticas tradicionais, promovendo um setor agrícola e pecuário mais eficiente e sustentável.

IMPACTS INDICATORS

The use of microbial inoculants in maize silage offers a range of benefits and impacts in different spheres: social, technological, economic and cultural. In the social sphere, their use has an impact on maintaining the quality of preserved food, benefiting both small and large rural producers. By adopting technologies such as inoculants, producers are better able to guarantee quality feed for their livestock, which strengthens livestock production and potentially generates more jobs in the sector. In terms of technological impact, the use of microbial inoculants in corn silage represents a biotechnological advance, promoting the efficient conservation of plant nutrients. Associated technologies, such as the selection of specific strains for each type of climate and planting condition, also encourage innovation in the agricultural biotechnology sector. In terms of economic impact, the use of biotechnology

can increase producers' profitability by reducing losses and improving the quality of the final product. In the cultural sphere, the adoption of microbial inoculants reflects a change in producers' perception of agricultural practices and nutritional management. This progress fosters a culture of greater appreciation for science and technology in the field, promoting a mindset more geared towards sustainability and innovation. The use of microbial inoculants in maize silage represents an important and impactful innovation in various aspects, from food production to the economic and social sustainability of the agricultural sector. The introduction and dissemination of this technology in the field demonstrates the potential of biotechnology to transform traditional practices, promoting a more efficient and sustainable agricultural and livestock sector.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Ensilagem	15
2.2 Inoculantes	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Local do estudo	18
3.2 Ensilagem e amostragem do experimento 1 (Silagem de espigas)	18
3.3 Ensilagem e amostragem do experimento 2 (Silagem de grãos úmidos)	19
3.4 Perfil fermentativo, características químicas e estabilidade aeróbia	19
3.5 Degrabilidade <i>in situ</i> do amido	21
3.6 Análise estatística	22
4 RESULTADOS	23
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

O milho é a principal fonte de energia das dietas nos sistemas de produção animal no Brasil. Em um levantamento realizado para avaliar técnicas de processamento e fonte de fibras utilizadas em dietas de terminação para bovinos em 149 confinamentos pelo Brasil, observou-se que 43,7% dos confinamentos utilizam silagens de grãos em suas dietas. As silagens de grãos de milho com alta umidade, snaplage, milho em grão reconstituído e sorgo granífero reconstituído, foram utilizados por 21, 12, 6,7 e 4% dos confinamentos, respectivamente (BERNARDES, CASTRO e LUZ, 2022).

No Brasil, o tipo de grão de milho mais utilizado nas dietas possui textura vítrea, apresentando uma menor digestibilidade do amido. Suas características permitem um amplo incremento na digestibilidade por meio de técnicas de processamento do milho, como a ensilagem (FERRARETTO, CRUMP e SHAVER, 2013). Durante o processo de ensilagem, ocorre a ação de bactérias proteolíticas e proteases, quebrando a matriz proteica (JUNGES *et al.*, 2017) e aumentando a disponibilidade de amido (HOFFMAN *et al.*, 2011). Como consequência, observa-se o aumento da eficiência alimentar de vacas leiteiras e bovinos de corte (FERRARETTO, CRUMP e SHAVER, 2013; CORRIGAN *et al.*, 2009; JACOVACI *et al.*, 2021).

Um fator que pode ser limitante para o uso da silagem de grãos e de espigas é sua suscetibilidade ao processo de deterioração aeróbia. Entretanto, o uso de inoculantes heterofermentativos como o *Lentilactobacillus buchneri* (LB) promove uma melhora na estabilidade aeróbia, devido ao aumento na concentração de ácido acético, que é um importante agente antifúngico, promovendo redução na contagem de leveduras, principais microrganismos iniciadores do processo de deterioração (McDONALD *et al.*, 1991). O uso de outros microrganismos heterofermentativos obrigatórios que são fisiologicamente semelhantes ao LB tem sido avaliados para esse fim, como *L. brevis*, *L. diolivorans*, *L. kefiri*, *L. farraginis* e *L. parafarraginis*. (MUCK *et al.* 2018; COSTA *et al.*, 2021).

A adição de *Lactobacillus hilgardii* (LH) tem demonstrado capacidade de alterar a fermentação, melhorar a estabilidade aeróbia e a degradação do amido das silagens. Drouin *et al.*, 2023, avaliando a expressão gênica, o perfil fermentativo e a degradação do amido em silagem de grãos úmidos de milho com a inoculação de LB ou a combinação de LB e LH, observou que a combinação dos microrganismos melhorou a degradação do amido, além de modificar a expressão de genes relacionados ao perfil de

aminoácidos e carboidratos. É sabido que a atividade proteolítica das bactérias é a principal responsável pela degradação de proteína em silagens de grãos úmidos, (60.4%) (JUNGES *et al.*, 2015). Adicionalmente, o efeito dos inoculantes sobre o perfil microbiano das silagens pode influenciar a degradação de amido nas silagens de milho grão úmido (HOFFMAN *et al.*, 2011).

Considerando a atuação dos microrganismos heterofermentativos na melhoria da estabilidade aeróbia, é possível que a associação de diferentes microrganismos em silagem de grãos possa atuar de forma mais efetiva, melhorando as características químicas, microbiológicas e nutricionais. A hipótese do presente trabalho é que a associação de diferentes microrganismos possa apresentar melhor desempenho na degradação do amido e estabilidade aeróbia em relação à inoculação isolada. Diante disso, objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes microrganismos e concentrações sobre: perfil fermentativo, estabilidade aeróbia e degradação *in situ* do amido de silagem de espigas por 30, 60 e 120 dias de ensilagem e de silagem de grãos úmidos por 30, 60, 120 e 150 dias de ensilagem.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil é um dos principais produtores de milho na atualidade, sendo esta a principal cultura utilizada na produção de silagens, tanto para o sistema produtivo de gado de leite, quanto de gado de corte (SANTOS *et al.*, 2020; BERNARDES e RÊGO, 2014). Altas produtividades associadas ao alto valor nutritivo, a facilidade de colheita mecânica, ampla variedade de maquinário, padrões de fermentação e versatilidade quanto ao uso (planta inteira, grãos úmidos, reidratados e espigas) são os principais fatores que contribuem para escolha do milho frente a outras culturas (GUSMÃO, 2021). Em confinamentos comerciais, sua utilização como fonte de grãos primários chega a 97% (SILVESTRE e MILLEN, 2021).

No Brasil, o uso da tecnologia de ensilagem de grãos começou nos anos de 1980, com o uso de silagem de milho de alta umidade (grãos úmidos) para alimentar suínos e gado de leite. Atualmente o uso de grãos para ensilagem tem se difundindo significativamente, à medida que ocorrem avanços nas técnicas de colheita, armazenamento e processamento. (DANIEL., *et al* 2019).

2.1 Ensilagem

A ensilagem é uma técnica utilizada para conservar alimentos há mais de 3.000 anos (WOOLFORD, 1984). O processo fermentativo é baseado em dois princípios: anaerobiose e acidez ambiental. Esse processo é realizado por microrganismos e as melhorias na conservação têm sido acompanhadas por uma evolução nas tecnologias de gestão e um maior conhecimento sobre a presença e o desempenho da microbiota no processo fermentativo (ÁVILA; CARVALHO, 2019).

A silagem de espigas, também conhecida com *snaplage*, possui em sua composição a palha, sabugo (em torno de 20 a 30%) e os grãos de milho (70 a 80%) (DANIEL et al., 2019). Nutricionalmente, as silagens de espigas apresentam em média 10% menos amido quando se compara com silagens de grãos úmidos, por exemplo. Podem possuir variações entre 50 a 55% de amido e 18 a 25% de FDN. (MAHANNA, 2008; EUKEN et al., 2018).

A silagem de grãos úmidos, também conhecida como silagem de grão com alta umidade, consiste na ensilagem do grão de milho em estágio de maturação (em torno da linha negra), quando a planta apresenta o teor de umidade entre 30 e 40%.

A ensilagem de cereais, como o grão úmido de milho e a silagem de espigas, pode melhorar a degradabilidade do amido devido a redução da integridade da matriz proteica que envolve os grânulos de amido de milho (HOFFMAN *et al.*, 2011; FERRARETTO *et al.*, 2015), sendo esta potencialmente degradada durante o processo de ensilagem, por solubilização ou atividade proteolítica. Apesar da zeína ser insolúvel em água e no fluido ruminal, ela pode ser solúvel em ácido láctico e ácido acético, produtos da fermentação em silagens (LAWTON, 2002).

Durante o período de ensilagem, a degradação das proteínas pode ocorrer em duas fases. Primeiramente, ocorre a hidrólise da proteína devido a proteases vegetais e microbianas, resultando em peptídeos e aminoácidos livres (AA) (ROOKE *et al.*, 2003; MCDONALD *et al.*, 1991). Seguida, pela descarboxilação dos AA, levando à formação de aminas biogênicas e dióxido de carbono, enquanto a desaminação de AA resulta em NH_3 e ácidos orgânicos (OHSHIMA e MCDONALD *et al.*, 1978).

O aumento no tempo de armazenamento da silagem reduz os teores de prolamina através do mecanismo de proteólise, promovendo um aumento na degradação ruminal *in situ* do amido (FERNANDES *et al.*, 2015). Hoffman *et al.*, (2011), relataram que a degradação das subunidades de prolamina - zeína da matriz proteica da silagem de

grãos de úmidos foi extensa, com redução de 60%, sugerindo que os grânulos de amido se dissociam como resultado da fermentação da silagem, o que aumenta a área de superfície para a fixação bacteriana no rúmen (HUNTINGTON *et al.*, 2006).

Kung Jr, Windle e Walker (2014) observaram que ao longo do tempo de estocagem (0, 70 e 140 dias) ocorreu redução nos teores de prolamina e aumento nos teores de nitrogênio amoniacal e proteína solúvel, sendo indício da quebra da matriz proteica que recobre os grãos de amido, aumentando da digestibilidade *in vitro* do amido. Hoffman *et al.* (2011) também relataram maior concentração de nitrogênio amoniacal à medida que as subunidades de proteína zeína em silagem de alta umidade diminuíram. Junges *et al.*, (2017), avaliando a influência de várias fontes proteolíticas durante a fermentação de silagens de grãos reconstituindo, observaram que a que a proteólise microbiana foi o principal contribuinte para a redução da matriz proteica do milho.. Taylor e Kung (2002) observaram que a inoculação da silagem de grãos úmidos de milho com LB aumenta frequentemente a concentração de NH₃. Ferrareto *et al.*, (2014), afirmam que altas concentrações de proteína solúvel e NH₃ estão positivamente relacionadas à digestibilidade do amido.

2.2 Inoculantes

Em função do alto valor nutricional das silagens de grãos e de espigas, porém com baixa concentração de ácidos orgânicos, esses tipos de silagens são mais propensos ao processo de deterioração aeróbia. Os microrganismos deterioradores, como as leveduras, utilizam o ácido lático produzido durante o processo de fermentação, os carboidratos solúveis remanescentes e até mesmo o amido presente nesse tipo de silagem, como substratos para seu crescimento e multiplicação; elevando o pH, produzindo etanol e aumentando as perdas de MS (PAHLOW *et al.*, 2003).

Os aditivos disponíveis hoje no mercado, podem ser classificados em quatro categorias, baseadas em seus efeitos e modo de ação na preservação da silagem: estimulantes da fermentação, inibidores da fermentação, inibidores da deterioração aeróbia, nutrientes e adsorventes (McDONALD *et al.*, 1991; KUNG *et al.*, 2003).

De modo geral, os aditivos bacterianos utilizados durante o processo de ensilagem auxiliam na preservação do valor nutritivo da forragem conservada, através do mecanismo da inibição do crescimento de microrganismos deterioradores na massa

ensilada, reduzindo, por exemplo, as perdas de matéria seca (PAHLOW *et al.*, 2003). Entre as categorias de aditivos, os inibidores de deterioração aeróbia são usados especialmente com culturas que apresentam uma alta capacidade de deterioração, como a silagem de milho e suas variações (KUNG; STOKES e LIN, 2003).

O uso de aditivos classificados como inibidores de deterioração aeróbia tem demonstrado resultados positivos no controle de deterioração em silagens de milho planta inteira. Dentre eles, o LB é o mais estudados nos últimos anos (KUNG; STOKES e LIN, 2003). O LB é uma bactéria ácido láctica heterofermentativa obrigatória, sendo capaz de produzir ácido láctico, acético, manitol e etanol pela fermentação de glicose e frutose.. O componente ácido acético proporciona melhorias na estabilidade aeróbia das silagens, devido a suas características antifúngicas. Isso porque o pH do meio é inferior ao seu pKa o que faz com que ele esteja na forma não dissociada. Nessa forma, ele entra na célula microbiana através da sua membrana via transporte passivo. Uma vez dentro da célula, o ácido é dissociado, em razão do pH interno ser próximo a 7,0 e ocorre a liberação dos íons H⁺, acidificando o meio intracelular; conseqüentemente a ocasionando a morte do microrganismo, devido ao gasto de energia para manter a neutralidade da célula na eliminação dos íons por meio do transporte ativo. (LAMBERT e STRATFORD, 1999).

Existem inúmeros estudos realizados com o LB que demonstram melhora na estabilidade aeróbia das silagens. Porém, os efeitos são específicos da cepa (MUCK, 2004; KLEINSCHMIT *et al.*, 2005) e dependentes da dosagem (RANJIT e KUNG, 2000; TAYLOR e KUNG, 2002). Nas diversas configurações comerciais hoje existentes, as formulações com LB podem ser encontradas com uma variedade de taxas de aplicações finais, variando de 100.000 a 600.000 UFC/g de forragem (MUCK *et al.*, 2018).

Uma área de pesquisa e comercial que vem sendo investida nos últimos anos é na combinação de bactérias heterofermentativas capazes de melhorar a estabilidade aeróbia da silagem mais rapidamente que o LB. Dados sugerem que a conversão anaeróbia de ácido láctico em ácido acético por LB precisa de cerca de 30 a 60 dias para ser tornar aparente (MUCK *et al.*, 2018). Kleinschimit e Kung (2006) não detectaram 1,2-propanodiol em silagens de milho tratadas após 28 dias de ensilagem, sendo detectados apenas aos 42 dias. Oude Elferink *et al.*, (2001) relataram que a conversão de lactato em 1,2-propanodiol só ocorre quando toda a glicose é esgotada no meio de cultivo.

A adição de LH tem demonstrado capacidade de alterar a fermentação e melhorar a estabilidade aeróbia das silagens. Ávila *et al.*, (2014), trabalhando com silagens de cana-de-açúcar, relataram que duas cepas de LH (CNCM I-4784 e CNCM I-4785) resultaram em maiores concentrações de ácido acético e 1,2-propanodiol do que em silagens de cana não tratada; além de menores perdas de MS, etanol e ácido butírico em comparação aos outros tratamentos. Polukis *et al.*, (2016) trabalhando com o LH (CNCM I-4785) e LB (40788) adicionado ao milho úmido a uma taxa de aplicação final de 6×10^{-5} UFC/g de material, relataram que ambos os tratamentos resultaram em aumentos semelhantes na produção de ácido acético e 1,2-propanodiol, menor número de leveduras e maior estabilidade aeróbia (após 10 dias de fermentação a estabilidade aeróbia foi de 22 horas para silagem não tratada, 42 horas com LB e 56 horas com LH).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do estudo

Foram realizados dois experimentos na Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil (21°13'49" S, 44°58'10" W), para avaliar a eficácia de inoculantes bacterianos em silagem de espigas e de grãos úmidos de milho. No experimento 2, o material foi colhido na fazenda e levado imediatamente para a UFLA.

3.2 Ensilagem e amostragem do experimento 1 (Silagem de espigas)

As silagens foram confeccionadas quando a matéria seca estava próxima a 62%. Os tratamentos consistiram em: controle e silagem inoculada com *L. buchneri* NCIMB 40788 (1k20757) + *L. hilgardii* CNCM I-4785 ($1,5 \times 10^{-5}$ /g para ambas as bactérias).

O inoculante foi pré-diluído em 1 litro de água, conforme a recomendação do fabricante. Posteriormente, foi retirada uma alíquota do inoculante pré-diluído, adicionado em 1 litro de água e então aplicado no material a ser inoculado com um pulverizador manual. A silagem controle, por sua vez, recebeu a mesma dosagem de água utilizada no tratamento com inoculante. Foi coletada uma amostra do material *in natura* para caracterização em cada tratamento. Os silos experimentais foram baldes com tampa, com capacidade de 5 litros e as silagens compactadas a uma densidade de $598,13 \pm 5,45$ kg de massa fresca m^{-3} . Os silos foram fechados com tampa e estas

vedadas com filme plástico e silicone, foram pesados e mantidos em sala fechada durante 30, 60 e 120 dias, totalizando 30 silos experimentais, com 5 repetições por tratamento, em cada tempo de abertura.

3.3 Ensilagem e amostragem do experimento 2 (Silagem de grãos úmidos)

A ensilagem do experimento foi realizada na Fazenda Terra Madre, em Alfenas–MG, utilizando a safra 2022/23, quando o material possuía aproximadamente 65% de matéria seca (MS), utilizando o híbrido P3016VYHR. Os tratamentos consistiram em: tratamento 1 sem aditivo (CON), tratamento 2 (LB) adição de *L. buchneri* NCIMB 40788 (1k20739) ($6,0 \times 10^{-5}$ UFC /g), tratamento 3 (LBLH) adição de *L. buchneri* NCIMB 40788 (1k20757) + *L. hilgardii* CNCM I-4785 ($6,0 \times 10^{-5}$ UFC/g, para ambas as bactérias), tratamento 4 (LBLHP) adição de *L. buchneri* NCIMB 40788 (1k20757) + *L. hilgardii* CNCM I-4785 ($4,0 \times 10^{-5}$ UFC/g para ambas as bactérias) + *Pediococcus pentosaceus* NCIMB 12455 (1k2106) ($2,0 \times 10^{-5}$ UFC/g), tratamento 5 (LBLHPE) adição de *L. buchneri* NCIMB 40788 (1k20757) + *L. hilgardii* CNCM I-4785 ($6,0 \times 10^{-5}$ UFC/g para ambas as bactérias) + *Pediococcus pentosaceus* NCIMB 12455 (1k2106) ($\geq 2,0 \times 10^{-6}$ UFC/g) + Xylanase (EC3.2.1.8) de *Trichoderma longibrachiatum* MUCL 39203 (1k) ($\geq 1,2 \times 10^{-1}$ IU/g) + Beta-glucanase (EC 3.2.1.6) de *Aspergillus niger* MUCL 39199 (1k) ($\geq 2,3 \times 10^{-2}$ IU/g).

As diluições e aplicações dos inoculantes foram realizadas seguindo a mesma metodologia descrita no experimento 1. Como silos experimentais, foram utilizados baldes com capacidade de 5 litros e os grãos úmidos compactados a uma densidade de $953,43 \pm 33,38$ kg de massa fresca m^{-3} . Os silos foram fechados com tampas e vedados com filme plástico e silicone nas bordas, foram pesados e mantidos em sala fechada durante 30, 60, 90 e 150 dias (totalizando 100 silos experimentais, com 5 repetições por tratamento, em cada tempo de abertura).

Após os períodos de estocagem em ambos os experimentos, os silos foram pesados e abertos para a determinação das perdas gasosas segundo Jobim *et al.*, (2007). Todo o conteúdo de cada silo foi homogeneizado para coleta de amostras e posteriores análises.

3.4 Perfil fermentativo, características químicas e estabilidade aeróbia

Cada sub-amostra foi submetida a análises para a investigação das alterações do perfil fermentativo, características químicas, contagem de microrganismos, estabilidade aeróbia e degradação *in situ* do amido.

Para o teste de estabilidade aeróbia, foram utilizados 1,5 kg de silagem de cada unidade experimental. No experimento 1, o material permaneceu exposto ao ar durante 168 horas (7 dias) a $25,5 \pm 0,8$ °C, No experimento 2, o material permaneceu exposto ao ar durante 240 horas (10 dias) a 25 °C. Em ambos os experimentos, alocados em caixas de poliéster (350 mm de diâmetro x 350 mm de altura) cobertas com uma folha de alumínio para reduzir a perda excessiva de umidade e possíveis contaminações por elementos externos. A temperatura da sala e das silagens, foram registradas a cada 60 minutos com dataloggers, sendo 1 para cada balde e 3 para o ambiente. A estabilidade aeróbia foi definida como o tempo total em horas que a silagem permaneceu estável antes de atingir uma temperatura de 2°C acima da temperatura ambiente (MORAN *et al.*, 1996).

A deterioração aeróbia das silagens foi definida como o somatório da temperatura acumulada, em °C, a partir do momento em que houve a quebra da estabilidade das silagens (CONAGHAN; O'KIELY; O'MARA, 2010).

Um extrato aquoso de cada subamostra foi preparado com 30 g de amostra e 270 mL de água peptonada, homogeneizado em aparelho Stomacher (400, Seward London, UK) durante quatro minutos por 200 rpm. Esse extrato foi utilizado para realizar a leitura do pH com potenciômetro (HI 2221, Hanna Instruments) e para a contagem de leveduras, fungos filamentosos e bactérias ácido-láticas (BAL).

Foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície para contagem dos microrganismos. Para a contagem de fungos filamentosos e leveduras, foi utilizado o meio de cultura YGC Agar (Fluka, Sigma Aldrich Química Brasil LTDA) e preparadas diluições em séries de 10^{-1} a 10^{-5} , em duplicata (TABACCO *et al.*, 2009). As placas permaneceram em câmara de germinação, à 28 °C, durante três e cinco dias, para as contagens de leveduras e fungos filamentosos, respectivamente.

Para a contagem de bactérias do ácido lático (BAL), foi utilizado o meio de cultura MRS Agar (DIFCO LACTOBACILLI MRS AGAR) com agente antifúngico (nistatina), na relação de 4 mL por litro de meio de cultura, onde foram preparadas diluições em séries de 10^{-2} a 10^{-6} , em duplicata (TABACCO *et al.*, 2009). As placas permaneceram em estufa, a 37 °C, durante três dias para a contagem de bactérias.

O mesmo extrato aquoso foi utilizado para análises de nitrogênio amoniacal e ácidos orgânicos. O nitrogênio amoniacal foi determinado por calorimetria conforme o método INCT-CA N-006/1 (2012). A avaliação dos produtos finais da fermentação (ácidos lático, acético, propiônico e butírico e dos álcoois 1,2 propanodiol e etanol), foi por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), segundo metodologia descrita por Santos *et al.*, (2014).

Amostras de cada silo foram levadas à estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas para posteriores das análises bromatológicas. Uma subamostra foi moída em moinho tipo Willey com peneira de crivo de 1 mm para determinação de MS, proteína bruta (PB) pelo método Kjeldahl (AOAC, 2006) e para as análises de proteína solúvel, nitrogênio não proteico, proteína insolúvel em detergente neutro e ácido. No experimento 1, foi utilizado a métodos descritos por Licitra *et al* (1996) e no experimento 2, o fracionamento de nitrogênio foi determinado usando o CNCPS v.6.5 (A1, A2, B1, B2 e C) (Van Amburgh *et al.*, 2015). As concentrações de amido em ambos experimentos foram quantificadas conforme o método enzimático descritos por Hall, 2015, com α -amilase termoestável (Ankom Tchnology, Macedon, NY) e amiloglucosidase (Megazyme E-AMGDF, Bray, Co. Wicklow, Irlanda).

3.5 Degradabilidade *in situ* do amido

Para a análise de degradabilidade *in situ* do amido (isSD), foram utilizadas amostras secas moídas para tamanho médio de 2 mm. Sacos de poliéster foram usados para incubação (10 x 20 cm e 50 \pm 10 microporosidade), contendo 5,0 gramas de amostra em cada unidade. Foram utilizadas duas vacas da raça Tabapuã canuladas no rúmen. As vacas foram alimentadas com ração total, contendo 60% de forragem e 40% de concentrado. Os sacos *in situ* foram colocados em sacos maiores de náilon, umedecidos em água morna e incubados no saco ventral por 7 horas. Sacos vazios foram incubados para correção de possíveis infiltrações de MS nos sacos das amostras. Após a remoção, os sacos foram colocados em recipiente com água gelada por 15 min e posteriormente enxaguados em máquina de lavar. Dois sacos cada tratamento (sacos de 0 horas, contendo amostras sem incubar) foram lavados juntos dos tratamentos para corrigir perdas de partículas no processo de lavagem. Os sacos individuais foram secos em estufa de ventilação forçada por 72 horas, posteriormente as amostras residuais

foram moídas em pilão até passarem por uma peneira de 0,5 mm e foram analisados quanto ao amido conforme descrito anteriormente.

3.6 Análise estatística

O experimento 1 foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 (dois tratamentos e 3 tempos de estocagem), totalizando 30 unidades experimentais. O experimento 2 foi realizado também em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 4 (cinco tratamentos e quatro tempos de estocagem), totalizando 100 unidades experimentais.

As análises dos dados foram realizadas utilizando o PROC MIXED do programa estatístico SAS (SAS Institute, 2001). As médias dos tratamentos foram estimadas pelo “LSMEANS” e a comparação será realizada pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, conforme o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + I_i + T_j + (I \times T)_{ij} + e_{ijk}$$

Sendo,

Y_{ijk} = valor da variável referente à repetição que recebeu o inoculante i no tempo de estocagem j ;

μ = média geral;

I_i = efeito fixo do inoculante i , para $i = (1 \text{ e } 2)$ ou $(1, 2, 3, 4 \text{ e } 5)$;

T_j = efeito fixo do tempo de estocagem j , para $j = (1, 2 \text{ e } 3)$ ou $(1, 2, 3 \text{ e } 4)$;

T tempo_{ij} = efeito da interação entre o inoculante i no tempo de estocagem j ;

e_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação Y_{ijk} .

4 RESULTADOS

Experimento 1

As características do material no momento da ensilagem estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição química e população microbiana de espigas de milho antes da ensilagem.

Item	Média
MS (%)	62,6
Cinzas (% MS)	3,20
PB (% MS)	9,10
FDN (% MS)	25,7
pH	6,42
BAL (log UFC.g ⁻¹)	5,42
Leveduras (log UFC.g ⁻¹)	4,96
Fungos (log UFC.g ⁻¹)	3,23

Os resultados para o perfil de fermentação e as perdas fermentativas de silagem de espiga (snaplage) em função do uso de inoculante e tempos de estocagem são apresentadas na Tabela 2. As concentrações de MS (%) foram afetadas pelo tempo de estocagem ($P=0,006$). Não foram observados efeitos do uso do inoculante ($P=0,670$) e interação inoculante x tempo de estocagem sobre esse parâmetro ($P=0,374$). Houve interação entre inoculante x tempo de estocagem para os valores de pH ($P < 0,001$). Os menores valores de pH foram observados em silagens do grupo controle, estocadas por 120 dias (pH= 3,67). As concentrações de N-NH₃ (% MS) foram afetadas pelo uso do inoculante ($P < 0,001$) e pelo tempo de estocagem ($P = 0,048$). Silagem controle apresentou menor concentrações médias de N-NH₃ (0,13% da MS) em relação ao grupo inoculado (0,15% da MS). Maiores concentrações de N-NH₃ foram observadas em Snaplage estocadas por 120 dias (0,17% da MS).

O Uso de inoculante afetou as concentrações do ac. láctico ($P < 0,001$). Os diferentes tempos de estocagem também alteraram as concentrações deste produto ($P = 0,020$). Snaplage inoculadas com LB e LH apresentaram menores concentrações de ác. Láctico (4,32% da MS) em relação ao controle (5,43% da MS). Silagens estocadas por 120 dias apresentaram maiores concentrações de ácido láctico (5,27% da MS) comparados aos demais tempos de estocagem. Foram observadas interações entre uso do inoculante x tempo de estocagem para a produção de ácido acético, ácido propiônico e para 1,2 propanodiol ($P = 0,015$; $P < 0,001$ e $P < 0,001$, respectivamente). Maiores concentrações de ácido acético e 1,2 propanodiol foram observadas em silagens inoculadas com LB+LH e estocadas por 120 dias (1,48% e 0,40% da MS, respectivamente). A concentração de etanol foi afetada apenas pelo uso do inoculante ($P < 0,001$).

Com relação as perdas gasosas, as mesmas foram afetadas apenas pelo tempo de estocagem ($P < 0,001$). Snaplage armazenadas por 30 dias apresentaram menores perdas (0,66 %) em relação a silagens armazenadas por 60 (0,78%) ou 120 dias (1,06%).

Tabela 2 - Efeitos da adição de inoculante e tempos de estocagem sobre o perfil fermentativo de Snaplage.

Tempo estocagem	Inoculante		Média	EPM ¹	P- Valor		
	Controle	Inoculado			I ²	T ³	I * T ⁴
Matéria seca (%)							
30	60,9	60,8	60,8 a	0,166	0,67	0,0062	0,3744
60	59,7	60,0	59,8 b				
120	60,8	60,3	60,5 ab				
Média	60,4	60,3					
pH							
30	3,77 Aa	3,78 Ab	3,77	0,007	<0,0001	0,0004	<0,0001
60	3,76 Ba	3,88 Aa	3,82				
120	3,67 Bb	3,85 Aa	3,76				
Média	3,73	3,84					
N-NH ₃ (% MS)							
30	0,09	0,11	0,10 c	0,005	0,048	<0,0001	0,932
60	0,14	0,15	0,14 b				
120	0,16	0,18	0,17 a				
Média	0,13 B	0,15 A					
Ácido láctico (% MS)							
30	5,31	4,10	4,71 ab	0,132	<0,0001	0,020	0,488
60	5,05	4,25	4,65 b				
120	5,93	4,60	5,27 a				
Média	5,43 A	4,32 B					
Ácido acético (% MS)							
30	0,46 Ab	0,69 Ba	0,57 b	0,058	<0,0001	0,0001	0,0155
60	0,38 Ab	1,01 Ba	0,70 b				
120	0,63 Ab	1,48 Aa	1,05 a				
Média	0,49 B	1,06 A					
Ácido propiônico (% MS)							
30	0,05 Aa	0,12 Ba	0,14 a	0,008	<0,0001	0,0008	<0,0001
60	0,0	0,19 Aa	0,09 b				
120	0,0	0,15 Aa	0,07 b				
Média	0,02 B	0,16 A					
Etanol (% MS)							
30	0,0	0,87	0,43	0,036	<0,0001	0,2542	0,2542
60	0,0	0,94	0,47				
120	0,0	0,73	0,36				
Média	0,0 B	0,85 A					
1,2 propanodiol (% MS)							
30	0,0	0,14 Ba	0,07 b	0,037	<0,0001	<0,0001	<0,0001
60	0,0	0,34 Aa	0,17 a				
120	0,0	0,40 Aa	0,20 a				
Média	0,0 B	0,29 A					
Perdas gasosas (%)							
30	0,73	0,60	0,66 c	0,021	0,069	<0,0001	0,3425
60	0,79	0,78	0,78 b				
120	1,09	1,05	1,06 a				
Média	0,86	0,81					

¹EPM: Erro padrão da média; ²Inoculante; ³Tempo; ⁴Interação. Médias com letras minúsculas diferem quanto ao tempo e maiúsculas quanto ao inoculante ($P < 0,05$).

Os resultados do perfil microbiológico, estabilidade aeróbia, concentração de amido e degradabilidade do amido de snaplage inoculadas ou não, em função dos diferentes tempos de estocagem, são apresentados na Tabela 3.

A população de BAL (log UFC.g⁻¹), foi afetada apenas pelo uso do inoculante ($P < 0,001$). Maiores populações de bactérias do ácido lático foram observadas em silagens com adição do inoculante em relação ao grupo controle (7,16 vs. 5,32 log UFC/g). O tempo de estocagem e o uso de inoculante não afetaram a contagem de leveduras e fungos filamentosos, com contagem < 2 log UFC/g.

O uso de inoculante e os diferentes tempos de estocagem afetaram a estabilidade aeróbia da snaplage ($P < 0,001$). Snaplage armazenadas por 120 dias apresentaram estabilidade superior (135h) aos materiais armazenados por 30 (56h) e 60 dias (83h). Silagens inoculadas com LB + LH apresentaram valores de estabilidade aeróbia superior ao grupo controle (120h vs. 63h). Em relação a deterioração aeróbia, esse parâmetro também foi afetado pelo uso de inoculantes ($P < 0,001$) e pelo tempo de estocagem ($P = 0,023$). Maiores acúmulos de temperatura foram observados em silagens controle em relação às inoculadas (16,7°C vs. 5,55°C).

As concentrações de amido (% MS) não foram afetadas pelo uso do inoculante, tempo de estocagem ou pela interação desses fatores ($P \geq 0,05$). Em relação a degradabilidade do amido (7h), foram observadas interações entre o uso de inoculante x tempo de estocagem ($P = 0,023$). Snaplage inoculadas com LB e LH armazenadas por 60 e 120 dias apresentaram degradabilidade do amido (7h) superior a snaplage sem uso do inoculante (91,5 e 91%; respectivamente), armazenadas por 60 e 120 dias (82,5 e 83,1%; respectivamente).

Tabela 3 - População microbiana, estabilidade aeróbia, concentração de amido e degradabilidade do amido de snaplage inoculadas e estocadas por diferentes tempos.

Tempo de estocagem	Inoculante		Média	EPM ¹	P- Valor		
	Controle	Inoculado			I2	T3	I* T ⁴
BAL (log UFC.g ⁻¹)							
30	5,00	6,95	5,98				
60	5,47	7,41	6,44	0,14	<0,0001	0,1707	0,75 05
120	5,49	7,11	6,30				
Média	5,32 B	7,16 A					
Estabilidade aeróbia (h)							
30	38	74	56 c				
60	49	117	83 b	6,25	<0,0001	<0,0001	0,27 80
120	102	168	135 a				
Média	63 B	120 A					
Deterioração (°C)							
30	16,9	11,0	13,9 a				
60	18,6	5,62	12,1 ab	1,35	<0,0001	0,0236	0,16 08
120	14,6	0,0	7,31 b				
Média	16,7 A	5,55 B					
Amido (% MS)							
30	53,3	50,0	51,6				
60	50,7	53,3	52,0	0,844	0,389	0,486	0,082
120	53,8	52,2	53,0				
Média	52,6	51,8					
Degradabilidade do amido 7h (%) ⁵							
30	80,8 Aa	78,1 Ba	79,5 b				
60	82,5 Ab	91,5 Aa	87,0 a	0,016	0,016	0,001	0,023
120	83,1 Ab	91,0 Aa	87,1 a				
Média	82,1 B	86,9 A					

¹EPM = Erro padrão da média; ²Efeito do uso do inoculante; ³Efeito do tempo de estocagem; ⁴Efeito da interação inoculante x tempo de estocagem; ⁵Degradabilidade *in situ* do amido por 7 horas. Médias com diferentes letras minúsculas diferem quanto ao tempo de estocagem ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras maiúsculas diferem quanto ao uso do inoculante ($P < 0,05$).

Os resultados do fracionamento proteico de snaplage inoculadas ou não em função dos diferentes tempos de estocagem são apresentados na Tabela 4.

Foram observadas interações entre inoculante x tempo de estocagem para a fração A da proteína ($P = 0,023$). Snaplage inoculada com LB+LH, armazenadas por 60 e 120 dias, apresentaram maiores valores da fração A (55,41% e 55,55%), em comparação ao grupo controle, estocadas pelo mesmo período (47,37% e 50,23%,

respectivamente). Em relação a fração B1 da proteína, não foram observados efeitos do uso de inoculante ($P = 0,764$), do tempo de estocagem ($P = 0,396$), ou interação desses fatores ($P = 0,925$). O uso de inoculante afetou a fração B2, sendo observados maiores valores no grupo controle (41,63%) em comparação à silagens inoculadas (38,36%). O tempo de estocagem afetou a fração B2 ($P = 0,012$), a fração B3 ($P < 0,001$) e a fração C ($P < 0,001$). Maiores tempos de estocagem reduzem as frações B1, B2, B3 e C.

Tabela 4 - Fracionamento proteico de snaplage em função do uso de inoculante e tempos de estocagem

Tempo de estocagem	Inoculante		Média	EPM ¹	P-Valor		
	Controle	Inoculado			I ²	T ³	I * T ⁴
A (% de PB)							
0	24,92 Ab	23,55 Ac	24,24	1,65	<0,0001	<0,0001	0,0231
30	44,37 Aa	43,63 Ab	44,00				
60	47,37 Ba	55,41 Aa	51,76				
120	50,23 Aa	55,55 Aa	52,82				
Média	41,87	44,54					
B1 (% de PB)							
0	4,46	5,09	4,77	0,18	0,7644	0,3964	0,9205
30	4,10	3,87	3,99				
60	4,41	3,97	4,19				
120	3,44	2,62	3,03				
Média	4,10	3,89					
B2 (% de PB)							
0	51,85	47,59	49,72 c	1,77	<0,0001	0,0125	0,4865
30	40,43	40,21	40,32 b				
60	37,74	32,18	34,96 a				
120	36,51	33,45	34,98 a				
Média	41,63 B	38,36 A					
B3 (% de PB)							
0	9,23	11,64	10,43 b	1,04	0,6697	<0,0001	0,1534
30	5,26	6,91	6,08 a				
60	4,83	3,63	4,23 a				
120	4,88	3,29	4,08 a				
Média	6,05	6,36					
C (% de PB)							
0	9,14	9,21	9,18 c	0,12	0,8070	<0,0001	0,8961
30	6,93	6,47	6,70 b				
60	5,04	4,65	4,84 a				
120	4,93	5,21	5,07ab				
Média	6,39	6,51					

¹EPM = Erro padrão da média; ²Efeito do uso do inoculante; ³Efeito do tempo de estocagem; ⁴Efeito da interação inoculante x tempo de estocagem. Médias com diferentes letras minúsculas diferem quanto ao tempo de estocagem ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras maiúsculas diferem quanto ao uso do inoculante ($P < 0,05$).

Experimento 2

As características do milho grão úmido antes da ensilagem são apresentadas na Tabela 5. No momento de ensilagem, o material apresentou em torno de 34,9% de umidade, 11,75% de FDN, 68,2% de amido e 9,1% de PB, com granulometria média de 0,978 mm.

Tabela 5 - Composição química, população microbiológica e diâmetro geométrico médio de grãos úmidos no momento da ensilagem.

Item	Média ± DP
MS (%)	66,1 ± 0,69
FDN (% MS)	11,7 ± 0,21
Amido (% MS)	68,2 ± 2,6
PB (% MS)	9,1 ± 0,18
BAL (log UFC/g)	5,3 ± 0,17
Leveduras (log UFC/g)	5,6 ± 0,13
Fungos (log UFC/g)	6,1 ± 0,11
DGM (mm)	0,978 ± 0,019

Os dados do perfil de fermentação das silagens de grãos úmidos em função dos tipos de inoculantes e tempos de estocagem são apresentados na Tabela 6. As concentrações de MS não foram afetadas pelo uso dos diferentes inoculantes ($P = 0,202$), pelo tempo de estocagem ($P = 0,528$) ou pela interação inoculante x tempo de estocagem ($P = 0,485$). Em relação aos valores de pH, foram observados apenas efeitos do uso do inoculante ($P = 0,056$). Silagens de grãos úmidos inoculadas com LB apresentaram menores valores de pH (pH= 3,99) em relação aos demais tratamentos. As concentrações de N-NH₃ (% MS) foram modificadas pelo uso de inoculante ($P < 0,001$) e pelos diferentes tempos de estocagem ($P = 0,007$). As maiores concentrações de N-NH₃ foram verificadas em silagens de grão úmido inoculadas com LBLHP. Os valores de N-NH₃ (% MS) aumentaram de forma contínua entre os tempos de estocagem. Maiores concentrações de N-NH₃ foram observadas em silagens armazenadas por 120 dias (0,20 % da MS) e por 150 dias (0,22% da MS).

Foram observadas interações entre inoculante x tempo de estocagem para as concentrações de ácido láctico ($P = 0,054$). Silagens de grãos úmidos inoculadas com LBLHPE, LBLH e LBLHP, estocadas por 150 dias apresentaram uma maior concentração de ácido láctico (3,04; 3,48 e 3,08% da MS, respectivamente). O uso dos

diferentes tipos de inoculante e os tempos de estocagem afetaram as concentrações de ácido acético ($P < 0,001$ e $P < 0,001$), assim como as concentrações de 1,2 propanodiol ($P < 0,002$ e $P = 0,002$), respectivamente. Na média, silagens de grãos úmidos inoculadas com LBLH tiveram maiores concentrações de ácido acético (1,94% da MS) e de 1,2 propanodiol (0,89% da MS). Em relação aos tempos de estocagem, silagens de grãos úmidos estocadas por 120 e 150 dias também tiveram maiores concentrações desses produtos finais da fermentação.

As perdas gasosas não foram afetadas pelo uso de inoculantes ($P = 0,057$) e sim pelo tempo de estocagem ($P < 0,001$). Silagens de grãos úmidos estocadas por 150 dias apresentam perdas superiores (0,99%), seguidas pelos materiais armazenados 60 dias (0,63%) e por aqueles armazenados por 30 dias (0,45%).

Tabela 6 - Perfil fermentativo de silagens de grão úmido inoculadas e estocadas por diferentes tempos.

(Continua)

Tempo De estocagem (d)	Inoculante					Média	EPM ¹	I ²	T ³	IxT ⁴
	Controle	LB	LBLH	LBLHP	LBLHPE					
MS (%)										
30	65,4	66,0	65,6	65,7	65,7	65,7	0,7069	0,2020	0,5288	0,4857
60	65,8	65,5	65,9	65,9	65,6	65,8				
120	65,4	65,7	66,7	66,4	66,0	66,1				
150	64,0	67,0	66,5	65,4	64,0	65,4				
Média	65,2	66,1	66,2	65,8	65,3					
pH										
30	3,97	4,01	3,99	4,00	4,09	4,01	0,0391	0,0561	0,3244	0,5875
60	4,04	4,00	4,09	4,07	4,09	4,06				
120	4,04	4,03	4,02	4,03	4,03	4,03				
150	4,05	3,93	4,03	4,03	4,11	4,03				
Média	4,02AB	3,99A	4,03AB	4,03AB	4,08B					
N-NH3 (%MS)										
30	0,08	0,21	0,16	0,26	0,08	0,15b	0,0251	<0,001	0,0007	0,6189
60	0,09	0,23	0,25	0,29	0,09	0,19ab				
120	0,10	0,26	0,25	0,29	0,11	0,20a				
150	0,11	0,27	0,26	0,37	0,11	0,22a				
Média	0,09C	0,24B	0,23B	0,30A	0,10C					

Tabela 6 - Perfil fermentativo de silagens de grão úmido inoculadas e estocadas por diferentes tempos.

(Continuação)

Ácido láctico (% MS)										
30	2,47Aa	2,20Ba	2,20Ba	2,33Ba	2,37Ba	2,31	0,1660	0,1329	<0,0001	0,0544
60	2,47Aa	2,30ABa	2,32Ba	2,40Ba	2,80ABa	2,45				
120	2,55Aa	2,81ABa	2,38Ba	2,40Ba	3,03Aa	2,63				
150	2,85Aab	2,82Ab	3,48Aa	3,08Aab	3,04Aab	3,05				
Média	2,58	2,53	2,59	2,55	2,81					
Ácido acético (% MS)										
30	0,53	0,63	1,52	1,09	1,03	0,96c	0,0524	<0,0001	<0,0001	0,1468
60	0,53	0,83	1,74	1,12	1,41	1,13bc				
120	0,57	1,02	2,23	1,22	1,43	1,29ab				
150	0,59	1,20	2,26	1,44	1,45	1,39a				
Média	0,55D	0,92C	1,94A	1,22B	1,33B					
1,2-Propanodiol (% MS)										
30	0,03	0,10	0,85	0,24	0,30	0,30b	0,097	<0,0001	0,0028	0,7611
60	0,03	0,23	0,85	0,30	0,46	0,37ab				
120	0,04	0,31	0,92	0,48	0,66	0,48a				
150	0,04	0,36	0,95	0,64	0,60	0,52a				
Média	0,03D	0,25C	0,89A	0,41BC	0,50B					
Perdas gasosas (%)										
30	0,40	0,40	0,52	0,44	0,50	0,45b	0,1285	0,0575	<0,0001	0,9878
60	0,56	0,57	0,69	0,62	0,74	0,63b				
120	0,72	0,77	1,03	1,02	1,03	0,91a				
150	0,79	0,92	1,04	1,18	1,05	0,99a				
Média	0,62	0,66	0,82	0,81	0,83					

¹EPM = Erro padrão da média; ²Efeito do uso do inoculante; ³Efeito do tempo de estocagem; ⁴Efeito da interação inoculante x tempo de estocagem. Médias com diferentes letras minúsculas diferem quanto ao tempo de estocagem ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras maiúsculas diferem quanto ao uso do inoculante ($P < 0,05$).

Os resultados do perfil microbiológico das silagens de grãos úmidos em função do uso de inoculante e tempos de estocagem são apresentados na Tabela 7.

Os diferentes tipos de inoculante e tempo de estocagem afetaram a população de LAB ($P = 0,002$ e $P = 0,001$, respectivamente). Na média, silagens inoculadas com LBLH e LB apresentaram maior população de BAL (6,56 e 6,14 log UFC/g, respectivamente). Silagens de grãos úmidos estocadas por 60 dias (6,12 Log UFC/g); 120 dias (6,32 log UFC/g) e por 150 dias (6,41 log UFC/g) apresentaram população de BAL superior aos materiais estocados por 30 dias (5,75 log UFC/g). O tempo de estocagem e o uso de inoculante não afetaram a contagem de leveduras e fungos filamentosos, apresentando contagem < 2 log UFC/g.

Tabela 7 - Efeito do uso de inoculante e tempo de estocagem sobre a população microbiana de silagens de grão úmido.

Tempo de estocagem (d)	Inoculante					Média	EPM ¹	I ²	T ³	I x T ⁴
	Controle	LB	LBLH	LBLHP	LBLHPE					
	LAB (log UFC.g ⁻¹)									
30	5,66	5,62	6,46	5,31	5,68	5,75b	0,2740	0,0024	0,0013	0,9742
60	6,06	6,09	6,47	5,98	6,02	6,12ab				
120	6,08	6,38	6,71	6,25	6,18	6,32a				
150	6,24	6,47	6,59	6,44	6,31	6,41a				
Média	6,01B	6,14AB	6,56A	5,99B	6,05B					

¹EPM = Erro padrão da média; ²Efeito do uso do inoculante; ³Efeito do tempo de estocagem; ⁴Efeito da interação inoculante x tempo de estocagem. Médias com diferentes letras minúsculas diferem quanto ao tempo de estocagem ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras maiúsculas diferem quanto ao uso do inoculante ($P < 0,05$).

Os dados de estabilidade e deterioração aeróbia são apresentados na Tabela 8. O uso de inoculantes e o tempo de estocagem afetaram a estabilidade aeróbia ($P < 0,001$) e o pico de temperatura durante o teste de estabilidade de silagens de grão úmido ($P < 0,001$). Em termos do uso de inoculantes, ambas as silagens tratadas com LBLHPE, LBLH, LBLHP, e LB apresentaram estabilidade similares, próximas a 200h, e superiores ao grupo controle (130h). Além disso, silagens de grãos úmidos estocadas por mais de 120 dias apresentam estabilidade maior que 200h. Os maiores picos de temperatura avaliados durante o teste de estabilidade foram verificados em silagens do grupo controle ($39,6^\circ$). Silagens de grão úmido do grupo controle estocadas por 30 dias, apresentam maior pico de temperatura durante a exposição ao oxigênio, em relação as demais tratamentos ($32,6^\circ$). Foram observadas interações entre inoculante x tempo de estocagem, para os valores de pH após a exposição aeróbia ($P < 0,001$). Maiores valores de pH após a exposição aeróbia foram observados no controle, e estocados por 30 dias (pH= 6,10).

Tabela 8 - Efeito do uso de inoculante e diferentes tempos de estocagem sobre a estabilidade aeróbia em silagens de grão úmido.

Tempo de estocagem (d)	Inoculante					Média	EPM ¹	I ²	T ³	I x T ⁴
	Controle	LB	LBLH	LBLHP	LBLHPE					
Estabilidade aeróbica (h)										
30	87	128	164	165	148	138c	10,13	<0,0001	<0,0001	0,1445
60	124	158	167	161	167	155b				
120	160	>240	>240	>240	>240	221a				
150	160	>240	>240	>240	>240	224a				
Média	130B	191A	202A	201A	199A					
Pico de temperatura (°C)										
30	48,1	29,5	27,7	28,3	29,3	32,6a	1,960	<0,0001	<0,0001	0,1209
60	39,1	21,1	26,3	27,1	26,3	28,0b				
120	33,5	24,1	23,6	25,6	25,6	26,5b				
150	37,7	25,6	23,9	28,1	25,2	28,1b				
Média	39,6A	25,1B	25,4B	27,3B	26,6B					
pH após exposição aeróbica										
30	6,10Aa	5,00Ba	3,99Ba	3,97Bb	4,26Ba	4,66	0,2739	<0,0001	0,0001	0,0005
60	5,41Ab	4,04Ba	4,07Ba	4,11Bab	4,07Ba	4,14				
120	5,33Ab	4,03Ba	4,03Ba	4,03Bab	4,10Ba	4,30				
150	5,84Aab	4,08Ba	4,50Ba	5,03Ba	4,13Ba	4,91				
Média	5,67	4,29	4,15	4,29	4,14					

¹EPM = Erro padrão da média; ²Efeito do uso do inoculante; ³Efeito do tempo de estocagem; ⁴Efeito da interação inoculante x tempo de estocagem. Médias com diferentes letras minúsculas diferem quanto ao tempo de estocagem ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras maiúsculas diferem quanto ao uso do inoculante ($P < 0,05$).

Os dados do fracionamento proteico e a degradabilidade do amido em função do uso de inoculante e dos tempos de estocagem são apresentados na Tabela 9. O uso de inoculante e os tempos de estocagem alteraram a fração A1 da proteína ($P < 0,001$ e $P = 0,023$, respectivamente). Silagens de grão úmido inoculada com LBLH, LBLHP e LB apresentaram maiores valores da fração A da proteína (0,10%; 0,13% e 0,10%, respectivamente). Por outro lado, a fração A2 não foi afetada pelo uso do inoculante, pelos tempos de estocagem, ou pela interação entre esses fatores ($P > 0,05$). Em relação a fração B da proteína, ambas as frações B1 e B2 foram afetadas pelo uso do inoculante ($P < 0,001$) e pelos tempos de estocagem ($P < 0,001$). O uso do LBLHP aumentou a fração B2 em relação aos demais inoculante. Entre os tempos de estocagem, no intervalo de 30 para 60 dias, houve um aumento de quase 10% na fração B1. Após 60 dias de estocagem, os valores da fração B1 se mantiveram constantes entre os tempos de estocagem. A fração C também foi afetada pelo uso dos diferentes tipos de inoculantes ($P < 0,001$) e pelo tempo de estocagem ($P < 0,001$). Houve uma redução da fração C, conforme o aumento dos tempos de estocagem, saindo de 0,36% após 30 dias de estocagem, reduzindo para 0,25% aos 150 dias de estocagem. A degradabilidade do amido foi alterada apenas pelo tempo de estocagem ($P < 0,001$). Aos 30 dias de estocagem, os valores de degradabilidade do amido saltaram de 58,4% para 76,4% quando os materiais ficaram estocados por 150 dias.

Tabela 9 - Efeito do uso de inoculante e do tempo de estocagem sobre o fracionamento proteico e a degradabilidade do amido de silagens de grãos úmido.

Tempo de armazenamento (d)	Inoculante					Média	EPM ¹	F ²	T ³	I x T ⁴
	Controle	LB	LBLH	LBLHP	LBLHPE					
(Contiua)										
A1 (% de PB)										
30	0,04	0,09	0,08	0,13	0,04	0,07b	0,0023	<0,0001	0,0235	0,9670
60	0,04	0,09	0,09	0,12	0,04	0,08ab				
120	0,05	0,11	0,12	0,12	0,05	0,09ab				
150	0,04	0,12	0,13	0,16	0,05	0,1a				
Média	0,04B	0,10A	0,10A	0,13A	0,04B					
A2 (% de PB)										
30	48,5	45,5	53,8	49,5	52,4	49,9	0,0289	0,3554	0,0803	0,9584
60	47,8	42,5	41,5	41,6	45,1	43,7				
120	48,3	44,0	42,5	40,5	48,0	44,7				
150	43,4	43,4	42,2	42,9	48,4	44,1				
Média	47,0	43,9	45,0	43,6	48,5					
B1 (% de PB)										
30	47,3	51,6	41,4	47,5	43,6	46,3b	0,0279	0,0007	<0,0001	0,6853
60	49,1	54,4	52,7	54,9	47,2	51,7a				
120	49,4	54,8	53,3	55,2	49,2	52,4a				
150	52,6	54,5	53,9	55,1	49,1	53,7a				
Média	49,6AB	53,8A	50,3AB	53,2A	47,3B					
B2 (% de PB)										
30	3,8	2,1	4,3	3,0	3,6	3,3b	0,0028	<0,0001	0,0006	0,6381
60	2,0	1,6	3,4	2,8	3,7	2,7ab				
120	2,3	1,1	3,5	2,1	2,8	2,3a				
150	2,2	1,4	3,7	1,9	2,3	2,3a				
Média	2,6B	1,5A	3,7C	2,4B	3,1B					

Tabela 9 - Efeito do uso de inoculante e do tempo de estocagem sobre o fracionamento proteico e a degradabilidade do amido de silagens de grãos úmido.

(Continuação)

C (% de PB)										
30	0,56	0,27	0,31	0,28	0,30	0,36c	0,0025	<0,0001	<0,0001	0,6638
60	0,50	0,22	0,26	0,27	0,28	0,30bc				
120	0,39	0,21	0,24	0,25	0,25	0,26ab				
150	0,35	0,21	0,23	0,21	0,23	0,25a				
Média	0,45B	0,26A	0,26A	0,25A	0,26A					
Degradabilidade do amido por 7 h (% de amido)										
30	57,5	58,5	59,3	61,1	55,4	58,4c	4,21	0,84	<0,0001	0,880
60	66,1	58,8	60,8	61,7	60,5	61,6c				
120	69,6	73,1	71,0	68,9	68,0	70,1b				
150	69,1	76,8	80,7	77,1	78,2	76,4a				
Média	65,6	66,8	68,0	67,2	65,5					

¹EPM = Erro padrão da média; ²Efeito do uso do inoculante; ³Efeito do tempo de estocagem; ⁴Efeito da interação inoculante x tempo de estocagem.

Médias com diferentes letras minúsculas diferem quanto ao tempo de estocagem ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras maiúsculas diferem quanto ao uso do inoculante ($P < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Após abertura, pequenas modificações quanto aos teores de MS do snaplage e da silagem de grão úmido foram observados em relação aos teores iniciais de MS. Diferenças na ordem 1% a 2% entre o teor de MS inicial e na abertura dos silos já são esperadas, em função dos processos fermentativos e de perdas atrelados a microrganismos presentes no processo de conservação (Mc DONALD *et al.*, 1991). Ambas as silagens foram bem conservadas, dado as faixas de pH, produtos finais da fermentação e porcentagem de perdas observados em ambos experimentos (Tabela 2 e Tabela 6). Numericamente, as faixas de pH encontradas no snaplage, foram mais baixas que no grão úmido. Os teores de umidade desses materiais podem ter afetado esse parâmetro (Da SILVA, *et al.*, 2022). Snaplage foram conservados com um pouco mais de umidade, aproximadamente 40%, enquanto que os grãos úmidos foram colhidos com uma umidade média de 35% (Tabela 1 e Tabela 5).

Em ambas as silagens; snaplage e silagens de grãos úmidos, o uso do LB e LH combinado, promoveu aumentos sobre as concentrações de ácido acético e ácido propiônico (Tabela 2 e Tabela 6). O uso do LBLH mais que triplicou as concentrações de ácido acético e de 1,2 propanodiol em silagem de grãos úmidos (Experimento 2, Tabela 6). Comportamento semelhante foram observados quando esse mesmo tipo de inoculante foi usado no snaplage (Experimento 1). Quando inoculadas de forma combinada, as cepas desses microrganismos produzem compostos antifúngicos, como o ácido acético e o ácido propiônico, os quais são capazes de aumentar a estabilidade aeróbia (FERRERO *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2021). Ambas classificadas como bactérias heterofermentativas obrigatórias, o LB e LH, em suas rotas de fermentação de carboidratos, usam a via da pentose fosfocetolase (PPK), produzindo quantidades equimolares de CO₂, lactato, acetato e etanol (SPECTOR, 2009). Além da produção de ácido láctico, e ácido acético pelas vias fermentativas, esses microrganismos também podem produzir ácido acético e 1,2 propanodiol a partir do metabolismo anaeróbico do ácido láctico e o 1,2 propanodiol. A depender da presença de certos grupos de bactérias, o 1,2 propanodiol pode ser convertido em ácido propiônico (KROONEMAN *et al.*, 2002).

Além do efeito do uso dos inoculantes, o tempo de estocagem também intensificou as concentrações de ácido acético e de 1,2 propanodiol, em ambos os tipos

de silagens. Ao longo do tempo de estocagem, os processos de conversão do ácido láctico em ácido acético e 1,2 propanodiol são intensificados, principalmente após 30 a 60 dias (MUCK *et al.*, 2018). Além da produção desses compostos intensificados com o tempo, as perdas de MS de ambas silagens, snaplage e grão úmido, também foram incrementadas com o tempo de estocagem, o que igualmente pode estar relacionado ao metabolismo de heterofermentativas obrigatórias, que pelas vias de fermentação também produzem CO₂ (OUDE ELFERINK *et al.*, 2001).

Com relação a população de microrganismos no snapalage, houve uma redução na população de leveduras tanto pelo uso de LB+LH como pelo tempo de estocagem (Tabela 3). As maiores concentrações de ácido acético em silagens inoculadas podem ter contribuído para redução da população de leveduras no snaplage. Em quantidades satisfatórias, o ácido acético é um ácido fraco com capacidade de inibição do crescimento desses microrganismos (KLEINSCHMIT, KUNG; 2006; WILKSON, DAVES; 2013), os quais são os principais iniciadores do processo de deterioração aeróbia (PAHLOW *et al.*, 2003). Já no segundo experimento, a contagem de levedura se manteve baixa, independente do uso de inoculante (<2 Log/UFC). A contagem de BAL no snaplage (experimento 1) foi superior a contagem de BAL no tratamento controle, o que possivelmente pode estar relacionado com o uso do inoculante. No entanto, na silagem de grãos úmidos, a população de BAL, pouco foi afetada pelo uso do inoculante (Tabela 7), mesmo naqueles tratamentos com adição de enzima (Platinum-*L. buchneri*, *L. plantarum*, *P. pediococcus* e *xylanase*). A adição de enzimas em inoculantes tem por objetivo aumentar a disponibilidade de açúcares, e por consequência aumentar a população de BAL (BENJAMIM DA SILVA, *et al.*, 2024). No entanto, poucos efeitos sobre o crescimento de BAL foram observados no segundo experimento.

Em ambos os experimentos, o uso de LB+LH possibilitou o aumento da estabilidade aeróbia (Tabela 3 e Tabela 8). Após os primeiros 30 dias de estocagem, já foi possível observar os efeitos de prolongamento da estabilidade aeróbia, em ambos os tipos de silagens. Resultados semelhantes foram observados por Da silva *et al.*, (2021). Os autores observaram valores de estabilidade superior a 250 horas, após 30 dias de estocagem em silagens de grãos úmidos inoculadas com LB+ LH. No experimento 2, as diferentes estratégias de uso do inoculante pouco afetaram a estabilidade aeróbia após 120 dias de estocagem. No entanto, nos primeiros 30 e 60 dias, o uso do LBLH e LBLHP foi mais eficiente que o uso exclusivo do LB.

Assim como o aumento da estabilidade, as silagens inoculadas também apresentaram menor deterioração aeróbia. O acúmulo de temperatura em silagens não tratadas com inoculantes foi cerca de 50% maior aos materiais tratados (Experimento 1, Tabela 3). Em concordância, no experimento 2, silagens de grãos úmidos não tratadas tiveram maiores picos de temperatura, e maiores valores de pH após a exposição aeróbia (Tabela 8). No processo de deterioração, substratos como açúcares residuais e lactato são oxidados a CO₂, água e calor, principalmente por leveduras, resultando em aumento do pH, aumento da temperatura e no crescimento de outros microrganismos (ROOKE e HATFIELD., 2003).

Snaplage inoculadas com LB+LH apresentaram maior degradabilidade do amido (Tabela 3). No entanto, esse mesmo efeito não foi observado em silagens de grãos úmidos, no experimento 2. Alguns estudos têm apontado o potencial de aumento da digestibilidade do amido quando o LB+ LH são inoculados de forma conjunta em silagens (DROUIN *et al.*, 2023; ALMEIDA, 2024). Os aumentos da digestibilidade do amido, geralmente, estão relacionados com a atividade proteolítica, os quais são observados pelo aumento da solubilidade da proteína e pelo aumento dos níveis de nitrogênio amoniacal (FERRARETTO *et al.*, 2014). Em concordância com os resultados do aumento da degradabilidade do amido na ordem de quase 6% nos materiais inoculados, também foram observados aumentos na fração A da proteína (Tabela 4) e nas concentrações de N-NH₃ (Tabela 2). No silo, inicialmente a hidrólise das ligações peptídicas libera aminoácidos e peptídeos, e por ação de endopeptidases, as ligações entre as cadeias polipeptídicas são quebradas. Os aminoácidos liberados são deaminados, formando uma série de produtos finais, o qual dentre eles temos a formação de N-NH₃ e aminas (ROOKE e HATFIELD; 2003).

Os resultados encontrados por Da Silva *et al.*, (2018), mostraram que o uso de LB também pode ter efeito sobre a degradação de prolaminas e sobre o aumento da digestibilidade *in situ* da MS de silagens de grãos reidratados. A queda brusca do pH associado ao acúmulo de ácidos orgânicos promovido pela adição de inoculantes podem aumentar a solubilização das zeínas e melhorar a digestibilidade do amido. Tem sido observado, os mecanismos pelos quais o uso de LH também promovem esse efeito.

Embora não foram observados efeitos do uso dos diferentes inoculantes sobre a degradabilidade do amido no experimento 2, o uso do LBLHP e LB promoveram incrementos tanto na concentração de nitrogênio amoniacal, na fração A1 e na fração B1 (Tabela 9). No entanto, no primeiro experimento, somente foram observados efeitos

do tempo de estocagem sobre esse parâmetro. De acordo Kung *et al.*, (2018) os efeitos lineares sobre a digestibilidade do amido ruminal ocorrem em função dos mecanismos relacionados com a solubilização e a degradação das subunidades de zeínas, que são contínuos durante a estocagem do material, com maior atividade proteolítica por ação dos microrganismos ou pelas proteases, no início da fermentação, podendo se estender ao longo de processos de estocagem por mais de 360 dias.

6 CONCLUSÃO

O uso LB e suas combinações com LH modificam o perfil de fermentação tanto no snaplage e na silagem de grão úmido, aumentando a produção de ácido acético e 1,2 propanodiol, resultando em silagens mais estáveis e com menor intensidade de deterioração, mesmo em tempos de aberturas mais curtos. O uso de LH+LB modifica as frações proteicas do snaplage e proporciona silagens com maiores digestibilidade do amido. Em silagens de grãos úmidos, o uso do LBLHP e LB promoveu incrementos tanto na concentração de nitrogênio amoniacal, na fração A1 e na fração B1.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**, 15th ed. Arlington, VA, USA: AOAC International, 1990.
- ALMEIDA, S. T. **Utilization of reconstituted corn grain silage in supplements for finishing beef cattle on pasture: evaluation of supplement aerobic stability and cattle performance**. 2024. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2024.
- ÁVILA, C.L.S. et al The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. **Journal of Dairy Science**, v.97, n.2, p .940 – 951, 2014.
- ÁVILA, C. L. S. and CARVALHO, B. F. Silage fermentation—updates focusing on the performance of micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 4, p. 966-984, 2019.
- BERNARDES, T; CASTRO, T and DA LUZ, M. PSVIII-B-11 Grain Processing Methods and Fiber Sources in the Brazilian Beef Feedlots. **Journal os Anim Science**, v.100, n. 3, p. 315-316, 2022.
- BERNARDES, T. F. and RÊGO, A. C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1852 - 1861, 2014.
- CONAGHAN, P.; O'KIELY, P and O'MARA, F. P. Conservation characteristics of wilted perennial ryegrass silage made using biological or chemical additives. **Journal of Dairy Science**, v.93, p. 628–643, 2010.
- CORRIGAN, M. E.; et al. Effect of corn processing method and corn wet distillers grains plus solubles inclusion level in finishing steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, p. 3351–3362, 2009.
- COSTA, D. M. et al. New epiphytic strains of lactic acid bacteria improve the conservation of corn silage harvested at late maturity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 274, april 2021.
- DA SILVA, E. B., et al. Effects of *Lactobacillus hilgardii* 4785 and *Lactobacillus buchneri* 40788 on the bacterial community, fermentation and aerobic stability of high-moisture corn silage. **Journal Applied Microbiology**, v.130, p. 1481–1493, 2021.
- DA SILVA, E. B., et al. Effect of dry matter content on the microbial community and on the effectiveness of a microbial inoculant to improve the aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 105, p. 5024–5043, 2022.
- DA SILVA, N. C. et al. Influence of storage length and inoculation with *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of high high-moisture corn and rehydrated corn grain silage. **Animal Feed Science and. Technology**, v. 251, p. 124–133, 2019.

DA SILVA., B. E., et al. The use of *Lentilactobacillus buchneri* PJB1 and *Lactiplantibacillus plantarum* MTD1 on the ensiling of whole-plant corn silage, snaplage, and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 10, p. 883-901, 2024.

DANIEL, J. L. P., et al. Production and utilization of silages in tropical areas with focus on Brazil. **Grass and Forage Science**, v. 74, p. 188-200, 2019.

DROUIN, P.; et al. Inoculation with *Lentilactobacillus buchneri* alone or in combination with *Lentilactobacillus hilgardii* modifies gene expression, fermentation profile, and starch digestibility in high-moisture corn. **Frontiers in Microbiology**, v.14, 2023.

EUKEN, R. Corn silage and earlage nutrient analysis. **Iowa State University Animal Industry Report**, 2018.
Disponível em: <https://www.iastatedigitalpress.com/air/article/6768/galley/6633/view/>.
Acesso em: 20 jul. 2024.

FERNANDES, J.; et al. Prolonged storage offset the negative effect of vitreousness on the degradability of high moisture corn silages. In Proc. XVIIth **International Silage Conf.** June 1-3. Piracicaba, SP, Brasil, p. 564 -565, 2015.

FERRARETTO, L.F; CRUMP, P.M; SHAVER, R.D. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion, and milk production by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 533-550. 2013.

FERRARETTO, L.F; FREDIN, S.M. SHAVER RD. Influence of ensiling, exogenous protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 10, p. 7318–7327. 2015.

FERRARETTO, L. F. et al. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal Dairy Science**, v. 97, p. 3221-3227, 2014.

FERRERO, F.; PIANO, S.; TABACCO, E. and BORREANI, G. Effects of conservation period and *Lactobacillus hilgardii* inoculum on the fermentation profile and aerobic stability of whole corn and sorghum silages. **Journal Science Food Agriculture**, v. 99, p. 2530–2540, 2019.

GUSMÃO, J. O. **Optimizing the utilization of whole plant corn silage and snaplage by selection hybrids and maturities.** - 2021. Tese (Doutorado em Nutrição de Ruminantes) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

HALL, M. B. Determination of dietary starch in animal feeds and pet food by an enzymatic colorimetric method: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 98, p. 397–409, 2015.

HOFFMAN, P. C. et al. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 2465–2474, 2011.

HUNTINGTON, G. B; HARMON, D.L; RICHARDS, C.J. Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 14-24, 2006. Suplemento.

JACOVACI, F. A. et al. Effect of ensiling on the feeding value of flint corn grain for feedlot beef cattle: A meta-analysis. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 50, 2021.

JOBIM, C.C; NUSSIO, L.G; REIS, A.R; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 101-119, 2007.

JUNGES, D. et al. Contribution of proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. In: XVII INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 2015, Piracicaba. **Anais[...]**. Piracicaba: 2015. p. 566-567.

KLEINSCHMIT, D. H. and L. KUNG JR. A Meta-Analysis of the Effects of *Lactobacillus buchneri* on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn and Grass and Small-Grain Silages. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p.4005–4013, 2006.

KLEINSCHMIT, D. H.; SCHMIDT, R. J. and KUNG, L., JR. THE effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2130–2139, 2005.

KROONEMAN, J. et al. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 639–646, 2002.

KUNG JR., L., SHAVER, R.D., GRANT, R.J., and SCHMIDT, R.J. Silage review: interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 4020–4033, 2018.

KUNG JR., L.; STOKES, M. R. and LIN, C. J. Silage additives. In: BUXTON, D. R., MUCK, R. E. and HARRISON, J. H. **Silage Science and Technology**. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, 2003. p. 305-360.

KUNG, JR. L; WINDLE, M. C. and WALKER, N. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 707–712. 2014.

LAMBERT, R. J. and STRATFORD, M. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 1, p.157-164, jan. 1999.

LAWTON, J. W. Zein: A history of processing and use. **Cereal Chemistry**, v. 79, p. 1-18, 2002.

- LICITRA, G; HERNANDEZ, T. M. and VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 57, n. 4, p. 347-358, 1996.
- MAHANNA, B. Bottom line: Renewed interest in snaplage displayed. **Feedstuffs**, v. 80, n. 50, Dec. 8, 2008. The Miller Publ. Co., Bloomington, MN. Disponível em: https://s3.amazonaws.com/media.agricharts.com/sites/968/Crop%20Prod/Corn_Snaplage_120808.pdf. Acessado em: jul. 2024.
- MORAN J. P. et al. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: JONES, D. I. H.; JONES, R.; DEWHURST, R.; MERRY, R. J. **Proceedings** [...] Aberystwyth: University of Wales, 1996.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A. R. and HERON, S. J. E. **Biochemistry of silage** 2.ed. Marlow: Chalcombe Publication, 1991. 340p.
- MUCK, R.E. Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. **Transactions of the ASAE**, v.47, p. 1011-1016, 2004.
- MUCK, R. E. et al. Silage review: recent advances and future uses of silage additives. **Journal Dairy Science**, v. 101, p. 3980–4000, 2018.
- OHSHIMA, M. and MCDONALD, P. A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. **J. Sci. Food Agric.**,v. 29, p. 497–505, 1978.
- OUDE ELFERINK, S. J. W. H. et al. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied Environment Microbiology**, v. 67, p. 125–132, 2001.
- PAHLOW, G. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D. R., MUCK, R. E. and HARRISON, J. H. **Silage Science and Technology**. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, 2003. p. 31–93.
- POLUKIS, S. A. et al. The effect of microbial inoculants on the aerobic stability of high moisture corn. **J. Dairy Sci.** v. 94, p. 324, 2016, supplement 5.
- RANJIT, N.K. and KUNG, L. Jr. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **J. Dairy Sci.**, v. 83, p. 526–535, 2000.
- ROOKE, J. A. and HATFIELD, R.D. Biochemistry of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E. and HARRISSON, J. H. **Silage Science and Technology**. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, 2003. p. 95-140.
- SANTOS, W. P. et al. Glycerin as an additive for sugarcane silage. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 3, p. 1547-1556, 2015.

SANTOS, A. O. et al. A survey of Whole-plant corn silages from Minas Gerais dairy farms. **Scientia Agricola**, v. 77, n. 2, 2020.

SILVESTRE, M. A. MILLEN, D. D. The 2019 Brazilian survey on nutritional practices provided by feedlot cattle consulting nutritionists. **R. Bras. Zootec.**, 50, 2021.

SPECTOR, M. P. Metabolism, central (intermediary) In: SCHAECHTER M. **Encyclopedia of microbiology**. 3 ed. Oxford: Academic Press, 2009. P. 242–264.

TABACCO, E. et al. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1641-1650, 2009.

TAYLOR, C. C. and KUNG, L. JR. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 6, p. 1526–1532, jun. 2002.

VAN AMBURGH, M. E. et al. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System: updates to the model and evaluation of version 6.5. **J. Dairy Sci.** v. 98, p. 6361–6380. 2015.

WILKINSON, J. M. and DAVIES, D. R. The aerobic stability of silage: Key findings and recent developments. **Grass and Forage Science**, v.68, p.1–19, 2013.

WOOLFORD, M. K. The chemistry of silage. In: WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation**. 10 ed. Merceel Dekker, UE. 350p. 1984.