



GABRIELA MARTINS GARCIA

**AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO SOBRE A CONSERVAÇÃO DE
SILAGENS DE GRÃOS DE MILHO REIDRATADO**

**LAVRAS - MG
2025**

GABRIELA MARTINS GARCIA

**AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO SOBRE A CONSERVAÇÃO DE
SILAGENS DE GRÃOS DE MILHO REIDRATADO**

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

Orientadora

Dra. Beatriz Ferreira Carvalho – PPGZ/UFLA

Coorientadora

LAVRAS – MG

2025

GABRIELA MARTINS GARCIA

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

Garcia, Gabriela Martins.

Avaliação de bactérias do ácido láctico sobre a conservação de silagens de grãos de milho reidratado / Gabriela Martins Garcia - 2025.

51 p. : il.

Orientador(a): Carla Luiza da Silva Ávila.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2025.

Bibliografia.

1. Amido 2. Digestibilidade. 3. Fermentação. I. Ávila, Carla Luiza da Silva. II. Título..

GABRIELA MARTINS GARCIA

**AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO SOBRE A CONSERVAÇÃO DE
SILAGENS DE GRÃOS DE MILHO REIDRATADO**

**EVALUATION OF LACTIC ACID BACTERIA ON THE STORAGE OF
REHYDRATED CORN GRAIN 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 05 de março de 2025.

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila - UFLA

Dra . Batriz Ferreira Carvalho - UFLA

Dr. Gustavo Gonçalves de Souza Carvalho Salvati – ESALQ

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

Orientadora

Dra. Beatriz Ferreira Carvalho – PPGZ/UFLA

Coorientadora

LAVRAS – MG

2025

GABRIELA MARTINS GARCIA

*Aos meus pais, Claudinéia e Ramon pelo apoio e amor incondicional.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora de Aparecida por sempre estar me iluminando o meu caminho.

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 Denise, Felipe, Viviane, Victória, Laura, Marcos Paulo, Yasmim por sempre estenderem a mão quando precisava de ajuda. Em especial a Doutora Beatriz por toda ajuda, companheirismo e principalmente pela dedicação em nunca medir esforços quando precisei. E também aos bons momentos passados juntos, o trabalho, as risadas, as conversas e trocas de experiência.

Ao UFLALEITE pelo conhecimento adquirido neste tempo e seus membros que também sempre estavam dispostos a ajudar e por se preocuparem comigo.

Aos meus pais Claudinéia e Ramon pelo exemplo de amor e apoio incondicional. Aos meus irmãos Gabriel e Victor por sempre estarem presentes e torcendo por mim. Ao meu namorado, Daniel pelo companheirismo e sempre segurar a minha mão nos momentos que mais precisei.

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

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

RESUMO

Os híbridos de milho cultivados no Brasil têm o endosperma do grão predominantemente vítreo e com isso apresentam baixa degradação ruminal do amido. Entre outros processos para solucionar esse problema, a ensilagem de grãos de milho moídos e reidratados é uma opção de fácil acesso aos produtores. O uso de inoculantes nessa silagem é uma prática que pode otimizar a fermentação e melhorar a estabilidade aeróbia do material armazenado. O objetivo desse estudo foi avaliar o uso de diferentes inoculantes na silagem de grão de milho reidratado (SGMR). Dois inoculantes comerciais de composição mista, S1 e S2, a cepa - *Lentilactobacillus hilgardii* (LH), a cepa - *L. farraginis* (LF) e a combinação de S1+LF, foram avaliadas. O milho foi moído (3 mm), reidratado até 65% de matéria seca (MS) e inoculado (10^8 log UFC/kg). O milho moído foi reidratado e compactado manualmente (densidade de 1042 ± 11 kg/m³) em silos experimentais de 5L. Os silos foram vedados, pesados e armazenados por 35 e 98 dias. O experimento foi conduzido em DBC com 5 tratamentos (LF, LH, S1, S2 e S1+LF) mais 1 controle (sem inoculante) com 4 repetições (blocos em diferentes dias de produção dos silos), totalizando 48 unidades experimentais. Os dados foram submetidos à análise de variância (SISVAR®). As médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade. Houve efeito dos inoculantes na MS, amido, população de BAL, BAFE e leveduras, produtos da fermentação e estabilidade aeróbia. Os menores valores de pH foram observados nas silagens inoculadas com S1 e S2 (média: 3,87). As menores concentrações de amido foram observadas nas silagens S1, S2 e LF+S1. Os inoculantes mais eficientes em reduzir a população de leveduras foram LF e LH (< 2,00 log UFC/g). As silagens inoculadas com LF, LH e LF+S1 apresentaram maior estabilidade aeróbia após 35 dias de estocagem. As concentrações de 1,2-propanodiol e do ácido propiônico aumentaram com o tempo de estocagem e foram maiores nas silagens inoculadas com LH e LF. O efeito dos inoculantes sobre o pH, perdas de MS, população de bactérias lácticas e concentração de ácido acético foi dependente do período de estocagem. Com 35 dias de estocagem não houve diferença na perda de MS, mas aos 98 dias a perda de MS foi menor nas silagens inoculadas com S1 e S2 (0,81% em média para o grupo). A inoculação com S1 e S2 reduziu as perdas de MS, a concentração de ácido butírico e pH e aumentou a concentração de ácido lático sem alterar a população de leveduras. Porém a adição desses inoculantes, reduziu a estabilidade aeróbia das silagens após 98 dias de estocagem. A combinação de S1 com *L. farraginis* aumentou a estabilidade aeróbia das silagens após 35 dias de estocagem. A associação do uso de inoculantes de bactérias do ácido lático nessas silagens, foram capazes de alterar processo fermentativo, queda do pH, inibindo microrganismos indesejáveis e promovendo uma fermentação mais eficiente.

Palavras-chave: Amido; fermentação; estabilidade aeróbia; *Lentilactobacillus farraginis*, *Lentilactobacillus hilgardii*.

ABSTRACT

The maize hybrids grown in Brazil have a predominantly vitreous endosperm and therefore have low ruminal starch degradation. Among other processes to solve this problem, ensiling ground and rehydrated corn kernels is an easily accessible option for producers. The use of inoculants in this silage is a practice that can optimize fermentation and improve the aerobic stability of the stored material. The aim of this study was to evaluate the use of different inoculants in rehydrated maize grain silage (RMS). Two commercial inoculants of mixed composition, S1 and S2, the *Lentilactobacillus hilgardii* (LH) strain, the *L. farraginis* (LF) strain and the combination of S1+LF, were evaluated. The maize was ground (3 mm), rehydrated to 65% dry matter (DM) and inoculated (108 log CFU/kg). The ground maize was rehydrated and compacted manually (density of 1042 ± 11 kg/m³) in 5L experimental silos. The silos were sealed, weighed and stored for 35 and 98 days. The experiment was conducted in a DBC with 5 treatments (LF, LH, S1, S2 and S1+LF) plus 1 control (no inoculant) with 4 replications (blocks on different days of silo production), totaling 48 experimental units. The data was submitted to analysis of variance (SISVAR®). The means were compared using the Scott Knott test at a 5% probability level. There was an effect of the inoculants on DM, starch, BAL, BAFE and yeast populations, fermentation products and aerobic stability. The lowest pH values were observed in silages inoculated with S1 and S2 (average: 3.87). The lowest starch concentrations were observed in S1, S2 and LF+S1 silages. The most efficient inoculants in reducing the yeast population were LF and LH (< 2.00 log CFU/g). Silages inoculated with LF, LH and LF+S1 showed greater aerobic stability after 35 days of storage. The concentrations of 1,2-propanediol and propionic acid increased with storage time and were higher in silages inoculated with LH and LF. The effect of the inoculants on pH, DM loss, lactic acid bacteria population and acetic acid concentration depended on the storage period. At 35 days of storage there was no difference in DM loss, but at 98 days DM loss was lower in silages inoculated with S1 and S2 (0.81% on average for the group). Inoculation with S1 and S2 reduced DM losses, the concentration of butyric acid and pH and increased the concentration of lactic acid without changing the yeast population. However, the addition of these inoculants reduced the aerobic stability of the silages after 98 days of storage. The combination of S1 with *L. farraginis* increased the aerobic stability of the silages after 35 days of storage. The combination of lactic acid bacteria inoculants in these silages was capable of altering the fermentation process, lowering the pH, inhibiting undesirable microorganisms and promoting more efficient fermentation.

Keywords: Starch; fermentation; aerobic stability; *Lentilactobacillus farraginis*, *Lentilactobacillus hilgardii*.

INDICADORES DE IMPACTO

A silagem de grãos de milho reidratado (SGMR) é uma técnica de conservação do milho que consiste em moer o grão seco, adicionar água para reidratá-lo até cerca de 30–35% de matéria seca e armazená-lo em silos para fermentação anaeróbica. Esse processo permite conservar o milho por longos períodos, com mínima perda de nutrientes e excelente valor nutricional. Sendo é uma técnica eficiente que alia praticidade, economia e valor nutricional, contribuindo diretamente para o desempenho animal, a sustentabilidade do sistema produtivo e a rentabilidade da atividade pecuária. A aplicação de inoculantes nessas silagens reduz perdas por fermentações indesejadas, preserva nutrientes, aumenta a estabilidade aeróbia e garanti uma silagem de alta qualidade. No aspecto tecnológico, representa um avanço na biotecnologia, permitindo melhor conservação do grão moído e estimulando o desenvolvimento de cepas específicas adaptadas a diferentes condições de cultivo. Economicamente, reduz perdas, melhora a qualidade do produto final e aumenta a rentabilidade dos produtores. Assim, o uso de inoculantes em SGMR é uma prática recomendada tanto do ponto de vista técnico quanto econômico, contribuindo para uma pecuária mais produtiva, eficiente e sustentável.

TECHNOLOGICAL, ECONOMIC AND CULTURAL IMPACTS

Rehydrated maize grain silage (RGS) is a maize preservation technique that consists of grinding the dried grain, adding water to rehydrate it to around 30-35% dry matter and storing it in silos for anaerobic fermentation. This process allows corn to be preserved for long periods of time, with minimal loss of nutrients and excellent nutritional value. This is an efficient technique that combines practicality, economy and nutritional value, contributing directly to animal performance, the sustainability of the production system and the profitability of livestock farming. Applying inoculants to these silages reduces losses due to unwanted fermentation, preserves nutrients, increases aerobic stability and guarantees high quality silage. From a technological point of view, it represents an advance in biotechnology, allowing for better conservation of the ground grain and stimulating the development of specific strains adapted to different growing conditions. From an economic point of view, it reduces losses, improves the quality of the end product and increases producers' profitability. Thus, the use of inoculants in SGMR is a recommended practice from both a technical and economic point of view, contributing to more productive, efficient and sustainable livestock farming.

RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO

AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO SOBRE A CONSERVAÇÃO DE SILAGEM DE GRÃOS DE MILHO REIDRATADO

Elaborado por **Gabriela Martins Garcia**, orientado por **Carla Luiza da Silva Ávila**

O uso de inoculantes em silagens de grãos de milho reidratado (SGMR) é uma prática cada vez mais recomendada para melhorar a fermentação, preservar os nutrientes, aumentar a estabilidade aeróbia e garantir uma silagem de alta qualidade, oferecendo uma gama de benefícios e impactos em diferentes quesitos: social, tecnológico e econômico. No quesito 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. No quesito de impacto tecnológico, a utilização de inoculantes microbianos em silagens de grãos de milho reidratado representa um avanço biotecnológico, promovendo a conservação eficiente do grão moído. 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. 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.



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Perdas de matéria seca (MS) da silagem de grão de milho reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas e armazenada por diferentes tempos de estocagem (35 e 98 dias). I×E: $P < 0,01$. Médias com diferentes letras minúsculas diferem quanto ao uso do inoculante ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras maiúsculas diferem ao tempo de estocagem ($P < 0,05$).....46
- Figura 2.** Valores de pH da silagem de grão de milho reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas e armazenada por diferentes tempos de estocagem (35 e 98 dias). I×E: $P < 0,01$. Médias com diferentes letras minúsculas diferem quanto ao uso do inoculante ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras maiúsculas diferem ao tempo de estocagem ($P < 0,05$).....46
- Figura 3.** Valores de BAL em silagens de grãos de milho reidratado inoculadas e estocadas em diferentes tempos de ensilagem (35 e 98 dias). I×E: $P < 0,01$. Médias com diferentes letras minúsculas diferem quanto ao uso do inoculante ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras maiúsculas diferem ao tempo de estocagem ($P < 0,05$).....47
- Figura 4.** Concentração de Ácido Acético (% MS) na silagem de grão de milho reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas e armazenada por diferentes tempos de estocagem (35 e 98 dias). I×E: $P < 0,01$. Médias com diferentes letras minúsculas diferem quanto ao uso do inoculante ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras maiúsculas diferem ao tempo de estocagem ($P < 0,05$).....47
- Figura 5.** Concentração de 1-2 propanodiol (% MS) na silagem de grão de milho reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas e armazenada por diferentes tempos de estocagem (35 e 98 dias). I×E: $P < 0,01$. Médias com diferentes letras minúsculas diferem quanto ao uso do inoculante ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras maiúsculas diferem ao tempo de estocagem ($P < 0,05$).....48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Caracterização do Grão de Milho Reidratado antes da ensilagem.....43
- Tabela 2.** Perfil fermentativo, matéria seca (%), concentração de amido, proteína e CSA (%), população de bactérias aeróbias formadoras de esporos, fungos filamentosos e leveduras, teor de ácido láctico, propiônico, butírico e etanol em tempo de armazenamento diferentes (35 e 98 dias).44
- Tabela 3.** Estabilidade aeróbia da silagem de GMR inoculadas e estocadas no tempo de estocagem de 35 dias.....45
- Tabela 4.** Estabilidade aeróbia da silagem de GMR inoculadas em tempo de armazenamento diferentes (98 dias).45

LISTA DE SIGLAS

1,2-PRO	1,2-propanodiol
AL	Ácido láctico
AC	Ácido acético
BAFE	Bactérias aeróbias formadoras de esporos
BAL	Bactérias do ácido láctico
BUT	Ácido butírico
ETA	Etanol
GMR	Grão de milho moído e reidratado
LH	<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>
LF	<i>Lentilactobacillus farraginis</i>
MS	Matéria seca
PMS	Perda de matéria seca

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Silagem de grãos de milho reidratado	17
2.2 Microbiologia da silagem de grão de milho reidratado	19
2.3 Influência do tempo de estocagem sobre a silagem de grãos de milho reidratado.....	21
2.4 Ação dos inoculantes na silagem de milho reidratado.....	22
3 REFERENCIAS	26
1 CAPÍTULO II: INTRODUÇÃO.....	30
2 MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1 Processo de ensilagem.....	34
2.2 Análises químicas.....	35
2.3 Análises microbiológicas.....	36
2.4 Avaliação da estabilidade aeróbia.....	36
2.5 Análise Estatística.....	37
3 RESULTADOS.....	37
4 DISCUSSÃO	39
5 CONCLUSÃO.....	42
6 REFERÊNCIAS.....	49

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

A ensilagem de grãos de milho moídos reidratados (GMR) é uma técnica relevante para a conservação de alimentos destinados aos ruminantes. Além de possibilitar a redução nos custos para o produtor, mediante a aquisição do milho durante períodos de preços mais acessíveis, essa prática é uma estratégia de armazenamento de menor custo na propriedade rural e ainda contribui para a melhoria da digestibilidade do amido. 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).

Em comparação com silagens de milho planta inteira, a fermentação do grão reidratado é caracterizada por queda mais lenta do pH em função da quantidade limitada de carboidratos solúveis, cerca de 20 g kg⁻¹ da matéria seca (MS) (CARVALHO et al., 2016), que são o principal substrato para as bactérias do ácido lático (BAL) (PAHLOW et al., 2003). A queda lenta do pH, resultado da lenta produção de ácido lático são fatores que podem favorecer o crescimento de microrganismos indesejáveis como bactérias aeróbias produtoras de esporos, exemplo gênero *Bacillus* (CARVALHO et al., 2016) e do gênero *Clostridium* (CARVALHO-ESTRADA et al., 2020), podem deteriorar o alimento enquanto o silo está fechado ou após abertura. Apesar da alta compactação do material e baixa concentração de oxigênio, essa silagem está propensa a ter uma deterioração intensa (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

Nesse aspecto, os inoculantes podem atuar na melhoria tanto do processo fermentativo (fase anaeróbia de fermentação), quanto da estabilidade aeróbica (MORAIS, 2016). Com relação ao tipo de metabolismo, os inoculantes bacterianos podem ser utilizados para estimular a fermentação desejável e acelerar a queda do pH, ou para inibir a deterioração aeróbia. O primeiro é constituído principalmente por bactérias lácticas homofermentativas e o segundo por bactérias lácticas heterofermentativas obrigatórias e/ou bactérias do ácido propiônico. Apesar dos chamados estimuladores de fermentação serem utilizados para aumentar a produção de ácido lático, conseqüentemente inibindo microrganismos indesejáveis, esse ácido pode ser usado como substrato para microrganismos deterioradores aeróbios, principalmente as leveduras, após abertura dos silos. Além de atuar no processo fermentativo melhorando a preservação do alimento, há

35 indícios os inoculantes, podem agir na melhoria da digestibilidade da silagem (KUNG JR
36 et al., 2007; SILVA et al., 2018; TAYLOR; KUNG JR, 2002), pois a maior parte das
37 enzimas que degradam as prolaminas que envolvem os grânulos de amido parecem ser de
38 origem microbiana (JUNGES et al., 2017).

39 As características da silagem de GMR mudam com o tempo de fermentação, sendo
40 observado maiores teores de ácidos, menor pH, maior digestibilidade e maior estabilidade
41 aeróbia. Segundo Ferraretto (2017), um período maior de ensilagem pode ser benéfico para
42 aumentar a digestibilidade do amido em situações em que híbridos são processados mais
43 grossos, porém a pesquisa nesta área ainda é limitada.

44 Contudo, considerando que a eficiência de um inoculante depende do tipo de cepa,
45 visto que há diferenças entre cepas da mesma espécie, e o efeito destas cepas é dependente
46 das características do substrato, como tamanho de partículas e tempo de fermentação. A
47 condução deste projeto tem como objetivo avaliar o uso de inoculantes comerciais e cepas
48 selecionadas para verificar principalmente as interações entre elas, otimizando as
49 condições de fermentação destas silagens.

50

51 **2. REVISÃO DE LITERATURA**

52 **2.1 Silagem de grãos de milho reidratado**

53 O grão de milho é formado por quatro principais estruturas físicas: endosperma,
54 gérmen, pericarpo (casca) e ponta, as quais diferem em composição química e também na
55 organização dentro do grão. O endosperma compõe a maior parte do grão de milho, cerca
56 de 75 a 80% (BUCHANAN et al., 2015), sendo que 88% do endosperma é composto por
57 amido (PAES, 2006). Nele estão presentes as proteínas do tipo prolaminas, denominadas
58 zeínas, que compõem a matriz amido-proteína que envolve os grânulos de amido dentro
59 das células. Com base na distribuição dos grânulos de amido e da matriz de proteína, o
60 endosperma é classificado em farináceo ou vítreo. Os grânulos de amido no milho do tipo
61 farináceo estão dispersos e a matriz proteica é esparsa e fragmentada, enquanto que no
62 milho do tipo vítreo, a matriz proteica e os grânulos de amido estão adensados. Essa
63 característica dificulta a penetração de água, prejudicando a hidrólise enzimática e a
64 colonização por parte das bactérias do rúmen, o que resulta em menor digestibilidade do
65 amido (PAES, 2006; SILVA, 2016).

66 A zeína, é dividida em 4 subclasses (α , β , γ e δ) e representa de 30 a 60% de toda a
67 proteína do grão (SILVA, 2016). De acordo com os estudos de Hoffman et al. (2011), a γ -
68 zeína é altamente degradada no processo fermentativo da silagem de grão úmido de milho

69 e essa informação gera implicações importantes quanto a digestão do amido. Os dados
70 encontrados demonstram a redução de 42,2 e 73,2% dessa zeína nos respectivos híbridos
71 avaliados. A maior degradação de γ -zeína é explicada por localização superficial na matriz
72 proteica e sua degradação é um fator que contribui para tornar acessível os grãos de amido.

73 A produção da silagem de grãos de milho reidratado (GMR) é uma técnica que tem
74 sido amplamente difundida no Brasil, principalmente pelo seu grande efeito no aumento
75 da degradabilidade em grãos de milho com alta proporção de endosperma vítreo, como os
76 híbridos utilizados no país (CORREA et al., 2002). Outro fator que contribui com o
77 aumento do uso dessa técnica é a possibilidade de atraso da colheita do grão úmido, devido
78 a disponibilidade limitada de máquinas e o excesso de chuvas durante esse período
79 (BITENCOURT, 2012). Esta técnica também diminui o risco de perdas de armazenamento
80 (pragas, mudanças de temperatura, umidade, etc.), reduz os gastos com transporte e
81 minimiza os efeitos do mercado nas flutuações do preço do milho (ARCARI et al., 2016).

82 A reidratação de cereais para produção de silagem se baseia em devolver ao grão
83 a umidade necessária para que haja uma correta fermentação (OWENS et al., 1986) e,
84 conseqüentemente, esse processo melhora a digestibilidade desse alimento
85 (FERRARETTO et al., 2014; OWENS et al., 1986). A vantagem da ensilagem baseia-se
86 no fato de que no grão de milho com endosperma vítreo, o amido está envolvido por uma
87 matriz hidrofóbica de amido-proteína densa que impede a aderência dos microrganismos
88 ruminais, reduzindo a digestibilidade ruminal e intestinal do amido (REMOND et al.,
89 2004).

90 A limitada quantidade de carboidratos solúveis presente no grão de milho pode
91 limitar, inicialmente, a atividade das principais bactérias que estão presentes nas silagens,
92 visto que esses carboidratos são polimerizados como amido no endosperma do milho
93 durante seu desenvolvimento. Os carboidratos solúveis são o principal substrato para o
94 crescimento de BAL (MCDONALD et al., 1991), sendo que uma concentração de
95 carboidratos solúveis de 25 g kg⁻¹ de MS é relatada como ideal para o seu crescimento e
96 estabelecimento (PILTZ; KAISER, 2004). No estudo de Carvalho et al. (2016), foi
97 observado que a quantidade de 20 g kg⁻¹ de MS não foi limitante para o estabelecimento
98 do BAL ou para o processo de fermentação. No entanto, a redução significativa no valor
99 do pH foi detectada aos 30 dias de fermentação, demonstrando uma lenta queda de pH.

100 A deterioração é o principal problema associado à manutenção do valor nutritivo
101 da silagem após a abertura dos silos e o processo se inicia através de leveduras, que são
102 capazes de assimilar o ácido lático (WOOLFORD, 1990), resultando em baixa estabilidade
103 aeróbia após a abertura. Silva et al. (2018) relataram estabilidade de 74h para silagem de

104 GMR não inoculadas, podendo alcançar 288h quando inoculadas com *Lentilactobacillus*
105 *buchneri* NCIMB 40788.

106 A estabilidade aeróbia da silagem de GMR pode ser influenciada de acordo com
107 alguns aspectos de sua confecção. Silva et al. (2019) observaram que a estabilidade aeróbia
108 era incrementada com o aumento do tempo de estocagem da silagem de GMR. E essa
109 estabilidade foi maior para silagem inoculadas com *L. buchneri*, do que as silagens não
110 inoculadas.

111 **2.2 Microbiologia da silagem de grão de milho reidratado**

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

118 Segundo o estudo de Carvalho et al. (2016), as BAL responsáveis pelo início
119 do processo da fermentação láctica em silagem de milho reidratado seriam
120 *Enterococcus casseliflavus* e *Pediococcus pentosaceus*, apenas após os 15 dias de
121 fermentação que ocorreriam maiores populações e diversidade de espécies. Após 30 dias
122 de fermentação, *Ligilactobacillus acidipiscis* (*Lactobacillus acidipiscis*),
123 *Lentilactobacillus paracasei* (*Lentilactobacillus paracasei*) e *Lentilactobacillus* sp. seriam
124 as BAL dominantes no processo de fermentação. Bactérias do gênero *Lactobacillus*
125 dominam os processos finais de fermentação, quando o pH está mais baixo, dessa forma,
126 nestas silagens eles são dominantes em períodos mais longos de estocagem.

127 Carvalho-Estrada et al. (2020) ao estudarem as populações presentes em silagens
128 de milho úmido e grão reidratado, verificaram que os *Enterococcus* estiveram presentes no
129 início do processo fermentativo, com abundância relativa (AR) de 31,86% no dia 0 e
130 36,14% aos 7 dias. Reafirmando os achados de Carvalho et al. (2016), que observaram a
131 presença de *Enterococcus* nas etapas iniciais do processo.

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

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

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

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

159 Outro microrganismo de interesse são os *Bacillus*, que são bactérias formadoras de
160 endósporos com células em forma de bastonete, Gram-positivas (para a maioria das
161 espécies) e crescem aerobiamente, podendo ser anaeróbios facultativos (PAHLOW et al.,
162 2003). Os problemas relacionados a essas bactérias são a baixa queda de pH, início da
163 deterioração aeróbia, a contaminação do leite dos animais que consomem as silagens
164 contaminadas com os endósporos e a produção de enterotoxinas (ÁVILA; CARVALHO,
165 2019). Apesar disso, algumas espécies de *Bacillus* têm sido investigadas nos últimos anos
166 como novos inoculantes de silagem (LI et al., 2018), principalmente pela produção de
167 antimicrobianos que podem inibir bactérias indesejáveis (ÁVILA; CARVALHO, 2019).
168 Fernandes et al. (2022) encontraram uma contagem de bactérias aeróbias formadoras de
169 esporos (BAFE) de 1,92 log UFC/g de material ensilado em silagens de GMR. Dentre as
170 BAE identificadas nas silagens estavam: *Bacillus pumilus*, *Brevibacillus invocatus*
171 (*Bacillus invocatus*) e *Pae. glucanolyticus* (*Bac. glucanolyticus*) e *Brevibacillus brevis*

172 (*Bacillus brevis*).

173 As enterobactérias são geralmente o segundo grupo bacteriano mais numeroso da
174 microflora epifítica ativa no silo e, portanto, o mais importante em sua competição com as
175 BAL. Essas bactérias produzem principalmente ácido acético, mas também são
176 importantes na redução do NO_3 , resultando na produção de nitritos e gases de óxido de
177 nitrogênio (PAHLOW et al., 2003). Carvalho et al (2016) isolaram enterobactérias em meio
178 MRS em amostras de milho moído antes da ensilagem, eram elas *Enterobacter asburiae*,
179 *Enterobacter cowanii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus saprophyticus*. Após a
180 ensilagem, a contagem dessas bactérias caiu para menos de 2 log UFC/g de silagem. Assim
181 como os clostrídeos, a acidificação inicial rápida é a chave para controlar o crescimento
182 desses microrganismos indesejáveis (PAHLOW et al., 2003).

183 Os fungos e as leveduras, são os microrganismos mais importantes implicados no
184 início da deterioração aeróbia (PAHLOW et al., 2003). As leveduras estão associadas a
185 perdas fermentativas anaeróbias e deterioração aeróbia. Carvalho et al. (2016) observaram
186 uma sucessão de espécies de leveduras na silagem de grãos de milho reidratados. No início
187 da fermentação havia a presença de *Meyerozyma guilliermondii* e *Hyphopichia burtonii*,
188 enquanto *W. anomalus* e *I. orientalis* foram dominantes no final. Os fungos podem estar
189 presentes na silagem durante todas as fases da fermentação (ÁVILA; CARVALHO, 2019)
190 e sua relevância está na geração de perdas, reduções de palatabilidade e a produção de
191 micotoxinas (PAHLOW et al., 2003). Carvalho et al. (2016) relatam que a partir dos 30
192 dias de ensilagem, a população de fungos fica abaixo de 2 log UFC/g.

193 **2.3 Influência do tempo de estocagem sobre a silagem de grãos de milho reidratado**

194 O aumento no tempo de armazenamento da silagem reduz os teores de prolamina
195 através do mecanismo de proteólise, promovendo um aumento na degradação ruminal *in*
196 *situ* do amido (FERNANDES et al., 2015). Hoffman et al (2011), relataram que a
197 degradação das subunidades de prolamina - zeína da matriz proteica da silagem de grãos
198 foi extensa, com redução de 60%, sugerindo que os grânulos de amido se dissociam como
199 resultado da fermentação da silagem, o que aumenta a área de superfície para a fixação
200 bacteriana no rúmen (HUNTINGTON et al., 2006).

201 Kung Jr, Windle e Walker (2014) observaram ao longo do tempo de estocagem (0,
202 70 e 140 dias) ocorreu redução nos teores de prolamina e aumento nos teores de nitrogênio
203 amoniacal e proteína solúvel, sendo indício da quebra da matriz proteica que recobre os
204 grãos de amido, e aumento da digestibilidade *in vitro* do amido. Hoffman et al (2011),

205 também relataram maior concentração de nitrogênio amoniacal à medida que as
206 subunidades de proteína zeína em silagem de alta umidade diminuíram no estudo. Junges
207 et al., 2017, avaliando a influência de várias fontes proteolíticas durante a fermentação de
208 silagens de grãos reidratados, observou que a solubilização de proteínas teve como
209 principais contribuintes para a proteólise à atividade bacteriana. Deduzindo que pelo fato
210 da maior parte da proteína nos grãos de milho está na matriz que envolve o amido, as
211 bactérias epifíticas e/ou inoculadas são os principais determinantes da degradação da
212 matriz proteica em torno do grânulo de amido, juntamente com sua degradabilidade. Taylor
213 e Kung, 2002, observaram que a inoculação da silagem de grãos úmidos de milho com
214 *Lentilactobacillus buchneri* - NCIMB 40788, frequentemente aumenta a concentração de
215 NH_3 . Ferraretto et al., 2014, afirmaram que altas concentrações de proteína solúvel e NH_3
216 estão positivamente relacionadas à digestibilidade do amido.

217 Costa et al. (2023) observaram uma redução de matéria seca (MS) de 588 para 534
218 g.kg⁻¹ (redução de 0,27 g.kg⁻¹ MS.dia⁻¹) em silagem de GMR estocadas de 0 a 200 dias.
219 Fernandes et al (2022) observaram resultado similar onde a MS também reduziu em
220 silagem de GMR armazenadas de 30 (MS = 667 g.kg⁻¹) a 180 dias (636 g.kg⁻¹), redução
221 de 0,21 g.kg⁻¹ MS.dia⁻¹. Fernandes et al. (2021) avaliando a silagem de GMR de diferentes
222 híbridos também relataram redução da concentração de MS quando as silagens foram
223 armazenadas de 0 a 120 dias: 0,17 g.kg⁻¹ MS.dia⁻¹ para híbrido AG 1051 e 0,16 g.kg⁻¹
224 MS.dia⁻¹ para híbrido IAC 8390. Maiores tempos de estocagem tendem a reduzir a
225 concentração de MS, como pode ser observado pelos resultados citados anteriormente. De
226 forma paralela, trabalhos relatam que as perdas de MS aumentam ao longo da estocagem,
227 em outras palavras, ocorrem inversamente à redução da concentração de MS
228 (FERNANDES, et al., 2022; BORREANI et al., 2018; CARVALHO et al., 2017).

229 **2.4 Ação dos inoculantes na silagem de milho reidratado**

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

235 Os inoculantes comerciais em geral são classificados em dois grupos principais de
236 inoculantes: estimuladores de fermentação e os inibidores de deterioração aeróbia. A
237 principal diferença entre eles é seu metabolismo. Inoculantes microbianos classificados

238 como estimuladores da fermentação, como por exemplo *Lactiplantibacillus plantarum*,
239 *Pediococcus acidilactici* e *Enterococcus faecium*, aceleram a acidificação da silagem
240 através da produção mais rápida de ácido láctico, característica de um processo
241 homofermentativo (PAHLOW et al., 2003).

242 Os inoculantes microbianos classificados como inibidores de deterioração aeróbia
243 tem demonstrado resultados positivos no controle da deterioração aeróbia, principalmente
244 em silagens de planta inteira de milho. A espécie mais utilizada para esse fim é o
245 *Lentilactobacillus buchneri* (SILVA et al, 2018), mais recentemente o *Lentilactobacillus*
246 *hilgardii* (CCMA0170). O tipo de metabolismo dos inibidores de deterioração aeróbia,
247 denominado heterofermentativo, leva a produção de outros compostos além do ácido láctico,
248 como etanol, acetato e CO₂ (PAHLOW et al., 2003). A classificação das bactérias em três
249 grupos - homofermentativa, obrigatoriamente heterofermentativa e facultativamente
250 heterofermentativa - está bem estabelecida pela comunidade científica e define as
251 principais rotas metabólicas utilizadas, bem como os produtos da fermentação (ÁVILA;
252 CARVALHO, 2020).

253 A utilização de inoculantes para a silagem de GMR se justifica pela melhoria no
254 processo fermentativo, a inibição do crescimento de microrganismos indesejáveis
255 (MORAIS, 2016) e o aumento da estabilidade aeróbia (SILVA et al, 2018). Dentre alguns
256 exemplos de espécies de bactérias e suas combinações já estudadas e utilizadas como
257 inoculantes em silagens de grãos úmidos estão: *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788
258 (SILVA et al., 2018; SILVA et al., 2019); combinação de *Lactiplantibacillus plantarum*
259 MA18 e *Pediococcus acidilactici* MA18 (SILVA et al., 2018); combinação de
260 *Lactiplantibacillus plantarum* e *Propionibacterium acidipropionici* (LALSIL® Milho;
261 SOUZA ET AL., 2020); combinação de *Lactiplantibacillus plantarum* e *Enterococcus*
262 *faecium* (Brand 1189, Pioneer Hi-Bred International, Des Moines, IA; SEBASTIAN et al.,
263 1996); *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei* (*Lactobacillus casei*),
264 *Enterococcus faecium*, e *Pediococcus sp.* (Silo Charger “D,” NU-AG Bosko Inc.,
265 Oskaloosa, IA; FERRARETTO et al., 2015).

266 Resultados positivos são relatados em diversos trabalhos com a utilização de
267 inoculantes para este tipo de silagem. Ferraretto et al. (2015) observaram que a inoculação
268 microbiana (*L. plantarum*, *L. casei*, *E. faecium* e *Pediococcus sp*) diminuiu o pH e o
269 acetato, e aumentou as concentrações de lactato e ácidos totais nas silagens de milho. Souza
270 et al. (2020) ao avaliarem a reidratação dos grãos de milho com soro de leite associada ao
271 uso de inoculantes bacterianos (*L. plantarum* e *P. acidipropionici*), também observaram
272 melhora no perfil fermentativo da silagem, com menores valores de pH e perdas

273 fermentativas.

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

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

287 O aumento da perda de MS durante a fermentação da silagem resultou no
288 metabolismo heterofermentativo por BAL, fermentação etanólica por leveduras ou
289 metabolismo de outros microrganismos indesejáveis como bactérias aeróbias esporulantes
290 ou *Clostridium*, com metabolismo resultando na formação de CO₂ (ÁVILA; CARVALHO,
291 2019). Carvalho et al. (2016) observaram que as perdas de matéria seca chegaram a
292 alcançar o valor máximo de 7,6%. Essa alta perda de matéria seca também pode ser
293 observada em outros estudos em que não houve utilização de inoculantes microbianos.
294 Gomes et al. (2020) observaram perdas de MS aos 180 dias em torno de 6%, enquanto que
295 Fernandes (2014), observaram aos 120 dias que as silagens tiveram em média 6,59% de
296 perda de MS. Outro estudo, de Fernandes et al. (2022), apontou que suas silagens tiveram
297 uma perda de MS de 6,8 % do total ensilado, além disso, a perda de amido em silagens de
298 grão reidratado pode chegar aos 23,9% do total ensilado.

299 Em relação a digestibilidade do amido, a inoculação microbiana tem se mostrado
300 eficiente na degradação das prolaminas que envolvem os grânulos de amido. Silva et al.
301 (2018) observaram uma redução no teor de prolamina nas silagens tratadas com LB
302 associado a um aumento de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) em comparação ao controle, o
303 que resultou na maior degradabilidade ruminal in situ da MS. A maior degradabilidade da
304 MS in situ ruminal provavelmente foi desencadeada pela maior disponibilidade de amido,
305 que por sua vez foi induzida pela proteólise.

306 As prolaminas podem ser quebradas durante a ensilagem por enzimas e
307 microrganismos da silagem por meio de proteólise e solubilização por ácidos

308 produzidos durante o processo de fermentação (HOFFMAN et al., 2011). Junges et al.
309 (2017) deduziram que as bactérias epífitas e/ou inoculadas são os principais
310 determinantes da degradação da matriz proteica ao redor do amido, representando 60,4%
311 da proteólise. Neste trabalho, silagens que não tiveram o crescimento microbiano reduzido
312 apresentaram as maiores concentrações de proteína solúvel e N-NH₃. Pode ser por isso que
313 a inoculação com LB aumenta a concentração de N-NH₃ e a diminuição do teor de
314 prolaminas (SILVA et al., 2018).

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

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

336 **3. REFERÊNCIAS**

337 ARCARI, M. A.; MARTINS, C. M. M. R.; TOMAZI, T.; GONCALVES, J. L.;
338 SANTOS, M. V. Effect of substituting dry corn with rehydrated ensiled corn on dairy cow
339 milk yield and nutrient digestibility. **Animal Feed Science and Technology**, 221 v., 167-
340 173 p., 2016.

341

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

345

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

349

350 ÁVILA, C. L. S.; CARVALHO, B. F. Silage fermentation—updates focusing on the
351 performance of micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, 128 v., 4 n., 966-
352 984 p., 2020.

353

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

356

357 CARDOSO, M. **Seleção e uso de isolados epifíticos de bactérias do ácido lático como**
358 **inoculantes para silagem de grãos de milho reidratados**. 2023. 105 p. Tese (Doutorado
359 em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, 2023.

360

361 CARVALHO-ESTRADA, P. D. A.; FERNANDES, J.; DA SILVA, É. B.; TIZIOTO, P.;
362 PAZIANI, S. D. F.; DUARTE, A. P.; COUTINHO, L. L.; VERDI, M. C. Q.; NUSSIO, L.
363 G. Effects of hybrid, kernel maturity, and storage period on the bacterial community in
364 high-moisture and rehydrated corn grain silages. **Systematic and Applied**
365 **Microbiology**, 43 v., 5 n., 126-131 p., 2022.

366

367 CARVALHO, B. F.; ÁVILA, C. L. S.; BERNARDES, T. F.; PEREIRA, M. N.; SANTOS,
368 C.; SCHWAN, R. F. Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and
369 yeasts of rehydrated corn kernel silage. **Journal of Applied Microbiology**, 122 v., 3 n., 58

370 600 p., 2016.

371

372 DUFFNER, F.; O'CONNELL, M. Comparative evaluation of plasmid profiling and
373 ribotyping in the analysis of *Lactobacillus plantarum* strain heterogeneity in silage.
374 **Journal of Applied Bacteriology**, 78 v., 1 n., 20-27 p., 1995.

375

376 FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Produção de milho. **Guaíba: Agropecuária**,
377 18 v., 360 p., 2000.

378

379 FERNANDES, J. **Influência de genótipo, maturidade e tempo de armazenamento na**
380 **qualidade de silagens de grãos de milho com alta umidade**. 2014. 98 p. Tese (Mestrado
381 em Ciência Animal e Pastagens) - Universidade de São Paulo, 2014.

382

383 FERNANDES, T.; SILVA, K. T.; GOMIDE, D. R.; PEREIRA, R. A. N.; AVILA, C. L.
384 S.; PEREIRA, M. N. Effect of glucoamylase and duration of silage storage on ruminal
385 degradation and dry matter loss of corn and sorghum grain rehydrated and ensiled. **Journal**
386 **of Animal Science**, 94 v., suppl_5 n., 673-674 p., 2016.

387

388 FERRARETTO, L. F.; TAYSOM, K.; TAYSOM, D. M.; SHAVER, R. D.; HOFFMAN,
389 P. C. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal
390 in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science**, 97
391 v., 5 n., 3221-3227 p., 2014.

392

393 FERRARETTO, L. F.; FREDIN, S. M.; SHAVER, R. D. Influence of ensiling, exogenous
394 protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and
395 ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. **Journal of Dairy**
396 **Science**, 98 v., 10 n., 7318-7327 p., 2015.

397

398 KUNG JR, L.; SCHMIDT, R. J.; EBLING, T. E.; HU, W. The effect of *Lactobacillus*
399 *buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of ground and whole high-
400 moisture corn. **Journal of Dairy Science**, 90 v., 5 n., 2309-2314 p., 2007.

401

402 MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage:**
403 Chalcombe publications, 1991.

404

405 **MORAIS, G. D. A fermentação de grãos de milho reidratados influenciada pela**
406 **aplicação de aditivos: aspectos da conservação e do valor nutritivo para vacas**
407 **leiteiras.** 2016. 112 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e pastagens) – Universidade
408 de São Paulo, 2016.

409

410 MORAN, J. P.; WEINBERG, Z. G.; ASHBELL, G.; HEN, Y.; OWEN, T. R. A comparison
411 of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In:
412 **International Silage Conference**, 1996, 162-163 p.

413

414 SANTOS, A. O.; ÁVILA, C. L. S.; SCHWAN, R. F. Selection of tropical lactic acid
415 bacteria for enhancing the quality of maize silage. **Journal of Dairy Science**, 96 v., 12 n.,
416 7777-7789 p., 2013.

417

418 SILVA, Y. A. 2022. Avaliação de bactérias epifíticas para silagem de grãos de milho
419 reidratados. Dissertação de Mestrado. UnOp. 1984.

420

421 SILVA, N. C. et al. Influence of storage length and inoculation with *Lactobacillus*
422 *buchneri* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of high-moisture
423 corn and rehydrated corn grain silage. *Animal Feed Science and Technology*. v. 251, p.
424 124-133, 2019.

425

426 SILVESTRE, A. M.; MILLEN, D. D. The 2019 Brazilian survey on nutritional practices
427 provided by feedlot cattle consulting nutritionists. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 50,
428 e20200189, 2021.

429

430 SILVA, Y. **Avaliação de bactérias epifíticas para silagem de grão de milho moído e**
431 **reidratado.** 2022. 27 p. Tese (Mestrado em Nutrição e Produção de Ruminantes) -
432 Universidade Federal de Lavras, 2022.

433

434 SILVA, N. C.; NASCIMENTO, C. F.; NASCIMENTO, F. A.; RESENDE, F. D.;
435 DANIEL, J. L. P.; SIQUEIRA, G. R. Fermentation and aerobic stability of rehydrated corn
436 grain silage treated with different doses of *Lactobacillus buchneri* or a combination of
437 *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*. **Journal of Dairy Science**, 101 v.,
438 5 n., 4158-4167 p., 2018.

439

440 SILVA, N. C.; NASCIMENTO, C. F.; CAMPOS, V. M. A.; ALVES, M. A. P.; RESENDE,
441 F. D.; DANIEL, J. L. P.; SIQUEIRA, G. R. Influence of storage length and inoculation
442 with *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal
443 degradability of high-moisture corn and rehydrated corn grain silage. **Animal Feed
444 Science and Technology**, 251 v., 124-133 p., 2019.

445

446 SOUZA, W. L. D.; CIDRINI, I. A.; JÚNIOR, A. P. N.; SILVA, M. D.; GERVÁSIO, J. R.
447 S.; ABREU, M. J. I. D.; NASCIMENTO, D. C. Effect of rehydration with whey and
448 inoculation with *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium acidipropionici* on the
449 chemical composition, microbiological dynamics, and fermentative losses of corn grain
450 silage. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, 6Supl2 n., 3351-3364 p., 2022.

451

452 TABACCO, E. et al. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and
453 sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum*
454 inoculants. **Journal of Applied Microbiology**. v. 107, n. 5, p. 1632–41, 2009.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO SOBRE A CONSERVAÇÃO DE SILAGENS DE GRÃOS DE MILHO REIDRATADO

RESUMO

A utilização de inoculantes contendo bactéria do ácido lático (BAL) pode acelerar e melhorar a fermentação, garantindo uma silagem de alta qualidade e mais estável após abertura dos silos. Diante disso, objetivou-se avaliar o uso de diferentes inoculantes na silagem de grão de milho reidratado (SGMR). Sendo dois inoculantes comerciais de composição mista, S1 e S2, a cepa - *Lentilactobacillus hilgardii* (LH), a cepa - *L. farraginis* (LF) e a combinação de S1+LF. O milho foi moído (3 mm), reidratado até 65% de matéria seca (MS) e inoculado (média de 10^8 log UFC/kg). O milho moído foi reidratado e compactado manualmente (densidade de 1042 ± 11 kg/m³) em silos experimentais de 5L por 35 e 98 dias de armazenamento. O experimento foi conduzido em DBC com 5 tratamentos (LF, LH, S1, S2 e S1+LF) mais 1 controle (sem inoculante) com 4 repetições (blocos em diferentes dias de produção dos silos), totalizando 48 unidades experimentais. Os dados foram submetidos à análise de variância (SISVAR®). As médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade. A maior população de BAL foi observada na silagem inoculada com o aditivo comercial S1 (8,04 log UFC/g) no menor tempo de estocagem. Os inoculantes mais eficientes em reduzir a população de leveduras foram LF e LH (< 2,00 log UFC/g). Os menores valores de pH foram observados nas silagens inoculadas com S1 e S2 (média: 3,87). As maiores concentrações de N-NH₃ foram observadas nas silagens controle e naquelas inoculadas com LF e LH (média 16,33% MS). O efeito dos inoculantes sobre as perdas de MS, população de bactérias lácticas, concentração de ácido acético e 1,2-propanodiol foi dependente do período de estocagem. As silagens inoculadas com LF, LH e LF+S1 apresentaram maior estabilidade aeróbia após 35 dias de estocagem. As concentrações de 1,2-propanodiol e ácido propiônico aumentaram com o tempo de estocagem e foram maiores nas silagens inoculadas com LH e LF. Com 35 dias de estocagem não houve diferença na perda de MS. Aos 98 dias a perda de MS foi menor nas silagens inoculadas com S1 e S2 (0,81% em média para o grupo). A inoculação com S1 e S2 reduziram as perdas de MS e pH, aumentaram concentração de ácido lático sem alterar a população de leveduras. Porém a adição desses inoculantes, reduziu a estabilidade aeróbia das silagens após 98 dias de estocagem. As silagens inoculadas com a combinação de S1 com *L. farraginis* aumentou a estabilidade aeróbia das silagens após 98 dias de estocagem, desta forma, destaca-se que o uso de BAL presentes nos inoculantes é promissor, pois aceleram a fermentação, promovendo uma rápida queda do pH e inibindo microrganismos indesejáveis, como fungos e bactérias deteriorantes.

Palavras-chave: Ácido acético, inoculantes, microrganismos indesejáveis, valor nutritivo.

ABSTRACT

The use of inoculants containing lactic acid bacteria (LAB) can speed up and improve fermentation, guaranteeing high quality silage that is more stable after the silos have been opened. The aim of this study was to evaluate the use of different inoculants in rehydrated maize grain silage (RMS). There were two commercial inoculants of mixed composition, S1 and S2, the *Lentilactobacillus hilgardii* (LH) strain, the *L. farraginis* (LF) strain and the combination of S1+LF. The maize was ground (3 mm), rehydrated to 65% dry matter (DM) and inoculated (average of 10⁸ log CFU/kg). The ground maize was rehydrated and compacted manually (density of 1042 ± 11 kg/m³) in 5L experimental silos for 35 and 98 days of storage. The experiment was conducted in a DBC with 5 treatments (LF, LH, S1, S2 and S1+LF) plus 1 control (no inoculant) with 4 replications (blocks on different days of silo production), totaling 48 experimental units. The data was submitted to analysis of variance (SISVAR®). The means were compared using the Scott Knott test at 5% probability level. The highest BAL population was observed in silage inoculated with the commercial additive S1 (8.04 log CFU/g) at the shortest storage time. The most efficient inoculants in reducing the yeast population were LF and LH (< 2.00 log CFU/g). The lowest pH values were observed in silages inoculated with S1 and S2 (average: 3.87). The highest N-NH₃ concentrations were observed in the control silages and those inoculated with LF and LH (average 16.33% DM). The effect of the inoculants on DM losses, lactic acid bacteria population, acetic acid concentration and 1,2-propanediol was dependent on the storage period. Silages inoculated with LF, LH and LF+S1 showed greater aerobic stability after 35 days of storage. The concentrations of 1,2-propanediol and propionic acid increased with storage time and were higher in silages inoculated with LH and LF. At 35 days of storage there was no difference in DM loss. At 98 days, DM loss was lower in silages inoculated with S1 and S2 (0.81% on average for the group). Inoculation with S1 and S2 reduced DM loss and pH, and increased lactic acid concentration without altering the yeast population. However, the addition of these inoculants reduced the aerobic stability of the silages after 98 days of storage. The silages inoculated with the combination of S1 and *L. farraginis* increased the aerobic stability of the silages after 98 days of storage, thus highlighting that the use of LAB present in inoculants is promising, as they accelerate fermentation, promoting a rapid drop in pH and inhibiting undesirable microorganisms such as fungi and spoilage bacteria.

Keywords: Acetic acid, inoculants, undesirable microorganisms, nutritional value.

455 1. INTRODUÇÃO

456 As bactérias do ácido láctico são os principais microrganismos responsáveis pela
457 fermentação do alimento, produzindo ácido láctico, abaixando o pH e inibindo outros
458 microrganismos indesejáveis (MUCK et al., 2018).

459 Em se tratando de silagem de GMR, uma das principais vantagens nutricionais que
460 ocorre com a fermentação do grão ensilado está ligado ao aumento da digestibilidade do
461 amido (FERRARETTO et al., 2015). O grão de milho possui uma matriz proteica que
462 circunda os grânulos de amido, impedindo a degradação desse carboidrato pelos
463 microrganismos ruminais (HOFFMAN et al., 2011). Contudo, durante a estocagem ocorre a
464 degradação dessa matriz proteica facilitando o acesso pelos microrganismos ruminais
465 aumentando o valor nutricional da silagem (HOFFMAN et al., 2011). Junges et al (2017)
466 observaram que 60% da atividade proteolítica em silagens de grãos é realizada por bactérias,
467 mas não relatam quais microrganismos estão de fato ligados a esse processo.

468 Durante a estocagem, ocorre alteração na população e diversidade microbiana nas
469 silagens de milho (CARVALHO et al., 2017) e diversos são os estudos que estudam a
470 dinâmica e a identificação de microrganismos em silagens milho (AGARUSSI et al., 2022;
471 SANTOS et al., 2019; HU et al., 2018; CARVALHO et al., 2017; OGUNADE et al., 2017;
472 LI; NISHINO, 2011). Em estudo realizado por Carvalho et al (2017), os autores observaram
473 a dominância de BAL em silagem de GMR pertencentes aos gêneros *Enterococcus*,
474 *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* com 5 dias de fermentação, contudo, nenhuma
475 inferência sobre a capacidade proteolítica desses microrganismos foi realizada pelos autores.

476 A avaliação de inoculantes bacterianos em silagem de GMR também merece ser
477 ressaltado. É explanado na literatura que cepas de bactérias do ácido láctico (BAL) são as
478 mais importantes nesse processo (PAHLOW et al., 2003). Estudos realizados como o Silva
479 et al. (2019) avaliou uma cepa de bactéria *L. buchneri* (NCIMB 40788) como único
480 microrganismo compondo o inoculante. Além disso, a bactéria *L. buchneri* foi o único
481 microrganismo heterofermentativo utilizados nos estudos

482 O fato da silagem de GMR apresentarem queda mais lenta do pH (CARVALHO et al.,
483 2017) quando comparado com silagens de milho planta inteira, por exemplo, pode ter levado
484 o maior número de pesquisas envolvendo microrganismos homofermentativos. Assim é
485 comum a utilização deste tipo de inoculante nestas silagens. No entanto, não existem
486 resultados de pesquisa ou inoculantes comerciais contendo microrganismos isolados de
487 silagem de GMR ou selecionados especificamente para estas silagens, o que ressalta ainda
488 mais a importância em se ter conhecimento sobre os possíveis efeitos da inoculação com
489 microrganismos obtidos em silagem de GMR sobre a fermentação.

490 A hipótese do presente trabalho é que a utilização de inoculantes em silagem de grão
491 de milho moído reidratado possa melhorar a fermentação, consequentemente reduzir perdas
492 e aumentar a estabilidade aeróbia. Diante disso, objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes
493 inoculantes sobre: perfil fermentativo e estabilidade aeróbia de silagens de GMR pelo
494 período de 35 e 98 dias de armazenamento.

495 2. MATERIAL E MÉTODOS

496 2.1 Processo de ensilagem

497 O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Universidade
498 Federal de Lavras, Brasil (21°13'49" S, 44°58'10" W). O híbrido LG36799VIP3 foi
499 plantado na região de Macaia, em Bom Sucesso – MG, em 22 de outubro de 2023 e colhido
500 após 187 dias na data de 27 de abril de 2024 (safra 2023/24), o milho foi armazenado em
501 sacos de ráfia. Os grãos de milho seco foram moídos em moinho tipo martelo com peneira
502 de crivo de 3 mm. O tamanho médio geométrico das partículas foi mensurado por meio de
503 um conjunto de peneiras para grãos, os cálculos foram realizados de acordo com a
504 porcentagem da retenção de partículas de cada peneira (BAKER; HERMAN, 2002).
505 Posteriormente, foram hidratados com objetivo de atingir 65% de MS. A mistura entre água
506 e milho foi feita de forma manual e ensilados em silos experimentais com volume de 5L com
507 tampa.

508 A inoculação microbiana ocorreu no momento da reidratação dos grãos e o material
509 foi homogeneizado de forma a incorporar igualmente a umidade. Os aditivos utilizados
510 foram: inoculante comercial S1 (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*,
511 *Lentilactobacillus buchneri*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus*
512 *lactis*, *Pediococcus acidilactici* e *Propionibacterium acidipropionici*) mais enzima
513 celulolítica 5% (taxa de inoculação $3,86 \times 10^8$ UFC / kg), S2 (taxa de inoculação $1,71 \times 10^8$
514 UFC / kg), as cepas de *Lentilactobacillus hilgardii* – (taxa de inoculação $8,1 \times 10^9$ UFC /
515 kg) e *Lentilactobacillus farraginis* – (taxa de inoculação $1,05 \times 10^{10}$ UFC / kg), combinação
516 entre LF+S1 (taxa de inoculação $5,4 \times 10^9$ UFC / kg), e o controle (CTR – sem inoculação).
517 As cepas LF e LH foram cultivadas em laboratório conforme Ávila et al. (2009) e avaliadas
518 quanto a população de células viáveis por meio de plaqueamento antes da ensilagem. O
519 milho utilizado como controle foi misturado com um volume de água destilada igual ao dos
520 inoculantes aplicados, porém sem a presença do inóculo.

521 O milho reidratado foi compactado manualmente até atingir a uma densidade
522 aproximada ($1042 \pm 11 \text{ kg/m}^3$). Cada tratamento consistiu de 4 blocos, totalizando 48

523 unidades experimentais, as silagens foram feitas em dias distintos; em cada dia uma bloco.
524 Os silos foram lacrados, pesados e armazenados por 35 e 98 dias. Após os períodos de
525 estocagem, os silos foram novamente pesados e abertos. As perdas de matéria seca foram
526 calculadas por diferença entre o peso seco do material antes da ensilagem e o peso seco final
527 no momento da abertura dos silos.

528

529 **2.2 Análises químicas**

530 Amostras para avaliação de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), amido,
531 carboidratos solúveis (CSA) e N-amoniaco foram coletadas antes da ensilagem e de cada
532 silo após a abertura a cada tempo de armazenamento. As amostras foram pré-secas em
533 estufas com circulação de ar forçado a 55 °C por 72 horas, em seguida, moídas em peneira
534 de malha de 1 mm de diâmetro, utilizando um moinho de facas (Star FT 80, Fortinox
535 Indústria, Comércio e Serviços). A concentração de MS foi determinada em estufa à 105°C
536 por 24 h. A concentração de PB foi determinada pelo auto analisador de nitrogênio LECO®
537 modelo FP828 (LECO Corporation, Michigan, USA). A concentração de amido foi
538 mensurada com a utilização de α -amilase e amiloglicosidase, e a concentração de glicose
539 avaliada por colorimetria, como em Fernandes et al. (2022), adaptado de Hall et al. (2015).
540 As amostras para avaliação de N-amoniaco, pH e CSA foram mantidas congeladas e,
541 posteriormente, foi preparado um extrato aquoso com 30 g de amostra e 270 mL de água
542 deionizada. A partir desse extrato a avaliação de N-amoniaco, a concentração foi analisada
543 com uma reação de indofenol catalisada como em Chaney e Marbach (1962). Os
544 carboidratos solúveis em água (CSA) foram determinados pelo método do fenol usando uma
545 curva de glicose padrão (Dubois et al., 1956). O pH de cada amostra foi então determinado
546 por meio de um medidor de pH (Potenciômetro DIGIMED® DM 20, Digicrom
547 Instrumentos, SP, Brasil).

548 As concentrações dos ácidos láctico, acético, propiônico e butírico e dos álcoois 1,2
549 -propanodiol e etanol foram avaliadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência
550 (HPLC), seguindo metodologia descrita por Santos et al. (2014). As análises foram
551 realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu equipado com bomba
552 quaternária modelo LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPDM-20A,
553 desgaseificador modelo DGU-20A5, interface modelo CBM-20A e injetor automático com
554 amostrador automático modelo SIL-20A. As separações foram realizadas utilizando uma
555 coluna Supelcogel 8H 300mm x 7,8mm (cat. 59246-U) e pré-coluna Supelcogel 8H 10mm
556 x 7,8mm. A eluição foi realizada em sistema isocrático, utilizando solução tampão H₂SO₄

557 0,005 mol/L como fase móvel. O fluxo foi de 0,5 mL/min, com a temperatura mantida em
558 30°C. O volume injetado de amostras e padrão foi de 20 µL, e os ácidos foram analisados
559 em 210 nm e os álcoois no detector de índice de refração. Os compostos foram identificados
560 comparando o tempo de retenção das amostras com os padrões. A quantificação foi feita
561 utilizando padronização externa.

562 **2.3 Análises microbiológicas**

563 Para avaliação da população microbiana foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} –
564 10^{-6}), 0,1 mL de cada diluição foi espalhada em superfície em meios específicos para
565 diferentes grupos de microrganismos usando a técnica de plaqueamento em superfície
566 contendo três repetições. Um extrato foi preparado misturando 30g das amostras do milho
567 moído com 270 mL de água peptonada estéril a 0,1% e homogeneizada em shaker orbital
568 por 20 min para contagem de BAL, leveduras, fungos filamentosos (FF) e bactérias aeróbias
569 formadoras de esporos (BAFE). A população de BAL foi avaliada em Man, Rogosa e Sharpe
570 ágar (MRS, HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia) mais nistatina (4 ml/L), as placas foram
571 incubadas a 37°C por 48h. Para avaliação da população de BAFE, o extrato aquoso foi
572 pasteurizado à 80°C por 15 min e, posteriormente o extrato foi espalhado em placas com
573 meio Nutrient Agar (NA; HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia) mais nistatina (4 mL/L) e
574 incubadas à 37°C por 24 h. A população de leveduras e FF foi avaliada em Dicloran Rose
575 Bengal Chloramphenicol (DRBC, Difco; Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA) e incubadas
576 à 28°C. As placas foram avaliadas com 72 h de incubação para quantificação de leveduras e
577 com 168 h para quantificação de FF. As leveduras foram distinguidas dos fungos
578 filamentosos pela aparência de suas colônias e morfologia celular. As colônias foram
579 contadas em placas contendo um mínimo de 30 e um máximo de 300 unidades formadoras
580 de colônias (UFCs) e foi feita por observação visual de cada placa e transformada em log
581 para as análises.

582 **2.4 Avaliação da estabilidade aeróbia**

583 A estabilidade aeróbia foi avaliada a partir de amostras de 3 kg de silagem em
584 baldes plástico, sem que as mesmas estivessem compactadas. Sensores data-logger (modelo
585 RC5+; Elitech, RS, Brasil) foram inseridos no centro da silagem para o registro de
586 temperatura a cada 30 minutos. Para evitar contaminação e ressecamento das amostras, duas
587 camadas de gaze foram colocadas sobre as silagens, que foram mantidas em sala fechada
588 por 7 dias. A temperatura ambiente também foi registrada. A perda de estabilidade aeróbia

589 (EA) foi considerada quando a temperatura da silagem ultrapassar em 2 °C a temperatura
590 ambiente (MORAN et al., 1996).

591 2.5 Análise Estatística

592 O delineamento experimental foi conduzido em blocos casualizados (cada bloco
593 um dia ensilagem), em fatorial 6 x 2 (5 inoculantes mais um controle x 2 tempos de
594 estocagem), com 12 tratamentos e quatro repetições (blocos), totalizando 48 unidades
595 experimentais. Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do pacote
596 computacional SISVAR®. O modelo utilizado foi $Y_{jkl} = \mu + B_j + I_k + E_l + (I \times E)_{kl} + e_{jkl}$, onde
597 μ é a média geral; B_j é o efeito de bloco ($j = 1, 2, 3$ e 4); I_k é o efeito dos inoculantes ($k =$
598 controle, S1, S2, LF, LH e S1+LF); E_l é o efeito do tempo de estocagem ($l = 35$ ou 98 dias);
599 $(I \times E)_{kl}$ é o efeito da interação entre inoculante e tempo de estocagem e e_{jkl} é o erro
600 experimental. As médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de
601 probabilidade em caso de significância no teste F.

602 3. RESULTADOS

603 O milho moído apresentou teor de matéria seca (MS) de 80,9% e após a reidratação
604 a MS seca do milho foi de 64,9 %. As populações de BAL, FF e leveduras foram 3,23; 3,26
605 e 3,48 log UFC/g de milho moído, respectivamente. Não foi observado crescimento de
606 BAFE no milho antes da ensilagem. A distribuição de partículas foi a seguinte: 10,04% para
607 a peneira de 3,25 mm, 40,37% para a peneira de 2 mm, 32,29% para a peneira de 1,25 mm
608 e 18,34% para o fundo. Os teores de amido, proteína bruta (PB) e NH₃ foram
609 respectivamente: 73,62%; 8,97% e 2,34% (Tabela 1).

610 Houve efeito da inoculação sobre a concentração de MS e amido das silagens
611 ($P < 0,05$) (Tabela 2). A concentração de MS das silagens inoculadas com S1 e S2 e a silagem
612 controle (média 60,05%) não diferiu do grupo contendo as silagens inoculadas com LF, LH
613 e S1+LF, que apresentaram concentração de MS menor que o grupo com as demais silagens.
614 A silagem controle e as silagens inoculada com LF e LH apresentaram maiores
615 concentrações de amido (média 72,73%). As demais silagens apresentaram média de 69,62%
616 de amido na MS (Tabela 2).

617 Houve efeito ($P < 0,01$) da interação entre inoculação e tempo de estocagem sobre
618 as perdas de MS. Com 35 dias de estocagem não houve diferença na perda de MS (média
619 0,70%). Aos 98 dias a perda de MS foi menor nas silagens inoculadas com S1 e S2 (0,81%
620 em média para o grupo, figura 1), seguido pelo grupo contendo as cepas LF, LF+S1 e

621 controle e por último pela cepa LH (média 2,45%).

622 Somente na silagem controle o pH reduziu de 35 para 98d de estocagem,
623 Comparando as silagens aos 35 dias de estocagem, a inoculação com S1, S2 e S1+LF (média
624 3,89) resultou em menor valor de pH. Aos 98 dias de estocagem, a silagem controle e
625 inoculada com S1 e S2 resultou em menores valores de pH apresentando valor médio de
626 3,87 (Figura 2). Com 35 dias de estocagem a inoculação resultou em aumento na população
627 de BAL, independente do inoculante testado. Aos 98 dias de estocagem a população de BAL
628 foi maior nas silagens inoculadas com LF, LH e S1+LF (média 8,14 log UFC/g) e menor
629 nas silagens inoculadas com S1 e S2 (média 6,68 log UFC/g) e controle. Não houve efeito
630 significativo ($P > 0,05$) de inoculantes e tempo de estocagem, sobre CSA e proteína bruta e
631 N-NH₃ (Tabela 2).

632 A população de BAFE foi maior nas silagens inoculadas com LF, S2 e S1+LF
633 (média 2,19 log UFC/g) em comparação as outras silagens que apresentaram média de 1,41
634 log UFC/g. A população dessas bactérias aumentou de 35 para 98 d de ensilagem. As
635 silagens inoculadas com LF e LH apresentaram menor população de leveduras, com valores
636 médios inferiores a 2,00 log UFC/g comparado a silagem controle, e as silagens inoculadas
637 com S1, S2 e S1+LF (média 3,79 log UFC/g). Houve efeito do tempo de estocagem sobre a
638 população de leveduras e fungos filamentosos. Foi observado maior população de fungos
639 filamentosos no menor tempo de estocagem (média 2,80 log UFC/g) comparado ao maior
640 tempo de estocagem de 98 dias (1,52 log UFC/g). Aos 35 dias de estocagem a população de
641 leveduras foi maior (média 3,58 log UFC/g) comparado ao tempo de estocagem de 98 dias
642 (média 2,40 log UFC/g, Tabela 2).

643 Houve efeito do inoculante sobre a concentração de ácido láctico ($P < 0,01$), as
644 silagens inoculadas com S1, S2 (média 5,57% MS; Tabela 2) apresentaram maiores
645 concentrações de ácido láctico, seguidas pelo grupo contendo as silagens controle e a
646 combinação S1+LF e posteriormente pelas silagens inoculadas com LF e LH (média 2,98%
647 MS), que tiveram o menor valor de ácido láctico. Houve efeito significativo do inoculante e
648 tempo de estocagem ($P < 0,01$), para a concentração de etanol. A interação entre o tempo de
649 estocagem e inoculação ($P < 0,01$) alterou a concentração de ácido acético (Figura 4). Aos
650 35 dias de estocagem, todos os inoculantes reduziram a concentração de ácido acético com
651 maior valor para o controle, seguido pelo grupo formado pelas silagens LH, S1, S2 e LF+S1
652 e pela silagem LF, que teve o menor valor. Com 98 dias de estocagem a maior contração de
653 ácido acético foi observada nas silagens inoculadas com LF e LH, S1, S2 e S1+LF (média
654 6,12% MS).

655 Houve diferença significativa entre os inoculantes para estabilidade aeróbia (P

656 <0,01) e temperatura máxima ($P = 0,02$) no tempo de estocagem de 35 dias (Tabela 3). As
657 silagens inoculadas com LF, LH e LF+S1 (média 41,43h) apresentaram maior estabilidade
658 aeróbia após 35 dias de estocagem. A temperatura máxima foi superior na silagem CTR e
659 silagens inoculadas com S1 e S2 (34,6 °C). Aos 98 dias de estocagem (Tabela 4) foi possível
660 observar que houve diferença significativa para estabilidade aeróbia ($P < 0,01$) e temperatura
661 máxima ($P < 0,01$). A silagens inoculadas com LF, LH e S1+LF (média 142,3h) teve maior
662 estabilidade comparada com as silagens inoculadas com S1 e S2 (média 77,05h). A silagem
663 controle (38,2 °C) apresentou maior temperatura máxima, comparado com os demais grupos.
664 Porém, a adição desses inoculantes, reduziu a estabilidade aeróbia das silagens após 98 dias
665 de estocagem. A combinação de S1 com *L. farraginis* aumentou a estabilidade aeróbia das
666 silagens após 35 e 98 dias de estocagem.

667 A interação entre o tempo de estocagem e inoculação ($P < 0,01$) alterou a
668 concentração de 1-2 propanodiol (Figura 5). Aos 35 dias de estocagem, as silagens
669 inoculadas com LF, LH e a combinação LF+S1 (média 0,42% MS) apresentaram maiores
670 concentrações de 1-2 propanodiol. Com 98 dias de estocagem a maior contração de 1-2
671 propanodiol foi observada nas silagens inoculadas com LF e LH (média 1,31% MS).

672 4. DISCUSSÃO

673 Após a hidratação, o milho apresentou teor de MS de 64,9%, e o teor de MS das
674 silagens após a fermentação variou de 58,96% a 60,69%, o que normalmente é observado
675 neste tipo de silagem (Costa et al., 2023; Mombach et al., 2019). Embora as perdas de MS
676 estejam dentro da faixa geralmente encontrada na literatura para este tipo de silagem
677 (Carvalho et al., 2017; Fernandes et al., 2022), os resultados mostram que os diferentes
678 inoculantes influenciaram nas perdas ocorridas. Geralmente, a inoculação com cepas
679 heterofermentativas resulta no maior percentual de perdas de MS devido à maior produção
680 de CO₂ no metabolismo. Silva et al. (2018a) observaram que a inoculação com *Lactobacillus*
681 *plantarum* (MA18/5U) e *Pediococcus acidilactici* (MA18/5M) reduziu as perdas, enquanto
682 a inoculação com *Lactobacillus buchneri* (NCIMB 40788) aumentou as perdas. Com isso, a
683 inoculação com inoculantes comerciais S1 e S2 reduziu as perdas, considerando que a
684 silagem controle e silagens inoculadas com LH e LF não diferiram.

685 As BAL heterofermentativas atuam na redução das perdas após a exposição aeróbia
686 das silagens, principalmente pela inibição de fungos. Entretanto, existem outros
687 microrganismos que causam perdas na fase anaeróbica da fermentação da silagem, como por
688 exemplo, *Clostridium*. Em silagens de cana-de-açúcar, a adição de cepas heterofermentativas
689 reduz as perdas de MS por atuar sobre as leveduras durante a fase de fermentação; em

690 silagens de plantas inteiras de milho, em geral, as cepas heterofermentativas aumentam as
691 perdas de MS nessa fase, reduzindo as perdas apenas na fase de abertura do silo. Dessa
692 forma, o efeito dos inoculantes nas perdas de MS depende de quais microrganismos estão
693 causando as perdas no substrato em questão, porem pode estar relacionada nessas silagens
694 devido à perda de carbono em forma de CO₂.

695 As perdas de MS não diferiram no tempo de estocagem de 35 e 98 dias para
696 inoculantes comerciais. O metabolismo microbiano durante a fermentação acarreta na
697 alteração de diversos parâmetros da silagem. No caso do pH, menores valores são
698 alcançados em silagens com maior concentração de ácido lático, composto orgânico formado
699 pelo metabolismo homofermentativo e responsável pela acidificação da silagem durante o
700 período de estocagem (MUCK et al., 2018). No presente estudo, a silagem inoculada com
701 S1, S2 (comercial) e S1+LF estocadas por 35 dias teve menor pH e maior concentração de
702 ácido lático em comparação às demais silagens. Não somente a inoculação, mas o tempo que
703 a silagem permanece estocada também afeta valores de pH. (ARCARI et al., 2016;
704 FERRARETTO et al., 2015). Diversos são os fatores que podem afetar o pH de uma silagem
705 ao longo da fermentação, como disponibilidade de substrato e perfil microbiano (MUCK et
706 al., 2018; FERRARETTO et al., 2015).

707 O fato das silagens terem sido inoculadas proporcionou um aumento na população
708 de BAL aos 35 dias, o que justifica os dados observados no presente estudo. Dentre as
709 silagens inoculadas, a silagem com S1 (comercial) apresentou maior população de BAL. As
710 silagens inoculadas com LH e LF apresentaram maior população aos 98 dias, isso se justifica
711 por serem bactérias heterofermentativas e podem ter se beneficiado de substratos restantes
712 ou da degradação de polissacarídeos complexos ao longo do tempo, permitindo seu
713 crescimento mais evidente após 98 dias. As BAL são microrganismos acidotolerantes mas
714 que podem ter uma redução na sua população em longos períodos de estocagem
715 (CARVALHO et al., 2017; WOOLFORD, 1984).

716 Em um processo de fermentação mista como a silagem, a redução do pH é o
717 principal mecanismo de inibição de microrganismos indesejáveis utilizados por BAL (Ávila
718 e Carvalho, 2019; Fennema et al., 1999). A inibição de bactérias *E. coli* ocorre devido à
719 rápida queda do pH, mas os *Bacillus* são mais resistentes à acidez e geralmente são inibidos
720 pela acidez associada à anaerobiose (Ávila e Carvalho, 2019; Pahlow et al., 2003).

721 O teor de proteína bruta na silagem de GMR teve um valor médio de 8,08% da MS.
722 O teor de proteína bruta encontrado por da Silva et al. (2018) foi de 9,09% da MS para milho
723 moído finamente e 8,87% da MS para milho moído grosseiramente. Rezende et al. (2014) e
724 Silva et al. (2018) observaram teores de PB semelhantes (em torno de 8 a 10% da MS) para

725 silagem de GMR. Ambos se enquadram dentro dos valores observados no presente estudo e
726 na literatura.

727 O aumento da estabilidade aeróbia das silagens pode ser explicado pelo aumento da
728 concentração de ácidos com características antifúngicas, as silagens mais estáveis tiveram
729 maior ácido acético e também maior concentração de 1,2 propanodiol que pode ser
730 convertido em propiônico. No processo de deterioração aeróbia, substratos como açúcares
731 residuais e lactato são oxidados a CO₂, água e calor, principalmente por leveduras, resultando
732 em aumento do pH, aumento da temperatura e no crescimento de outros microrganismos
733 (ROOKE e HATFIELD., 2003).

734 As bactérias do ácido lático também são capazes de produzir ácido acético. As BAL
735 heterofermentativas produzem um mol de ácido lático, um mol de dióxido de carbono e um
736 mol de etanol ou ácido acético a partir de glicose (MUCK, 2010). A maior concentração de
737 ácido acético foi observada nas silagens inoculadas com LF e LH, nessas silagens foi
738 detectado o crescimento de fungos, porem bem baixo. Isso pode ser explicado porque o ácido
739 acético juntamente com pH baixo são inibidores de vários microrganismos aeróbicos
740 (MUCK, 2010).

741 O etanol é um álcool formado durante a fermentação de silagens como resultado do
742 metabolismo de leveduras e, dependendo do tipo de microrganismo, por BAL de via
743 heterofermentativa (WOOLFORD, 1984; MUCK et al., 2018). De modo geral, a formação
744 de etanol pode contribuir com as PMS durante a ensilagem por ser oriundo de atividade de
745 leveduras, reduzindo o valor nutritivo do alimento (BORREANI, et al., 2018; MUCK et al.,
746 2018). Os valores de ácido butírico foram menores que os achados na literatura
747 (CARVALHO et al., 2016; SILVA et al., 2018; SILVA et al, 2019).

748 O uso de silagens inoculadas com *Lentilactobacillus hilgardii* e *Lentilactobacillus*
749 *farraginis* aumentou consideravelmente as concentrações de ácido acético e de 1,2 propanodiol
750 em silagens de grãos de milho reidratado. Quando essas silagens são inoculadas, as cepas
751 desses microrganismos produzem compostos antifúngicos, como o ácido acético e o ácido
752 propiônico, os quais são capazes de aumentar a estabilidade aeróbia (FERRERO et al., 2019;
753 DA SILVA et al., 2021). Ambas classificadas como bactérias heterofermentativas
754 obrigatórias, o LF e LH, em suas rotas de fermentação de carboidratos, usam a via da pentose
755 fosfocetolase (PPK), produzindo quantidades equimolares de CO₂, lactato, acetato e etanol
756 (SPECTOR, 2009). Além da produção de ácido lático, e ácido acético pelas vias
757 fermentativas, esses microrganismos também podem produzir ácido acético e 1,2
758 propanodiol a partir do metabolismo anaeróbico do ácido lático. A depender da presença de
759 certos grupos de bactérias, o 1,2 propanodiol pode ser convertido em ácido propiônico

760 (KROONEMAN et al., 2002). Para ambos os ácidos, o tempo de estocagem aumentou a sua
761 concentração de 35 para 98 dias, podendo ser explicado devido a maior formação dos ácidos
762 pelas BAL ao longo da fermentação (FERRARETTO et al., 2015).

763 5. CONCLUSÃO

764 A silagem de grão de milho reidratado, associada ao uso de inoculantes de bactérias
765 do ácido lático foram capazes de alterar o processo fermentativo, queda do pH, inibindo
766 microrganismos indesejáveis e promovendo uma fermentação mais eficiente. Dessa forma,
767 a inoculação com S1 e S2 em silagens de grãos de milho reidratado reduziram as perdas de
768 MS e pH, aumentaram concentração de ácido lático sem alterar a população de leveduras.
769 As silagens inoculadas com LF e LH foram eficientes na fase de abertura dessas silagens. A
770 combinação de S1 com *L. farraginis* aumentou a estabilidade aeróbia das silagens após 98
771 dias, além de uma fermentação mais eficiente.

Tabela 1 - Caracterização do grão de milho antes da ensilagem

Itens	Média ± DP
Matéria seca milho (MS; %)	80,9% ± 0,69
MS pós-reidratação (MS; %)	64,9% ± 0,73
Amido (MS; %)	73,6% ± 0,89
PB (MS; %)	8,97% ± 0,14
NH ₃ (PB; %)	2,34% ± 0,09
Distribuição de partículas	
3,25 mm	10,04%
2 mm	40,47%
1,25 mm	32,29%
Fundo	18,34%
Contagem de microrganismos (log UFC/g)	
BAL	3,23 ± 0,13
BAFE	nd -
Fungos filamentosos	3,26 ± 0,15
Leveduras	3,48 ± 0,19

MS = Matéria seca; PB = Proteína Bruta; NH₃ = Nitrogenio Amoniacal; BAL = bactéria do ácido láctico; BAFE = Bactérias aeróbias formadoras de esporos.

Tabela 2. – Teor de matéria seca, amido, proteína e CSA (%), população de microrganismos e teor de ácido lático, propiônico, butírico e etanol de silagens de milho moído reidratado em diferentes tempos de armazenamento (35 e 98 dias).

Variável	Inoculante (I)						Estocagem (E)		Valor -P			
	CTR	LF	LH	S1	S2	LF+S1	35d	98d	I	E	I×E	EPM
MS%	60,09a	59,33b	58,96b	60,08a	60,00a	59,60b	59,81	59,54	0,04	0,25	0,12	0,271
Amido (% MS)	72,09a	73,22a	72,9a	70,02b	69,63b	69,26b	71,45	70,93	<0,01	0,32	0,18	0,632
Proteína (% MS)	8,20	8,09	8,24	7,87	8,01	8,10	8,14	8,03	0,60	0,37	0,79	0,153
N-NH3 (% PB)	17,46	15,4	16,15	14,7	14,97	13,78	15,95	14,87	0,77	0,46	0,42	1,166
CSA (% MS)	0,33	0,57	0,23	0,21	0,40	0,37	0,41	0,29	0,13	0,11	0,34	0,091
BAFE (log UFC/g)	1,05b	2,08a	1,76b	1,44b	2,28a	2,23a	1,33B	2,28A	0,02	<0,01	0,15	0,282
FF (log UFC/g)	2,97	2,05	2,39	1,66	1,64	2,25	2,80A	1,52B	0,24	<0,01	0,41	0,421
Leveduras (log UFC/g)	4,97a	1,44b	1,35b	3,38a	3,68a	3,15a	3,58A	2,40B	<0,01	<0,01	0,17	0,424
Ácido lático (% MS)	4,16b	3,29c	2,68c	5,67a	5,48a	4,37b	4,02	4,53	<0,01	0,07	0,22	0,352
Ácido propiônico (% MS)	0,01b	0,03a	0,02a	0,01b	0,01b	0,03a	0,06	0,02	<0,01	0,09	0,21	0,004
Etanol (% MS)	0,57a	0,33b	0,24b	0,27b	0,28b	0,20b	0,27B	0,37A	<0,01	<0,01	0,07	0,460

¹EPM = Erro padrão da média; ²Efeito do uso do inoculante; ³Efeito do tempo de estocagem; ⁴Efeito da interação inoculante x tempo de estocagem. I×E: $P < 0,01$. Médias com diferentes letras maiúsculas diferem quanto ao tempo de estocagem ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras minúsculas diferem quanto ao uso do inoculante ($P < 0,05$).

Tabela 3. Estabilidade aeróbia da silagem de GMR inoculadas em tempo de armazenamento diferentes (35 dias).

Variável	Inoculante						EPM	P
	CTR	LF	LH	S1	S2	LF+S1		
Estabilidade aeróbia (h)	31,5b	128,6a	107,8a	46,9b	45,9b	103,0a	15,87	<0,01
Temperatura máxima (°C)	36,0a	28,4b	27,0b	35,0a	32,8a	24,7b	2,44	0,02
Tempo para T _{máx} (h)	100,9	107,6	107,0	107,3	107,9	100,1	24,01	1,00

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

Tabela 4. Estabilidade aeróbia da silagem de GMR inoculadas em tempo de armazenamento diferentes (98 dias).

Variável	Inoculante						EPM	P
	CTR	LF	LH	S1	S2	LF+S1		
Estabilidade aeróbia (h)	158,4a	140,3a	168,0 a	51,6b	102,5b	155,8a	17,79	<0,01
Temperatura máxima (°C)	38,2a	25,4b	25,7b	26,0b	37,3a	26,0b	1,74	<0,01
Tempo para T _{máx} (h)	79,6	94,4	131,4	73,0	56,4	94,4	17,97	0,19

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

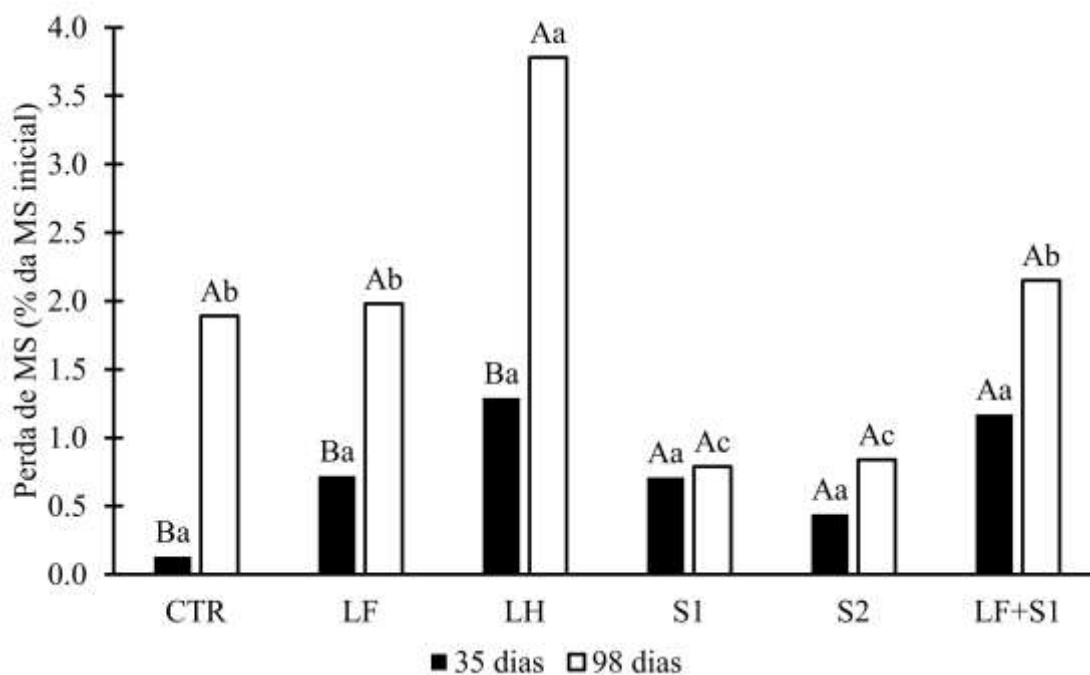


Figura 1. Perdas de matéria seca (MS) da silagem de grão de milho reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas e armazenada por diferentes tempos de estocagem (35 e 98 dias). I×E: $P < 0,01$. Médias com diferentes letras minúsculas diferem quanto ao uso do inoculante ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras maiúsculas diferem ao tempo de estocagem ($P < 0,05$).

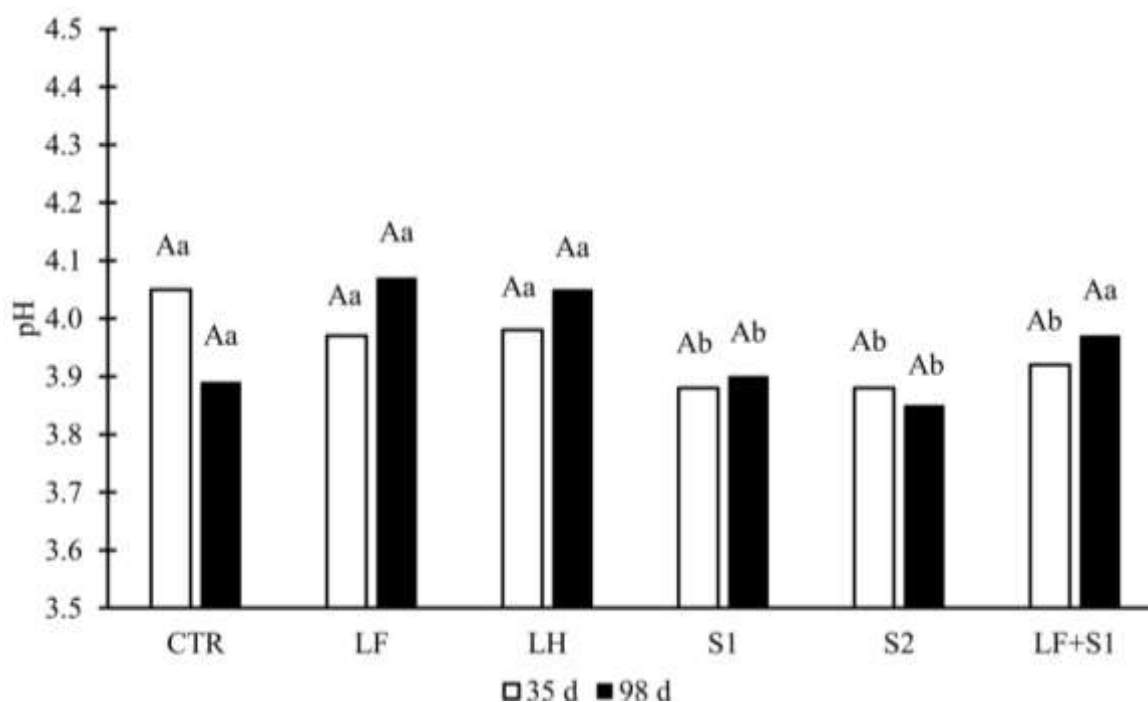


Figura 2. Valores de pH em silagem de grão de milho reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas e armazenada por diferentes tempos de estocagem (35 e 98 dias). I×E: $P < 0,01$. Médias com diferentes letras minúsculas diferem quanto ao uso do inoculante ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras maiúsculas diferem ao tempo de estocagem ($P < 0,05$).

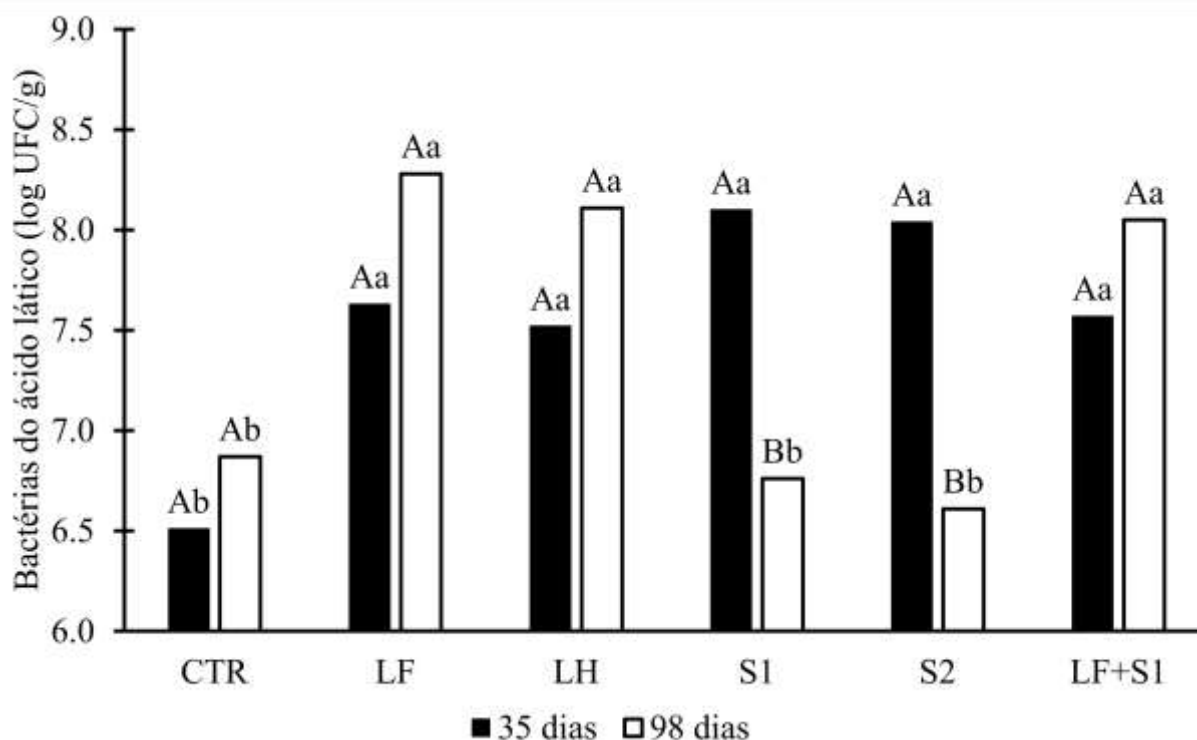


Figura 3. Valores de BAL em silagens de grãos de milho reidratado inoculadas e estocadas em diferentes tempos de ensilagem (35 e 98 dias). I×E: $P < 0,01$. Médias com diferentes letras minúsculas diferem quanto ao uso do inoculante ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras maiúsculas diferem ao tempo de estocagem ($P < 0,05$).

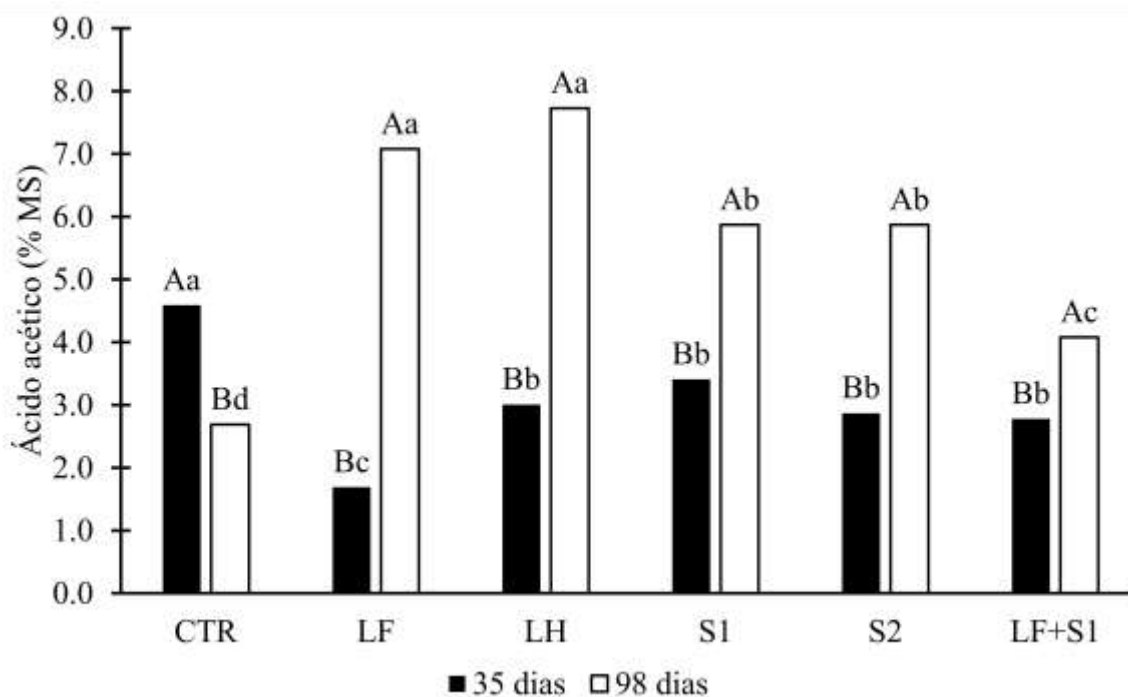


Figura 4. Concentração de ácido acético (% MS) na silagem de grão de milho reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas e armazenada por diferentes tempos de estocagem (35 e 98 dias). I×E: $P < 0,01$. Médias com diferentes letras minúsculas diferem quanto ao uso do inoculante ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras maiúsculas diferem ao

tempo de estocagem ($P < 0,05$).

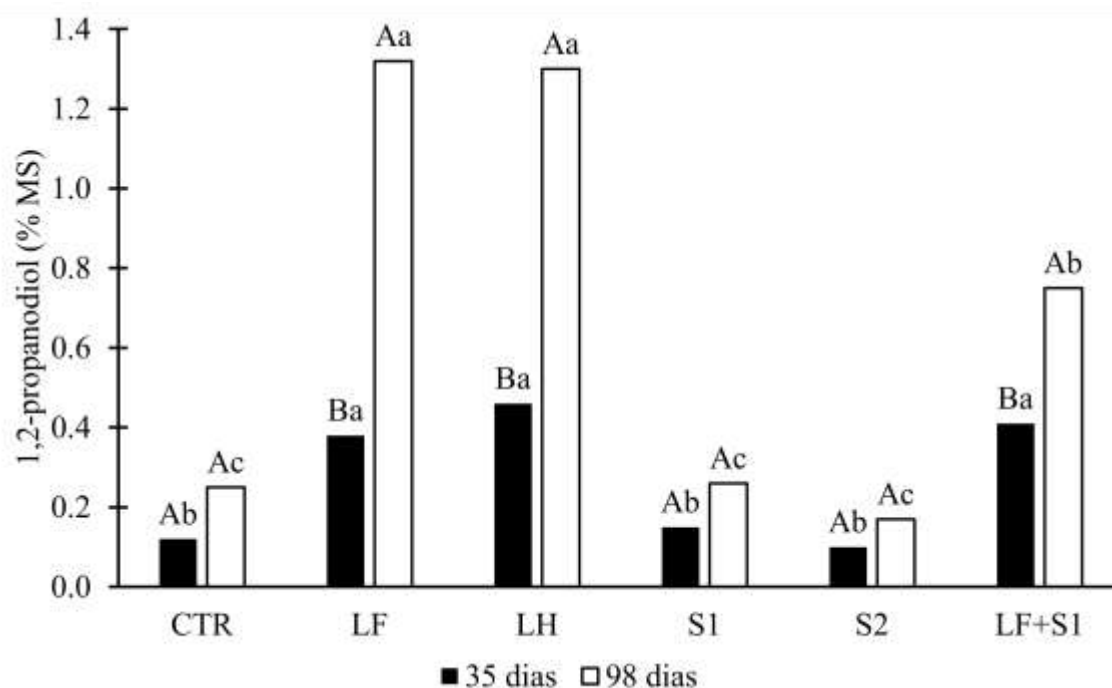


Figura 5. Concentração de 1-2 propanodiol (% MS) na silagem de grão de milho reidratado (GMR) inoculada com diferentes cepas e armazenada por diferentes tempos de estocagem (35 e 98 dias). I×E: $P < 0,01$. Médias com diferentes letras minúsculas diferem quanto ao uso do inoculante ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras maiúsculas diferem ao tempo de estocagem ($P < 0,05$).

814 **6.0 REFERÊNCIAS**

815

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

818

819 BERNARDES, T. F.; CARDOSO, M. V. S. B.; LIMA, L. M. Silage feeding programs on
820 intensive dairy farms. In: **Annual Meeting of the American Dairy Science Association**.
821 Knoxville, Tennessee. 2018.

822

823 BORREANI, G. et al. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in
824 silages.

825 **Journal of Dairy Science**. v. 101, p. 3952-3979, 2018.

826

827 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
828 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**,
829 v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

830

831 BRAGA, F. R. et al. Nematocidal activity of extracellular enzymes produced by the
832 nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on cyathostomin infective larvae. **Veterinary**
833 **Parasitology** 212(3–4):214–218, 2015.

834

835 BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry and Molecular Biology
836 of Plants. **American Society of Plant Biologists**. Rockville, MD. 1.264p. 2000.

837

838 CARVALHO, B. F. et al. Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and
839 yeasts of rehydrated corn kernel silage. **Journal of Applied Microbiology**. v. 122, n. 31, p.
840 589-600, 2017.

841

842 CARVALHO, B. F. et al. Aerobic stability of sugar-cane silage inoculated with tropical
843 strains of lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**. v. 70, n. 2, p. 308–323. 2014.

844

845 CARVALHO, B. F. et al. Microbiological and chemical profile of sugar cane silage
846 fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. **Animal Feed Science and**
847 **Technology**. v. 195, p. 1–13, 2014.

848

849 CONAGHAN, P.; O'KIELY., P; O'MARA, F. P. Conservation characteristics of wilted perennial
850 ryegrass silage made using biological or chemical additives. **Journal of Dairy Science**. 93, 628–643,
851 2010.

852 COUTINHO, F.S. et al. Perfil de degradação de amido de mandioca por *Saccharomyces*
853 *cerevisiae* expressando uma amilase de *Cryptococcus flavus*. **Biochemistry and**
854 **Biotechnology Reports**, v. 2, n. 4, p. 15-21, 2013.

855 DANIEL, et al. Alterações na qualidade de silagens de milho durante o armazenamento. In:
856 JOBIM, C. C.; CECATO, U.; CANTO M. W.; BANKUTI, F. I. (Eds.). Simpósio sobre
857 produção e utilização de forragens conservadas, 5. 2014. Maringá, 2014. p.23-36.

858 FERRARETTO, L. F.; FREDIN, S. M.; SHAVER, R. D. Influence of ensiling, exogenous
859 protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and
860 ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. **Journal of Dairy**
861 **Science**. v. 98, n. 10, p. 7318-7327, 2015.

- 814
815 GRANT, R. J.; ADESOGAN, A. T. Journal of dairy science silage special issue:
816 introduction. **Journal of Dairy Science** v. 101, n. 5, p. 3935-3936. 2018.
817
- 818 HALL, M. B.; MERTENS, D. R. Technical note: effect of sample Processing procedures on
819 measurement of starch in corn silage and corn grain. **Journal of Dairy Science**. Champaign,
820 v. 91, n.12, p. 4830-4833, 2008.
- 821 HOFFMAN, P. C. et al. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-
822 protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 2465–2474, 2011.
- 823 JUNGES, D. et al. Short communication: Influence of various proteolytic sources during
824 fermentation of reconstituted corn grain silages. **Journal of Dairy Science**. v. 100, n. 11, p.
825 9048-9051, 2017.
- 826 JURJANZ, S.; MONTEILS, V. Ruminant degradability of corn forages depending on the
827 processing method employed. **Animal Research**. v. 54, p. 3-15, 2005.
828
- 829 MORAN J. P. et al. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability
830 of whole crop wheat silage. In: JONES, D. I. H.; JONES, R.; DEWHURST, R; MERRY, R.
831 J. (Eds) **Proceedings...** Aberystwyth: UK, 1996, pp. 162–163. Aberystwyth, UK: University
832 of Wales.
833
- 834 MUCK, R. E. et al. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives.
835 **Journal of Dairy Science** v. 101, n. 5, p. 3980-4000. 2018.
836
- 837 NELLIS, S.E., HOFFMAN, P.C., SHAVER, R.D. A modified method to quantify prolamin
838 proteins in dry and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**. 96, 4647–4652.
- 839 OHSHIMA, M.; McDONALD, P. A review of the changes in nitrogenous compounds of
840 herbage during ensilage. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 29:497–505.
841 1978.
- 842 PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and ensiling of corn
843 grain on in situ degradation of starch in the rumen. **Journal of dairy Science** 81:2178–2184.
844 1998.
- 845
- 846 ROSEIRA, J. P. S. et al. Effects of exogenous protease addition on fermentation and nutritive
847 value of rehydrated corn and sorghum grain silages. **Scientific Reports**. v. 13, n. 7302, 2023.
- 848 SAARISALO, E. et al. Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for
849 ensiling grass. **Journal of Applied Microbiology**. v. 102, n. 2, p. 327–336, 2007.
- 850 SILVA, Y. A. 2022. **Avaliação de bactérias epifíticas para silagem de grãos de milho**
851 **reidratados**. Dissertação de Mestrado. Unop. 1984.
- 852 SILVA, N. C. et al. Influence of storage length and inoculation with *Lactobacillus buchneri*
853 on the fermentation, aerobic stability, and ruminant degradability of high-moisture corn and
854 rehydrated corn grain silage. **Animal Feed Science and Technology**. v. 251, p. 124-133,
855 2019.

- 814
815 SILVESTRE, A. M.; MILLEN, D. D. The 2019 Brazilian survey on nutritional practices
816 provided by feedlot cattle consulting nutritionists. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 50,
817 e20200189, 2021.
- 818
819 TABACCO, E. et al. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and
820 sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum*
821 inoculants. **Journal of Applied Microbiology**. v. 107, n. 5, p. 1632–41, 2009.
- 822
823 VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Cornell University,
824 1994. 476 p.
- 825 WOOLFORD, M. K. The chemistry of silage. In: WOOLFORD, M. K. (Ed). **The silage**
826 **fermentation**. 10 ed. Merceel Dekker, UE.

