



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA**  
**DOUTORADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

**RITA DE CÁSSIA ALMEIDA DE MENDONÇA**

**EFEITOS DA REALOCAÇÃO NA QUALIDADE DE SILAGENS DE MILHO  
INOCULADAS**

**BELÉM**

**2020**

**RITA DE CÁSSIA ALMEIDA DE MENDONÇA**

**EFEITOS DA REALOCAÇÃO NA QUALIDADE DE SILAGENS DE MILHO  
INOCULADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da  
Amazônia, como parte das exigências do Programa  
de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na  
Amazônia: área de concentração Produção Animal,  
para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Aníbal Coutinho do Rêgo

Coorientador: Prof. Thiago Carvalho da Silva

**BELÉM  
2020**

**RITA DE CÁSSIA ALMEIDA DE MENDONÇA**

**EFEITOS DA REALOCAÇÃO NA QUALIDADE DE SILAGENS DE MILHO  
INOCULADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Produção Animal, para obtenção do título de Doutora.  
Orientador: Prof. Aníbal Coutinho do Rêgo

Data de Aprovação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Thiago Carvalho da Silva- Coorientador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

---

Prof. José Neuman Miranda Neiva - 1º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS - UFT

---

Prof. Carlos Henrique Silveira Rabelo - 2º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS - UFPel

---

Prof. Rafael Mezzomo. - 3º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

---

Profa. Daiany Iris Gomes - 4º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me iluminar com sabedoria e discernimento nos momentos difíceis e pela fé que me mantém firme em busca de meus objetivos profissionais.

A Universidade Federal Rural da Amazônia pela oportunidade de poder realizar o mestrado em Produção Animal na linha de pesquisa de Conservação de Forragem.

Ao meu orientador Professor Dr. Aníbal Coutinho do Rêgo e ao meu coorientador Professor Dr. Thiago Carvalho da Silva por acreditarem no meu potencial, me orientarem com paciência e sempre me passarem motivação e incentivo.

Aos membros do Grupo de Estudo em Ruminantes e Forragicultura da Amazônia (GERFAM), especialmente aos membros Sarah Pantoja, Amanda Queiroz, Melany Simões, Andreza Amoras e Camilo Cruz por serem pessoas dedicadas e prestativas.

Aos professores Cristian Faturi, Felipe Domingues e Thiago Bernardes por me nortearem em alguns momentos durante a pesquisa.

A Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de poder realizar análises laboratoriais e acompanhar experimentos de pesquisa.

A minha mãe, Izauli Mendonça por me conduzir durante minhas caminhadas, estar sempre disposta a me ajudar e por ser um exemplo de pessoa.

Aos meus irmãos, Carolina Mendonça e Eduardo Mendonça por estarem ao meu lado me dando apoio e carinho.

Aos professores de pós-graduação por contribuírem com conhecimentos e sugestões para meu desempenho acadêmico.

Aos meus amigos, Felipe, Carlos, Maiara, Sara e Thaiz por torcerem pelo meu sucesso e por compreenderem minha ausência durante os momentos corridos.

A minha grande amiga Sarah por todo auxílio, dedicação, preocupação e paciência nos momentos difíceis.

A FAPESPA/CAPES por me apoiar com a bolsa de pós-graduação.

Agradeço a todos que contribuíram para que eu obtivesse esse título.

## RESUMO

A silagem de milho é um volumoso bastante usado em dietas de ruminantes, pois apresenta elevada concentração de nutrientes digestíveis e a planta reúne características que favorecem a conservação pela ensilagem. Entretanto, pode ser facilmente instável quando exposta ao ar, o que torna essa etapa crítica na realocação dessas silagens. Assim é de suma importância que estratégias de redução da deterioração durante a realocação sejam definidas. Diante disso, objetivou-se determinar o efeito do tempo de exposição ao ar e da inoculação com cepas de bactérias heterofermentativas combinadas ou não a cepas homofermentativas, sobre as perdas, características fermentativas e o valor nutritivo de silagens de milho realocadas. Para isso foram propostos a condução de dois ensaios experimentais em delineamento inteiramente casualizado. O primeiro estudo foi conduzido em arranjo fatorial  $4 \times 6$ , com quatro repetições. Os fatores estudados foram: inoculante microbiano (sem inoculante; *Lactobacillus plantarum* (DSM3676; DSM3677) + *Lactobacillus buchneri* (DSM13573), *Lactobacillus plantarum* + *Propionibacterium acidipropionici* e *Lactobacillus buchneri* (DSM13573)) e tempo de realocação (não realocadas; ou 12; 24; 36; 48 e 60 horas de exposição ao ar antes da realocação). Observou-se que após 120 dias de fermentação, as silagens tratadas com inoculante microbiano apresentaram melhor perfil fermentativo, menor população de leveduras e menores perdas de matéria seca. Após 60h de realocação, todas as silagens tiveram alta temperatura ( $>30^{\circ}\text{C}$ ), o que indica que após esse período as silagens estavam entrando em processo de deterioração mais avançado. Contudo, as alterações ocorridas até 60h de realocação não refletiram em aumento no pH das silagens, indicando que as silagens não estavam completamente deterioradas. Durante a realocação, as silagens tratadas com *L. buchneri* tiveram melhor controle no desenvolvimento das leveduras, e após o segundo processo fermentativo essas silagens tinham maior qualidade e foram mais estáveis que as demais, independente do tempo de realocação. No segundo estudo foi testado os efeitos da realocação de silagem de milho inoculada ou não, somente com *L. buchneri* (LB) ou em combinação com *L. plantarum* (LBLP) sobre a estabilidade aeróbia, digestibilidade aparente e desempenho de cordeiros. Os tratamentos foram as dietas: silagem de milho sem inoculante não realocada (SISR); silagem de milho sem inoculante realocada após 24h de exposição aeróbia (SIR); silagem de milho com LB realocada após 24h de exposição aeróbia (LBR); e silagem de milho com LBLP realocadas após 24h de exposição aeróbia (LBLPR). Foi observado que as silagens com LBLPR tiveram maior estabilidade aeróbia que as silagens SISR, SIR e LBR. No ensaio de metabolismo, observou-se que não houve diferença no consumo e digestibilidade das dietas, independente da silagem utilizada e conseqüentemente, não houve efeito sobre o balanço de nitrogênio dos cordeiros. No ensaio de desempenho, a silagem SISR apresentou maior consumo de fibra em detergente neutro (FDN), devido a maior quantidade de FDN e menor quantidade de carboidratos não fibrosos contidos nessa silagem quando comparadas as silagens SIR, LBR e LBLPR. Contudo, nenhuma das silagens afetaram a conversão alimentar, ganho de peso diário e comportamento ingestivo dos cordeiros. Conclui-se que as silagens LBLPR são mais estáveis em ambiente aeróbio, diminuindo a quantidade diária de silagem deteriorada descartada. As silagens realocadas até 24h de exposição ao ar contendo ou não inoculante microbiano não afetam a digestibilidade e o desempenho de cordeiros.

**Palavras-chave:** desempenho, estabilidade aeróbia, inoculante microbiano, reensilagem

## ABSTRACT

Corn silage is a roughage widely used in ruminant diets, as it has a high concentration of digestible nutrients and the plant has characteristics that favor conservation through silage. However, it can be easily unstable when exposed to air, which makes this step critical in relocating these silages. Thus, it is extremely important that strategies to reduce deterioration during reallocation are defined. Therefore, the objective was to determine the effect of the time of exposure to air and the inoculation with strains of heterofermentative bacteria combined or not with homofermentative strains, on losses, fermentative characteristics and the nutritional value of reallocated corn silages. For that, it was proposed to conduct two experimental tests in a completely randomized design. The first study was conducted in a  $4 \times 6$  factorial arrangement, with four replications. The factors studied were: microbial inoculant (without inoculant; *Lactobacillus plantarum* (DSM3676; DSM3677) + *Lactobacillus buchneri* (DSM13573), *Lactobacillus plantarum* + *Propionibacterium acidipropionici* and *Lactobacillus buchneri* (DSM13573) and real time; 36; 48 and 60 hours of exposure to air before relocation). It was observed that after 120 days of fermentation, the silages treated with microbial inoculant showed a better fermentation profile, less yeast population and less dry matter losses. After 60h of relocation, all silages had a high temperature ( $> 30^{\circ}\text{C}$ ), which indicates that after this period the silages were entering a more advanced deterioration process. However, the changes that occurred up to 60h of reallocation did not reflect an increase in the pH of the silages, indicating that the silages were not completely deteriorated. During the relocation, silages treated with *L. buchneri* had better control in the development of yeasts, and after the second fermentation process these silages had higher quality and were more unstable than the others, regardless of the time of relocation. In the second study, the effects of relocating corn silage inoculated or not, with *L. buchneri* (LB) or in combination with *L. plantarum* (LBLP), were tested on aerobic stability, apparent digestibility and lamb performance. The treatments were the diets: corn silage without non-relocated inoculant (SISR); corn silage without inoculant relocated after 24h of aerobic exposure (SIR); corn silage with LB relocated after 24h of aerobic exposure (LBR); and corn silage with LBLP relocated after 24h of aerobic exposure (LBLPR). It was observed that silages with LBLPR had greater aerobic stability than silages SISR, SIR and LBR. In the metabolism test, it was observed that there was no difference in diet intake and digestibility, regardless of the silage used and, consequently, there was no effect on the lambs nitrogen balance. In the performance test, the SISR silage showed a higher consumption of neutral detergent fiber (NDF), due to the greater amount of NDF and less non-fibrous carbohydrates contained in this silage when compared to the SIR, LBR and LBLPR silages. However, none of the silages affected feed conversion, daily weight gain and ingestive behavior of the lambs. It is concluded that LBLPR silages are more stable in an aerobic environment, decreasing the daily amount of deteriorated silage discarded. Silages relocated within 24 hours of exposure to air containing or not microbial inoculants do not affect the digestibility and performance of lambs.

**Key words:** aerobic stability, microbial inoculant, performance, re-ensiling

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	9
<b>2. EFEITO DA EXPOSIÇÃO AERÓBIA E DO USO DE INOCULANTES NAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E FERMENTATIVAS DE SILAGENS DE MILHO REALOCADAS<sup>1</sup></b> .....	15
<b>RESUMO</b> .....	15
<b>ABSTRACT</b> .....	16
<b>2.1 Introdução</b> .....	17
<b>2.2 Material e Métodos</b> .....	18
2.2.1 Localização do experimento, obtenção e preparo de amostras .....	18
2.2.2 Composição microbiológica e química .....	19
2.2.3 Características fermentativas e perdas .....	20
2.2.4 Estabilidade aeróbia .....	20
2.2.5 Análise estatística.....	21
<b>2.3 Resultados</b> .....	21
<b>2.4 Discussão</b> .....	30
<b>2.6 Conflitos de interesse</b> .....	36
<b>2.7 Referências</b> .....	36
<b>3. EFEITOS DA REALOCAÇÃO DE SILAGEM DE MILHO INOCULADA COM ADITIVOS MICROBIANOS NA ESTABILIDADE AERÓBIA, DIGESTIBILIDADE APARENTE E DESEMPENHO DE CORDEIROS</b> .....	39
<b>RESUMO</b> .....	39
<b>ABSTRACT</b> .....	40
<b>3.1 Introdução</b> .....	41
<b>3.2 Material e Métodos</b> .....	42
3.2.2 Digestibilidade de cordeiros.....	45
3.2.3 Desempenho de cordeiros .....	47
3.2.4 Análise estatística.....	49
<b>3.3 Resultados</b> .....	49
<i>Estabilidade aeróbia</i> .....	49
<i>Digestibilidade de cordeiros</i> .....	51
<i>Desempenho de cordeiros</i> .....	53

<b>3.4</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>54</b>
<b>3.5</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>56</b>
<b>3.6</b>	<b>Referências.....</b>	<b>57</b>
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>58</b>

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A silagem de milho é um dos volumosos conservados mais utilizados em dietas de ruminantes em todo o mundo (FERRARETTO; SHAVER; LUCK, 2018). No Brasil, Bernardes e Rêgo (2014) observaram em um levantamento sobre práticas de produção e utilização de silagens em fazendas leiteiras, que 97,0% dos produtores entrevistados usam o milho para produção de silagem. Acredita-se que 2,25 milhões de hectares das lavouras de milho do Brasil são destinados à produção de silagem, o que representa algo em torno de 15% da área total cultivada de milho (PASA et al., 2015). A alta produtividade associada ao bom valor nutritivo dessa cultura são os fatores principais que justificam o uso da silagem de milho nos sistemas de produção de ruminantes.

A produção de silagem é baseada no processo de fermentação anaeróbia realizado por bactérias que produzem ácido lático a partir de carboidratos solúveis presentes em forragens úmidas durante o processo de ensilagem (KUNG et al., 2018). Tais bactérias utilizam esses substratos na fermentação, e os convertem em ácidos orgânicos, principalmente ácido lático. Diante disso, o pH é reduzido inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis e a massa é preservada pela acidificação do meio. Contudo, após a abertura do silo a anaerobiose é quebrada e a silagem é inevitavelmente exposta ao ar, podendo permanecer de forma estável nessas condições a depender do manejo no desabastecimento do silo e da qualidade da silagem.

A estabilidade aeróbia de uma silagem pode ser definida como o período em que a mesma é exposta ao ar sem aquecer em 2°C acima da temperatura ambiente (MORAN et al., 1996). Esse aquecimento é resultado da atividade de microrganismos deterioradores em aerobiose, principalmente leveduras e mofos, que degradam açúcares residuais e liberam calor (TABACCO et al., 2011). O manejo adequado do silo pode reduzir a extensão de perdas por deterioração. Os principais agentes associados a deterioração de silagens no manejo do desabastecimento são, o avanço incorreto da remoção da massa e o tempo excessivo de exposição ao ar da mesma.

Por exemplo, em regiões de clima quente, silagens que são retiradas em fatias diárias inferiores a 30 cm são mais susceptíveis a perdas por deterioração devido a maior área de superfície do painel do silo exposta ao ar (BERNARDES et al., 2018). Assim também como, silagens que permanecem mais tempo expostas ao ar também são mais propensas a deterioração, e podem ter qualidade reduzida (GERLACH et al., 2014). Além disso, silagens que apresentam bom padrão de fermentação, com elevadas concentrações de ácido lático e

baixa de ácidos com propriedades antifúngicas e com boa composição química, podem ser mais susceptíveis a atividade de microrganismos deterioradores.

No Brasil, a comercialização de silagem tem sido frequente, onde normalmente pequenos e médios produtores são os consumidores em destaque. As principais justificativas observadas na compra de silagens estão relacionadas a erros no planejamento e na gestão dos recursos forrageiros disponíveis nas propriedades, a grande dependência de tecnologia na produção de silagem, o baixo rendimento de lavouras acometidas por variações climáticas em alguns anos, e erros no manejo de silos que levam a grandes perdas. Nesse cenário, algumas propriedades têm buscado produzir silagem especificamente para atender esse nicho de mercado (DOS ANJOS et al., 2018).

A comercialização de silagens é feita basicamente com a venda de forragens ensiladas diretamente em unidades menores (fardos ou sacos) ou pela venda de silagens realocadas, a granel ou em ensacada. No caso da realocação, a silagem produzida é retirada do silo, transportada, compactada e vedada em um novo silo ou estrutura de armazenagem (CHEN; WEINBERG, 2014). Nesse processo a silagem é inevitavelmente exposta ao ar, tornando essencial a rapidez nas operações para minimizar os efeitos da quebra da anaerobiose e possíveis perdas por deterioração ocasionada pelos microrganismos aeróbios até a realocação da massa.

Após o contato com o oxigênio presente no ar, microrganismos aeróbios epifíticos tornam-se metabolicamente ativos e iniciam o processo de deterioração da massa. Normalmente, as leveduras são o primeiro grupo de microrganismos a se desenvolver, pois são extremamente versáteis e conseguem se proliferar em meio com pH baixo (3,5), na maioria das silagens. Assim, as leveduras utilizam como substratos açúcares solúveis e ácido láctico, impactando na redução da concentração destes e consequente elevação no pH da silagem, o que abre possibilidade ao desenvolvimento de outros microrganismos deterioradores, como mofos (PAHLOW et al., 2003).

Os mofos igualmente se desenvolvem na silagem, mas crescem muito mais lentamente do que as leveduras. Deste modo, a presença visual de mofos é indicação de exposição excessiva da silagem ao ar e de que a silagem apresenta qualidade consideravelmente menor do que a forragem ensilada, o que deve dobrar a atenção em relação a qualidade desse volumoso, pois tais microrganismos podem produzir micotoxinas que afetam a sanidade animal (MUCK, 2010).

Alguns grupos de bactérias produtoras de ácido acético também são ácido-tolerantes e podem iniciar a deterioração. Apesar de raramente estarem presentes na silagem, já foram

observadas em silagens de milho, justificadas pelo fato dessas silagens apresentarem um alto teor de açúcar residual, o qual pode favorecer a produção de etanol, sendo este um substrato utilizado por essas bactérias resultando na produção de ácido acético (SPOELSTRA et al., 1988). Uma vez que o etanol tenha sido esgotado, elas podem utilizar como substrato o ácido acético, produzindo dióxido de carbono e água. Isso elevará o pH e permitirá o crescimento de outros microrganismos aeróbios (MUCK, 2010).

Após leveduras ou bactérias produtoras de ácido acético terem aumentado o pH ( $\geq 4,5$ ), e a temperatura ter aumentado, uma segunda fase de aquecimento geralmente ocorre, e está frequentemente relacionada a atividade de bacilos (MUCK; PITT, 1994), os quais podem fermentar ácidos orgânicos (como: acetato, lactato, e butirato), etanol, 2,3-butanodiol e glicerol (PAHLOW et al., 2003) resultando uma silagem baixa qualidade. Contudo, ainda que a população microbiana durante o processo de deterioração possa seguir uma determinada dinâmica, não deve-se generalizar, pois a mesma pode variar entre silagens e época do ano.

O processo de deterioração da silagem pode ser observado pela alteração de temperatura, pH e odor, mas só pode ser visualmente notada quando está em fase avançada. Nesse processo, a massa apresenta alterações na composição química e perdas de matéria seca, desta forma, tendo implicações no desempenho animal, conforme observado por Bolsen et al. (2002). Os autores avaliaram os efeitos das proporções de silagem deteriorada sobre a ingestão e digestibilidade de nutrientes de dietas a base de silagem de milho, e observaram que a presença de silagem deteriorada causou alterações na qualidade da dieta, reduzindo o consumo de matéria seca e a digestibilidade de nutrientes, o que conseqüentemente afeta a lucratividade (TABACCO et al., 2011).

Apesar disso, a deterioração da silagem tem recebido pouca atenção na prática, provavelmente por se tratar na maioria das vezes de um problema sem manifestação visual aparente, podendo ser mais grave em silagens de milho realocadas, as quais estão susceptíveis a deterioração por terem bom valor nutritivo e alta concentração de ácido lático como substratos para microrganismos deterioradores. Existem poucos estudos relacionados aos efeitos do tempo de exposição aeróbia e do uso de inoculantes microbianos sobre a qualidade de silagens realocadas. No entanto, acredita-se que a decisão de fazer o processo de realocação irá depender da característica qualitativas da silagem inicial, como perfil fermentativo, contagem de leveduras e mofos, e da velocidade que será feito o processo (MAHANA; CHASE, 2003; CHEN; WEINBERG, 2014; MICHEL et al., 2017; DOS ANJOS et al., 2018).

Com base nessas informações, uma das alternativas para reduzir a deterioração por microrganismos aeróbios e perdas no valor nutritivo durante o processo de realocação de

silagens seria o uso de inoculantes bacterianos que produzem ácidos antifúngicos durante o processo fermentativo, impactando assim no aumento da estabilidade aeróbia das silagens. O princípio baseia-se na produção de ácido acético e/ou ácido propiônico por bactérias heterofermentativas, os quais podem inibir o crescimento das leveduras porque quando estão em pH inferior aos seus pKa (ácido acético de 4,76 e ácido propiônico de 4,87) permanecem na forma não dissociada, e permeável à membrana das leveduras via transporte passivo. Dentro da célula desses microrganismos, dissociam-se e liberam H<sup>+</sup>, reduzindo o pH intracelular, que normalmente é 7,0. Para manter o pH neutro, as leveduras tentam eliminar os íons de H<sup>+</sup>, perdendo energia. O prolongamento desse processo provoca retardo no crescimento e morte celular (MOON, 1983).

Basicamente, os grupos de inoculantes mais utilizados em silagens de milho com tal fim são os que apresentam as bactérias: *Lactobacillus buchneri* e as *Propionibacterium acidipropionici*. Esses microrganismos podem ser combinados com cepas de bactérias homofermentativas, que diminuem as perdas durante a fermentação no silo. Hipotetiza-se que numa situação de produção de silagem para comercialização, o inoculante em combinação aplicado durante o processo de ensilagem, em primeiro momento atua no perfil de fermentação aumentando a produção de ácido láctico e ácido acético (antifúngico). O ácido láctico inibi o crescimento de microrganismos indesejáveis na massa e o ácido acético inibi o crescimento de leveduras, mais evidentemente no processo de realocação da silagem.

Já o inoculante sem combinação também aplicado durante o processo de ensilagem, não tem um papel expressivo na produção de ácido láctico, mas auxilia desde esta fase na redução de leveduras presentes na massa, devido a produção de ácidos antifúngicos. Posteriormente, na fase de realocação da silagem, onde a massa é inevitavelmente exposta ao ar, esses ácidos vão continuar a proteger a silagem desses microrganismos deterioradores. Dessa forma, é de suma importância que práticas de manejo sejam adotadas na ensilagem para reduzir os possíveis efeitos da realocação de silagens de milho, como o estabelecimento de tempos máximos, bem como o uso de inoculantes que minimizem os efeitos da exposição ao ar na realocação.

Diante da falta de práticas consolidadas que visem diminuir as perdas por deterioração durante o processo de realocação e da falta de estudos com silagens realocadas, objetivou-se avaliar o tempo de exposição ao ar e seus efeitos sobre a qualidade de silagens de milho realocadas, bem como, o efeito da ação de bactérias heterofermentativas na redução da deterioração aeróbia antes da realocação e nas silagens realocadas. Além disso, avaliar as implicações desses efeitos no valor nutritivo de silagens de milho realocadas.

## REFERÊNCIAS

- BERNARDES, T. F. et al. Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4001–4019, 2018.
- BERNARDES, T. F.; REGO, A. C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.97, n.3, p.1852-1861, 2014.
- BOLSEN, K. K., WHITLOCK, L. A., URIARTE-ARCHUNDIA, M. E. Effect of surface spoilage on the nutritive value of maize silages diets. In: THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 13th, 2002, Auchincruive. Proceedings... Auchincruive, p.75-77, 2002.
- CHEN, Y.; WEINBERG, Z. G. The effect of relocation of whole-crop wheat and corn silages on their quality. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 1, p. 406–410, 2014.
- DOS ANJOS, G. V. S. et al. Effect of re-ensiling on the quality of sorghum silage. **Journal of Dairy Science**, p. 1–8, 2018.
- FERRARETTO, L. F.; SHAVER, R. D.; LUCK, B. D. Silage review: Recent advances and future technologies for whole-plant and fractionated corn silage harvesting. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 3937–3951, 2018.
- GERLACH, K. et al. Aerobic exposure of grass silages and its impact on dry matter intake and preference by goats. **Small Ruminant Research**, v. 117, n. 2–3, p. 131–141, 2014.
- KUNG, L. et al. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* v.101, p.4020–4033, 2018.
- MAHANA, B.; CHASE, L. Practical applications and solutions to silage problems. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. **Silage science and technology**. 1.ed. Madison: American Society of Agronomy, p. 855–895, 2003.
- MICHEL, P. H.F. et al. Re-ensiling and inoculant application with *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium acidipropionici* on sorghum silages. *Grass and Forage Science*, v.72, n.3, p.432-440, 2017.
- MOON, N.J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**, v.55, n.3, p.454-460, 1983.
- MORAN, J.P. et al. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 11., 1996, Aberystwyth. Proceedings... Aberystwyth: [IGER]. p.162-163, 1996.
- MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. suppl spe, p. 183–191, 2010.
- MUCK, R.E.; PITT, R.E. Aerobic deterioration in corn silage relative to the silo face. **Transactions of the ASAE**, v.37, n.3, p.735-743, 1994.
- PASA, C.; PASA, M. C. Zea mays L. e a produção de massa seca. *Biodiversidade* - V.14, N3,

2015 - pág. 36.

PAHLOW, G. MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. **Silage science and technology**. 1.ed. Madison: American Society of Agronomy, p.31-94, 2003.

TABACCO, E. et al. Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by different lactic acid bacteria inocula. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 3, p. 1409–1419, 2011.

SPOELSTRA, S.F.; COURTIN, M.G.; VAN BEERS, J.A.C. 1988. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. **J. Agr. Sci. Camb.**, 111: 127-132.

## 2. EFEITO DA EXPOSIÇÃO AERÓBIA E DO USO DE INOCULANTES NAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E FERMENTATIVAS DE SILAGENS DE MILHO REALOCADAS<sup>1</sup>

### RESUMO

Silagens de milho realocadas são susceptíveis a perdas por deterioração durante o processo de realocação. Tais perdas podem variar com o tempo em exposição, mas podem ser possivelmente amenizadas com o uso de alternativas no sentido de reduzi-las, como a inoculação microbiana com cepas heterofermentativas. Objetivou-se avaliar o efeito do tempo de exposição ao ar e inoculação microbiana sobre características químicas e fermentativas de silagens milho. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com fatorial  $4 \times 6$ , com quatro repetições. Os fatores estudados foram: inoculante microbiano (sem inoculante; *Lactobacillus plantarum* + *L. buchneri*; *L. plantarum* + *Propionibacterium acidipropionici* ou *L. buchneri*, taxa de aplicação de  $1 \times 10^5$  ufc/g de forragem); e tempo de realocação (não realocada; 12; 24; 36; 48 e 60 horas de exposição aeróbia antes da realocação). Foram avaliadas as características químicas, fermentativas e microbiológica das silagens. As silagens tratadas com inoculante microbiano apresentaram menor contagem de leveduras, nitrogênio amoniacal e perdas de matéria seca. As silagens de milho sem IM foram mais instáveis após 24h de exposição ao ar, apresentando aumento na contagem de leveduras e mofos. As silagens tratadas com *L. buchneri* apresentaram melhor controle no crescimento de leveduras durante 60h de exposição ao ar. As silagens de milho não realocadas despenderam de menor tempo para atingir a temperatura máxima. Conclui-se que silagens de milho tratadas com IM apresentam melhor composição química e as características fermentativas do que silagens de milho não tratadas. O tempo de exposição ao ar afeta as características fermentativas de silagens de milho. Silagens tratadas com *L. buchneri* apresentam menor crescimento de leveduras, mas perdem o efeito antifúngico quando submetida a um novo processo fermentativo (realocação). Silagens de milho realocadas são mais estáveis do que as silagens não realocadas.

**Palavras-chave:** estabilidade aeróbia, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, *Propionibacterium acidipropionici*, reensilagem

## ABSTRACT

Relocated corn silages are susceptible to deterioration losses during the relocation process. Such losses can vary with the time in exposure, but they can possibly be mitigated with the use of alternatives in order to reduce them, as the microbial inoculation with heterofermentative strains. The objective of this study was to evaluate the effect of time of exposure to air and microbial inoculation on chemical and fermentative characteristics of corn silages. The experiment was conducted in a completely randomized design, with a  $4 \times 6$  factorial, with four replications. The factors studied were: microbial inoculant (without inoculant; *Lactobacillus plantarum* + *L. buchneri*; *L. plantarum* + *Propionibacterium acidipropionici* or *L. buchneri*, application rate of  $1 \times 10^5$  cfu / g of forage); and reallocation time (not reallocated; 12; 24; 36; 48 and 60 hours before reallocation). The chemical, fermentative and microbiological characteristics of the silages were evaluated. The silages treated with microbial inoculant showed lower yeast count, ammonia nitrogen and dry matter losses. Corn silages without MI were more unstable after 24h of exposure to air, showing an increase in yeast and mold count. The silages treated with *L. buchneri* showed better control in yeast growth during 60h of exposure to air. Corn silages not relocated took less time to reach the maximum temperature. It is concluded that corn silages treated with IM have better chemical composition and fermentative characteristics than untreated corn silages. The time of exposure to air affects the fermentative characteristics of corn silages. Silages treated with *L. buchneri* show less yeast growth, but lose their antifungal effect when subjected to a new fermentation process (relocation). Relocated corn silages are more stable than unallocated silages.

**Key words:** aerobic stability, deterioration, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, *Propionibacterium acidipropionici*, re-ensiling

## 2.1 Introdução

A realocação de silagem de milho é uma prática comum adotada pelos criadores de gado em diferentes regiões do mundo. As principais razões para a realocação são a comercialização de silagens ou a distância do curral em relação ao silo. Nesse processo a silagem é retirada do silo, transportada, compactada e vedada em um novo silo ou estrutura de armazenagem (Chen and Weinberg, 2014). No entanto, a silagem de milho é altamente suscetível à deterioração aeróbia, o que torna essencial a rapidez no processo. Nesse caso, o tempo de exposição ao ar excessivo na realocação da silagem pode causar aumento da população de microrganismos aeróbios e comprometer a qualidade da silagem (Pahllow et al., 2003).

Após o contato com o oxigênio do ar, leveduras aeróbias presentes na massa tornam-se metabolicamente ativas e iniciam o processo de deterioração da silagem, oportunizando o desenvolvimento de outros microrganismos deterioradores. Dessa forma, o manejo empregado no processo de ensilagem e realocação irão refletir sobre a extensão de perdas desencadeadas por microrganismos aeróbios, os quais causam alterações na composição química e perdas de matéria seca na silagem, tendo implicações sobre a ingestão e digestibilidade de nutrientes, reduzindo o desempenho animal (Bolsen et al., 2002), o que consequentemente afeta a lucratividade do empreendimento rural (Tabacco et al., 2011).

Poucos são os estudos relacionados ao processo de deterioração em silagens realocadas. No entanto, acredita-se que o sucesso no processo de realocação irá depender de características qualitativas da silagem inicial, como perfil fermentativo, contagem de leveduras e mofos, e da velocidade que será feito o processo (Mahana and Chase, 2003; Chen and Weinberg, 2014; Michel et al., 2017; Dos Anjos et al., 2018). Uma das formas de tentar melhorar o perfil fermentativo em silagens que serão realocadas é por meio do uso de inoculantes microbianos capazes de produzirem ácidos antifúngicos durante o processo fermentativo anaeróbio, e aumentam a estabilidade aeróbia das silagens (Muck et al., 2018).

Basicamente, os grupos de inoculantes mais utilizados em silagens de milho com esse objetivo são os que apresentam cepas de bactérias heterofermentativas, como as *Lactobacillus buchneri* e as *Propionibacterium acidipropionici*. Os quais podem ser combinados com cepas de bactérias homofermentativas, que diminuem as perdas durante a fermentação no silo. Diante disso, nós hipotetizamos que numa situação de produção de silagem para comercialização, o inoculante em combinação aplicado durante o processo de ensilagem, em primeiro momento atuaria no perfil de fermentação aumentando a produção de ácido lático e ácido acético (antifúngico), onde o ácido lático inibiria o crescimento de microrganismos indesejáveis na

massa e o ácido acético inibiria o crescimento de leveduras, sendo mais evidente no processo de realocação da silagem.

Já o inoculante sem combinação também aplicado durante o processo de ensilagem, não teria um papel expressivo na produção de ácido lático, mas auxiliaria desde esta fase na redução de leveduras presentes na massa, devido a produção de ácidos antifúngicos. E posteriormente, na fase de realocação da silagem, esses ácidos iriam continuar a proteger a silagem dos microrganismos deterioradores. Com base no exposto, objetivou-se avaliar o efeito da exposição aeróbia e do uso de inoculantes nas características químicas e fermentativas de silagens de milho realocadas.

## 2.2 Material e Métodos

### 2.2.1 Localização do experimento, obtenção e preparo de amostras

O ensaio foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com esquema fatorial  $4 \times 6$ , usando quatro repetições por arranjo. Os fatores estudados foram: inoculante microbiano (sem inoculante; *Lactobacillus plantarum* (DSM3676; DSM3677) + *Lactobacillus buchneri* (DSM13573), *Lactobacillus plantarum* + *Propionibacterium acidipropionici* e *Lactobacillus buchneri* (DSM13573)) e tempo de realocação (não realocadas; e 12; 24; 36; 48 e 60 horas de exposição ao ar antes da realocação).

A lavoura de milho foi cultivada na Fazenda Água Parada localizada no município de Paragominas, Pará, na mesorregião Sudeste do estado. A fazenda possui localização geográfica com latitude de  $02^{\circ}50'29,4''S$ , longitude de  $47^{\circ}26'34,1''W$  e aproximadamente 90 m de altitude. Essa região apresenta segundo a classificação de Köppen, o tipo Am, a temperatura média é  $26.6^{\circ}C$  e tem uma pluviosidade média anual de 1805 mm. A lavoura de milho foi implantada no mês de fevereiro do ano de 2017, onde usou-se o híbrido de milho Pioneer 4285 em densidade de plantio de 55 mil plantas/ha. Na implantação da lavoura foi feita adubação com 400kg/ha de NPK 10-30-10 e na cobertura foi feita com 200kg/ha de NPK 20-00-20.

A colheita do milho para ensilagem foi feita quando o mesmo apresentava matéria seca de 344.5 g/kg, matéria orgânica de 957.4 g/kg, proteína bruta de 57.5 g/kg, extrato etéreo de 33.5 g/kg, fibra em detergente neutro de 508.1 g/kg e carboidratos não fibrosos de 358.3 g/kg, respectivamente. As silagens foram confeccionadas em mini silos experimentais (baldes plásticos com capacidade de 20 litros), onde foram colocados 12 kg de massa de forragem a fim de atingir densidade padrão de  $600\text{kg/m}^3$ . As massas de forragem não inoculadas, após o processamento e pesagem, foram compactadas por pisoteio nos respectivos silos. Já as massas de forragem que foram inoculadas, foram compactadas após a homogeneização com o

inoculante (*Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum* + *Propionibacterium acidipropionici*, ou *Lactobacillus buchneri*).

Os inoculantes foram diluídos em água, aplicando-os uniformemente sobre a forragem dos respectivos tratamentos com auxílio de pulverizador, visando alcançar  $1 \times 10^5$  UFC/g de forragem de cada microrganismo. Após o enchimento de todos os mini silos, os mesmos foram pesados para quantificação de perdas e ficaram armazenados em ambiente protegido por 120 dias. Posteriormente os mesmos foram abertos e as silagens foram expostas ao ar na forma de pilhas nos tempos descritos abaixo e em seguida realocadas nos mesmos silos. Foram confeccionados dois mini silos extras para cada tratamento com o objetivo de completar a massa, em função de porções que visualmente estivessem deterioradas na primeira abertura e pela porção retirada na amostragem.

### 2.2.2 Composição microbiológica e química

As amostras da primeira abertura, antes da realocação e segunda abertura foram processadas no Laboratório de Microbiologia da UFRA. Foi feita a contagem de leveduras, mofos e bactérias ácido lácticas (BAL), utilizando um extrato aquoso (1:10) com água peptonada (1g por litro de água), homogeneizado durante 4 minutos tipo Stomacher. Para a contagem de leveduras e mofos foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície com o meio de cultura YGC Agar (Fluka, Sigma Aldrich Química Brasil LTDA), (TABACCO et al., 2009). Após incubação em câmara de germinação a 28°C durante três e cinco dias para leveduras e mofos, respectivamente, foram contadas as colônias separadamente, com base nas suas características macromorfológicas. Na contagem de BAL foi usada a mesma técnica descrita para leveduras e mofos, entretanto o meio de cultura utilizado foi o MRS Agar, com incubação em câmara de germinação a 35°C por três dias.

Na avaliação de composição química as amostras foram processadas no Laboratório de Nutrição Animal e Análise de Alimentos (LABNUTAN) da UFRA. As amostras de silagem foram descongeladas e submetidas à pré-secagem em estufa de circulação forçada de ar a 55°C e posteriormente moídas em moinho de faca tipo Willey, com peneira com crivo de 1 mm de diâmetro. As amostras coletadas antes da realocação só foram avaliadas quanto ao teor de matéria seca usado na determinação de perdas e nitrogênio total usado na determinação do nitrogênio amoniacal em relação ao total. Nas demais amostras foram feitos todos os procedimentos descritos abaixo.

Na determinação dos teores de matéria seca (MS), as amostras foram secas em estufa a 105°C por 16 horas ininterruptas (AOAC-967.03, 1990). Os conteúdos de matéria mineral

(AOAC Método Oficial 942.05) para cálculo da matéria orgânica (MO), extrato etéreo (EE) (AOAC Método Oficial 920.39), e proteína bruta (PB) (AOAC Método Oficial 984.13), foram realizados segundo metodologia descrita pela AOAC (1990). As análises da fibra em detergente neutro (FDN) foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Mertens (2002) utilizando-se alfa-amilase termoestável com ausência de sulfito de sódio. O teor de carboidratos não fibrosos foi determinado usando a fórmula:  $100 - (PB + EE + cinzas - FDN)$ . Além disso, ainda serão determinados os teores de carboidratos solúveis em água (Deriaz, 1961).

### 2.2.3 Características fermentativas e perdas

Na avaliação do pH (Bolsen et al., 1992), nitrogênio amoniacal (AOAC, 1990), ácidos orgânicos, álcoois e leveduras, mofos e bactérias ácido lácticas (Tabacco et al., 2009) foram utilizadas amostras da primeira abertura, antes da realocação e da segunda abertura.

A avaliação dos ácidos orgânicos (lático, acético, propiônico e butírico) e os álcoois (etanol e 1,2-propanodiol) foi feita por meio de um extrato aquoso (1:10) com água destilada processadas em homogeneizador tipo Stomacher. Foi utilizado 2 ml do extrato aquoso de cada amostra, o qual foi centrifugado, filtrado e injetado em cromatógrafo de fase líquida de alta precisão (Shimadzu LC- 10Ai; Shimadzu Corp. Tokyo, Japão). Os ácidos foram detectados pela absorvância do UV (210nm), e os álcoois foram identificados usando o detector de índice de refração (RID; 10ASPD-10Ai). O aparelho foi equipado com uma coluna de exclusão de íon (SUPELCO –SUPELCOGEL 8H-5cm-4,8mm) operado a 30° com um fluxo de corrida de 0,6ml/min com fase móvel água e ácido sulfúrico 0,005M.

Para quantificação das perdas por gases, os pesos dos mini silos foram determinados imediatamente após a primeira vedação, antes da primeira abertura, imediatamente depois da segunda vedação, e no final do ensaio.

### 2.2.4 Estabilidade aeróbia

Após abertura dos silos, foram colocados 1,5 kg de forragem em baldes plásticos de 9 L, os quais foram cobertos com folha de papel alumínio para se evitar perda de umidade da silagem e contaminação por elementos externos (Tabacco et al., 2009). Os baldes foram mantidos em uma sala fechada por 7 dias. A temperatura da sala e das silagens foi registrada a cada 30 minutos, por meio de dataloggers que foram colocados no interior das amostras. A estabilidade aeróbia foi definida como o número de horas que a silagem permaneceu estável antes de atingir 2°C acima da temperatura ambiente (Moran et al., 1996).

### 2.2.5 Análise estatística

Após tabulação dos dados, foram testadas as pressuposições de normalidade dos erros e homogeneidade de variância pelos testes de Cramer-von Mises e Brown e Forsythe's, respectivamente. Posteriormente, os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa SAS 9.4 (Statistical Analysis System, 2013) através do procedimento PROC MIXED. As médias foram comparadas por meio do teste “Tukey” em nível de 5% de probabilidade.

O modelo estatístico utilizado para avaliar as silagens de milho armazenadas por 120 dias antes da realocação foi:

$$Y_{ij} = \mu + IM_i + e_i$$

Onde  $Y_{ij}$  é o valor de cada observação;  $\mu$ , a média geral;  $IM_i$ , o efeito fixo do inoculante microbiano;  $e_i$ , o erro padrão.

O modelo estatístico utilizado para avaliar as silagens de milho em processo de realocação e as silagens de milho realocadas ou não foi:

$$Y_{ij} = \mu + IM_i + TR_j + N_{ij} + E_{ij}$$

Onde  $Y_{ij}$  é o valor de cada observação;  $\mu$ , a média geral;  $IM_i$ , o efeito fixo do inoculante microbiano (SI, LPPA, LPLB e LB);  $TR_j$ , o efeito fixo do tempo de realocação (0, 12, 24, 36, 48 e 60 horas);  $e_i$ , o erro padrão.

## 2.3 Resultados

### *Silagens de milho armazenadas por 120 dias antes da realocação*

Observou-se efeito ( $P < 0,05$ ) de inoculante microbiano (IM) sobre a temperatura, características microbiológicas e químicas das silagens de milho avaliadas (Tabela 1). As silagens tratadas com IM tiveram menores perdas de matéria seca (%MS), contagem de leveduras e concentração de nitrogênio amoniacal do que as silagens sem inoculante (SI). As silagens tratadas com LPPA e LB tiveram menores perdas por efluentes do que as silagens SI e tratadas com LPLB. A contagem de mofos foi menor nas silagens tratadas com LPPA diferindo das demais.

Tabela 1 – Temperatura, composição microbiológicas e químicas de silagens de milho tratadas ou não com inoculante microbiano (g/kg de MS)

Item	SI	LPLB	LPPA	LB	EPM	p_valor
Temperatura (°C)	27,7 <sup>a</sup>	27,5 <sup>a</sup>	27,7 <sup>a</sup>	27,3 <sup>b</sup>	0,01	<0,01
Perdas de MS	64,2 <sup>a</sup>	55,3 <sup>b</sup>	32,3 <sup>c</sup>	28,4 <sup>c</sup>	0,14	<0,01
Efluentes (g/kg)	4,02 <sup>a</sup>	3,10 <sup>a</sup>	1,07 <sup>b</sup>	0,51 <sup>b</sup>	0,35	<0,01
Mofos (ufc/g)	2,0 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>	1,7 <sup>b</sup>	2,1 <sup>a</sup>	0,05	<0,01
Leveduras (ufc/g)	3,5 <sup>a</sup>	2,5 <sup>b</sup>	2,6 <sup>b</sup>	2,6 <sup>b</sup>	0,05	<0,01
N-NH <sub>3</sub> (%NT)	5,9 <sup>a</sup>	2,4 <sup>b</sup>	2,2 <sup>b</sup>	2,5 <sup>b</sup>	0,20	<0,01
pH	4,0 <sup>b</sup>	4,1 <sup>a</sup>	4,0 <sup>b</sup>	3,9 <sup>c</sup>	0,01	<0,01
Ácido láctico: Ácido acético	24,4 <sup>b</sup>	23,2 <sup>b</sup>	25,3 <sup>b</sup>	31,7 <sup>a</sup>	0,12	<0,01
Ácido láctico	79,7 <sup>b</sup>	73,3 <sup>b</sup>	77,5 <sup>b</sup>	87,6 <sup>a</sup>	0,23	<0,01
Ácido acético	32,9	31,7	30,8	27,8	0,12	0,09
Ácido propiônico	5,5 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	6,9 <sup>a</sup>	4,0 <sup>b</sup>	0,04	<0,01
Etanol	7,4 <sup>a</sup>	4,7 <sup>b</sup>	4,4 <sup>b</sup>	3,9 <sup>b</sup>	0,05	<0,01
1,2 propanodiol	3,0 <sup>a</sup>	0,9 <sup>d</sup>	1,4 <sup>c</sup>	2,0 <sup>b</sup>	0,01	<0,01
Matéria seca (g/kg)	290,6 <sup>b</sup>	301,3 <sup>a</sup>	296,9 <sup>ab</sup>	300,9 <sup>a</sup>	0,19	<0,01
Matéria orgânica	954,1	953,2	953,2	954,7	0,09	0,60
Proteína bruta	61,8 <sup>b</sup>	63,5 <sup>ab</sup>	65,8 <sup>a</sup>	57,8 <sup>b</sup>	0,14	<0,01
Extrato etéreo	24,3	30,7	31,2	33,1	0,28	0,19
Fibra em detergente neutro	477,0 <sup>b</sup>	479,0 <sup>b</sup>	485,0 <sup>b</sup>	528,0 <sup>a</sup>	0,32	<0,01
Carboidratos não fibrosos	390,3 <sup>a</sup>	379,1 <sup>a</sup>	372,1 <sup>a</sup>	335,4 <sup>b</sup>	0,53	<0,01

SI – sem inoculante, LPLB - *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*, LPPA- *Lactobacillus plantarum* + *Propionibacterium acidipropionici*, LB- *Lactobacillus buchneri*, MS- matéria seca, Ufc- unidade formadora de colônia em log<sub>10</sub>, %NT- porcentagem do nitrogênio total. Letras minúsculas iguais na linha, não diferem pelo test tukey (nível de significância  $\alpha < 0,05$ ).

As silagens tratadas com LB tiveram maior teor de ácido láctico, maior proporção de ácido láctico: ácido acético e menor pH do que as silagens SI, e tratadas com LPLB e LPPA. Todas as silagens tiveram concentrações iguais de ácido acético. As silagens tratadas com LPPA tiveram concentração de ácido propiônico semelhante as silagens SI, as quais também tiveram maior concentração de 1,2-propanodiol e etanol do que as silagens tratadas. As silagens tratadas com LPLB e LB tiveram maior teor de matéria seca do que as silagens SI, mas as silagens tratadas com LPPA tiveram teor de MS semelhante a essas silagens. As silagens de milho tiveram semelhantes ( $P > 0,05$ ) teores de MO e EE. As silagens tratadas com LPPA tiveram maior teor de PB do que as silagens SI e tratadas com LB, sendo que as últimas citadas tiveram maior teor de FDN e menor teor de CNF em comparação as demais silagens.

#### *Silagens de milho em processo de realocação*

Houve interação ( $P < 0,05$ ) IM  $\times$  TR (tempo de realocação) na maioria das variáveis avaliadas nas silagens de milho antes da realocação (Tabela 2). No entanto, isso não foi observado na temperatura das silagens, que apresentou diferença apenas no TR, onde as silagens tiveram temperatura mais baixa (27.6°C) quando não expostas e mais elevada (31.5°C) quando expostas por 60h. As silagens tratadas com IM tiveram menor ( $P < 0,05$ ) contagem de

mofos que silagens SI quando expostas por 12 e 24h. As silagens tratadas com LPLB tiveram menor contagem de mofos que as demais quando expostas por 24h. Silagens tratadas com LB tiveram maior contagem de mofos que as demais quando expostas por 48h. As silagens SI exibiram maiores contagens de mofos quando não expostas e quando expostas por 12h, e menores contagens após 24h de exposição. As silagens tratadas com IM apresentaram maiores contagens de mofos no momento da abertura, e após 12h de exposição as contagens foram mais baixas.

Observou-se que as silagens SI tiveram maior ( $P < 0,05$ ) contagem de leveduras do que as silagens tratadas com IM quando não expostas e quando expostas por 12h. As silagens tratadas com LPLB tiveram maior contagem de leveduras do que as demais quando expostas por 24h. As silagens tratadas com LPPA tiveram maior contagem de leveduras do que as demais silagens quando expostas por 48h. As silagens tratadas com LB não tiveram maiores contagens de leveduras que as demais silagens em nenhum dos TR. As silagens tratadas com LPLB e LB tiveram maiores contagens de leveduras quando expostas por 60h. Já as silagens tratadas com LPPA tiveram maiores contagens após 48h de exposição. As silagens tratadas com LPLB tiveram o menor teor de matéria seca do que as silagens SI, e tratadas com LPPA e LB quando expostas por 60h. Contudo, todas as silagens tiveram maior teor de matéria seca quando expostas por 60h do que quando não expostas.

As silagens SI tiveram maior concentração de nitrogênio amoniacal do que as silagens tratadas com LPLB e LPPA quando não expostas e quando expostas por 12 e 24h, e semelhante as tratadas com LB quando expostas por 12-60h. Já as tratadas com LPLB e LPPA tiveram concentração de nitrogênio amoniacal semelhante as SI quando expostas por 36-60h. Após 36h de exposição, as silagens SI tiveram concentração de nitrogênio amoniacal menores do que as quando não expostas e quando expostas por 12 e 24h. O pH das silagens teve uma pequena diferença ( $P < 0,05$ ) apenas para o TR, onde as silagens tiveram pH mais alto (4.0) quando não expostas e mais baixo (3.9) quando expostas por 60h. A interação IM  $\times$  TR indicou que as silagens tratadas com LB tiveram maior proporção ácido lático: ácido acético do que as silagens SI quando não expostas, mas semelhante a essas silagens quando expostas por 12h.

Já as silagens tratadas com LPLB e LPPA tiveram a proporção ácido lático: ácido acético semelhante as silagens SI em todos os TR. As concentrações dos ácidos lático e acético tiveram diferenças ( $P < 0,05$ ) em relação ao uso do IM e ao TR, isoladamente. As silagens tratadas com LB tiveram maior concentração de ácido lático do que as silagens SI e tratadas com LPPA, mas também tiveram menor concentração de ácido acético.

Tabela 2 - Temperatura, características microbiológicas e químicas de silagens de milho sem e com inoculante microbiano após exposição aeróbia (g/kg de MS)

Item	TR (horas)	Temperatura (°C)	Mofos (ufc/g)	Leveduras (ufc/g)	Matéria seca (g/kg)	pH	N-NH <sub>3</sub> (%NT)	Ácido lático: Ácido acético	Ácido lático	Ácido acético	Ácido propiônico	Etanol	1,2 - Propanodiol
IM													
SI	0	27,7	2,0 <sup>Aa</sup>	3,5 <sup>Ac</sup>	290,2 <sup>c</sup>	4,0	5,9 <sup>Aa</sup>	24,4 <sup>Bab</sup>	79,7	32,9	5,5	7,4 <sup>Aa</sup>	3,0
	12	27,7	2,0 <sup>Aa</sup>	3,6 <sup>Ac</sup>	339,9 <sup>b</sup>	3,8	5,3 <sup>Aa</sup>	25,6 <sup>ABab</sup>	75,5	29,6	7,0 <sup>A</sup>	2,1 <sup>c</sup>	5,3
	24	27,6	1,6 <sup>Ab</sup>	3,5 <sup>Bc</sup>	346,4 <sup>b</sup>	3,8	4,9 <sup>Aa</sup>	23,1 <sup>ab</sup>	73,6	31,7	9,5 <sup>A</sup>	2,1 <sup>Ac</sup>	3,1
	36	28,6	1,0 <sup>c</sup>	3,8 <sup>Ab</sup>	336,8 <sup>b</sup>	3,7	2,4 <sup>ABb</sup>	20,8 <sup>Bb</sup>	64,3	31,1	8,0 <sup>A</sup>	4,3 <sup>Ab</sup>	2,6
	48	28,6	1,2 <sup>Bc</sup>	3,9 <sup>Bb</sup>	345,9 <sup>b</sup>	3,8	2,9 <sup>ABb</sup>	24,5 <sup>ab</sup>	63,8	26,7	8,3	1,4 <sup>c</sup>	2,7
	60	34,2	1,1 <sup>c</sup>	4,9 <sup>Aa</sup>	397,7 <sup>Aa</sup>	3,9	2,6 <sup>ABb</sup>	36,3 <sup>a</sup>	57,7	17,6	5,9	0,6 <sup>c</sup>	4,5
LPLB	0	27,5	2,2 <sup>Aa</sup>	2,5 <sup>Bd</sup>	300,0 <sup>b</sup>	4,1	2,4 <sup>B</sup>	23,2 <sup>B</sup>	73,3	31,7	6,6	4,7 <sup>Ba</sup>	0,9
	12	27,7	1,6 <sup>Bb</sup>	3,0 <sup>Bc</sup>	354,4 <sup>a</sup>	3,9	2,4 <sup>B</sup>	22,7 <sup>B</sup>	69,4	30,5	7,7 <sup>A</sup>	2,6 <sup>b</sup>	1,3
	24	26,7	1,0 <sup>Cc</sup>	4,0 <sup>Aab</sup>	358,6 <sup>a</sup>	3,8	2,1 <sup>B</sup>	29,2	76,7	26,4	5,3 <sup>BC</sup>	1,2 <sup>Bb</sup>	1,2
	36	28,3	1,1 <sup>c</sup>	3,7 <sup>Ab</sup>	362,2 <sup>a</sup>	3,7	1,8 <sup>B</sup>	24,0 <sup>B</sup>	65,2	27,2	5,4 <sup>AB</sup>	1,2 <sup>Bb</sup>	1,1
	48	28,8	1,0 <sup>Bc</sup>	3,7 <sup>Bb</sup>	363,0 <sup>a</sup>	3,9	1,9 <sup>B</sup>	26,1	67,6	26,7	6,6	1,2 <sup>b</sup>	1,0
	60	30,1	1,0 <sup>c</sup>	4,6 <sup>Aa</sup>	350,1 <sup>Ba</sup>	3,8	2,0 <sup>B</sup>	27,3	68,9	25,6	6,5	1,2 <sup>b</sup>	1,6
LPPA	0	27,7	1,7 <sup>Ba</sup>	2,6 <sup>Bc</sup>	296,1 <sup>c</sup>	4,0	2,1 <sup>B</sup>	25,3 <sup>ABab</sup>	77,5	30,8	6,9	4,4 <sup>Ba</sup>	1,4
	12	27,5	1,5 <sup>Bab</sup>	2,9 <sup>Bc</sup>	339,5 <sup>b</sup>	3,8	2,9 <sup>B</sup>	23,1 <sup>Bb</sup>	69,2	30,2	7,3 <sup>A</sup>	1,9 <sup>b</sup>	2,0
	24	27,0	1,4 <sup>Bab</sup>	3,1 <sup>Cc</sup>	337,8 <sup>b</sup>	3,8	2,3 <sup>B</sup>	24,0 <sup>ab</sup>	68,4	28,9	7,8 <sup>AB</sup>	3,3 <sup>Aab</sup>	2,0
	36	28,9	1,3 <sup>bc</sup>	3,8 <sup>Ab</sup>	359,4 <sup>ab</sup>	3,7	2,3 <sup>AB</sup>	26,7 <sup>ABab</sup>	69,2	26,2	6,2 <sup>AB</sup>	1,4 <sup>Bb</sup>	0,8
	48	27,9	1,0 <sup>Bc</sup>	5,0 <sup>Aa</sup>	369,2 <sup>a</sup>	3,8	2,3 <sup>AB</sup>	27,8 <sup>ab</sup>	67,8	24,4	5,2	1,0 <sup>c</sup>	0,7
	60	30,2	1,0 <sup>c</sup>	4,8 <sup>Aa</sup>	388,2 <sup>Aa</sup>	3,9	2,9 <sup>AB</sup>	29,5 <sup>a</sup>	60,2	20,3	4,3	0,9 <sup>c</sup>	0,7
LB	0	27,3	2,1 <sup>Aa</sup>	2,6 <sup>Bc</sup>	300,8 <sup>c</sup>	3,9	2,5 <sup>B</sup>	31,6 <sup>Aab</sup>	87,6	27,8	4,0	3,9 <sup>Ba</sup>	2,0
	12	27,2	1,8 <sup>Bab</sup>	2,5 <sup>Cc</sup>	373 <sup>ab</sup>	3,8	4,2 <sup>A</sup>	30,9 <sup>Aab</sup>	80,3	26,0	3,2 <sup>B</sup>	0,9 <sup>b</sup>	0,8
	24	26,6	1,4 <sup>Bbc</sup>	2,2 <sup>Dc</sup>	340,8 <sup>b</sup>	3,8	4,1 <sup>A</sup>	30,8 <sup>ab</sup>	75,4	24,5	3,3 <sup>C</sup>	2,5 <sup>Aab</sup>	2,3
	36	28,0	1,2 <sup>c</sup>	3,3 <sup>Bb</sup>	355,4 <sup>ab</sup>	3,7	4,9 <sup>A</sup>	31,1 <sup>Aab</sup>	75,4	24,4	3,6 <sup>B</sup>	1,0 <sup>Bb</sup>	1,8
	48	28,7	1,4 <sup>Abc</sup>	3,3 <sup>Cb</sup>	369,7 <sup>ab</sup>	3,9	4,1 <sup>A</sup>	27,1 <sup>b</sup>	64,5	23,9	4,4	1,0 <sup>b</sup>	1,6
	60	31,4	1,0 <sup>c</sup>	3,9 <sup>Ba</sup>	383,3 <sup>Aa</sup>	3,8	4,1 <sup>A</sup>	36,3 <sup>a</sup>	63,4	17,6	4,5	1,0 <sup>b</sup>	1,4
EPM		0,27	0,11	0,19	0,73	0,03	0,21	0,16	0,34	0,16	0,08	0,36	0,06
Efeitos													
IM		0,06	<0,01	<0,01	0,08	0,27	<0,01	<0,01	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
TR		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	0,03	<0,01	<0,01	0,24	<0,01	0,40
IM × TR		0,16	<0,01	<0,01	<0,01	0,98	<0,01	0,01	0,12	0,08	<0,01	<0,01	0,30

SI – sem inoculante, LPLB - *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*, LPPA- *Lactobacillus plantarum* + *Propionibacterium acidipropionici*, LB- *Lactobacillus buchneri*, Ufc- unidade formadora de colônia em log<sub>10</sub>, IM- inoculante microbiano, TR – tempo de realocação, IM×TR – interação dos fatores. Letras maiúsculas comparam inoculantes microbianos dentro de cada tempo e letras minúsculas comparam os tempos dentro de cada inoculante, onde letras iguais não diferem pelo teste de tukey (nível de significância  $\alpha < 0,05$ ).

De maneira geral, as silagens tiveram maior concentração de ácido láctico e ácido acético (79.5 e 30.8 g/kg, respectivamente) quando TR não expostas e menor (62.6 e 2.03 g/kg, respectivamente) quando expostas por 60h. As silagens tratadas com LPPA tiveram concentração de ácido propiônico semelhante ( $P>0,05$ ) as silagens SI quando expostas por 12, 24 e 36h.

A interação ( $P<0,05$ ) IM  $\times$  TR indicou que as silagens tratadas com LB tiveram menor concentração de ácido propiônico do que as silagens SI e, tratadas com LPLB e LPPA quando expostas por 12h, mas as silagens tratadas com LPLB tiveram teor desse ácido semelhante as silagens tratadas com LB quando expostas por 24h, ambas menores do que a concentração observada nas silagens controle. As silagens SI também tiveram maior concentração de ácido propiônico do que as silagens tratadas com LB quando expostas por 36h. As silagens SI tiveram maior concentração de etanol do que as silagens tratadas com IM quando não expostas e quando expostas por 36h. As silagens tratadas com LPLB tiveram menor concentração de etanol quando expostas por 24h. Apesar das variações nas concentrações de etanol, todas as silagens avaliadas apresentaram maior concentração de etanol quando não expostas e menor quando expostas por 36h. As concentrações de 1,2 propanodiol tiveram diferenças ( $P<0,05$ ) em relação ao uso do IM. As silagens SI tiveram maior concentração de 1,2 propanodiol que as silagens tratadas com inoculante microbiano.

#### *Silagens de milho realocadas ou não*

Observou-se interação ( $P<0,05$ ) IM  $\times$  TR para a maioria das variáveis avaliadas nas silagens de milho (Tabela 3 e 4). Mesmo após 210 dias de fermentação a contagem de mofos nas silagens de milho foi elevada e semelhante ao das silagens realocadas pelo menos até 24h de TR. As silagens tratadas com LPLB e LB tiveram menor contagem de mofos do que as silagens SI quando realocadas em 36 e 60h. As silagens tratadas com LPPA tiveram maiores contagens de mofos quando realocadas após 36, 48 e 60h quando comparadas as silagens realocadas nas primeiras 24h. As contagens de leveduras tiveram diferenças ( $P<0,05$ ) em relação ao uso do IM. As silagens realocadas tratadas com LPPA tiveram maior contagem de leveduras do que as silagens SI, e tratadas com LPLB e LB. Contudo, as silagens tiveram semelhante ( $P>0,05$ ) contagem de bactérias ácido lácticas e pH. As concentrações de ácido láctico tiveram diferenças ( $P<0,05$ ) em relação ao TR, onde as silagens tiveram concentração de ácido láctico maior (média de 73.4 g/kg de silagem) até 24h de TR, e menor após 36h de TR (média de 69.24 g/kg de silagem).

As concentrações de ácido acético tiveram diferenças ( $P < 0,05$ ) em relação ao uso do IM e ao TR, isoladamente. As silagens SI, e tratadas com LPLB e LPPA tiveram maior concentração de ácido acético do que as silagens tratadas com LB. De forma geral, todas as silagens tiveram concentração de ácido acético maior (31.2 g/kg) quando não realocadas e menor (23.5 g/kg) quando TR foi de 60h. A interação ( $P < 0,05$ ) IM  $\times$  TR indicou que as silagens tratadas com LPPA tiveram concentração de ácido propiônico semelhante ( $P > 0,05$ ) as silagens SI quando não realocadas ou quando TR foi de 12 e 24h, mas tiveram concentração de ácido propiônico menor que as silagens SI quando TR foi 36; 48 e 60h.

As silagens SI tiveram menor concentração de ácido propiônico quando não realocadas diferindo dos TR, os quais foram maiores e iguais. Enquanto as silagens tratadas com LPLB tiveram concentração de ácido propiônico variável nos TR, onde foi maior quando não realocada, 12 e 48h e menor quando 24, 36 e 60h. As silagens tratadas com LB tiveram maior concentração de ácido propiônico quando TR foi de 48h, diferindo das concentrações nos demais TR. Já as silagens tratadas com LPPA tiveram concentração de ácido propiônico semelhantes nos TR estudados. As silagens SI tiveram maior concentração de etanol que as silagens tratadas com IM quando não realocadas, mas quando TR foi de 12h as silagens tratadas com LPPA tiveram concentração semelhante ( $P > 0,05$ ) a essas silagens. Nos demais TR não houve diferença na concentração de etanol das silagens.

As silagens SI quando não realocadas também tiveram maior concentração de 1,2-propanodiol, mas quando TR foi de 12h as silagens tratadas com LB tiveram concentração semelhante ( $P > 0,05$ ) a essas silagens, assim como as silagens tratadas com LPLB, que tiveram concentração semelhante a essas silagens quando TR foi de 24h. No entanto, quando o TR foi de 48h, as silagens SI tiveram maior concentração desse álcool. As silagens SI e tratadas com LB, quando não realocadas tiveram maior concentração de 1,2-propanodiol do que as silagens realocadas. Já as silagens tratadas com LPLB e LPPA realocadas e não realocadas tiveram concentrações semelhantes desse álcool.

Tabela 3 - Características microbiológicas e fermentativas de silagens de milho realocadas, sem e com inoculante microbiano (g/kg de MS)

Item	TR (horas)	Mofos (ufc/g)	Leveduras (ufc/g)	Bactérias ácido lácticas (ufc/g)	pH	N-NH <sub>3</sub> (%NT)	Ácido láctico: Ácido acético	Ácido láctico	Ácido acético	Ácido propiônico	Etanol	1,2 - Propanodiol
IM												
SI	Não realocada	4,0	2,5	3,0	3,9	2,7 <sup>Aa</sup>	22,8	74,9	32,9	5,1 <sup>Ab</sup>	7,4 <sup>Aa</sup>	6,4 <sup>Aa</sup>
	12	4,1	2,0	3,3	3,8	2,7 <sup>Aa</sup>	26,5	77,2	29,5	6,1 <sup>A*</sup>	1,6 <sup>Ab</sup>	3,4 <sup>Ab</sup>
	24	4,2	2,2	3,7	3,8	2,4 <sup>Aab</sup>	21,5	73,0	34,1	8,1 <sup>A*</sup>	0,7 <sup>c</sup>	2,3 <sup>Abc</sup>
	36	4,5 <sup>Aa</sup>	2,3	4,1	3,8	2,3 <sup>Aab</sup>	21,6	64,8	30,0	7,9 <sup>Aa</sup>	0,6 <sup>c</sup>	2,2 <sup>bc</sup>
	48	4,4 <sup>AB</sup>	2,5	4,1	3,8	2,0 <sup>Bb</sup>	27,3	72,3	26,8	7,7 <sup>Aa</sup>	0,7 <sup>c</sup>	4,2 <sup>A<sup>b</sup></sup>
	60	4,6 <sup>A</sup>	2,0	5,2	3,9	2,0 <sup>b</sup>	25,2 <sup>B</sup>	66,1	26,0	7,3 <sup>Aa</sup>	0,7 <sup>c</sup>	0,6 <sup>c</sup>
LPLB	Não realocada	3,6	2,2	5,6	3,8	1,6 <sup>B</sup>	18,7 <sup>b</sup>	60,4	32,7	6,4 <sup>Aab</sup>	3,6 <sup>Ca</sup>	0,6 <sup>B</sup>
	12	3,7	2,0	4,4	3,8	1,7 <sup>B</sup>	26,4 <sup>ab</sup>	77,5	29,3	7,3 <sup>Aa</sup>	0,7 <sup>Bb</sup>	0,6 <sup>B</sup>
	24	3,8	2,1	3,7	3,7	1,6 <sup>B</sup>	30,6 <sup>a</sup>	76,4	25,1	4,2 <sup>Bc</sup>	0,7 <sup>b</sup>	1,4 <sup>A</sup>
	36	3,6 <sup>B</sup>	2,7	4,5	3,8	1,5 <sup>B</sup>	25,7 <sup>ab</sup>	67,8	26,4	5,1 <sup>Bbc</sup>	0,6 <sup>b</sup>	1,6
	48	3,8 <sup>BC</sup>	2,9	4,5	3,9	2,0 <sup>B</sup>	22,9 <sup>ab</sup>	64,3	27,9	7,0 <sup>Aa</sup>	0,7 <sup>b</sup>	1,6 <sup>B</sup>
	60	3,3 <sup>B</sup>	2,3	3,9	3,9	1,7	27,9 <sup>ABa</sup>	69,3	24,8	5,5 <sup>Abc</sup>	0,6 <sup>b</sup>	1,3
LPPA	Não realocada	3,3 <sup>b</sup>	2,9	4,8	3,8	2,1 <sup>Bab</sup>	22,5 <sup>b</sup>	70,5	32,0	4,7 <sup>A</sup>	5,2 <sup>Ba</sup>	0,9 <sup>B</sup>
	12	3,7 <sup>b</sup>	3,0	4,2	3,8	2,2 <sup>Bab</sup>	24,6 <sup>ab</sup>	72,5	30,0	6,3 <sup>A</sup>	1,7 <sup>Ab</sup>	0,4 <sup>B</sup>
	24	3,7 <sup>b</sup>	3,1	4,4	3,8	1,6 <sup>Bb</sup>	25,3 <sup>ab</sup>	76,3	30,2	6,2 <sup>A</sup>	0,7 <sup>c</sup>	0,3 <sup>B</sup>
	36	4,3 <sup>Aa</sup>	2,9	4,2	3,9	1,7 <sup>Bb</sup>	27,3 <sup>ab</sup>	73,1	26,9	5,4 <sup>B</sup>	0,6 <sup>c</sup>	0,7
	48	4,7 <sup>Aa</sup>	3,1	4,5	3,8	2,2 <sup>A<sup>ab</sup></sup>	24,9 <sup>ab</sup>	65,1	26,2	5,3 <sup>B</sup>	0,8 <sup>c</sup>	0,4 <sup>B</sup>
	60	4,5 <sup>Aa</sup>	2,9	4,6	3,9	2,6 <sup>a</sup>	30,9 <sup>Aa</sup>	71,8	23,2	4,7 <sup>B</sup>	0,6 <sup>c</sup>	0,2
LB	Não realocada	3,4	2,3	5,0	3,9	3,5 <sup>A</sup>	27,3	73,1	26,7	3,5 <sup>Bb</sup>	1,9 <sup>Da</sup>	2,8 <sup>Ba</sup>
	12	3,7	2,4	3,6	3,8	2,9 <sup>A</sup>	29,4	83,7	28,5	3,9 <sup>Bb</sup>	0,9 <sup>Bb</sup>	2,1 <sup>Aa</sup>
	24	3,5	2,3	3,8	3,8	3,2 <sup>A</sup>	25,0	66,0	27,0	3,9 <sup>Bb</sup>	0,9 <sup>b</sup>	1,6 <sup>Ab</sup>
	36	3,4 <sup>B</sup>	2,4	3,9	3,8	2,8 <sup>A</sup>	29,3	72,0	24,7	3,2 <sup>Bb</sup>	0,8 <sup>b</sup>	1,4 <sup>b</sup>
	48	3,3 <sup>C</sup>	2,8	3,9	3,8	2,3 <sup>A</sup>	32,5	74,6	23,0	5,2 <sup>Ba</sup>	0,6 <sup>b</sup>	1,7 <sup>Bb</sup>
	60	3,3 <sup>B</sup>	3,0	3,8	3,8	2,6	36,3 <sup>A</sup>	69,7	19,8	3,9 <sup>Bb</sup>	0,8 <sup>b</sup>	0,3 <sup>c</sup>
EPM		0,16	0,22	0,68	0,04	0,17	0,19	0,24	0,15	0,56	0,13	0,04
Efeitos												
IM		<0,01	<0,01	0,16	0,68	<0,01	<0,01	0,45	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
TR		<0,01	0,05	0,41	0,34	0,01	0,01	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
IM × TR		<0,01	0,34	0,28	0,96	<0,01	<0,01	0,16	0,16	<0,01	<0,01	<0,01

SI – sem inoculante, LPLB - *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*, LPPA- *Lactobacillus plantarum* + *Propionibacterium acidipropionici*, LB- *Lactobacillus buchneri*, Ufc- unidade formadora de colônia em log<sub>10</sub>, IM- inoculante microbiano, TR – tempo de realocação, IM×TR – interação dos fatores. Letras maiúsculas comparam inoculantes microbianos dentro de cada tempo e letras minúsculas comparam os tempos dentro de cada inoculante, onde letras iguais não diferem pelo teste de tukey (nível de significância  $\alpha < 0,05$ ).

Em relação a composição química (Tabela 4), as silagens tratadas com LB tiveram maior teor de MS do que as silagens SI, e tratadas com LPLB e LPPA quando TR foi de 48h, mas essas silagens tiveram maior teor de MS do que as silagens SI quando TR foi de 60h. As silagens avaliadas tiveram teor de MS menor quando não realocadas e maior quando TR foi de 60h. As silagens tratadas com LPLB tiveram teor de MO variável entre os TR, mas as silagens não realocadas tiveram teor de MO igual ao das silagens realocadas quando o TR foi de 60h.

As silagens com LPLB tiveram maior teor de PB do que as SI, e as tratadas com LPPA e LB quando não realocadas e quando TR foi de 24, 36, 48 e 60h. As silagens SI tiveram teor de PB semelhante as silagens tratadas com LPLB somente quando TR foi de 12h. As silagens tratadas com LPLB tiveram teor de PB maior quando não realocadas e quando o TR foi de até 48h, e menor quando TR foi de 60h. As silagens tratadas com LPPA e LB tiveram menor teor de EE do que as silagens SI quando não realocadas, mas quando TR foi de 12h, todas as silagens tratadas com IM tiveram menor teor de EE do que as silagens SI. Entretanto, isso não foi uma tendência nos TR de 24, 36 e 48h, onde teve pelo menos uma das silagens tratadas semelhante as silagens SI.

As silagens avaliadas tiveram teor de EE semelhante quando TR foi de 60h. As silagens tratadas com LB tiveram menor teor de EE quando não realocada e quando TR foi de 12h, e maior nos demais TR. Essa tendência dos dados não foi observada nas silagens SI, e tratadas com LPLB e LPPA, as quais tiveram teores de EE variáveis nos TR. O teor de FDN foi semelhante em todas silagens. As silagens tiveram semelhantes teores de carboidratos não fibrosos (CNF) quando não realocadas e quando o TR foi de 12, 36, 48 e 60h. As silagens tratadas com LB tiveram maior teor de CNF do que as silagens SI e tratadas com LPPA quando TR foi de 24h. Essas silagens tiveram teores de CNF variáveis nos TR.

As silagens tratadas com LPPA E LPLB tiveram menores perdas de matéria seca do que as silagens SI quando TR foi de 60h. A estabilidade aeróbia das silagens teve diferença ( $P < 0,05$ ) em relação ao uso do IM e ao TR, isoladamente. As silagens tratadas com LB tiveram menor estabilidade aeróbia do que as silagens SI, e tratadas com LPLB e LPPA. A estabilidade aeróbia foi maior nas silagens quando realocadas nos tempos 12, 24, 36, 48 e 60h (136, 138, 141, 150 e 153, respectivamente) do que nas não realocadas (92h).

Tabela 4 – Composição química (g/kg de MS) e estabilidade aeróbia de silagens de milho realocadas, sem e com inoculante microbiano

Item	TR (horas)	Matéria seca (g/kg)	Matéria orgânica	Proteína bruta	Extrato etéreo	FDN	CNF	Perdas de MS total	Estabilidade aeróbia (h)	Temperatura máxima (°C)	THM (h)	pH
IM												
SI	Não realocada	303,8 <sup>b</sup>	957,6	65,4 <sup>B</sup>	29,9	452,2	410,0	46,6	122	28,9 <sup>Ba</sup>	58 <sup>Bb</sup>	4,49
	12	309,1 <sup>b</sup>	956,5	65,5 <sup>AB</sup>	32,9	448,9	409,1	102,6	137	26,3 <sup>ab</sup>	153 <sup>a</sup>	4,19
	24	316,1 <sup>b</sup>	957,7	60,8 <sup>B</sup>	33,2	450,9	412,7 <sup>B</sup>	96,7	168	22,7 <sup>Bb</sup>	164 <sup>a</sup>	4,55
	36	339,8 <sup>a</sup>	957,3	58,6 <sup>B</sup>	32,1	438,7	428,0	62,8	168	22,7 <sup>b</sup>	161 <sup>a</sup>	4,63
	48	334,9 <sup>Ba</sup>	957,8	59,9 <sup>B</sup>	30,1	435,8	432,0	81,5	168	25,0 <sup>b</sup>	146 <sup>a</sup>	4,48
	60	335,2 <sup>Ba</sup>	958,4	60,8	30,5	407,9	459,2	126,7 <sup>A</sup>	165	23,5 <sup>b</sup>	162 <sup>a</sup>	4,77
LPLB	Não realocada	308,6 <sup>b</sup>	957,5 <sup>ab</sup>	75,0 <sup>Aa</sup>	26,6 <sup>a</sup>	411,2	444,7	41,3	105	28,3 <sup>Ba</sup>	132 <sup>A</sup>	4,75
	12	316,9 <sup>b</sup>	954,3 <sup>b</sup>	74,6 <sup>A</sup>	19,6 <sup>a</sup>	427,2	432,9	96,4	166	24,9 <sup>a</sup>	157	4,68
	24	321,1 <sup>ab</sup>	955,8 <sup>b</sup>	74,4 <sup>A</sup>	19,2 <sup>a</sup>	422,8	439,3 <sup>AB</sup>	98,7	142	26,3 <sup>Aa</sup>	151	4,27
	36	345,4 <sup>a</sup>	957,0 <sup>ab</sup>	73,8 <sup>A</sup>	18,2 <sup>a</sup>	427,8	437,2	63,1	141	25,5 <sup>a</sup>	158	4,56
	48	318,3 <sup>Bab</sup>	954,9 <sup>b</sup>	72,6 <sup>A</sup>	12,8 <sup>b</sup>	464,8	404,7	93,7	168	23,0 <sup>b</sup>	108	4,63
	60	344,1 <sup>Aba</sup>	962,5 <sup>a</sup>	64,3 <sup>Bb</sup>	20,2 <sup>a</sup>	418,1	459,8	62,5 <sup>B</sup>	168	22,9 <sup>b</sup>	153	4,19
LPPA	Não realocada	316,6 <sup>b</sup>	962,5	62,4 <sup>B</sup>	15,0 <sup>b</sup>	425,4	459,7	58,7	70	28,2 <sup>B</sup>	124 <sup>A</sup>	4,32
	12	322,0 <sup>b</sup>	963,2	64,8 <sup>B</sup>	18,4 <sup>b</sup>	423,5	456,5	68,3	149	27,0	147	4,14
	24	325,8 <sup>b</sup>	957,0	60,4 <sup>B</sup>	26,7 <sup>a</sup>	457,6	412,4 <sup>B</sup>	45,8	143	25,2 <sup>A</sup>	162	4,03
	36	347,0 <sup>a</sup>	954,1	58,9 <sup>B</sup>	20,7 <sup>a</sup>	440,4	434,2	45,6	139	25,2	162	4,40
	48	335,5 <sup>Ba</sup>	956,1	60,9 <sup>B</sup>	17,8 <sup>b</sup>	456,3	421,1	60,8	160	24,8	165	4,28
	60	350,7 <sup>Aba</sup>	956,0	60,1	18,6 <sup>b</sup>	447,8	429,4	31,3 <sup>B</sup>	157	23,7	161	3,96
LB	Não realocada	312,2 <sup>b</sup>	960,1	55,3 <sup>C</sup>	13,4 <sup>b</sup>	449,9	441,5 <sup>ab</sup>	48,4	71	33,0 <sup>Aa</sup>	99 <sup>Ab</sup>	4,03
	12	320,0 <sup>b</sup>	959,8	64,1 <sup>B</sup>	14,8 <sup>b</sup>	407,0	473,9 <sup>ab</sup>	72,4	94	30,3 <sup>ab</sup>	134 <sup>a</sup>	3,92
	24	326,5 <sup>b</sup>	957,1	62,5 <sup>B</sup>	18,5 <sup>a</sup>	387,1	489,0 <sup>Aa</sup>	50,9	97	29,3 <sup>Aab</sup>	131 <sup>a</sup>	3,93
	36	333,7 <sup>b</sup>	959,0	60,4 <sup>B</sup>	25,5 <sup>a</sup>	435,7	437,4 <sup>ab</sup>	50,8	116	27,0 <sup>b</sup>	153 <sup>a</sup>	3,85
	48	346,7 <sup>Aa</sup>	959,0	58,7 <sup>B</sup>	29,5 <sup>a</sup>	444,1	437,1 <sup>b</sup>	61,5	103	25,5 <sup>b</sup>	164 <sup>a</sup>	4,18
	60	363,6 <sup>Aa</sup>	958,1	56,3	25,5 <sup>a</sup>	423,2	454,4 <sup>ab</sup>	93,6 <sup>A</sup>	123	27,1 <sup>b</sup>	160 <sup>a</sup>	4,15
EPM		0,50	0,17	0,17	0,22	1,42	1,41	0,44	9,29	0,96	14,9	0,28
Efeitos												
IM		<0,01	0,28	<0,01	<0,01	0,12	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,23	<0,01
TR		<0,01	0,14	<0,01	<0,01	0,14	0,07	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,85
IM × TR		0,04	0,01	0,02	<0,01	0,06	0,01	<0,01	0,08	<0,01	<0,01	0,94

SI – sem inoculante, LPLB - *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*, LPPA- *Lactobacillus plantarum* + *Propionibacterium acidipropionici*, LB- *Lactobacillus buchneri*, Ufc- unidade formadora de colônia em log<sub>10</sub>, MS- matéria seca, FDN- fibra em detergente neutro, CNF- carboidratos não fibrosos, THM – tempo em horas para atingir a temperatura máxima, IM- inoculante microbiano, TR – tempo de realocação, IM×TR – interação dos fatores. Letras maiúsculas comparam inoculantes microbianos dentro de cada tempo e letras minúsculas comparam os tempos dentro de cada inoculante, onde letras iguais não diferem pelo teste de tukey (nível de significância  $\alpha < 0,05$ ).

A interação ( $P < 0,05$ ) IM  $\times$  TR indicou que as silagens não realocadas tratadas com LB tiveram maior temperatura máxima (TM) que as silagens SI, e tratadas com LPLB e LPPA. Essas silagens tiveram menor TM quando TR foi 36, 48 e 60h em relação as silagens não realocadas. As silagens SI tiveram menor TM quando TR foi de 24h. As silagens tratadas com LPPA não diferiram para TM nos TR. As silagens tratadas com LPLB tiveram maior TM quando não realocadas e quando TR foi 12, 24 e 36h. As silagens SI apresentaram menor TM nos TR de 24, 36, 48 e 60h em relação as silagens não realocadas. As silagens SI quando não realocadas apresentaram menor tempo em horas para atingir a temperatura máxima (THM) do que as silagens tratadas com IM. As silagens tratadas com LB tiveram maior THM quando TR foi 12, 24, 36 e 60h em relação a não realocada.

## 2.4 Discussão

### *Silagens de milho armazenadas por 120 dias antes da realocação*

Embora a planta de milho apresente um conjunto de características desejáveis (MS, açúcares fermentáveis e baixo poder tampão) ao processo de ensilagem, muitos fatores podem afetar o tipo de fermentação que ocorre no silo. Entre eles, os tipos e a população de microrganismos epifítica da planta têm efeitos profundos. Em situações, onde essa população não é dominada por microrganismos que produzem ácido láctico, fermentações secundárias e indesejáveis podem ocorrer e outros produtos, por exemplo, nitrogênio amoniacal, ácido acético e etanol, podem ser observados nas silagens em concentrações atípicas (Kung et al., 2018). Neste estudo, a população de microrganismos epifítica das plantas de milho provavelmente era constituída por um número elevado de BAL e outros microrganismos, resultando em produção de vários produtos na fermentação, principalmente nas silagens SI.

Além do mais, as silagens tratadas com cepas de bactérias heterofermentativas, capazes de produzir durante a fermentação os ácidos acéticos (LPLB e LB) e propiônico (LPPA), provavelmente, tiveram seus efeitos reduzidos devido a população epifítica de BAL ter sido maior que a quantidade aplicada no inoculante (Muck, 2010), e por isso as concentrações desses ácidos não foram maiores nas silagens tratadas em relação as silagens SI. Contudo, as silagens com IM em relação as SI, tiveram melhor perfil fermentativo na ensilagem, pois as cepas inoculadas, possivelmente deram vantagem competitiva as BAL presentes na massa, e assim, a produção de ácido láctico e conseqüente redução no pH ocorreu de maneira mais rápida, inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis e conseqüentemente, as perdas de MS.

Já as silagens SI, apesar de terem tido adequadas concentrações de ácido láctico tiveram fermentações secundárias durante o processo fermentativo, onde microrganismos indesejáveis utilizaram como substratos carboidratos solúveis e proteínas, e formaram como produtos dessa fermentação maior concentração de etanol e nitrogênio amoniacal, justificando a maior perda de MS dessas silagens. Mesmo assim, a intensidade de perdas não foi o suficiente para causar alterações na composição química das silagens SI. As silagens SI também tiveram maior concentração de 1,2- propanodiol, e isso deve ter acontecido pela atividade da população de LB epifítica e tempo de conservação das silagens. Esses resultados são semelhantes ao observado por Elferink et al. (2001) e Kristensen et al. (2010) que relataram a presença desse álcool em silagens de milho não tratadas quando conservadas por longos períodos (acima de 90 dias), devido a maior atividade de LB.

Entre as silagens tratadas com IM, as silagens tratadas com LPLB e LB, possivelmente tiveram o processo fermentativo mais eficiente, visto que as perdas de MS foram menores nessas silagens do que nas silagens tratadas com LPPA. As silagens tratadas com LB tiveram maior consumo de açúcares solúveis para o processo fermentativo, isso resultou em uma silagem com alto teor de FDN por essa fração não ser fermentável por bactérias ácido lácticas e insolúvel em água. Além disso, essas silagens tiveram maior acidificação pela maior concentração de ácido láctico, o qual inibiu a atividade de microrganismos indesejáveis durante a fase anaeróbia, resultando menor temperatura na silagem no momento da abertura do silo.

A baixa concentração de ácido acético e 1,2-propanodiol pode ser considerado atípico, pois LB caracteriza-se por apresentar rota metabólica heterolática, com capacidade de produzir ácido acético durante a fermentação, e também por fazer a degradação anaeróbia do ácido láctico para o ácido acético e 1,2-propanodiol (Kung and Ranjit, 2001; Filya, 2003; Pahlow et al., 2003). Tabacco et al. (2011), ao avaliar o efeito de duas cepas de LB, também tiveram um resultado inesperado, onde as concentrações de ácido acético e 1,2-propanodiol, duas características da atividade de LB, não diferiram entre as silagens tratadas e não tratadas.

O motivo para que a inoculação com LB (combinada ou não) não tenha elevado a concentração de ácido acético e 1,2 propanodiol pode ser a baixa taxa de inoculação usada de  $10^5$  ufc/g de silagem (Kleinschmit and Kung, 2006), a qual pode ser ineficaz mesmo em taxas de aplicação de  $4 \times 10^5$  ufc/g de (Schmidt and Kung, 2010). Ou ainda, isso pode ter acontecido em função da dinâmica de transformação de ácido láctico em ácido acético, a qual depende primeiramente da cepa de LB utilizada, e das condições de temperatura (15-30°C) e pH (3.8) que essa exige para fazer essa transformação (Elferink et al., 2001). Neste estudo, a temperatura ambiente média foi de 27.6°C, enquanto a temperatura e pH das silagens foram em média de

27.3 e 4.0, respectivamente, adequadas para o desenvolvimento das LB. No entanto, não se sabe como a temperatura e o pH das silagens comportaram-se durante o processo fermentativo e se foram adequados para as cepas do estudo. Logo, as condições inadequadas também podem ter influenciado na baixa concentração de ácido acético nas silagens tratadas com LB. Apesar de tudo, durante o processo de realocação, as silagens tratadas com LB tiveram menor população de leveduras.

#### *Silagens de milho em processo de realocação*

Após o contato com o oxigênio presente no ar iniciou-se o processo de deterioração da massa, onde as leveduras tornaram-se metabolicamente ativas e iniciaram o uso de substratos para crescimento. De regra, esses são o primeiro grupo de microrganismos a se desenvolver devido ao baixo pH da silagem (Pahlow et al., 2003). Já os mofos, caracterizados por apresentar crescimento mais tardio do que as leveduras (Borreani et al., 2018), provavelmente não tiveram tempo suficiente (60h) em contato com o oxigênio para demonstrar atividade de crescimento. Algumas das leveduras envolvidas no processo de deterioração das silagens estudadas, possivelmente eram assimiladoras de lactato, e por isso houve diminuição na concentração de ácido lático durante as 60h de realocação (Borreani et al., 2018).

Após esse período, todas as silagens tiveram alto teor de MS, devido à perda de umidade para o ambiente, e alta temperatura ( $>30^{\circ}\text{C}$ ), devido a liberação de calor pela atividade metabólica das leveduras, e de outros microrganismos aeróbios não avaliados. A elevada temperatura nas silagens também indica que elas estavam entrando em um processo de deterioração mais avançado. Contudo, as alterações ocorridas até 60 h de realocação não refletiram em aumento no pH das silagens, o qual poderia ter aumentado se as silagens tivessem sido expostas por um período superior. O pH não aumentou ( $>4.2$ ), porque as silagens mesmo após 60h de realocação, ainda apresentavam teor de ácido lático adequado (Kung et al., 2018).

Entre as silagens tratadas com IM, as silagens tratadas com LB foram mais estáveis e não tiveram população de leveduras superior a 3.9 ufc/g. Possivelmente, esse resultado foi observado neste estudo pelo fato das silagens tratadas com LB terem tido melhor inibição ou redução na população de leveduras durante a fase anaeróbia de conservação da silagem (Kung et al., 1998; Muck, 2004). Além disso, a maior relação ácido lático: ácido acético (Kung et al., 2018) e menor concentração de produtos secundários, também contribuiu para com os efeitos desses ácidos sobre a amostra, resultando em maior controle no crescimento das leveduras das silagens durante a realocação.

Já as silagens tratadas com LPPA foram mais instáveis e tiveram alta população de leveduras (>4.5 ufc/g), semelhante as silagens SI. Ao contrário disso, esperava-se que essas silagens apresentassem maior controle no crescimento dos fungos pela ação antifúngica dos ácidos acético e propiônico. No entanto, os ácidos antifúngicos não foram produzidos em quantidades suficientes durante o processo fermentativo. Em um estudo semelhante, Filya et al. (2006) observaram que a acidificação rápida da silagem por BAL comprometeu o crescimento das bactérias ácido propiônicas ocasionando baixa produção dos ácidos acético e propiônico, tornando as silagens mais instáveis em condições aeróbias.

Os compostos voláteis (ácido acético, ácido propiônico e álcoois) exceto a amônia tenderam a reduzir na maioria das silagens em exposição pois podem evaporar continuamente, sendo que a taxa de evaporação é maior em temperaturas mais altas. O ácido láctico não foi perdido da mesma forma que os compostos voláteis porque para ocorrer a volatilização, as substâncias devem estar na forma não dissociada (Luiz et al., 2011). Outro fator determinante da volatilização de compostos é a proporção de água no meio, pois quanto mais seco o material, maior a concentração dos compostos e taxa de evaporação. Diante disso, acredita-se que as alterações no pH das silagens nos TR devem ter acontecido em função de três fatores: a rápida volatilização dos compostos voláteis, ao aumento no teor de MS e a lenta redução do ácido láctico. Pois o aumento no teor de MS e a redução rápida dos compostos voláteis, provavelmente concentraram o ácido láctico na silagem, e este a acidificou levemente.

#### *Silagens de milho realocadas ou não*

As silagens de milho não realocadas, provavelmente, tiveram bom processo fermentativo na ensilagem, justificando a adequada concentração de ácido láctico nas silagens (Kung et al., 2018). No entanto, as silagens tratadas com *Lactobacillus plantarum* (LPPA e LPLB) provavelmente, tiveram o processo fermentativo mais acelerado, pois as cepas de bactérias inoculadas devem ter proporcionado vantagem competitiva as bactérias desejáveis e produtoras de ácido láctico (como as LP) da planta, resultando no rápido abaixamento do pH. O que é essencial para reduzir perdas na fase aeróbia (primeira fase do processo fermentativo na ensilagem), onde ocorrem reações de respiração e proteólise decorrente da ação enzimática dentro das células vegetais, e pela ação de alguns microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos (Weinberg and Muck, 1996).

Quando microrganismos indesejáveis (leveduras e enterobactérias) se desenvolvem na massa ensilada durante a fermentação no silo liberam etanol e CO<sub>2</sub>, indicando perdas

fermentativas no processo, por isso, neste estudo as silagens SI tiveram maior (7.4 g/kg de silagem) concentração de etanol (Borreani et al., 2018). Ainda nas silagens não realocadas, a maior concentração de 1,2 -Propanodiol nas SI, confirma a ideia de que houve acentuada fermentação por bactérias heterofermentativas epífitas da planta nessas silagens. Entre as silagens com IM, as tratadas com LPLB tiveram menor proteólise, e por isso maior teor de PB e baixa concentração de nitrogênio amoniacal. Mesmo assim, as perdas de MS foram iguais nas silagens não realocadas. Durante a avaliação de estabilidade aeróbia, as silagens tratadas com LB (não realocadas) pareceram ter maior concentração de substratos para o desenvolvimento de microrganismos deterioradores, pois tiveram temperatura máxima muito alta (33°C). Contudo, a estabilidade aeróbia aumentou quando TR aumentou, o que indica que todas as silagens apresentaram menor concentração de substratos que as silagens não realocadas.

As silagens realocadas, provavelmente passaram por uma fase aeróbia maior que o comum e tiveram um processo fermentativo prolongado devido à baixa concentração de substratos e maior teor de MS, sendo mais evidente nas silagens que foram reensiladas após 36h de TR, favorecendo a atividade de mofos. As silagens tratadas com LPPA durante o processo de realocação já haviam demonstrado ser mais sensíveis a atividade de leveduras, o que refletiu em maiores contagens de leveduras independente do TR e maior atividade de mofos nas silagens realocadas após 36h de TR. A provável baixa concentração de açúcares solúveis para a fermentação parece ter limitado o crescimento das bactérias ácido lácticas e consequentemente a produção de ácido láctico e abaixamento do pH, mas isso não afetou o controle da proteólise nas silagens tratadas com LPLB e LPPA não realocadas e realocadas até 36h.

A maior concentração de ácido acético nas silagens SI, e tratadas com LPLB e LPPA pode indicar que possivelmente ocorreu atividade de bactérias do ácido acético durante a realocação e no início do segundo processo fermentativo (fase aeróbia). Essas bactérias podem se desenvolver junto com as leveduras e aumentar a concentração de ácido acético da silagem (Muck, 2010). Além disso, no momento da realocação, essas silagens já tinham alta concentração dos ácidos acético, o qual pode estimular o crescimento desse tipo de bactéria em silagens de milho (Driehuis and Van Wixselaar, 1996). Resultado semelhante foi observado por Michel et al. (2016) ao avaliar o efeito da realocação e de um inoculante microbiano em silagens de sorgo, onde as silagens reensiladas tiveram maior concentração de ácido acético nas silagens reensiladas após 24h de exposição ao ar. Em geral, as silagens tratadas com LPPA tiveram menor concentração de 1,2- Propanodiol, provavelmente porque tiveram menor população de LB epifítica após a realocação.

Durante o processo de fermentação no silo, as bactérias presentes, provavelmente, liberaram água durante o metabolismo, e por isso o teor de MS das silagens realocadas foi menor do que o das silagens no momento da realocação, mas foram maiores nas silagens realocadas do que nas não realocadas. As silagens tratadas com IM quando realocadas após 60h provavelmente tiveram maior teor de MS, porque tiveram menores perdas de MS, e por isso provavelmente eram de maior qualidade do que as silagens realocadas não tratadas. A concentração de substratos para a fermentação, provavelmente era baixa e o teor de MS mais alto, logo as condições para o eficiente processo fermentativo não eram ideais (Kung et al., 2018). O teor de PB tendeu a ser maior nas silagens tratadas com LPLB, devido a menor ação de proteólise nessas silagens, justificada pela baixa concentração de nitrogênio amoniacal e provavelmente baixo teor de nitrogênio solúvel (Kung et al., 2018). As alterações nos teores de EE devem ter acontecido por causa da atividade de fungos, os quais quebram estruturas complexas de carbono de materiais orgânicos para satisfazer suas necessidades de carbono e nitrogênio para o desenvolvimento (Lange, 2017).

Os teores de FDN não alteraram nas silagens. Acredita-se que isso ocorreu devido o tempo de realocação de 60h não ter sido o suficiente para que as silagens fossem totalmente deterioradas. Resultados semelhantes foram observados por Chen e Weinberg (2014) e Michel et al. (2016), onde as silagens de milho também não tiveram alteração no teor de fibra após 48 e 24h, respectivamente. A melhor preservação das silagens tratadas com LB durante o processo de realocação resultou em maior teor de CNF, os provavelmente foram consumidos por leveduras durante a avaliação de estabilidade aeróbia, tornando essas silagens mais instáveis. Durante a exposição excessiva ao ar, as leveduras que utilizam lactato proliferam e oxidam o ácido láctico, o ácido acético e os carboidratos solúveis, produzindo dióxido de carbono e água, com liberação de calor (McDonald et al., 1991). O pH também tido como um indicador de deterioração aeróbica da silagem, pois o ácido láctico é consumido pelas leveduras assimiladoras de lactato durante a exposição aeróbica, e a silagem torna-se favorável ao crescimento de outros microrganismos indesejáveis, como bolores e bactérias. Apesar disso, o pH das silagens tratadas com LB foi menor. Isso pode indicar que a população de leveduras assimiladoras de lactato não era dominante no processo de deterioração. No entanto, é melhor que o pH sempre seja observado juntamente com outros parâmetros que identificam o processo de deterioração aeróbia, pois neste estudo ele não refletiu a deterioração aeróbia da silagem.

Conclui-se que silagens de milho tratadas com IM contendo as cepas *Lactobacillus plantarum* (DSM3676; DSM3677) + *Lactobacillus buchneri* (DSM13573), *Lactobacillus plantarum* + *Propionibacterium acidipropionici* ou *Lactobacillus buchneri* (DSM13573)

apresentam melhor composição química e características fermentativas do que silagens de milho não tratadas. O tempo de exposição ao ar afeta as características fermentativas de silagens de milho. Silagens tratadas com *Lactobacillus buchneri* (DSM13573) apresentam melhor controle no crescimento de leveduras durante 60h de exposição ao ar, mas perdem o efeito antifúngico quando submetida a um novo processo fermentativo (realocação). Silagens de milho realocadas são mais estáveis do que as silagens não realocadas.

## 2.5 Agradecimentos

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por financiar essa pesquisa, aos integrantes do GERFAM (Grupo de Estudos em Ruminantes e Forragicultura da Amazônia) e ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

## 2.6 Conflitos de interesse

Os autores declaram não ter conflito de interesses em relação ao trabalho apresentado neste relatório.

## 2.7 Referências

- AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. 1990. Official methods of analysis. 15th AOAC. (1990) *Official methods of analysis*, 15th edn. Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemistry.
- BOLSEN, K. K., WHITLOCK, L. A., URIARTE-ARCHUNDIA, M. E. (2002) Effect of surface spoilage on the nutritive value of maize silages diets. p.76-77. In: *Proceedings of the 13th International Silage Conference*, Auchinruive, Scotland.
- BORREANI, G., E. TABACCO, R.J. SCHMIDT, B.J. HOLMES, AND R.E. MUCK. (2018) Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *J. Dairy Sci.* **101**,3952–3979.
- CHEN, Y., and WEINBERG. Z.G. (2014) The effect of relocation of whole-crop wheat and corn silages on their quality. *J. Dairy Sci.* **97**, 406–410.
- DOS ANJOS, G.V.S., GONÇALVES, L.C., RODRIGUES, J.A.S., KELLER, K.M., COELHO, M.M., MICHEL, P.H.F., OTTONI, D. and JAYME, D.G. (2018) Effect of re-ensiling on the quality of sorghum silage. *J. Dairy Sci.* 1–8.
- ELFERINK, S.J.W.H.O., KROONEMAN, J. JAN, C. SPOELSTRA, S.F.and FABER, F.

- (2001) Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1, 2-Propanediol by *Lactobacillus buchneri* Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 125–132.
- DERIAZ, R. E. (1961) Routine analysis of carbohydrates and lignin in herbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* **12**, 152-160.
- DRIEHUIS, F. and VAN WIKSELAAR, P.G. (1996) Effects of formic, acetic or propionic acid to maize silage and low dry matter grass silage on the microbial flora and aerobic stability. In: *Proceedings of the 11th International Silage Conference*. University of Wales, Aberystwyth, Wales. pp. 256-257.
- FILYA, I. (2003) The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. *Journal of Applied Microbiology.* **95**, 1080-1086.
- FILYA, I.; SUCU, E.; and KARABULUT, A. (2006) The effects of *Propionibacterium acidipropionici* and *Lactobacillus plantarum*, applied at ensiling, on the fermentation and aerobic stability of low dry matter corn and sorghum silages. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* **33**, 353-358.
- KLEINSCHMIT, D.H., and L. KUNG. (2006) A Meta-Analysis of the Effects of *Lactobacillus buchneri* on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn and Grass and Small-Grain Silages. *J. Dairy Sci.* **89**, 4005–4013.
- KUNG, L. JR., A. C. SHEPERD, A. M. SMAGALA, K. M. ENDRES, C. A. BESSETT, N. K. RANJIT, and J. L. GLANCEY. (1998) The effect of preservatives based on propionic acid on the fermentation and aerobic stability of corn silage and a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* **81**, 1322–1330.
- KUNG, L. JR and RANJIT, N.K. (2001) The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *Journal of Dairy Science.* **84**, 1149–1155.
- KUNG, L., SHAVER, R.D. GRANT, R.J and SCHMIDT, R.J. (2018) Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* **101**, 4020–4033.
- LANGE, L. (2017) Fungal Enzymes and Yeasts for Conversion of Plant Biomass to Bioenergy and High-Value Products. *The Fungal Kingdom* 1029–1048.
- LUIZ, J., DANIEL, P. and NUSSIO, L.G. (2011) Contribuições de compostos voláteis de silagens na produção animal † 1–28.
- MAHANA, B., and CHASE, L. (2003) Chapter 19: Practical applications and solutions to silage problems. Pages 855–895 in *Silage Science and Technology*. Agronomy Monograph 42. D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, ed. American Society of Agronomy, Madison, WI.
- MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R. and HERON, S. J. E. (1991) *The biochemistry of silage*. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, UK.

- MERTENS, D.R. (2002) Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC International*, **85**, 1217-1240.
- MICHEL, P.H.F., GONÇALVES, L.C., RODRIGUES, J.A.S., KELLER, K.M., RAPOSO, V.S., LIMA, E.M., SANTOS, F.P.C. and JAYME, D.G. (2017) Re-ensiling and inoculant application with *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium acidipropionici* on sorghum silages. *Grass Forage Sci*, **72**, 432–440.
- MUCK, R. E. (2004) Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, **47**, 1011-1016.
- MUCK, R.E. (2010) Silage microbiology and its control through additives. *Rev. Bras. Zootec.* **39**,183–191.
- MUCK, R.E., NADEAU, E.M.G., MCALLISTER, T.A., CONTRERAS-GOVEA, F.E., SANTOS, M.C. and KUNG, L. (2018) Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *J. Dairy Sci.* **101**, 3980–4000.
- PAHLOW, G., MUCK, R.E. DRIEHUIS, F., OUDE ELFERINK, S.J.W.H. and SPOELSTRA, S.F. (2003) Chapter 2: Microbiology. Pages 31–93 in *Silage Science and Technology*. Agronomy Monograph 42. D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, ed. American Society of Agronomy, Madison, WI.
- SCHMIDT, R. J. and KUNG JR., L. (2010) The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silages made at different locations. *Journal of Dairy Science*. **93**, 1616-1624.
- SILVA, D.J. and QUEIROZ, A.C. (2002) *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, pp. 235.
- TABACCO, E., PIANO, S., CAVALLARIN, L., BERNARDES, T.F. and BORREANI, G. (2009) Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. *J. Appl. Microbiol.* **107**,1632–1641.
- TABACCO, E., PIANO, S., REVELLO-CHION, A., and BORREANI, G. (2011) Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. *J. Dairy Sci.* **94**, 5589–5598.
- WEINBERG, Z.G., and MUCK, R. (1996) New trends and opportunities in the development and use inoculants for silage. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**, 53–68.

### 3. EFEITOS DA REALOCAÇÃO DE SILAGEM DE MILHO INOCULADA COM ADITIVOS MICROBIANOS NA ESTABILIDADE AERÓBIA, DIGESTIBILIDADE APARENTE E DESEMPENHO DE CORDEIROS

#### RESUMO

Objetivou-se com esse estudo avaliar os efeitos da realocação de silagem de milho inoculada ou não com *Lactobacillus buchneri* (LB) sozinho ou em combinação com *Lactobacillus plantarum* (LBLP) na estabilidade aeróbia, digestibilidade aparente e desempenho de cordeiros. Nos ensaios de estabilidade aeróbia das silagens, assim também como das dietas, foram usadas dezesseis unidades experimentais. Na avaliação de digestibilidade foram usados vinte e quatro cordeiros Santa Inês pesando  $17,4 \pm 2,0$  kg. Na avaliação de desempenho foram usados trinta e seis cordeiros Santa Inês pesando  $20,9 \pm 2,0$  kg. Em ambos os estudos, os cordeiros foram atribuídos aleatoriamente em cada 1 dos 4 tratamentos, sendo as dietas: silagem de milho sem inoculante não realocada (SISR); silagem de milho sem inoculante realocada após 24h de exposição aeróbia (SIR); silagem de milho com LB realocada após 24h de exposição aeróbia (LBR); e silagem de milho com LBLP realocadas após 24h de exposição aeróbia (LBLPR). Na avaliação de digestibilidade, os cordeiros foram alimentados com as dietas experimentais por 21 dias e foram avaliados o consumo de matéria seca, a digestibilidade aparente e balanço de nitrogênio a partir de amostras de alimento fornecido, sobras, fezes e urina obtidas em 7 dias de coleta. Na avaliação de desempenho, os cordeiros foram alimentados com as dietas experimentais por 60 dias. O desempenho foi avaliado a partir da determinação do consumo de matéria seca, consumo de nutrientes, ganho de peso diário, conversão alimentar e comportamento ingestivo dos cordeiros. Houve efeito ( $P < 0,05$ ) da realocação e da inoculação microbiana, onde a silagem LBLPR teve maior estabilidade que as silagens SISR, SIR e LBR. Não houve efeito ( $P > 0,05$ ) da realocação e da inoculação microbiana sobre o consumo e digestibilidade das silagens de milho, e consequentemente, não houve efeito ( $P > 0,05$ ) sobre o balanço de nitrogênio dos cordeiros. Houve efeito ( $P < 0,05$ ) da realocação e da inoculação microbiana no consumo dos animais avaliados no desempenho. A silagem SISR apresentou maior ( $P < 0,05$ ) consumo de fibra em detergente neutro (FDN), devido a maior quantidade de FDN e menor quantidade de carboidratos não fibrosos contidos nessa silagem quando comparadas as silagens SIR, LBR e LBLPR. Contudo, não houve efeito ( $P > 0,05$ ) da realocação e da inoculação microbiana sobre a conversão alimentar, ganho de peso diário e comportamento ingestivo. Conclui-se que as silagens LBLPR são mais estáveis em ambiente aeróbio, diminuindo a quantidade diária de silagem deteriorada descartada. As silagens realocadas até 24h de exposição ao ar contendo ou não inoculante microbiano não afetam a digestibilidade e o desempenho de cordeiros.

**Palavras-chave:** consumo, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, qualidade da silagem, reensilagem

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of reallocation of corn silage inoculated or not with *Lactobacillus buchneri* (LB) alone or in combination with *Lactobacillus plantarum* (LBLP) on aerobic stability, apparent digestibility and lamb performance. In the aerobic stability tests of the silages, as well as of the diets, sixteen experimental units were used. In the digestibility assessment twenty-four Santa Inês lambs weighing  $17.4 \pm 2.0$  kg were used. In the performance evaluation thirty-six Santa Inês lambs weighing  $20.9 \pm 2.0$  kg were used. In both studies, lambs were randomly assigned to each of the 4 treatments, the diets being: corn silage without unallocated inoculant (SISR); corn silage without inoculant relocated after 24h of aerobic exposure (SIR); corn silage with LB relocated after 24h of aerobic exposure (LBR); and corn silage with LBLP relocated after 24h of aerobic exposure (LBLPR). In the digestibility evaluation, the lambs were fed with the experimental diets for 21 days and the consumption of dry matter, apparent digestibility and nitrogen balance were evaluated from samples of supplied food, leftovers, feces and urine obtained in 7 days of collect. In the performance evaluation, the lambs were fed with experimental diets for 60 days. Performance was assessed based on the determination of dry matter intake, nutrient intake, daily weight gain, feed conversion and ingestive behavior of the lambs. There was an effect ( $P < 0.05$ ) of the relocation and microbial inoculation, where the LBLPR silage had greater stability than the SISR, SIR and LBR silages. There was no effect ( $P > 0.05$ ) of the relocation and microbial inoculation on the consumption and digestibility of corn silages, and consequently, there was no effect ( $P > 0.05$ ) on the lambs nitrogen balance. There was an effect ( $P < 0.05$ ) of the relocation and microbial inoculation in the consumption of the animals evaluated in the performance. The SISR silage showed a higher ( $P < 0.05$ ) consumption of neutral detergent fiber (NDF), due to a greater amount of NDF and less non-fibrous carbohydrates contained in this silage when compared to the SIR, LBR and LBLPR silages. However, there was no effect ( $P > 0.05$ ) of relocation and microbial inoculation on feed conversion, daily weight gain and ingestive behavior. It is concluded that LBLPR silages are more stable in an aerobic environment, decreasing the daily amount of deteriorated silage discarded. Silages relocated within 24 hours of exposure to air containing or not microbial inoculants do not affect the digestibility and performance of lambs.

**Key words:** intake, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, re-ensiling, silage quality

### 3.1 Introdução

A falta de planejamento dos recursos forrageiros é um dos principais motivos para a redução da produção de ruminantes nos períodos de baixa disponibilidade de forragem. Uma alternativa de alimento volumoso para os animais nesse período seria a aquisição de forragens conservadas. Nesse mercado, a demanda por silagens realocadas, tem aumentado. Produtores que apresentam facilidade e segurança na produção de silagem fazem o planejamento para produzir silagem em grande escala a fim de comercializar e abastecer o mercado de silagens conservadas (DOS ANJOS et al., 2018).

Na confecção da silagem realocada, o alimento já fermentado é retirado diretamente do silo e passa pelos mesmos processos referentes a ensilagem da forragem fresca no campo (CHEN; WEINBERG, 2014). A quebra da anerobiose e a exposição da silagem ao ambiente durante essas operações é inevitável, ocorrendo sem um tempo fixo, variando de acordo com o manejo de desabastecimento do silo até a completa realocação do alimento. A presença do oxigênio pode desencadear perdas no valor nutricional, em especial por leveduras, que iniciam a deterioração da silagem, processo este ainda mais intenso em regiões de elevada temperatura. A constante utilização dos nutrientes pelos microrganismos aeróbios durante a realocação ocasiona alterações do perfil dos componentes químicos da silagem, reduzindo a ingestão do alimento, bem como a digestibilidade dos nutrientes pelos animais (GEARLACH et al., 2014; MICHEL et al., 2016).

A deterioração da silagem é um processo que se inicia logo após a quebra da sua estabilidade, o que não necessariamente implica em alterações físicas e organolépticas imediatas, ou seja, as alterações na qualidade da forragem ocorrem muito antes desta apresentar estágios avançados de deterioração (e.g. presença de bolores na massa). Devido a isso, pouca atenção tem sido dada a esse assunto por se tratar, geralmente, de um problema assintomático, principalmente em silagens realocadas, que dependem fortemente do perfil de fermentação da silagem que será utilizada no processo, definindo as características finais do alimento no final da sua realocação. Diante disso, uma maior atenção deve ser dada à todas as etapas de produção da realocada, desde a forragem fresca no campo e, principalmente, durante o desabastecimento do silo e consequente tempo de exposição ao ar, etapa mais crítica do processo de realocação.

Os inoculantes bacterianos contendo cepas de bactérias homo e heterofermentativas (e.g. *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus buchneri*, respectivamente) são uma técnica comumente difundida entre os produtores durante a ensilagem. Os principais efeitos sobre a silagem estocada estão no incremento do perfil de fermentação, com redução mais drástica do

pH, e maior controle de microrganismos que desencadeiam o processo de deterioração, devido a maior produção dos ácidos lático e acético, durante a estocagem, respectivamente (Elferink et al., 2001). Dessa forma, esse aditivo pode diminuir as perdas fermentativas e aumentar a estabilidade das silagens em ambiente aeróbio, proporcionando melhor perfil dos nutrientes mesmo na silagem realocada, evitando a redução do consumo do alimento pelos animais.

O conhecimento sobre o consumo e o valor nutritivo dos alimentos é um fator que deve ser dado atenção na alimentação animal, visto que, o uso de alimentos de baixa qualidade irá refletir em menor desempenho animal. Em se tratando de pequenos ruminantes, estes são animais muito mais sensíveis a qualquer tipo de alteração no alimento fornecido, além de serem muito mais seletivos em comparação a outros animais. Atualmente, existem poucos estudos realizados com animais, principalmente pequenos ruminantes, para explicar os possíveis efeitos da silagem realocada na ingestão da forragem pelos animais. Com base no exposto, objetivou-se com esse estudo avaliar o efeito do uso de inoculante microbiano e da realocação de silagens de milho sobre a estabilidade aeróbia, digestibilidade e desempenho de cordeiros.

### **3.2 Material e Métodos**

Esse ensaio foi dividido em três ensaios experimentais e conduzido na Fazenda Escola de Igarapé-Açu (FEIGA) pertencente à Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), que está localizada a 01° 07' 44" de latitude sul, 47° 37' 12" de longitude oeste, situado a aproximadamente 33 m de altitude, no município de Igarapé Açu, no estado do Pará, Brasil, de acordo com as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), com número de protocolo 022/2016 (CEUA) e 23084. 006712/2016-21 (UFRA).

A lavoura de milho foi cultivada nos meses de fevereiro a abril de 2018 no campo experimental da FEIGA. Segundo a classificação de Köppen o clima da região é classificado como Am, clima tropical, caracterizado por temperatura média de 26,4 °C e pluviosidade média anual de 2.495 mm.

A semeadura do milho (K9105, RB9006, K9960 e 2B688) foi realizada em sistema de plantio direto sobre a palhada de plantas invasoras. A adubação na semeadura foi de 300 kg/ha do formulado 08-40-08 e a adubação de cobertura foi realizada quando as plantas estavam no estágio de seis folhas, ou seja, quarenta e três dias após a semeadura. Na ocasião foram aplicados 180 kg/ha de nitrogênio e 120 Kg/ha de potássio, com auxílio da distribuidora de sementes e fertilizantes, modelo SEMBRA – 600®.

As plantas de milho foram ensiladas apresentando teor de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, fibra em detergente neutro e carboidratos não fibrosos de 36,7; 98,0; 6,6; 1,5; 37,5 e 52,4, respectivamente. Após colhida, a massa de forragem foi pesada, homogeneizada ou não ao inoculante (*Lactobacillus buchneri* - DSM13573 ou *Lactobacillus plantarum* - DSM3676; DSM3677 + *Lactobacillus buchneri* - DSM13573) e compactada por meio de pisoteio nos respectivos silos trincheira com capacidade de uma tonelada e meia.

No preparo dos inoculantes, eles foram diluídos em água destilada, e aplicados uniformemente sobre a forragem dos respectivos tratamentos com auxílio de pulverizador, visando alcançar  $10^5$  UFC/g de forragem de cada microrganismo.

Após 90 dias da realização da ensilagem, os silos foram abertos e as silagens foram expostas ao ar durante a realocação por 24 horas, na forma de pilhas, em ambiente protegido e posteriormente realocadas em tambores de 210L. Em cada tambor (silo experimental) foi acondicionado em média 140 kg de massa de silagem até atingir a densidade de  $700 \text{ kg/m}^3$ .

### 3.2.1 Estabilidade aeróbia

O ensaio foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatro repetições, totalizando dezesseis unidades experimentais. Os fatores estudados foram: inoculante microbiano (sem inoculante microbiano, *Lactobacillus buchneri* - DSM13573 sozinho ou em combinação com *Lactobacillus plantarum* - DSM3676; DSM3677) e tempo de realocação (não realocadas e 24h de exposição ao ar antes da realocação).

Para essas avaliações, foram amostradas a planta inteira e as silagens nas aberturas dos silos e na realocação. As avaliações microbiológicas e o pH foram feitas com as silagens frescas enquanto as avaliações químicas foram feitas com as amostras após armazenamento em freezer em temperatura de  $16^\circ\text{C}$ .

Para avaliação microbiológica, as amostras foram processadas no Laboratório de Microbiologia da UFRA. Foi feita a contagem de leveduras, mofos e bactérias ácido lácticas (BAL), utilizando um extrato aquoso (1:10) com água peptonada (1g por litro de água), homogeneizado durante 4 minutos tipo Stomacher. Para a contagem de leveduras e mofos será utilizada a técnica de plaqueamento em superfície com o meio de cultura YGC Agar (Fluka, Sigma Aldrich Química Brasil LTDA), (TABACCO et al., 2009).

Após incubação em câmara de germinação a  $28^\circ\text{C}$  durante três e cinco dias para leveduras e mofos, respectivamente, foram contadas as colônias separadamente, com base nas suas características macromorfológicas. Na contagem de BAL foi usada a mesma técnica descrita

para leveduras e mofos, entretanto o meio de cultura utilizado se foi o MRS Agar, com incubação em câmara de germinação a 35°C por três dias.

Na análise do pH, 30 g de silagem fresca foram colocadas em um béquer com 270 mL de água destilada. Aguardou-se 3 minutos e após este período o material foi homogeneizado com um bastão de vidro e, posteriormente, foi realizada a leitura utilizando potenciômetro.

Para avaliação química, as amostras foram processadas no Laboratório de Nutrição Animal e Análise de Alimentos (LABNUTAN) da UFRA. Primeiramente, as amostras de silagem foram descongeladas e submetidas à pré-secagem em estufa de circulação forçada de ar a 55°C, e posteriormente moídas em moinho de faca tipo Willey, com peneira com crivo de 1 mm de diâmetro. Na determinação dos teores de matéria seca (MS) as amostras foram secas em estufa a 105°C por 16 horas ininterruptas (AOAC-967.03, 1990).

Os conteúdos de matéria mineral (MM) (AOAC Método Oficial 942.05) para quantificação da matéria orgânica (MO), extrato etéreo (EE) (AOAC Método Oficial 920.39), e proteína bruta (PB) (AOAC Método Oficial 984.13), foram realizados segundo metodologia descrita pela AOAC (1990). As análises da fibra em detergente neutro (FDN) foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Mertens (2002) utilizando-se alfa-amilase termoestável com ausência de sulfito de sódio e posteriormente foram corrigidas para cinzas e proteína. O nitrogênio amoniacal (AOAC Método Oficial no. 941.04) foi feito conforme a metodologia proposta pela AOAC (1990).

Após abertura dos silos, foram feitas duas avaliações de estabilidades, um para avaliar a silagem sozinha e outro para avaliar a dieta total. Para avaliar a estabilidade das silagens sozinhas, foram colocados 3 kg de silagem em baldes plásticos de 20 L. Para avaliar a estabilidade das dietas, foram colocados 2,5 kg de dieta em baldes plásticos de 15 L.

As avaliações de estabilidade aeróbia tiveram período de 7 dias. Essas amostras foram mantidas em ambiente coberto, onde foi monitorada a temperatura de cada amostra a cada 4 horas. Para isso, um termômetro de espeto digital, foi inserido na massa ensilada, em profundidade de 10 cm, durante as 168 horas, para tomada de temperatura seis vezes ao dia (8, 12, 16, 20, 0 e 4 horas). A temperatura ambiente foi medida com o auxílio de um termômetro localizado próximo aos baldes. A estabilidade aeróbia foi calculada com o tempo, em horas, para que as silagens, após a abertura do silo, apresentem temperatura 2°C mais elevada que a temperatura ambiente (KUNG JR. et al., 2001). O pH foi mensurado nas silagens em exposição aeróbia diariamente as 8 horas conforme metodologia descrita anteriormente.

Durante a avaliação de estabilidade aeróbia procedeu-se a avaliação sensorial das silagens diariamente, quanto aos aspectos: odor, a textura, coloração e a presença de fungos), para os

quais as silagens receberam pontuações e, a partir do somatório destas, as silagens foram então classificadas em boa a muito boa, satisfatória, regular e insatisfatória (HUSSBAUM et al., 2004).

Os ácidos orgânicos (lático, acético, propiônico e butírico) e os álcoois (etanol e 1,2-propanodiol) serão obtidos por meio de um extrato aquoso (1:10) com água destilada processadas em homogeneizador tipo Stomacher. Será utilizado 2 ml do extrato aquoso de cada amostra, o qual será centrifugado, filtrado e injetado em cromatógrafo de fase líquida de alta precisão (Shimadzu LC- 10Ai; Shimadzu Corp. Tokyo, Japão). Os ácidos serão detectados pela absorvância do UV (210nm), e os álcoois serão identificados usando o detector de índice de refração (RID; 10ASPD-10Ai). O aparelho será equipado com uma coluna de exclusão de íon (SUPELCO –SUPELCOGEL 8H-5cm-4,8mm) operado a 30° com um fluxo de corrida de 0,6ml/min com fase móvel água e ácido sulfúrico 0,005M.

### 3.2.2 Digestibilidade de cordeiros

Nesse ensaio foram usados vinte e quatro cordeiros da raça Santa Inês, com peso médio inicial de  $17,4 \pm 2,0$ kg dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e seis repetições. Os tratamentos consistiram em: silagens de milho sem inoculante não realocadas; silagens de milho sem inoculante realocadas após 24h de exposição aeróbia; silagens de milho com *L. buchneri* realocadas após 24h de exposição aeróbia; e silagens de milho com *L. plantarum* + *L. buchneri* realocadas após 24h de exposição aeróbia. Foram avaliados o consumo, digestibilidade aparente e o balanço de nitrogênio.

Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas de madeira com área de 0.79 m<sup>2</sup> (1.31 m x 0.60 m), com piso ripado coleta total de sobras, fezes e urina. As gaiolas estavam providas de bebedouro e comedouro para fornecimento de água e alimento, respectivamente. O período experimental foi de 14 dias de adaptação e 7 dias para coleta.

Os animais foram identificados individualmente por colar e alimentados duas vezes por dia, às 8 h e as 17 h, com dietas experimentais compostas por silagens e ração (Tabela 1), formuladas de forma a serem isoprotéicas, atendendo as exigências de nutrientes para cordeiros, segundo recomendações do NRC (2007). As dietas tinham proporção volumoso/concentrado de 60:40. A composição química das dietas pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 1 – Composição centesimal da dieta

Composição Centesimal	
Alimentos	%MS
Silagem de milho	60,00
Milho grão moído 8.51%	18,35
Soja farelo 45%	16,81
Óleo de soja	2,50
Calcário	1,04
Ureia	1,00
Sal mineral	0,30
Total	100,00

Tabela 2 – Composição química dos ingredientes das dietas

Item (%MS)	Concentrado	SISR	SIR	LBR	LBLPR
MS (%MN)	95,4	36,8	36,4	36,3	34,7
MO	98,0	97,5	97,9	97,8	97,6
MM	2,0	2,5	2,1	2,2	2,4
PB	12,1	7,2	6,6	6,9	7,4
EE	3,5	2,3	3,3	2,8	3,0
FDN	25,4	47,9	42,4	38,2	40,0
CNF	56,26	39,3	47,5	49,1	47,1

MS – Matéria seca; MO – Matéria orgânica; MM – Matéria mineral; PB – Proteína bruta; EE – Extrato etéreo; FDN – Fibra em detergente neutro; CNF – Carboidratos Não Fibrosos; SISR - silagens sem inoculante + sem realocação; SIR - silagens sem inoculante + realocadas; LBR - silagens com LB + realocadas; LBLPR - silagens com LBLP + realocadas.

A quantidade oferecida aos animais foi calculada diariamente, a partir do consumo do dia anterior, de modo que permita sobras de aproximadamente 10%. As fezes foram coletadas em coletores plásticos, pesadas diariamente e individualmente homogeneizadas para retirada de amostras referentes a 10% do peso total, e acondicionadas em embalagens plásticas devidamente identificadas.

A urina foi colhida em baldes plásticos com tela separadora, com intuito de evitar a mistura com as fezes. Para que não ocorra perda de compostos nitrogenados da urina por volatilização, foi colocada nos coletores diariamente 100mL de solução de ácido clorídrico a 10% (com o objetivo de deixar o pH da amostra abaixo de 3.0), amostrando-se 10% do volume total diário de urina produzida, formando amostras compostas de cada animal ao final do sétimo dia de coleta.

As amostras compostas das sobras, alimento fornecido, urina e fezes foram conservadas em freezer para posterior processamento e análises laboratoriais. O consumo foi calculado por meio da pesagem do alimento fornecido e das sobras, durante o período de coleta de dados. Foram determinados os consumos de MS, MO, PB, FDN, FDA, EE, CNF e nutrientes

digestíveis totais (NDT) e as digestibilidades da MS, MO, PB, FDN, FDA, EE, CHOT, CNF e o percentual de NDT (%NDT) após a determinação química das amostras de fornecido, sobras e fezes.

Para avaliação do balanço aparente de nitrogênio, expresso em g/animal/dia, foram determinados nas amostras de urina o teor de nitrogênio, e posteriormente foram calculados o nitrogênio retido (NR), o nitrogênio absorvido (NA) e o nitrogênio ingerido (NI), através das formulas:  $NR = NI - (N \text{ fezes} + N \text{ urina})$ ;  $NA = NI - N \text{ fezes}$ ;  $NI = N \text{ ofertado} - N \text{ sobras}$ .

### 3.2.3 Desempenho de cordeiros

Nesse ensaio foram utilizados 36 cordeiros, com peso corporal médio inicial de  $20,9 \pm 4$ kg, dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado. Antes do início do estudo, estipulou-se que os animais deveriam alcançar o de 31kg de PV durante o confinamento. O estudo teve duração de 60 dias, com 10 dias de adaptação as dietas e ao ambiente. Os tratamentos consistiram em: silagens de milho sem inoculante não realocadas; silagens de milho sem inoculante realocadas após 24h de exposição aeróbia; silagens de milho com *L. buchneri* realocadas após 24h de exposição aeróbia; e silagens de milho com *L. plantarum* + *L. buchneri* realocadas após 24h de exposição aeróbia. Foram avaliados o consumo de matéria seca e dos nutrientes, ganho de peso, conversão alimentar e comportamento ingestivo dos cordeiros.

Os animais foram alojados em baias individuais de madeira com piso ripado e área correspondente a  $1.48 \text{ m}^2$  ( $1.52 \text{ m} \times 0.97 \text{ m}$ ), providas de comedouros e bebedouros individuais para o fornecimento de ração e água a vontade. O galpão utilizado é coberto para proteção contra chuva e radiação solar direta. Além disso, possui aberturas laterais para perfeita circulação de ar, deixando o ambiente bem arejado e propiciando assim bem-estar aos animais. Antes do início do período experimental, foram observados os aspectos relativos as anormalidades zootécnicas e sanitárias para posterior controle de endo e ectoparasitos. No início do período experimental, os animais receberam ivermectina, na dosagem de  $0.5\text{mL}/25$  kg de peso vivo, via subcutânea como medida profilática para controle de verminose.

Os animais foram identificados individualmente por colar e alimentados duas vezes por dia, às 8 h e as 17 h, com dietas experimentais compostas por silagens e ração (Tabela 1), formuladas de forma a serem isoprotéicas, atendendo as exigências de nutrientes para cordeiros com ganho de peso de  $200\text{g}/\text{d}$ , segundo recomendações do NRC (2007). As dietas tinham proporção volumoso/concentrado de 60:40. A composição das dietas pode ser observada na Tabela 2.

O consumo de matéria seca foi determinado pela pesagem diária da quantidade do alimento fornecido e de sobras, sendo feito ajuste diário do fornecido de forma a permitir sobras de 10% do total ofertado. A amostragem foi realizada a cada 10 dias, as pesagens dos animais foram feitas no início, na metade e ao final do estudo, para avaliação do ganho de peso e conversão alimentar.

As avaliações comportamentais foram observadas durante três dias distintos ao longo de setenta dias (observações a cada vinte e três dias) de confinamento, somando um total de 72 horas de observações. No período da noite o local referente ao experimento foi iluminado através de luz artificial. Foram utilizados oito observadores, previamente treinados, em um revezamento a cada quatro horas, com quatro observadores por turno. Estas observações eram realizadas a cada cinco minutos, onde foram registrados os comportamentos de alimentação, ruminação e ócio dos animais (FISCHER, 1998).

As atividades foram divididas entre contínuas (ócio, ruminação e alimentação) e atividades de frequência (micção, defecação e ingestão de água), em cada dia de observação as análises foram divididas em 6 turnos de quatro horas cada: 08:00h às 11:55h, 12:00h às 15:55h, 16:00h às 19:55h, 20:00h às 23:55h, 00:00h às 03:55h e 04:00h às 07:55h. O quantitativo de mastigações meréricas e os tempos de ruminação em segundos.bolo<sup>-1</sup> foram avaliados em três períodos de oito horas durante o dia: 08:00h às 15:55h, 16:00h às 23:55h e 00:00h às 07:55h, utilizou-se cronômetro digital para registros dessas atividades.

Foram calculados o tempo total de alimentação (TAL), tempo total de ruminação (TRU) e o tempo total em ócio (TOC) de cada animal em vinte e quatro horas, por meio da soma das observações, em minutos, de cada atividade realizada pelos cordeiros durante a coleta dos dados.

Por meio das observações de mastigações e do tempo de ruminação, foram determinados de acordo com Burguer et al. (2000), o tempo de mastigação total (TMT) em horas.dia<sup>-1</sup>, o número de bolos ruminais (NBR) em números.dia<sup>-1</sup>, e o número de mastigações meréricas (NMM) em número.dia<sup>-1</sup>, de acordo com equações:  $TMT = TAL \text{ (h.dia}^{-1}\text{)} + TRU \text{ (h.dia}^{-1}\text{)}$ ;  $NBR = TRU / TRB$ ;  $NMM = TRB \times NMM \text{ (número.bolo}^{-1}\text{)}$ .

Também foi determinada a eficiência de alimentação da matéria seca (EAL) em g MS.hora<sup>-1</sup>, a eficiência de alimentação da fibra em detergente neutro (EAL) em g FDN.hora<sup>-1</sup>, a eficiência de ruminação da matéria seca (ERU) em g MS.hora<sup>-1</sup>, a eficiência de ruminação da fibra em detergente neutro (ERU), em g FDN.hora<sup>-1</sup>, o consumo de matéria seca (CMS), em g.dia<sup>-1</sup>, e o consumo a fibra em detergente neutro (CFDN), em g.dia<sup>-1</sup>, conforme equações: EAL

= CMS ou CFDN / TAL; ERU = CMS ou CFDN / TRU; CMS = alimento fornecido (g MS) – sobras (g MS); CFDN = alimento fornecido (g FDN) – sobras (g FDN).

### 3.2.4 Análise estatística

Após tabulação dos dados, serão testadas as pressuposições de normalidade dos erros e homogeneidade de variância pelos testes de Cramer-von Mises e Brown e Forsythe's, respectivamente. Posteriormente, os resultados obtidos serão submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa SAS 9.4 (Statistical Analysis System, 2013) através do procedimento PROC MIXED. As médias serão comparadas por meio do teste “Tukey” em nível de 5% de probabilidade.

O modelo estatístico utilizado nas variáveis avaliadas na estabilidade aeróbia, na digestibilidade e desempenho foi:

$$Y_{ij} = \mu + IMir + ei$$

Onde  $Y_{ij}$  é o valor de cada observação;  $\mu$ , a média geral;  $IMir$ , o efeito fixo do inoculante microbiano e realocação;  $ei$ , o erro padrão.

O modelo estatístico utilizado na avaliação do pH das silagens na estabilidade aeróbia foi:

$$Y_{ij} = \mu + IMir + Te + eirt$$

Onde  $Y_{ij}$  é o valor de cada observação;  $\mu$ , a média geral;  $IMir$ , o efeito fixo do inoculante microbiano e realocação;  $Te$ , o efeito fixo de tempo;  $ei$ , o erro padrão.

## 3.3 Resultados

### *Estabilidade aeróbia*

Observou-se que as silagens inoculadas realocadas ou não (SIR, LBR e LBLPR) apresentaram menor ( $P < 0,05$ ) contagem de leveduras e mofos que a SISR (Tabela 3). As silagens SISR e LBLPR apresentaram maior contagem de Bals que as silagens SIR e LBR. As silagens LBR e LBLPR tiveram maior ( $P < 0,05$ ) produção de N-NH<sub>3</sub> durante o processo fermentativo que as silagens SISR e SIR. As silagens SISR apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) teor

de FDN e menor teor que CNF que as demais silagens. No entanto, não observou-se ( $P>0,05$ ) efeito do inoculante microbiano e da realocação no pH, teores de MS, MO, MM, PB e EE das silagens de milho.

Tabela 3 – Contagem microbiológica, composição química e estabilidade aeróbia de silagens de milho sem ou com inoculação microbiana realocadas, e estabilidade aeróbia de dietas contendo essas silagens

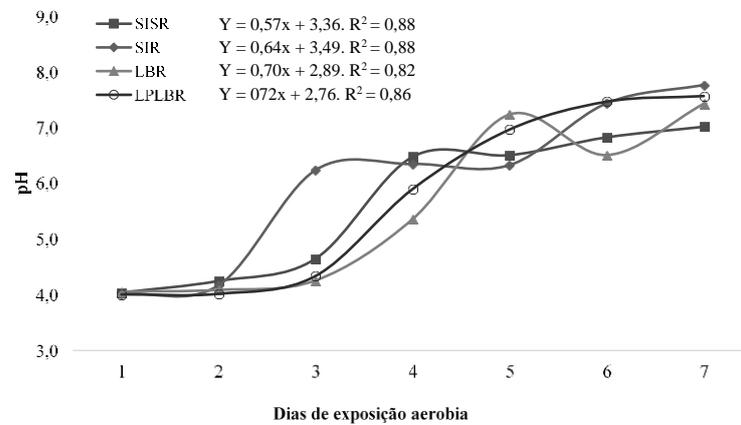
Item	Planta inteira	SISR	SIR	LBR	LBLPR	SEM	<i>P_valor</i>
Lev ufc/g	-	4,9 <sup>a</sup>	1,0 <sup>c</sup>	2,7 <sup>b</sup>	2,5 <sup>b</sup>	0,44	<0,001
Mofos ufc/g	-	7,1 <sup>a</sup>	2,6 <sup>b</sup>	2,4 <sup>b</sup>	2,8 <sup>b</sup>	0,33	<0,001
Bals ufc/g	-	8,1 <sup>a</sup>	7,0 <sup>c</sup>	7,7 <sup>b</sup>	8,0 <sup>a</sup>	0,06	<0,001
pH	-	4,0	4,0	4,1	4,0	0,02	0,174
N-NH <sub>3</sub> %NT	-	1,16 <sup>b</sup>	1,21 <sup>b</sup>	1,68 <sup>a</sup>	1,66 <sup>a</sup>	0,08	0,002
MS (%MN)	36,7	36,8	36,4	36,3	34,7	0,94	0,441
MO (%MS)	98,0	97,5	97,9	97,8	97,6	0,20	0,438
MM (%MS)	2,0	2,5	2,1	2,2	2,4	0,20	0,438
PB (%MS)	6,6	7,2	6,6	6,9	7,4	0,21	0,067
EE (%MS)	1,5	2,3	3,3	2,8	3,0	0,18	0,066
FDN (%MS)	37,5	47,9 <sup>a</sup>	42,4 <sup>b</sup>	38,2 <sup>b</sup>	40,0 <sup>b</sup>	1,39	0,005
CNF(%MS)	52,42	39,3 <sup>b</sup>	47,5 <sup>a</sup>	49,1 <sup>a</sup>	47,1 <sup>a</sup>	1,39	0,047
Estabilidade aeróbia (h)	-	10,5 <sup>c</sup>	12,0 <sup>c</sup>	25,5 <sup>b</sup>	90,0 <sup>a</sup>	4,75	<0,001
Estabilidade aeróbia das dietas (h)	-	9,8 <sup>b</sup>	19,5 <sup>a</sup>	22,5 <sup>a</sup>	27,0 <sup>a</sup>	1,77	<0,001

Lev – Leveduras; Bals – Bactérias ácido lácticas; N-NH<sub>3</sub> – Nitrogênio amoniacal; MS – Matéria seca; MO – Matéria orgânica; MM – Matéria mineral; PB – Proteína bruta; EE – Extrato etéreo; FDN – Fibra em detergente neutro; CNF – Carboidratos não fibrosos; SISR - silagens sem inoculante + sem realocação; SIR - silagens sem inoculante + realocadas; LBR - silagens com LB + realocadas; LBLPR - silagens com LBLP + realocadas.

Observou-se que as silagens de milho SISR tiveram estabilidade aeróbia semelhante ( $P>0,05$ ) as silagens SIR (Tabela 3). Já as silagens LBR e LBLPR foram mais estáveis ( $P<0,05$ ) em ambiente aeróbio que as silagens SISR e SIR. As dietas contendo SIR, LBR e LBLPR foram igualmente ( $P>0,05$ ) estáveis em ambiente aeróbio. Já as dietas contendo silagens SISR perderam a estabilidade aeróbia em menos de 12h (Tabela 3).

Após quatro dias de exposição aeróbia, as silagens SIR apresentaram pH 6,05 (Figura 1) e as silagens SISR, LBLPR e LBR tiveram pH 5,64, 5,69 e 5,64, respectivamente, apresentando pH acima de 6,0 após cinco dias de exposição aeróbia.

Figura 1 – pH de silagens de milho sem ou com inoculante microbiano realocadas



SISR - silagens sem inoculante + sem realocação; SIR - silagens sem inoculante + realocadas; LBR - silagens com LB + realocadas; LBLPR - silagens com LBLP + realocadas.

Com base na avaliação sensorial das silagens, observou-se que as silagens SISR apresentaram características visuais de deterioração em 24h. As silagens SIR apresentaram característica regular enquanto as silagens LBR apresentaram característica ruim em 48h de exposição aeróbia. Já as silagens LBLPR apresentaram característica ruim em 168h (Tabela 6).

Tabela 4 – Avaliação sensorial de silagens de milho sem ou com inoculante microbiano realocadas em 7 dias de exposição aeróbia

Silagem	Dias de avaliação						
	1	2	3	4	5	6	7
SISR	B	Reg	Reg	R	MR	MR	MR
SIR	B	B	B	Reg	Reg	Reg	R
LBR	MB	MB	B	R	R	MR	MR
LBLPR	MB	MB	B	B	B	B	R

MB – Muito bom; B – Bom; Reg – Regular; R – Ruim; MR – Muito ruim; SISR - silagens sem inoculante + sem realocação; SIR - silagens sem inoculante + realocadas; LBR - silagens com LB + realocadas; LBLPR - silagens com LBLP + realocadas.

### Digestibilidade de cordeiros

Observou-se que a inoculação microbiana e a realocação das silagens de milho não afetaram ( $P > 0,05$ ) o consumo e a digestibilidade aparente da matéria seca e nutrientes das dietas contendo silagens de milho (Tabela 5 e 6). Os animais apresentaram consumo médio de MS, PB, FDN e CNF de 777,33; 53,22; 268,04 e 406,03 g/kg de MS.

Tabela 5 – Consumo de matéria seca e nutrientes de dietas contendo silagens de milho sem ou com inoculante microbiano realocadas

Item (g/d)	SISR	SIR	LBR	LBLPR	SEM	<i>P_valor</i>
MS	799,1	777,4	762,7	770,1	65,29	0,979
MO	782,0	759,1	734,4	752,3	63,79	0,978
PB	135,2	128,6	127,8	130,6	1,77	0,928
EE	21,5	19,8	22,9	19,9	1,79	0,549
FDN	271,4	295,2	252,1	253,4	23,78	0,580
CNF	424,0	376,4	402,3	421,4	34,98	0,775
NDT	612,2	567,7	578,2	646,7	45,72	0,636

MS – Matéria seca; MO – Matéria orgânica; MM – Matéria mineral; PB – Proteína bruta; EE – Extrato etéreo; FDN – Fibra em detergente neutro; CNF – Carboidratos não fibrosos; SISR - silagens sem inoculante + sem realocação; SIR - silagens sem inoculante + realocadas; LBR - silagens com LB + realocadas; LBLPR - silagens com LBLP + realocadas.

Observou-se digestibilidade aparente da MS, PB, FDN e NDT de 72,78; 53,22; 60,61 e 48,84%.

Tabela 6 – Digestibilidade aparente da matéria seca e nutrientes digestíveis totais de dietas contendo silagens de milho sem ou com inoculante microbiano realocadas

Item (%MS)	SISR	SIR	LBR	LBLPR	SEM	<i>P_valor</i>
MS (%MN)	73,25	70,58	73,57	73,67	0,88	0,084
MO	74,54	71,95	74,85	73,47	1,24	0,394
PB	74,83	74,79	76,16	75,11	1,81	0,688
EE	79,10	75,18	73,90	62,67	5,55	0,205
FDN	61,17	60,16	60,58	60,51	2,88	0,996
CNF	86,90	84,57	87,17	85,28	0,90	0,164
NDT	79,7	63,9	79,8	88,8	1,19	0,098

MS – Matéria seca; MO – Matéria orgânica; MM – Matéria mineral; PB – Proteína bruta; EE – Extrato etéreo; FDN – Fibra em detergente neutro; CNF – Carboidratos não fibrosos; SISR - silagens sem inoculante + sem realocação; SIR - silagens sem inoculante + realocadas; LBR - silagens com LB + realocadas; LBLPR - silagens com LBLP + realocadas.

Observou-se que os animais apresentaram em média nitrogênio ingerido, retido e absorvido de 11,10; 7,63 e 8,67 g/d, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7 – Balanço de nitrogênio de dietas contendo silagens de milho sem ou com inoculante microbiano realocadas

Item (g/d)	SISR	SIR	LBR	LBLPR	SEM	<i>P_valor</i>
Ningerido	11,68	10,83	10,88	11,01	0,95	0,928
Nretido	8,05	7,79	7,39	7,28	0,82	0,898
Nabsorvido	9,07	8,56	8,46	8,57	0,92	0,963

Ningerido - nitrogênio ingerido; Nretido – nitrogênio retido; Nabsorvido - Nitrogênio absorvido; SISR - silagens sem inoculante + sem realocação; SIR - silagens sem inoculante + realocadas; LBR - silagens com LB + realocadas; LBLPR - silagens com LBLP + realocadas.

### Desempenho de cordeiros

Observou-se maior CFDN nas dietas contendo silagens SISR que nas dietas contendo SIR, LBR e LBLPR (Tabela 8). No entanto, não observou-se efeito de inoculação microbiana e realocação de silagens de milho no CMS, CMO, CPB, CEE, CFDN, CCNF, GPD, CA e EA das dietas contendo silagens de milho.

Tabela 8 – Desempenho de cordeiros alimentados com silagens de milho realocadas

Item	SISR	SIR	LBR	LBLPR	SEM	<i>P_valor</i>
CMS (g/d)	864,1	891,7	903,3	821,6	43,48	0,561
CMO (g/d)	849,2	882,2	874,9	795,3	40,37	0,491
CMM (g/d)	150,8	117,8	125,1	204,7b	40,37	0,491
CPB (g/d)	147,5	149,7	150,4	141,8	8,43	0,858
CEE (g/d)	45,1	45,2	49,9	43,7	2,25	0,246
CFDN (g/d)	253,5 <sup>bc</sup>	306,2 <sup>ab</sup>	247,5 <sup>c</sup>	219,5 <sup>c</sup>	14,01	0,002
CCNF (g/d)	411,4	381,9	427,4	391,7	20,49	0,415
Peso inicial (kg)	20,9	20,9	20,9	20,9	1,21	0,999
Peso final (kg)	31,8	31,6	31,3	30,6	1,80	0,912
GPD (g/d)	218,0	215,5	209,0	193,8	0,01	0,444
CA (kg)	4,0	4,2	4,4	4,3	0,22	0,656
EA (kg)	26,0	24,2	23,3	23,6	1,63	0,723

CMS – Consumo de matéria seca; CMO – Consumo de matéria orgânica; CMM – Consumo de matéria mineral; CPB – Consumo de Proteína bruta; CEE – Consumo de extrato etéreo; CFDN – Consumo de fibra em detergente neutro; CCNF – Consumo de carboidratos não fibrosos; GPD – Ganho de peso diário; CA – Conversão alimentar; EA – Eficiência alimentar; SISR - silagens sem inoculante + sem realocação; SIR - silagens sem inoculante + realocadas; LBR - silagens com LB + realocadas; LBLPR - silagens com LBLP + realocadas.

As dietas contendo silagens SISR, SIT, LBR e LBLPR não afetaram ( $P>0,05$ ) a maioria das variáveis avaliadas no comportamento ingestivo dos cordeiros. O tempo de alimentação, ruminação e ócio médios foram de 3,86; 8,18 e 11,96 h.dia<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 9). O CMS médio foi de 881,51 g/kg.

O TMT médio foi de 12,04 h.dia<sup>-1</sup>, o TRB foi de 41,95 seg.bolo<sup>-1</sup> e NMM foi de 49.051 n°.bolo<sup>-1</sup>. Observou-se que o CFDN foi maior ( $P<0,05$ ) nas dietas contendo silagens SISR do que nas demais dietas. A EAL de MS e ERU de MS foram em média de 235,05 e 109,14 g MS.h<sup>-1</sup>.

Tabela 9 – Atividades contínuas, consumos, número de mastigações e eficiência de alimentação e ruminação de cordeiros alimentados com dietas contendo silagens de milho inoculadas ou não, realocadas

Item	SISR	SIR	LBR	LBLPR	SEM	<i>P_valor</i>
TAL (h.dia <sup>-1</sup> )	4,15	3,70	4,01	3,56	0,23	0,268
TRU (h.dia <sup>-1</sup> )	8,56	7,85	8,02	8,27	0,32	0,441

TOC (h.dia <sup>-1</sup> )	11,28	12,44	11,96	12,16	0,34	0,129
TMT (h.dia <sup>-1</sup> )	12,72	11,58	12,03	11,84	0,34	0,129
NBR (n°.dia <sup>-1</sup> )	722,63	674,45	673,63	758,41	36,09	0,296
TRB (seg.bolo <sup>-1</sup> )	42,88	42,07	43,32	39,53	1,12	0,102
NMM (n°.bolo <sup>-1</sup> )	65,19	73,27	72,98	68,38	2,06	0,051
NMM (n°.dia <sup>-1</sup> )	46.699	49.318	48.610	51.578	1,96	0,383
CMS (g.dia <sup>-1</sup> )	872,74	882,09	917,45	853,76	41,18	0,744
CFDN (g.dia <sup>-1</sup> )	328,67 <sup>a</sup>	254,71 <sup>b</sup>	289,84 <sup>b</sup>	281,06 <sup>b</sup>	13,64	0,007
EAL (g MS.h <sup>-1</sup> )	213,85	251,27	232,32	242,73	18,67	0,534
EAL (g FDN.h <sup>-1</sup> )	80,52	72,45	73,33	79,86	5,75	0,657
ERU (g MS.h <sup>-1</sup> )	103,00	113,47	115,72	104,40	6,78	0,459
ERU (g FDN.h <sup>-1</sup> )	38,77	32,75	36,52	34,40	2,22	0,267

TAL – tempo total de alimentação; TRU – tempo total de ruminação; TOC – tempo total em ócio; TMT – tempo de mastigação total; NBR – número de bolos ruminais; TRB – tempo de ruminação por bolo; NMM – número de mastigações meréricas; CMS – consumo de matéria seca; CFDN – consumo de fibra em detergente neutro; EAL – eficiência de alimentação; ERU – eficiência de ruminação; SISR - silagens sem inoculante + sem realocação; SIR - silagens sem inoculante + realocadas; LBR - silagens com LB + realocadas; LBLPR - silagens com LBLP + realocadas.

Não houve efeito de inoculação microbiana e realocação ( $P>0,05$ ) de silagens de milho sobre as atividades pontuais dos cordeiros (Tabela 10). As médias de micção, defecação e ingestão de água foram de 8,70; 6,06 e 6,56 vezes ao dia.

Tabela 10 – Atividades pontuais de cordeiros alimentados com silagens de milho inoculadas ou não, realocadas ou não, após 24 horas de exposição ao ar

Item (n°.d <sup>-1</sup> )	SISR	SIR	LBR	LBLPR	SEM	<i>P_valor</i>
Micção	9,54	10,30	7,54	7,42	1,46	0,418
Defecação	6,32	6,13	5,83	5,96	0,96	0,981
Ingestão de água	7,04	7,30	4,60	7,30	1,02	0,403

SISR - silagens sem inoculante + sem realocação; SIR - silagens sem inoculante + realocadas; LBR - silagens com LB + realocadas; LBLPR - silagens com LBLP + realocadas.

### 3.4 Discussão

As silagens de milho deste estudo apresentaram contagem de bactérias ácido lácticas (Bals), valores de pH e N-NH<sub>3</sub> dentro do indicado como bom processo fermentativo no silo (KUNG JR. et al., 2018).

Observou-se que as silagens sem inoculante e sem realocação (SISR) tiveram maior contagem de leveduras e mofos em relação as silagens realocadas sem ou com inoculante microbiano (SIR, LBR e LBLPR). Provavelmente, esses microrganismos encontraram condições favoráveis para se desenvolver, pois conseguem se proliferar em meio com pH baixo, e utilizaram parte dos carboidratos solúveis da silagem para crescimento, resultando em menor teor de CNF e maior teor de FDN nessas silagens em relação as demais (PAHLOW et al., 2003).

Após o contato com o oxigênio do ar, leveduras aeróbias tornam-se metabolicamente ativas e consomem o ácido láctico presente na massa, ocasionando o aumento do pH das silagens e oportunizando o desenvolvimento de outros microrganismos deterioradores (MCDONALD, 1991). Nesse trabalho a alta contagem de leveduras e mofos nas silagens SISR provavelmente acelerou o processo de deterioração ocasionando aumento do pH e alterações negativas nas características sensoriais dessas silagens antes das demais.

A alta contagem de leveduras e mofos nas silagens SISR também pode explicar, o fato das dietas contendo silagens SISR terem perdido a estabilidade aeróbia em menos de 12h, primeiro que as demais. Possivelmente, esses microrganismos utilizaram os substratos contidos na dieta, acelerando o processo de deterioração. Além disso, as dietas contendo silagens de milho realocadas podem ter sido mais estáveis, porque silagens realocadas apresentam maior tempo de estabilidade aeróbia (MICHEL et al., 2016).

Segundo Chen e Weinberg (2014), quando as silagens são adequadamente preservadas no período de estocagem, a duração do processo de realocação tem pouco efeito sobre a estabilidade aeróbia. Nesse estudo, observou-se que as silagens LBR e LBLPR foram mais estáveis em ambiente aeróbio que as silagens SISR e SIR, indicando que o uso de inoculante microbiano contendo *L. Buchneri* melhorou as características fermentativas das silagens durante a estocagem, e conseqüentemente a estabilidade aeróbia das silagens de milho realocadas.

A silagem de milho é particularmente susceptível à deterioração aeróbia (WEINBERG et al., 2011). O uso de inoculante microbiano com *L. Buchneri* no processo de ensilagem tem como objetivo aumentar a estabilidade aeróbia das silagens. Esses inoculantes aumentam a produção de ácido acético de ação antifúngica, e por isso inibe o desenvolvimento de leveduras e mofos (MUCK et al., 2018).

Contudo as silagens LBLPR ficaram estáveis por um tempo maior que as demais, em torno de 90h. Possivelmente, a quantidade de ácido acético produzido nas silagens LBR foi inferior ao produzido nas silagens LBLPR. Além disso, a presença de *L. Plantarum* nas silagens LBLPR pode ter proporcionado maior produção de ácido láctico nessas silagens, aumentando a

quantidade desse substrato disponível as bactérias *L. Buchneri*, que fazem a degradação anaeróbia do ácido láctico para o ácido acético e 1,2-propanodiol, tornando as silagens LBLPR mais estáveis (KUNG; RANJIT, 2001; FILYA, 2003; PAHLOW et al., 2003).

Nesse estudo, as silagens SIR apresentaram maior teor de FDN que as demais. No entanto, as diferenças observadas não foram suficientes para causar efeito biológico nos cordeiros, dessa forma não houve efeito do inoculante microbiano e da realocação no consumo e a digestibilidade aparente da MS e dos nutrientes, assim como o desempenho e o comportamento ingestivo dos cordeiros.

Os resultados observados nos ensaios com os animais mostraram pouco efeito da inoculação microbiana e realocação. Sabe-se que tanto o consumo e a digestibilidade aparente da MS e dos nutrientes, bem como o desempenho e comportamento ingestivo dos animais dependem das estruturas físicas e químicas dos alimentos que compõe a dieta. Além disso, o processo de realocação pode alterar negativamente essas características, e conseqüentemente reduzir o consumo dos animais (GERLACH et al. 2013, GERLACH et al., 2014).

As atividades comportamentais dos cordeiros ao longo do dia como tempos despendidos com alimentação, ruminação e ócio, também não foram afetadas. Neste estudo, observou-se de modo geral que os tempos despendidos em alimentação, ruminação e ócio, durante 24 horas, foram próximos aos encontrados por Ribeiro et al. (2011) que verificaram  $TAL \cong 4$ ,  $TRU \cong 8$  e  $TOC \cong 12$  horas.

De acordo com Vieira et al. (2011), as atividades de frequência, principalmente de defecação e micção em cordeiros acontecem quase que simultaneamente. A ingestão de água pelo animal se dá conforme a consumo da dieta, onde dietas com maiores teores de MS podem fazer com que o animal consuma água de maneira mais efetiva em comparação a dietas com menor teor matéria seca. Observou-se neste estudo que as atividades de frequência (ingestão de água, micção e defecação), não apresentaram efeito, comprovando a ausência de diferença efetiva entre os teores de matéria seca nos entre as dietas.

### **3.5 Conclusão**

Silagens de milho realocadas são mais estáveis do que as silagens não realocadas. A inoculação microbiana com *L. Buchneri* sozinha ou em combinação com *L. Plantarum* pode melhorar a estabilidade aeróbia de silagens de milho realocadas após 24h de exposição aeróbia. Dietas contendo silagens de milho realocadas são mais estáveis que dietas contendo silagens milho não realocadas. Dietas contendo silagens de milho realocadas até 24h de exposição ao ar

sem ou não inoculante microbiano, não afetam a digestibilidade e o desempenho de cordeiros. Portanto, o produtor rural pode utilizar silagens de milho realocadas independente do uso de inoculante microbiano, desde que a realocação do material seja feita até 24h.

### 3.6 Referências

AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. **AOAC International**, Arlington, VA.

CHEN, Y.; WEINBERG, Z. G. The effect of relocation of whole-crop wheat and corn silages on their quality. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 1, p. 406–410, 2014.

DOS ANJOS, G. V. S. et al. Effect of re-ensiling on the quality of sorghum silage. *Journal of Dairy Science*, p. 1–8, 2018.

ELFERINK, S.J.W.H.O, et al. Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1, 2-Propanediol by *Lactobacillus buchneri* Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 125–132, 2001.

FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of Applied Microbiology**, 2003.

FISCHER, V. et al. Efeitos da pressão de pastejo sobre o padrão neotemeral do comportamento ingestivo de cordeiros em pastagens. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 27, n. 1, p.164–170, 1998.

GERLACH, K. et al. Changes in maize silage fermentation products during aerobic deterioration and effects on dry matter intake by goats. **Agric. Food Sci.** v. 22, p. 168–181, 2013.

GERLACH, K. et al. Aerobic exposure of grass silages and its impact on dry matter intake and preference by goats. **Small Ruminant Research**, v. 117, n. 2–3, p. 131–141, 2014.

HUSSBAUM, A. H. et al. Grobfutterbewertung: Teil A – DLG-Schlüssel zur Bewertung von Grünfütter, Silage und Heu mit Hilfe der Sinnenprüfung. DLG Information 1/2004.

KUNG, L. et al. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.4020–4033, 2018.

KUNG, L. JR et al. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1149–1155, 2001.

McDonald, P. et al. The biochemistry of silage. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, UK, 1991.

MICHEL, P. H.F. et al. Re-ensiling and inoculant application with *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium acidipropionici* on sorghum silages. **Grass and Forage Science**, v.72, n.3, p.432-440, 2016.

MUCK, R.E. et al. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 3980–4000, 2018.

NRC - National Research Council. Nutrient requirements of small ruminants. National Academy of Sciences, Washington, DC, 362pp.

PAHLOW, G. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. Silage science and technology. 1.ed. Madison: American Society of Agronomy, p.31-94, 2003.

RIBEIRO E. L. A. et al. Desempenho, comportamento ingestivo e características de carcaça de cordeiros confinados submetidos a diferentes frequências de alimentação. **R. Bras. Zootecv.**, v. 40, n. 852-898, 2011.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM – SAS. 2013. SAS/STAT 9.4 Users' Guide. SAS Institute Inc, Cary, NY.

TABACCO, E. et al. Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by different lactic acid bacteria inocula. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 3, p. 1409–1419, 2011.

VIEIRA M. M. M. et al. Comportamento ingestivo de cordeiros alimentados com rações contendo quatro níveis de inclusão do farelo de mamona. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 58, n.4, p. 444-451, jul/ago, 2011.

WEINBERG, Z.G. et al. Ensiling fermentation products and aerobic stability of corn and sorghum silages. **Grassland science**, Tochigi, v. 57, p. 46-50, 2011.

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos mostraram que silagens de milho tratadas com inoculante microbiano contendo as cepas *L. plantarum* + *L. buchneri*, *L. plantarum* + *Propionibacterium acidipropionici* ou *Lactobacillus buchneri* apresentam melhor composição química e características fermentativas do que silagens de milho não tratadas.

O tempo de exposição ao ar afeta as características fermentativas de silagens de milho. Silagens tratadas com *L. buchneri* apresentam melhor controle no crescimento de leveduras durante 60h de exposição ao ar. Não é interessante inocular silagens que serão realocadas com inoculante microbiano contendo cepas de *L. plantarum* + *Propionibacterium acidipropionici*.

Silagens de milho realocadas são mais estáveis do que as silagens não realocadas. A inoculação microbiana com *L. Buchneri* sozinha ou em combinação com *L. Plantarum* pode

melhorar a estabilidade aeróbia de silagens de milho realocadas após 24h de exposição aeróbia. Dietas contendo silagens de milho realocadas são mais estáveis que dietas contendo silagens milho não realocadas. Dietas contendo silagens de milho realocadas até 24h de exposição ao ar sem ou não inoculante microbiano, não afetam a digestibilidade e o desempenho de cordeiros.

Portanto, o uso de silagens de milho realocadas na alimentação de ruminantes é interessante para o produtor desde que a realocação do material seja feita rapidamente. A silagem pode ficar exposta ao oxigênio por 24h sem que o crescimento microbiano cause alterações drásticas na qualidade desse alimento. Contudo, se a realocação for durar mais de 24h recomenda-se o uso de inoculante microbiano contendo cepas de *L. Buchneri* para aumentar o tempo de estabilidade aeróbia da silagem realocada.