



LARA SOUSA RESENDE

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE INOCULANTES SOBRE A
ESTABILIDADE AERÓBIA DA SILAGEM DE GRÃOS
ÚMIDOS DE MILHO**

**LAVRAS – MG
2023**

LARA SOUSA RESENDE

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE INOCULANTES SOBRE A ESTABILIDADE
AERÓBIA DA SILAGEM DE GRÃOS ÚMIDOS DE MILHO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte das
exigências do Curso de Zootecnia, para a obtenção
do título de Bacharel.

Prof. Dr. Thiago Fernandes Bernardes
Orientador

**LAVRAS – MG
2023**

LARA SOUSA RESENDE

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE INOCULANTES SOBRE A ESTABILIDADE
AERÓBIA DA SILAGEM DE GRÃOS ÚMIDOS DE MILHO**

**EFFECT OF THE APPLICATION OF INOCULANTS ON THE AEROBIC
STABILITY OF CORN WET GRAIN SILAGE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte das
exigências do Curso de Zootecnia, para a obtenção
do título de Bacharel.

APROVADA em 24 de julho de 2023

Dr. Prof. Thiago Fernandes Bernardes

Msc. Natália Nunes de Melo

Msc. Viviane Camila de Souza

UFLA

UFLA

UFLA

Prof. Dr. Thiago Fernandes Bernardes
Orientador

**LAVRAS – MG
2023**

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus que me deu força para concluir essa jornada.

À minha família, minha base, especialmente meus pais, Darly e Eustáquio, e minha irmã Laís, por sempre me apoiarem e me incentivarem ao longo dessa jornada.

Aos amigos que o curso me proporcionou, Maria Eduarda, Giovanna, Roberta, Hiago, Pedro e Ana Flávia, pelo companheirismo e apoio durante todos os anos de graduação.

Ao NEFOR e ao Grupo de Conservação de Alimentos, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional e pelas boas amizades.

Ao meu orientador Prof. Thiago Bernardes, pela oportunidade e confiança para realizar esse trabalho e por todo o aprendizado.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma fizeram parte dessa etapa da minha formação.

RESUMO

Objetivou-se avaliar a efetividade de um inoculante bacteriano em controlar o processo de deterioração e auxiliar na estabilidade aeróbia de silagens de grãos úmidos de milho. Os tratamentos consistiram em: silagem de grãos úmidos de milho (Controle); silagem com a adição de *Lentilactobacillus buchneri* NCIM 40788 e *L. hilgardii* CNCM I-4785 ($6,0 \times 10^5$ UFC/g de forragem para ambas as bactérias), *Pediococcus pentosaceus* NCIMB 12455, Xylanase de *Trichoderma longibrachiatum* MUCL 39203, Beta-glucanase de *Aspergillus niger* MUCL 39199 (Platinum); silagem com *L. buchneri* NCIMB 40788 e *L. hilgardii* CNCM I-4785 ($6,0 \times 10^5$ UFC/g para ambas as bactérias) (Platinum I); silagem com a adição de *L. buchneri* NCIMB 40788 *L. hilgardii* CNCM I-4785 ($4,0 \times 10^5$ UFC/g para ambas as bactérias) e *Pediococcus pentosaceus* NCIMB 12455 (Platinum II); silagem com a adição de *L. buchneri* NCIMB 40788 ($6,0 \times 10^5$ UFC /g) (Fresh). As silagens confeccionadas permaneceram estocadas durante os tempos de 30, 60 e 120 dias. O material foi compactado, em média 5,17 kg de forragem em silos experimentais (5L), alcançando uma densidade média de 953,43 Kg m³, aproximadamente. Foram avaliadas as variáveis matéria seca (MS), pH, contagem microbiana, perdas por gases (%). As silagens foram submetidas a um teste de deterioração e estabilidade aeróbia por 10 dias. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 3, com 5 repetições por tratamento, totalizando 75 unidades experimentais. A análise dos dados foi feita utilizando o PROC MIXED do programa estatístico SAS. As médias dos tratamentos foram estimadas pelo “LSMEANS” e a comparação foi realizada pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os teores de MS e o pH foram significativos para o efeito tempo de estocagem (ambos com $P < 0,0001$). A adição de inoculantes no momento da ensilagem não afetou o teor de MS das silagens ($P = 0,3883$). As perdas por gases foram significativas para o tempo de estocagem ($P < 0,0001$) e para a inoculação ($P = 0,0162$). A contagem de BAL foi significativa somente entre tempos de estocagem ($P < 0,0001$), enquanto que as contagens de fungos e leveduras não diferiram entre as silagens. Após o teste de estabilidade aeróbia (EA), o pH foi significativo para a inoculação ($P < 0,0001$) e para o tempo de estocagem ($P = 0,0125$); as perdas por gases apresentaram diferenças significativas entre os inoculantes ($P < 0,0001$); a estabilidade aeróbia foi significativa entre os tempos de estocagem e entre os tratamentos (ambos com $P < 0,0001$); a deterioração da silagem foi significativa para o efeito de inoculação ($P < 0,0001$) e para o tempo de estocagem ($P = 0,0003$). O uso de inoculantes com diferentes cepas à silagem de grãos úmidos de milho possibilita menores perdas por gases, menor deterioração, assim como maior estabilidade aeróbia da silagem. A inoculação combinada de *L. hilgardii* e *L. buchneri* é mais eficiente em melhorar a estabilidade aeróbia. A partir de 60 dias, os valores de pH são mais estáveis, com menores deteriorações e maior estabilidade.

Palavras-chave: Inoculante bacteriano. Deterioração da silagem. Tempos de estocagem. Cepas bacterianas. Bactérias ácido-láticas.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effectiveness of a bacterial inoculant in controlling the deterioration process and assisting in the aerobic stability of corn wet grain silages. The treatments consisted of: corn wet grain silage (Control); silage with the addition of *L. buchneri* NCIM 40788 and *L. hilgardii* CNCM I-4785 (6.0×10^5 CFU/g for both bacteria), *Pediococcus pentosaceus* NCIMB 12455, Xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* MUCL 39203, Beta-glucanase from *Aspergillus niger* MUCL 39199 (Platinum); silage with the addition of *L. buchneri* NCIMB 40788 and *L. hilgardii* CNCM I-4785 (6.0×10^5 CFU/g for both bacteria) (Platinum I); silage with the addition of *L. buchneri* NCIMB 40788 *L. hilgardii* CNCM I-4785 (4.0×10^5 CFU/g for both bacteria) and *Pediococcus pentosaceus* NCIMB 12455 (Platinum II); silage with the addition of *L. buchneri* NCIMB 40788 (6.0×10^5 CFU/g) (Fresh). The silages were stored for 30, 60 and 120 days. The material was compacted, on average 5.17 kg of forage in experimental silos (5L), reaching an average density of 953.43 Kg.m³, approximately. The variables dry matter (DM), pH, microbial count, gas losses (%) were evaluated. The silages were submitted to a deterioration and aerobic stability test for 10 days. The experiment was carried out in a completely randomized design, in a 5 x 3 factorial scheme, with 5 replications per treatment, totaling 75 experimental units. Data analysis was performed using PROC MIXED of the SAS statistical program. The means of the treatments were estimated by "LSMEANS" and the comparison was performed by Tukey test at 5% probability. DM content and pH were significant for the storage time effect (both with $P < 0.0001$). The addition of inoculants at the time of ensiling did not affect the DM content of silages ($P = 0.3883$). Gas losses were significant for storage time ($P < 0.0001$) and inoculation ($P = 0.0162$). LAB counts were significant only between storage times ($P < 0.0001$), while fungal and yeast counts did not differ between silages. After the aerobic stability (AS) test, pH was significant for inoculation ($P < 0.0001$) and storage time ($P = 0.0125$); gas losses showed significant differences between inoculants ($P < 0.0001$); aerobic stability was significant between storage times and between treatments (both $P < 0.0001$); silage deterioration was significant for inoculation effect ($P < 0.0001$) and for storage time ($P = 0.0003$). The use of inoculants with different strains to corn wet grain silage enables lower gas losses, lower spoilage, as well as higher aerobic stability of the silage. The combined inoculation of *L. hilgardii* and *L. buchneri* is more efficient in improving aerobic stability. From 60 days onwards, pH values are more stable, with lower spoilage and higher stability.

Keywords: Bacterial inoculant. Silage deterioration. Storage times. Bacterial strains. Lactic acid bacteria.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1 Silagem de grãos úmidos de milho	9
2.2 Deterioração aeróbia na silagem	9
2.3 Inoculantes bacterianos	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Preparo das silagens e tratamentos	11
3.2 Análises e preparo das amostras	12
3.3 Análise estatística	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o milho desempenha um importante papel na alimentação animal, sendo uma das principais fontes de energia mais comumente utilizada para bovinos (FERRAZ et al., 2018). Dentre as várias formas de utilização do milho, a silagem de grãos úmidos de milho é uma alternativa importante na alimentação animal, pois permite o armazenamento e fornecimento de um alimento de alta qualidade durante todo o ano, mesmo em períodos de escassez de pastagens, melhorando a eficiência do manejo e aumentando a produtividade dos rebanhos (MAGALHÃES et al., 2016).

A silagem de grão úmido é produzida a partir da fermentação anaeróbia de grãos, como milho, sorgo ou outros cereais, que são colhidos em um estágio de maturação adequado e processados (MUCK et al., 2018). Esses grãos são compactados em um silo, onde ocorre a fermentação e a produção de ácido láctico, que reduz o pH da massa, inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis e favorecendo a conservação do alimento (PEREIRA et al., 2015). No entanto, a silagem de grão úmido é mais susceptível ao processo de deterioração aeróbia durante o desabastecimento do silo, quando essa silagem é exposta ao ar e os microrganismos deterioradores, como leveduras e fungos filamentosos, utilizam os compostos produzidos durante a fermentação no silo, como o ácido láctico. Isso provoca um aumento da temperatura e do pH da silagem, o que resulta na quebra da estabilidade aeróbia (WEINBERG et al., 2017).

Portanto, para controlar a ação desses microrganismos deterioradores, é importante utilizar inoculantes bacterianos durante a produção de silagem (MCDONALD et al., 1991). Dessa forma, o aumento da oferta de ácidos fracos provenientes dos aditivos, combinado aos ácidos produzidos durante a fermentação, pode melhorar a estabilidade aeróbia das silagens de grãos após a abertura do silo (KUNG et al., 2018).

A adição de diferentes inoculantes à silagem de grãos úmidos de milho pode alterar suas características fermentativas, controlando a deterioração aeróbia do alimento, especificamente, as combinações de *L. buchneri* com *L. hilgardii*, *Pediococcus pentosaceus* e enzimas; *L. buchneri* com *L. hilgardii*; *L. buchneri* com *L. hilgardii* e *Pediococcus pentosaceus*, e apenas *L. buchneri*. Dessa forma, o objetivo desse estudo é avaliar o efeito da adição dos inoculantes mencionados anteriormente sobre a deterioração e estabilidade aeróbia da silagem de grãos úmidos de milho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Silagem de grãos úmidos de milho

A silagem de grãos úmidos de milho é uma técnica amplamente utilizada na alimentação animal, que consiste na fermentação anaeróbica dos grãos inteiros de milho com um teor de umidade entre 30% e 40% (WITZIG et al., 2017). Durante o processo de ensilagem, os grãos úmidos de milho são colhidos, picados e armazenados em um silo, onde ocorre a fermentação láctica, promovida por bactérias ácido-láticas. Esse processo resulta na produção de ácido láctico, que acidifica o meio, inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis e conservando os nutrientes presentes no milho (WITZIG et al., 2017).

Uma das principais vantagens da silagem de grãos úmidos de milho é o alto valor energético proveniente do amido, que contribui no ganho de digestibilidade e para o desempenho e a saúde dos animais (WITZIG et al., 2017). Além disso, a silagem resultante é mais rica em proteínas, vitaminas e minerais facilmente absorvíveis, proporcionando um alimento com melhor qualidade nutricional (WOOLFORD & PAHLOW, 1998).

No entanto, a silagem de grãos úmidos de milho está sujeita ao processo de deterioração aeróbia após a abertura do silo. A entrada de oxigênio permite o crescimento de microrganismos indesejáveis, como leveduras e fungos, que podem comprometer a qualidade da silagem (WITZIG et al., 2017). A presença desses microrganismos pode resultar em perdas de nutrientes, alterações na composição química e aumento da produção de gases tóxicos, como amônia, prejudicando a digestibilidade e a palatabilidade da silagem (WOOLFORD & PAHLOW, 1998).

2.2 Deterioração aeróbia na silagem

O processo de deterioração aeróbia da silagem de grãos úmidos de milho é influenciado pela presença de microrganismos indesejáveis que se desenvolvem em condições de oxigênio disponível. Esses microrganismos incluem enterobactérias, leveduras, fungos, clostrídeos e bacilos, que contribuem para a degradação da silagem, resultando em perdas nutricionais e diminuição da qualidade do alimento para os animais (MCDONALD et al., 1991; DRIEHUIS & OUDE ELFERINK, 2000).

Durante a fermentação inicial da silagem, as bactérias lácticas, como *Lactobacillus spp.* e *Pediococcus spp.*, convertem açúcares em ácido lático, reduzindo o pH e contribuindo para a estabilização da silagem (MCDONALD et al., 1991). No entanto, em condições aeróbias, microrganismos indesejáveis podem proliferar, principalmente as leveduras, causando aumento do pH, produção de calor e perdas de nutrientes (MCDONALD et al., 1991). As leveduras, como *Candida spp.* e *Saccharomyces spp.*, metabolizam açúcares fermentáveis, produzindo álcool etílico, dióxido de carbono (CO₂) e calor. A atividade dessas leveduras pode elevar o pH da silagem, prejudicando a estabilidade e a qualidade do alimento (MCDONALD et al., 1991).

O aumento do pH da silagem provoca o aumento da temperatura e, conseqüentemente, estimula a atividade de microrganismos deterioradores, como fungos filamentosos, enterobactérias, bacilos e clostrídeos. Os fungos filamentosos, tais como *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.*, são responsáveis pela produção de micotoxinas, substâncias tóxicas que podem contaminar a silagem. Esses fungos se desenvolvem em condições de umidade e temperatura elevadas, causando redução do valor nutritivo da silagem e representando riscos à saúde dos animais (FILYA, 2004; DRIEHUIS & OUDE ELFERINK, 2000).

Nesse contexto, a estabilidade aeróbia é um conceito-chave nesse processo, uma vez que consiste na capacidade da silagem em resistir à deterioração durante o armazenamento em presença de oxigênio. Uma silagem estável aerobiamente mantém uma baixa atividade microbiana, minimizando as perdas nutricionais e preservando a qualidade (MCDONALD et al., 1991).

Portanto, garantir a qualidade da silagem é de extrema importância para a alimentação animal, uma vez que uma silagem de boa qualidade proporciona maior valor nutritivo e reduz perdas de nutrientes, contribuindo para a saúde e desempenho dos animais. Isso pode ser alcançado por meio de boas práticas de ensilagem, como compactação adequada, vedação eficiente e monitoramento da estabilidade aeróbia (FILYA, 2004; DRIEHUIS & OUDE ELFERINK, 2000).

2.3 Inoculantes bacterianos

O uso de inoculantes bacterianos em silagens tem se mostrado uma prática eficaz na agricultura, visando melhorar a qualidade e a estabilidade da fermentação das silagens (KUNG L. & SHAVER, 2001). Os inoculantes são aditivos compostos por diferentes tipos de bactérias, que atuam no processo de ensilagem promovendo a fermentação adequada e inibindo a

deterioração aeróbia do material ensilado. Existem dois tipos principais de inoculantes: estimuladores de fermentação e inibidores da deterioração aeróbia.

Os inoculantes estimuladores de fermentação são compostos por cepas bacterianas homofermentativas, que promovem a rápida fermentação dos açúcares presentes no grão de milho, tais como *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lentilactobacillus buchneri* e *Pediococcus acidilactici*, resultando na produção de ácido lático. Esse ácido produzido pelas cepas é responsável pela acidificação do ambiente da silagem, reduzindo o pH e inibindo o crescimento de bactérias indesejáveis, como leveduras e fungos filamentosos (MUCK, 2018).

Por outro lado, os inoculantes inibidores da deterioração aeróbia são compostos por bactérias heterofermentativas que reduzem a atividade de microrganismos aeróbios, responsáveis pela deterioração da silagem na presença de oxigênio. Um exemplo de bactéria utilizada nesse tipo de inoculante é o *L. buchneri*, que produz ácido acético e etanol durante a fermentação, o que reduz a atividade de fungos e leveduras. Além disso, a cepa bacteriana desse tipo de inoculante também produz substâncias antimicrobianas, como enzimas e antibióticos, que contribuem para o controle do crescimento de bactérias e fungos (MUCK, 2018).

Dessa forma, os inoculantes estimuladores de fermentação, com bactérias lácticas, promovem uma fermentação mais eficiente, enquanto os inoculantes inibidores da deterioração aeróbia, com bactérias como o *L. buchneri*, reduzem as perdas causadas pela atividade de microrganismos aeróbios. Portanto, em geral, o uso de inoculantes bacterianos em silagens de grãos de milho é uma estratégia que resulta em silagens de melhor qualidade nutricional e estabilidade aeróbia, favorecendo a conservação do material e contribuindo para a saúde e desempenho animal (MCDONALD, 1991).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo das silagens e tratamentos

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia na Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil (21°13'49" S, 44°58'10" W). A silagem foi confeccionada na fazenda Terra Madre, em Alfenas-MG, quando a matéria seca (MS) estava próxima de 70%. Os tratamentos consistiram em:

- **Tratamento 1 (Controle):** silagem sem aditivo;

- **Tratamento 2 (Magniva Platinum):** silagem com a adição de *L. buchneri* NCIM 40788 (1k20757) e *L. hilgardii* CNCM I-4785 ($6,0 \times 10^5$ UFC/g para ambas as bactérias), *Pediococcus pentosaceus* NCIMB 12455 (1k2106) $\geq 2,0 \times 10^6$ UFC/g, Xylanase (EC3.2.1.8) de *Trichoderma longibrachiatum* MUCL 39203 (1k) $\geq 1,2 \times 10^{-1}$ IU/g; Beta-glucanase (EC 3.2.1.6) de *Aspergillus niger* MUCL 39199 (1k) $\geq 2,3 \times 10^{-2}$ IU/g;
- **Tratamento 3 (Magniva Platinum I):** silagem com a adição de *L. buchneri* NCIMB 40788 (1k20757) e *L. hilgardii* CNCM I-4785 ($6,0 \times 10^5$ UFC/g para ambas as bactérias);
- **Tratamento 4 (Magniva Platinum II):** silagem com a adição de *L. buchneri* NCIMB 40788 (1k20757), *L. hilgardii* CNCM I-4785 ($4,0 \times 10^5$ UFC/g para ambas as bactérias) e *Pediococcus pentosaceus* NCIMB 12455 (1k2106) ($2,0 \times 10^5$ UFC/g);
- **Tratamento 5 (Fresh):** silagem com a adição de *L. buchneri* NCIMB 40788 (1k20739) ($6,0 \times 10^5$ UFC /g).

A aplicação dos inoculantes comerciais foi realizada antes das silagens serem compactadas, de acordo com a recomendação do fabricante. Amostras do material antes de ensilar foram coletadas para análises químicas (Tabela 1), resultando em uma média de 73,65% de MS e 6,29 de pH. A massa de forragem foi compactada, de forma manual, em silos experimentais com capacidade de 5L, atingindo uma média de 5,17 kg de forragem e uma densidade média de 953,43 kg.m³. Após a compactação, os silos experimentais foram fechados com tampas próprias, vedados com filme plástico e silicone nas bordas, pesados e mantidos em sala climatizada com um aquecedor, que manteve a temperatura a ± 22 °C, durante os períodos de 30, 60 e 120 dias.

Tabela 1- Média de matéria seca e valores de pH de grãos úmidos antes da ensilagem.

Item	Controle	Platinum	Platinum I	Platinum II	Fresh
MS (%)	70,73	73,08	75,09	74,74	74,65
pH	6,50	6,32	6,26	6,10	6,30

3.2 Análises e preparo das amostras

Após os períodos de estocagem, os silos foram pesados, abertos, homogeneizados e subamostrados. Cada subamostra foi submetida às análises de teor de matéria seca (MS), características químicas e estabilidade aeróbica. Um extrato aquoso foi preparado com 30 g de amostra e 270 mL de água peptonada, homogeneizado em um aparelho Stomacher (400, Seward London, UK) a 200 rpm por quatro minutos. Esse extrato foi utilizado para realizar a leitura do pH, por meio de um potenciômetro (HI 2221, Hanna Instruments).

Para a contagem de leveduras, fungos filamentosos e bactérias ácido-láticas (BAL), foi utilizado o mesmo extrato aquoso com água peptonada (1 g por litro de água destilada). Foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície para contagem dos microrganismos. Para a contagem de fungos filamentosos e leveduras, foi utilizado como meio de cultura o Ágar YGC (Fluka, Sigma Aldrich Química Brasil LTDA) e foram preparadas diluições em séries de 10^{-1} a 10^{-4} em duplicata (TABACCO et. al., 2009). As placas permaneceram em BOD, a 28°C, durante três e cinco dias para as contagens de leveduras e fungos filamentosos, respectivamente.

Para a contagem de BAL, foi utilizado o meio de cultura Ágar MRS (DIFCO LACTOBACILLI MRS AGAR) juntamente com um agente antifúngico (nistatina), na relação de 4 mL por litro de meio de cultura, em que foram preparadas diluições em séries de 10^{-2} a 10^{-6} , também em duplicata (TABACCO et. al., 2009). As placas permaneceram em BOD, a 37°C, durante três dias para a contagem de bactérias, que foi feita com base nas suas características macromorfológicas.

As silagens foram submetidas a um teste de estabilidade e deterioração aeróbia, em que aproximadamente 2,0 kg de silagem de cada silo experimental foram colocados em caixas de poliéster (350 mm de diâmetro x 350 mm altura) por 240 horas (10 dias) a $25,5 \pm 0,8$ °C. Duas camadas de papel alumínio foram colocadas sobre as caixas para prevenir a desidratação da silagem e possíveis contaminações por elementos externos. A temperatura ambiente e das silagens foram mensuradas a cada hora por meio de dataloggers. Para o registro da temperatura ambiente, 3 dataloggers foram distribuídos pela sala, enquanto que os dataloggers para registro da temperatura das silagens foram colocados no interior das caixas, no centro da massa de silagem. A estabilidade aeróbia foi definida como o número de horas que a silagem se mantém estável antes de atingir uma temperatura de 2 °C acima da temperatura ambiente (MORAN et. al., 1996). A deterioração aeróbia foi definida como o somatório do aumento diário da temperatura (°C) acima da temperatura de referência (CONAGHAN; O'KIELY; O'MARA, 2010).

3.3 Análise estatística

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 3 (cinco tratamentos e três tempos de estocagem), com 5 repetições por tratamento, totalizando 75 unidades experimentais. A análise dos dados foi feita utilizando o PROC MIXED do programa estatístico SAS (SAS Institute, 2001). As médias dos tratamentos foram estimadas pelo “LSMEANS” e a comparação foi realizada pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, de acordo com o seguinte modelo:

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

Sendo,

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

μ = média geral;

I_i = efeito fixo do inoculante i , para $i = 1, 2, 3, 4$ e 5 ;

T_j = efeito fixo do tempo de estocagem j , para $j = 1, 2$ e 3 ;

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

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de MS, pH e perdas por gases das silagens de grãos úmidos de milho avaliadas em diferentes tempos de fermentação estão apresentados na Tabela 2. No momento da abertura dos silos, o teor MS e o pH apresentaram diferenças significativas entre os tempos de estocagem (ambos com $P < 0,0001$). A adição de inoculantes no momento da ensilagem não afetou o teor de MS das silagens ($P = 0,3883$). Aos 30 e 120 dias de estocagem, os tratamentos apresentaram médias estatisticamente semelhantes, de 70,10 e 69,50% de MS, respectivamente, enquanto que o tempo de 60 dias divergiu com uma média mais alta de 75,11% de MS. Aos 30 dias de estocagem, os tratamentos apresentaram menor média de pH, de 3,90, enquanto que os tratamentos com 60 e 120 dias foram estatisticamente iguais, com 4,06 e 4,03, respectivamente, porém com médias maiores à média de 30 dias.

As perdas por gases apresentaram diferenças significativas entre os tempos de estocagem ($P < 0,0001$) e entre os tratamentos ($P = 0,0162$). Todos os tratamentos foram estatisticamente diferentes entre si, em relação ao tempo de estocagem, apresentando um

aumento na porcentagem de perdas à medida que o tempo de estocagem aumentou. O tratamento controle apresentou menor percentual de perdas, enquanto que os tratamentos Platinum I, Platinum II e Fresh foram estatisticamente semelhantes ao tratamento controle e Platinum, com valores intermediários de perdas. O tratamento Platinum apresentou valores superiores de perdas, comparado ao tratamento controle.

Os resultados referentes à concentração de MS diferem do esperado, que seria a diminuição da concentração de MS à medida que se aumentou o tempo de estocagem, devido as perdas que ocorrem durante o processo de fermentação da silagem (KUNG et al., 2018). Durante o processo de ensilagem, ocorrem perdas naturais de MS, porém dependendo da atividade metabólica de microrganismos essas perdas podem ser mais intensas. Na fase inicial do processo de fermentação, de aerobiose, a formação de dióxido de carbono (CO₂) pode acontecer durante a fermentação dos carboidratos solúveis pelos microrganismos (McDONALD et al., 1991). A produção de CO₂ está associada com as perdas de MS na fermentação no silo, onde tais perdas irão depender da espécie microbiana dominante e do tipo de substrato fermentado (BORREANI et al., 2018).

A redução dos valores de pH nas silagens está relacionada com a atividade das bactérias homofermentativas, as quais formam principalmente o ácido lático, que é responsável pela rápida acidificação do meio (McDONALD et al., 1991). A atividade metabólica dessas bactérias pode variar de 2 a 6 semanas, para que o perfil fermentativo seja completamente estabilizado no interior do silo (PAHLOW et al., 2003). Nas silagens em estudo, a estabilização do pH ocorreu aos 60 dias de estocagem, independentemente se as silagens foram inoculadas ou não.

A presença de bactérias heterofermentativas obrigatórias, tais como *L. buchneri* e *L. hilgardii*, na composição dos inoculantes possivelmente contribuiu com maiores valores de perdas por gases nessas silagens, devido a produção de ácido acético por essas bactérias, o que está relacionado com a via de fermentação anaeróbia do ácido lático como substrato, e não necessariamente com a via das pentoses (OUDE ELFERINK et al., 2001; MUCK et al., 2018).

Tabela 2: Valores de MS, pH e perdas por gases de silagens de grãos úmidos de milho avaliadas em diferentes tempos de fermentação (contínua).

Tempo de estocagem	Tratamentos					Média	EPM ¹	I ²	T ³	I*T ⁴
	Controle	Platinum	Platinum I	Platinum II	Fresh					
Matéria seca (%)										
30	70.09	69.95	69.87	70.03	70.58	70.10a				
60	75.90	75.28	75.57	73.58	75.23	75.11b	0,4930	0.3883	<0.0001	0.1708
120	69.15	69.68	69.98	69.54	69.13	69.50a				
Média	71.71	71.63	71.80	71.06	71.64					
pH										
30	3.89	3.93	3.92	3.88	3.89	3.90a				
60	4.04	4.09	4.09	4.07	4.00	4.06b	0,0203	0.0835	<0.0001	0.2216
120	4.04	4.03	4.02	4.03	4.03	4.03b				
Média	3.99	4.02	4.01	3.99	3.97					

¹EMP=erro médio padrão; ²Efeito da inoculação; ³Efeito do tempo de estocagem; ⁴Efeito da interação do tratamento*tempo de estocagem

Médias com diferentes letras minúsculas diferem em tempo de estocagem ($P > 0,05$).

Médias com diferentes letras maiúsculas diferem em inoculação ($P > 0,05$).

Tabela 2: Valores de MS, pH e perdas por gases de silagens de grãos úmidos de milho avaliadas em diferentes tempos de fermentação (conclusão).

Tempo de estocagem	Tratamentos					Média	EPM ¹	I ²	T ³	I*T ⁴
	Controle	Platinum	Platinum I	Platinum II	Fresh					
	Perdas por gases (%)									
30	0.39	0.50	0.52	0.43	0.39	0.45a				
60	0.56	0.73	0.69	0.61	0.57	0.63b	0,0786	0.0162	<0.0001	0.1063
120	0.72	1.03	0.63	1.01	0.77	0.83c				
Média	0.56A	0.75B	0.61AB	0.68AB	0.57AB					

¹EMP=erro médio padrão; ²Efeito da inoculação; ³Efeito do tempo de estocagem; ⁴Efeito da interação do tratamento*tempo de estocagem

Médias com diferentes letras minúsculas diferem em tempo de estocagem ($P > 0,05$).

Médias com diferentes letras maiúsculas diferem em inoculação ($P > 0,05$).

A Tabela 3 apresenta os resultados referentes à população microbiana na silagem de grãos úmidos avaliadas em diferentes tempos de fermentação. Os valores de contagem de BAL apresentaram diferenças significativas entre os tempos de estocagem ($P < 0,0001$). A concentração de BAL aumentou à medida que se aumentou o tempo de estocagem, o que ocorreu como esperado, uma vez que as BAL desempenham um papel fundamental na fermentação láctica e na estabilização da silagem (KUNG et al., 2018). No entanto, a maior contagem de BAL ocorreu a partir do tempo de 60 dias, diferindo das expectativas teóricas, que geralmente indicam um pico inicial de BAL durante a fermentação (DA SILVA et al., 2021). Todos os tratamentos com 120 dias de estocagem obtiveram maior aporte de BAL nas silagens.

Os valores de contagem de fungos e leveduras não apresentaram diferenças significativas, pois estavam abaixo da faixa detectável de 2,00 log UFC/g (DA SILVA et al., 2021). A adição dos inoculantes que contém cepas de BAL homofermentativas e heterofermentativas pode ter contribuído com a redução da contagem de leveduras nas silagens que receberam esse tipo de tratamento, enquanto que a adição de BAL heterofermentativas pode ter auxiliado no controle do crescimento das leveduras. Os microrganismos heterofermentativos produzem o ácido acético como um dos produtos finais da fermentação, sendo que esse ácido apresenta características antimicrobianas capazes de controlar o crescimento de microrganismos deterioradores da silagem, tais como leveduras e fungos filamentosos (MCDONALD et al., 1991; DAVIDSON, 1997).

Tabela 3: População microbiana na silagem de grãos úmidos de milho avaliadas em diferentes tempos de fermentação (contínua).

Tempo de estocagem	Tratamentos					Média	EPM ¹	I ²	T ³	I*T ⁴
	Controle	Platinum	Platinum I	Platinum II	Fresh					
BAL (log UFC.g ⁻¹)										
30	5.66	5.68	6.46	5.31	5.62	5.75a				
60	6.06	6.02	6.78	5.98	6.09	6.18ab	0,3255	0.0995	<0.0001	0.7847
120	6.68	6.38	6.71	6.65	6.98	6.68b				
Média	6.13	6.02	6.65	5.98	6.23					
Leveduras (log UFC.g ¹)										
30	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00				
60	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00				
120	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	0,1001	0.1113	0.5988	0.8389
Média	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00					

¹EMP=erro médio padrão; ²Efeito de inoculação; ³Efeito do tempo de estocagem; ⁴Efeito da interação do tratamento x tempo de estocagem;

Médias com diferentes letras minúsculas diferem em tempo de estocagem (P > 0,05).

Médias com diferentes letras maiúsculas diferem em inoculação (P > 0,05).

Tabela 3: População microbiana na silagem de grãos úmidos de milho avaliadas em diferentes tempos de fermentação (conclusão).

Tempo de estocagem	Tratamentos					Média	EPM ¹	I ²	T ³	I*T ⁴
	Controle	Platinum	Platinum I	Platinum II	Fresh					
Fungos filamentosos (log UFC.g ¹)										
30	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00				
60	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	0,2043	0.7739	0.0836	0.8847
120	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00				
Média	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00				

¹EMP=erro médio padrão; ²Efeito de inoculação; ³Efeito do tempo de estocagem; ⁴Efeito da interação do tratamento x tempo de estocagem;

Médias com diferentes letras minúsculas diferem em tempo de estocagem (P > 0,05).

Médias com diferentes letras maiúsculas diferem em inoculação (P > 0,05).

Os resultados referentes às características da silagem de grãos úmidos de milho após estabilidade aeróbica (EA) estão apresentados na Tabela 4. O pH pós EA apresentou diferenças significativas para o efeito de inoculação ($P < 0,0001$) e para o tempo de estocagem ($P = 0,0125$). Aos 30 dias de estocagem, os tratamentos apresentaram maior média de pH, com 4,66, enquanto que aos 60 e 120 dias os tratamentos apresentaram menor e intermediária média, com 4,10 e 4,30, respectivamente. O tratamento controle apresentou maior pH, enquanto que os demais tratamentos foram estatisticamente semelhantes entre si. As perdas por gases pós EA apresentaram diferenças significativas entre os inoculantes ($P < 0,0001$), uma vez que o tratamento controle apresentou maiores perdas por gases, enquanto que os demais tratamentos foram estatisticamente semelhantes entre si.

A estabilidade aeróbia apresentou diferenças significativas entre os tempos de estocagem e entre os tratamentos (ambos com $P < 0,0001$) (Figuras 1, 2 e 3). A estabilidade aeróbia aumentou à medida que se aumentou o tempo de estocagem, sendo que os tratamentos Controle e Fresh foram estatisticamente semelhantes entre si e menos estáveis, quando comparados aos demais tratamentos, os quais foram estatisticamente semelhantes entre si e mais estáveis.

A deterioração da silagem pós EA apresentou diferenças significativas para o efeito de inoculação ($P < 0,0001$) e para o tempo de estocagem ($P = 0,0003$). A deterioração foi maior aos 30 dias de estocagem, reduzindo à medida que o tempo de estocagem aumentou. O tratamento Controle apresentou a maior deterioração em comparação aos demais tratamentos, que foram estatisticamente semelhantes entre si e apresentaram menor deterioração.

A inoculação de bactérias heterofermentativas contribuiu para a redução do pH da silagem pós EA, devido à maior produção de ácidos orgânicos, principalmente ácido acético (KUNG et al., 2018). Além disso, a inoculação também contribuiu na redução das perdas por gases pós EA, no entanto, observou-se que esses resultados foram contrários aos resultados vistos no momento da abertura das silagens.

A maior concentração de ácidos fracos, tais como ácido acético e ácido propiônico, advindos de BAL heterofermentativas inoculadas, permitiu melhorias na estabilidade aeróbia das silagens devido às suas características antifúngicas (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1999). Além disso, a inoculação simultânea de *L. hilgardii* e *L. buchneri* apresentou melhores resultados em relação à estabilidade aeróbia, quando comparada à silagem inoculada apenas com *L. buchneri*. Isso possivelmente ocorreu devido à maior produção desses ácidos fracos, advindos da combinação das cepas bacterianas, que promoveram um efeito

sinérgico na inibição do crescimento de leveduras e, conseqüentemente, promoveram melhorias na estabilidade aeróbica da silagem de grãos úmidos de milho (DA SILVA et al., 2021).

Os inoculantes influenciaram positivamente na redução da deterioração aeróbia da silagem, de forma que a maior concentração de ácidos fracos, principalmente ácido acético, inibiu a ação de microrganismos deterioradores (e.g. leveduras e fungos filamentosos) (KUNG et al., 2018). A temperatura da silagem pode ser utilizada como um índice para avaliar a atividade metabólica de leveduras (BORREANI; TABACCO,2010), uma vez que o aumento da temperatura pode ser controlado a partir da inibição da ação dos microrganismos deterioradores. Portanto, a maior concentração de ácidos fracos nas silagens tratadas com inoculantes de cepas heterofermentativas inibiram a ação destes microrganismos deterioradores durante a exposição destas silagens ao oxigênio.

Tabela 4: Características da silagem de grãos úmidos de milho após estabilidade aeróbica (contínua).

Tempo de estocagem	Tratamentos					Média	EPM ¹	I ²	T ³	I*T ⁴
	Controle	Platinum	Platinum I	Platinum II	Fresh					
pH pós EA										
30	6.10	4.25	3.98	3.97	5.00	4.66b				
60	4.41	4.07	3.87	4.11	4.03	4.10a				
120	5.32	4.09	4.03	4.03	4.03	4.30ab	0,2881	<0.0001	0.0125	0.0815
Média	5.28B	4.14 ^a	3.96A	4.03A	4.35A					
Perda por gases pós EA (%)										
30	4.33	1.39	1.33	1.97	1.89	2.18				
60	3.59	1.41	1.73	2.11	1.54	2.08	0,4445	<0.0001	0.7649	0.0626
120	2.68	1.75	2.95	2.65	1.39	2.28				
Média	3.54B	1.52 ^a	2.00A	2.24A	1.61A					

¹EMP=erro médio padrão; ²Efeito de inoculação; ³Efeito do tempo de estocagem; ⁴Efeito da interação do tratamento x tempo de estocagem;

Médias com diferentes letras minúsculas diferem em tempo de estocagem (P > 0,05).

Médias com diferentes letras maiúsculas diferem em inoculação (P > 0,05).

Tabela 4: Características da silagem de grãos úmidos de milho após estabilidade aeróbica (conclusão).

Tempo de estocagem	Tratamentos					Média	EPM ¹	I ²	T ³	I*T4
	Controle	Platinum	Platinum I	Platinum II	Fresh					
Estabilidade aeróbica (h)										
30	87	148	164	165	128	138c				
60	124	167	167	161	158	155b	11,21	<0.0001	<0.0001	0.0648
120	141	>240	>240	>240	>240	220a				
Média	117B	185A	190A	189A	176B					
Deterioração (°C)										
30	25.59	25.07	15.35	10.11	16.09	18.64b				
60	25.36	4.88	4.88	9.97	5.09	10.03a	4,36	<0.0001	0.0003	0.3192
120	25.05	5.32	0.00	4.98	0.00	7.07a				
Média	25.67B	11.76A	6.74A	8.35A	7.06A					

¹EMP=erro médio padrão; ²Efeito de inoculação; ³Efeito do tempo de estocagem; ⁴Efeito da interação do tratamento x tempo de estocagem;

Médias com diferentes letras minúsculas diferem em tempo de estocagem (P > 0,05).

Médias com diferentes letras maiúsculas diferem em inoculação (P > 0,05).

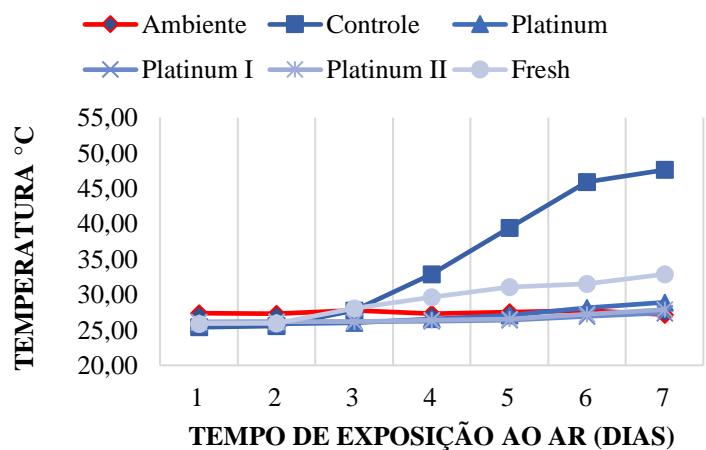


Figura 1 - Gráfico de estabilidade e processo de deterioração aeróbia de silagens de grãos úmidos de milho estocados por 30 dias.

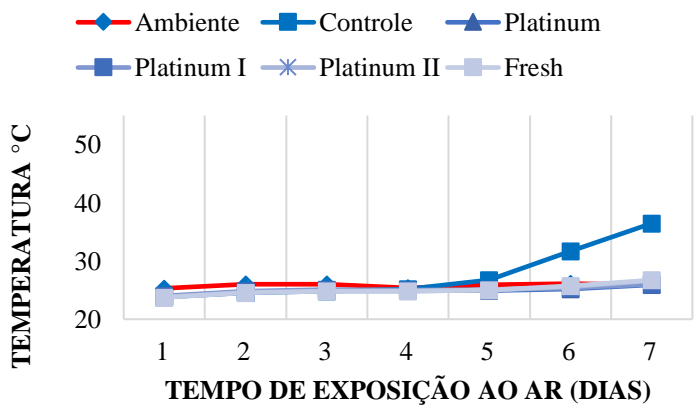


Figura 2 - Gráfico de estabilidade e processo de deterioração aeróbia de silagens de grãos úmidos de milho estocados por 60 dias.

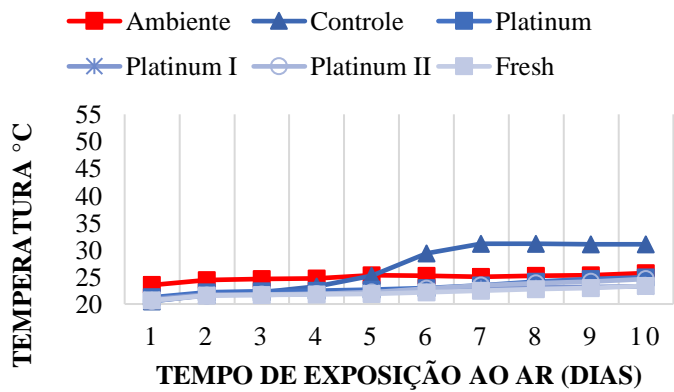


Figura 3 - Gráfico de estabilidade e processo de deterioração aeróbia de silagens de grãos úmidos de milho estocados por 120 dias.

5 CONCLUSÃO

A inoculação com diferentes cepas à silagem de grãos úmidos de milho, especificamente, os inoculantes Platinum, Platinum I, Platinum II e Fresh, possibilita menores perdas por gases, menor deterioração, assim como maior estabilidade aeróbia do alimento. Os inoculantes com combinação de *L. hilgardii* e *L. buchneri* (Platinum, Platinum I e Platinum II) são mais eficientes em melhorar a estabilidade aeróbia. Dentre os tempos de estocagem avaliados, a partir de 60 dias observa-se valores de pH mais estáveis, menores deteriorações e maior estabilidade.

REFERÊNCIAS

BORREANI, G. et al. Silage review: factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**. v. 101, n. 5, p. 3952-3979, 2018.

BORREANI, G.; TABACCO, E. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 93, n. 6, p. 2620-2629, 2010.

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

DA SILVA, E. B. et al. Effects of *Lactobacillus hilgardii* 4785 and *Lactobacillus buchneri* 40788 on the bacterial community, fermentation and aerobic stability of high-moisture corn silage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 5, p. 1481-1493, 2021.

DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTIVELLE, T. J. (Ed). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p. 520-556.

DRIEHUIS, F.; ELFERINK, SJWH Oude. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. **Veterinary Quarterly**, v. 22, n. 4, p. 212-216, 2000.

FERRAZ et al. Silagem de grãos úmidos de milho para bovinos. Boletim Técnico da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, v. 75, p. 41-49, 2018.

FILYA, I. Nutritive value and aerobic stability of whole crop maize silage harvested at four stages of maturity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 116, n. 1-2, p. 141-150, 2004.

KUNG JR et al. Fermentation and aerobic stability of corn silages inoculated with *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 2, p. 1595-1607, 2018.

KUNG, Limin; SHAVER, Randy. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. **Focus on forage**, v. 3, n. 13, p. 1-5, 2001.

MAGALHÃES, A. L. R. et al. Utilização de milho e seus coprodutos na alimentação de bovinos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 17, n. 4, p. 801-819, 2016.

MCDONALD, Peter et al. **The biochemistry of silage**. Chalcombe publications, 1991.

MORAN J. P. et al. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: JONES, D. I. H.; JONES, R.; DEWHURST, R.; MERRY, R. J. (Eds) **Proceedings...** Aberystwyth: UK, 1996, pp. 162–163. Aberystwyth, UK: University of Wales.

MUCK, R. E. et al. Silage review: recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, 2018.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H. et al. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 1, p. 125-132, 2001.

PAHLOW, G. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Eds). **Silage science and technology**. 1st ed. Madison: American Society of Agronomy, 2003.

PEREIRA, O. G. et al. Silagem de grãos úmidos de milho: uma revisão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 67, n. 6, p. 1659-1670, 2015.

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

WEINBERG, Z. G. et al. The survival of silage bacteria to aerobic exposure. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 100, n. 6, p. 4538-4545, 2017.

WITZIG, M. et al. Silagem de grãos úmidos de milho: fundamentos e tecnologia de produção. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, [S.l.], n. 274, 2017.

WOOLFORD, Michael K.; PAHLOW, Günter. The silage fermentation. **Microbiology of fermented foods**, p. 73-102, 1998.