

GABRIELA DUARTE OLIVEIRA LEITE

**FERMENTAÇÃO E ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE MILHO
INOCULADAS COM DIFERENTES CEPAS DE *Lactobacillus buchneri***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Odilon Gomes Pereira

Coorientadora: Karina Guimarães Ribeiro

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L533f
2021
Leite, Gabriela Duarte Oliveira, 1994-
Fermentação e estabilidade aeróbia de silagens de milho
inoculadas com diferentes cepas de *Lactobacillus buchneri* /
Gabriela Duarte Oliveira Leite. – Viçosa, MG, 2021.
1 dissertação eletrônica (33 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Odilon Gomes Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Zootecnia, 2021.

Referências bibliográficas: f. 29-33.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.226>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Inoculantes microbianos. 2. Leveduras. 3. Milho -
Cultivo - Localização. I. Pereira, Odilon Gomes, 1960-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 636.086

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578

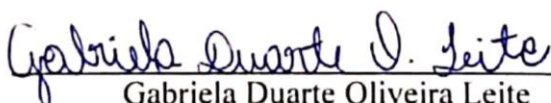
GABRIELA DUARTE OLIVEIRA LEITE

**FERMENTAÇÃO E ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE MILHO
INOCULADAS COM DIFERENTES CEPAS DE *Lactobacillus buchneri***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de julho de 2021.

Assentimento:



Gabriela Duarte Oliveira Leite
Autora



Odilon Gomes Pereira
Orientador

A DEUS,

Aos meus pais Délcio e Iêda pelo amor, incentivo e paciência,

Às minhas irmãs Mariane e Manuela pelo carinho, amor e apoio.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelo amor, proteção e força.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia e ao Laboratório de Forragicultura pela oportunidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Odilon Gomes Pereira pela orientação, oportunidade e pelos ensinamentos transmitidos.

Aos professores Karina Guimarães Ribeiro e João Paulo Sampaio Rigueira por terem aceitado o convite de participar da banca.

À pós doc. Vanessa Paula da Silva pela contribuição durante a execução do trabalho.

Ao Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira/ Programa de Capacitação de Especialistas em Pecuária Leiteira, PDPL/ PCEPL – UFV, em especial ao técnico Thiago Camacho.

Aos colegas do Laboratório de Forragicultura: Alberto, Felipinho, Hosnerson Renan, Jaína, João Paulo, Tamara, Vinícius e Wagner pela ajuda e condução desse trabalho, e principalmente pelo companheirismo e risadas.

A todos os funcionários do Departamento de Zootecnia Faustino Monteiro, Seu Mário pela colaboração e auxílio sempre que necessário.

Aos meus pais, Délcio e Iêda, por serem ponto de equilíbrio em momentos difíceis, pela transparência da nossa amizade, sempre me mostrando o melhor caminho a ser seguido. A minha gratidão será eterna, assim como o meu amor por vocês.

Às minhas irmãs Mariane e Manuela, por serem tão importantes na minha conquista, pela união e confiança.

A todos os amigos que estiveram junto a mim, em especial, Wagner, Natanael, Diego e Pedro.

A todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

LEITE, Gabriela Duarte Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Fermentação e estabilidade aeróbia de silagens de milho inoculadas com diferentes cepas de *Lactobacillus buchneri*.** Orientador: Odilon Gomes Pereira. Coorientadora: Karina Guimarães Ribeiro.

Objetivou-se avaliar inoculação de diferentes cepas selvagens de *Lactobacillus buchneri* sobre o perfil fermentativo e a estabilidade aeróbia (EA) de silagens de milho cultivadas em diferentes locais. Foi utilizado um esquema fatorial 4×5 (quatro inoculantes (I) e cinco locais de cultivo (L)), em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. O milho foi semeado em áreas de cinco municípios. Os inoculantes avaliados foram: controle (CON; sem inoculante), LALSIL AS (Lallamend, Brasil), isolado LB 45.22 (*L. buchneri*) e isolado LB 90.14 (*L. buchneri*). As cepas LB 45.22 e LB 90.14 foram isoladas previamente de silagem de sorgo. Os inoculantes foram aplicados usando-se taxa de aplicação de 1×10^6 UFC g⁻¹ de forragem, e os silos foram abertos após 60 dias de armazenamento. Houve efeito de local ($P < 0,001$) para o teor de MS das silagens; as silagens do L1 apresentaram maior teor de MS em relação às dos demais locais. Houve efeito de local e inoculante para ácido láctico (AL; $P \leq 0,001$) e ácido acético (AC; $P \leq 0,003$). Concentrações de AC foram maiores para silagens inoculadas com cepas selvagens. Houve efeito de interação L×I ($P \leq 0,05$) sobre as variáveis PB, FDN, PIDA, carboidratos solúveis em água (CHOs), nitrogênio amoniacal (N-NH₃), pH e bactérias do ácido láctico. Observou-se maior teor de FDN ($P = 0,032$) para as silagens CON e LB 45.22 no L1, enquanto no L3, as silagens inoculadas apresentaram maior FDN ($P = 0,014$). As silagens inoculadas com LB 45.22 e 90.14, nos L1, L2 e L3, apresentaram maior ($P \leq 0,012$) pH. A silagem inoculada com LB 90.14 no L3 apresentou maior ($P = 0,039$) CHOs. Após sete dias de exposição aeróbia, houve efeito de interação L×I ($P \leq 0,05$) para as variáveis MS, CHOs, pH, EA, mofos e leveduras. A EA foi maior ($P < 0,001$) para silagens inoculadas em relação às silagens CON, nos L1, L3 e L5; enquanto, nos L2 e L4, as silagens inoculadas com LB 90.14 apresentaram maior EA ($P = 0,026$). As silagens inoculadas com os isolados, nos L2 e L3, apresentaram menor ($P \leq 0,001$) população de leveduras. Ainda, observou-se menor ($P < 0,001$) contagem de leveduras para silagens inoculadas com LB 45.22 nos L1 e L5. A população de mofos foi menor ($P \leq 0,001$) nas silagens inoculadas no L1 e L5, no entanto, foi menor ($P = 0,002$) para as silagens inoculadas com os isolados no L3. Conclui-se que as cepas LB 45.22 e LB 90.14 melhoram a estabilidade aeróbia de silagens de milho e apresentam potencial como inoculantes na produção de silagens.

Palavras-chave: Inoculantes. Leveduras. Localidades.

ABSTRACT

LEITE, Gabriela Duarte Oliveira, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, July, 2021. **Fermentation and aerobic stability of corn silages inoculated with different strains of *Lactobacillus buchneri***. Adviser: Odilon Gomes Pereira. Co-Adviser: Karina Guimarães Ribeiro.

The objective of this study aimed to evaluate the inoculation of different wild strains of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation profile and aerobic stability (AE) of corn silages grown in different locations. A 4×5 factorial scheme (four inoculants (I) and five cultivation sites (L)) was used, in a completely randomized design, with four replications. Corn was sown in areas of five municipalities. The inoculants obtained were: control (CON; no inoculant), LALSIL AS (Lallamend, Brazil), isolate LB 45.22 (*L. buchneri*) and isolate LB 90.14 (*L. buchneri*). Strains LB 45.22 and LB 90.14 were previously prepared from sorghum silage. The inoculants were applied at an application rate of 1×10^6 CFU g⁻¹ of forage, and the silos were opened after 60 days of storage. There was a location effect ($P < 0.001$) for the DM content of the silages; silages from L1 had higher DM content compared to other locations. There was site and inoculant effect for lactic acid (LA; $P \leq 0.001$) and acetic acid (CA; $P \leq 0.003$). CA concentrations were higher for silages inoculated with wild strains. There was an interaction effect of L×I ($P \leq 0.05$) on the variables CP, NDF, ADICP, water-soluble carbohydrates (WSC), ammonia nitrogen (NH₃-N), pH and lactic acid bacteria. Greater NDF content ($P = 0.032$) was observed for CON and LB 45.22 silages in L1, while not L3 as inoculated silages with higher NDF ($P = 0.014$). The silages inoculated with LB 45.22 and 90.14, in L1, L2 and L3, dissipated higher ($P \leq 0.012$) pH. Silage inoculated with LB 90.14 at L3 had higher ($P = 0.039$) WSC. After seven days of aerobic exposure, there was a L×I interaction effect ($P \leq 0.05$) for the variables DM, WSC, pH, AE, molds and yeasts. The AE was higher ($P < 0.001$) for inoculated silages in relation to CON silages, in L1, L3 and L5; while, in L2 and L4, the silages inoculated with LB 90.14 aggregate greater AE ($P = 0.026$). The silages inoculated with those obtained, in L2 and L3, smaller ($P \leq 0.001$) yeast population. Also, a lower ($P < 0.001$) yeast count was observed for silages inoculated with LB 45.22 in L1 and L5. The mold population was smaller ($P \leq 0.001$) in the silages inoculated in L1 and L5, however, it was smaller ($P = 0.002$) in the silages inoculated with those qualified in L3. It is concluded that strains LB 45.22 and LB 90.14 improve the aerobic stability of corn silages and have potential as inoculants in the production of silages.

Keywords: Inoculants. Yeasts. Places.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1. Local do experimento	10
2.2. Delineamento experimental	10
2.3. Preparo dos inoculantes microbianos.....	11
2.3.1. Cepas selvagens.....	11
2.3.2. Inoculante comercial	11
2.4. Cultivo, ensilagem do milho e abertura dos silos	11
2.5. Perfil fermentativo e microbiologia	14
2.6. Estabilidade Aeróbia.....	15
2.7. Análises químicas	15
2.8. Recuperação de Matéria Seca	16
2.9. Análise estatística	16
3. RESULTADOS	16
3.1. Forragem antes da ensilagem.....	16
3.2. Composição química, perfil fermentativo e população microbiana das silagens	17
3.3. Estabilidade aeróbia.....	22
4. DISCUSSÃO.....	26
4.1. Composição química, perfil fermentativo e população microbiana das silagens	26
4.2. Estabilidade aeróbia.....	27
5. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

A silagem de milho apresenta tipicamente uma fermentação homolática, com baixa formação de ácido acético e/ou propiônico, os quais apresentam ação antifúngica. Por esse motivo e por apresentar grande disponibilidade de substratos, a silagem de milho é propensa a deterioração aeróbia quando o silo é aberto, sendo este processo iniciado principalmente por leveduras (Muck et al., 2018; O’Kiely e Muck, 1992)

As leveduras são responsáveis por iniciar a deterioração da silagem (Pahlow et al., 2003; Wilkinson e Muck, 2019), pois utilizam carboidratos residuais e ácido lático como substratos para seu crescimento. Assim, causam o aumento de pH, temperatura e perdas de MS na forma de CO₂ e H₂O, além de permitir que outros microrganismos se desenvolvam, como mofo, bacilos, bactérias do ácido acético, entre outros (Kung et al., 2018). Silagens deterioradas apresentam redução no valor nutritivo, diminuição da aceitabilidade e conseqüente menor desempenho animal (Auerbach e Nadeau, 2020; Borreani et al., 2018).

O uso de inoculantes microbianos contendo *Lactobacillus buchneri* têm reduzido as perdas decorrentes da deterioração aeróbia (Driehuis et al., 1999; Kleinschmit e Kung, 2006; Kung et al., 2021; Muck et al., 2018). Classificada como bactéria do ácido lático (BAL) heterofermentativa obrigatória, essa espécie é capaz de converter os carboidratos solúveis em água (CHOs), pela via da fosfocetolase, a ácido lático, acético e etanol (Heinl et al., 2012). Além disso, é capaz de degradar o ácido lático a ácido acético e 1,2-propanodiol em condições anaeróbias (Heinl et al., 2012; Oude Elferink et al., 2001), os quais podem inibir o crescimento de leveduras e assim, preservar a qualidade nutricional da silagem quando exposta ao ar (da Silva et al., 2018).

A seleção de novas cepas e o conhecimento de seus metabolismos, melhoram o entendimento sobre as interações que ocorrem durante a fermentação. Há crescente número de estudos sobre a triagem e efeitos da utilização de novas cepas bacterianas como inoculantes de silagens (Costa et al., 2021; Guan et al., 2020; Silva et al., 2018; Wang et al., 2018).

Poucos estudos avaliaram os efeitos da localização geográfica do cultivo de milho na fermentação e estabilidade aeróbia da silagem (Schmidt e Kung, 2010; Wang et al., 2021a, 2021b). Portanto, a diferença entre locais justifica o estudo de novas cepas com potencial para competir com a microflora epifítica em diferentes condições.

Dessa forma, a hipótese para o presente estudo é que a inoculação com diferentes cepas selvagens de *L. buchneri* isoladas de sorgo, em condições tropicais, pode alterar o perfil

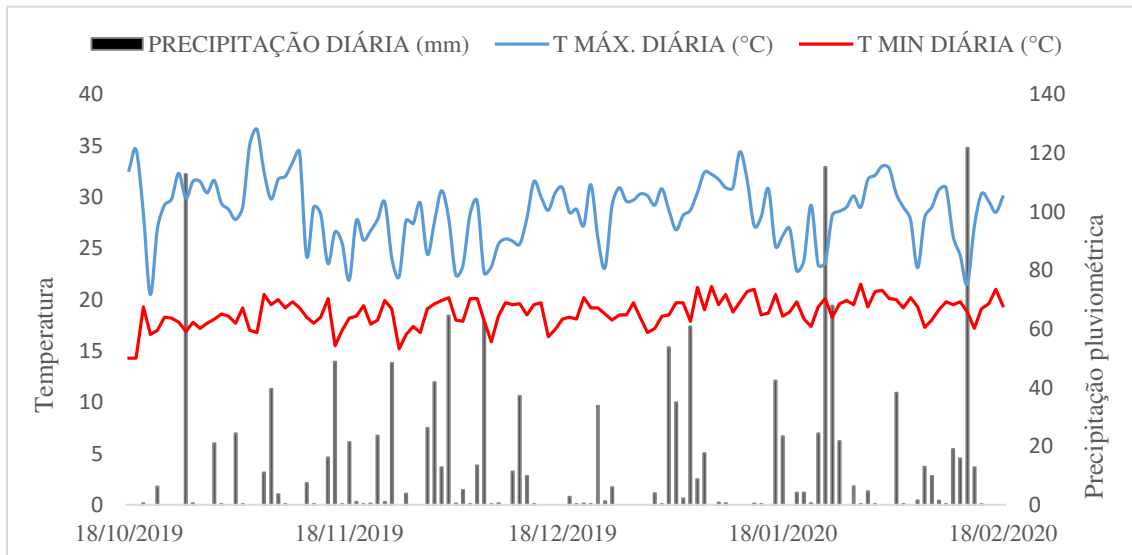
fermentativo e aumentar a estabilidade aeróbia de silagens de milho produzidas em diferentes locais. Portanto, objetivou-se avaliar a inoculação de diferentes de cepas selvagens de *L. buchneri* sobre o perfil fermentativo e a estabilidade aeróbia de silagens de milho cultivadas em locais distintos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Forragicultura e de Microbiologia de Silagem do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, localizada na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, Brasil, na latitude Sul de 20°45' e longitude Oeste de 42° 51', com altitude média de 657 m. O clima é do tipo Cwb, segundo a classificação proposta por KÖPPEN, com precipitação média anual de 1341 mm. Os valores de precipitação pluviométrica diária, temperatura máxima e mínima diária durante o período de cultivo estão apresentados na Figura 1.

Figura 1 - Precipitação pluvial e temperaturas máximas e mínimas durante o período de cultivo do milho



Fonte: INMET, 2021.

2.2. Delineamento experimental

Foi utilizado um esquema fatorial 4x5 (4 inoculantes e 5 locais), em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os tratamentos foram: controle (sem inoculante), Lalsil As (*L. buchneri* CNCM I-4323; Lallamend, Brasil), *L. buchneri* (isolado 45.22) e *L. buchneri* (isolado 90.14). O milho para ensilagem foi cultivado em cinco municípios da Zona da Mata Mineira.

2.3. Preparo dos inoculantes microbianos

2.3.1. Cepas selvagens

As cepas de *L. buchneri* 45.22 e 90.14, utilizados nesse estudo, pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia da Silagem do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. As cepas foram isoladas previamente em estudos com silagens de sorgo forrageiro, após 45 e 90 dias de fermentação, respectivamente.

As cepas, previamente estocadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram cultivadas consecutivamente, em caldo MRS, durante 16 horas cada. Em seguida, foi realizado o plaqueamento em meio MRS ágar (DifcoTM Lactobacilli MRS Agar, Detroit, MI, USA) e determinado o número de unidades formadora de colônia (UFC). Com base na contagem, foi realizado os cálculos para determinar o volume de meio necessário para atingir a taxa de aplicação de 1×10^6 UFC g^{-1} . As culturas ativas foram submetidas à centrifugação ($1000\text{ g} \times 10$ minutos, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), e, imediatamente após, o sobrenadante foi eliminado e o sedimento de células obtido foi ressuscitado em 50 mL de água destilada.

2.3.2. Inoculante comercial

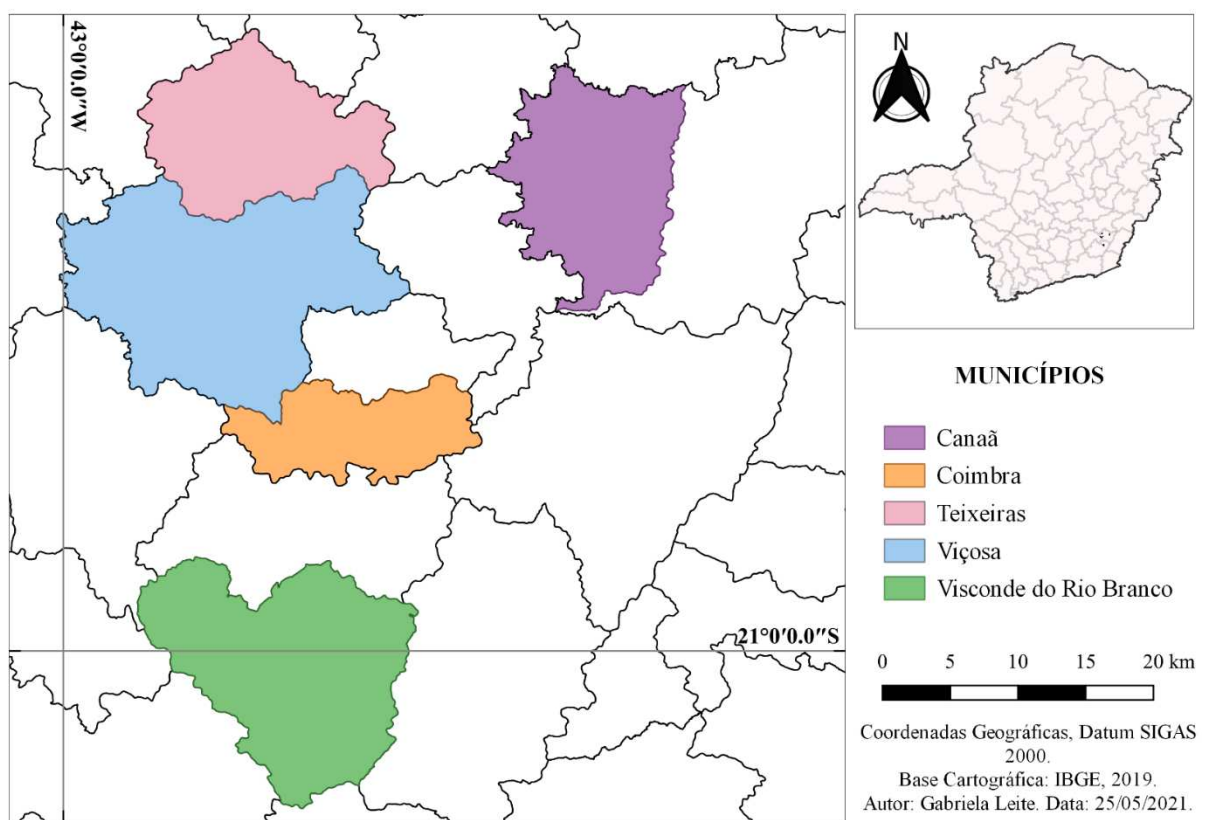
O inoculante comercial usado foi o Lalsil As (*L. buchneri* CNCM I-4323; Lallamend, Brasil). A mesma quantidade de água utilizada no preparo das cepas selvagens (50 mL) foi usada para a reidratação do inoculante comercial.

O inoculante comercial também foi ajustado para aplicação na taxa de 1×10^6 UFC g^{-1} de forragem, com base na matéria natural. A taxa foi ajustada pela determinação prévia da população de bactérias lácticas presentes no inoculante, com o uso da contagem de bactérias lácticas em placas, utilizando-se o meio MRS ágar.

2.4. Cultivo, ensilagem do milho e abertura dos silos

O milho (Híbrido RB9789VIP3) foi cultivado em áreas dos seguintes municípios: Canaã, 20°41'29"S 42°38'40"W e altitude média de 676 m (L1); Coimbra, 20°49'21"S 42°47'12"W e altitude média de 701 m (L2); Teixeira, 20°33'48"S 42°52'12"W e altitude média de 695 m (L3); Viçosa, 20°42'43"S 42°48'54"W e altitude média de 670 m (L4), e, Visconde do Rio Branco, 20°57'40"S 42°52'41"W e altitude média de 411 m (L5). Os municípios estão representados na Figura 2.

Figura 2 - Mapa de representação dos cinco locais de amostragem de milho para ensilagem



O solo nos diferentes locais foi caracterizado como Latossolo vermelho-amarelo distrófico, textura média a argilosa (SBCS, 2018), preparado, corrigido e adubado conforme resultado de análise química (Tabela 1) e exigência nutricional do milho. Foi aplicado calcário dolomítico, 45 dias antes do plantio, na quantidade de 2 e 3 t ha⁻¹, nos locais L1 e L5, respectivamente. Não houve correção de solo nos demais locais, por opção do produtor. As doses de adubo aplicadas encontram-se na Tabela 2. Adubação de cobertura foi realizada de 25 a 30 dias após a semeadura, em todos os locais, quando as plantas apresentavam, em média, de 3 a 5 folhas abertas, sendo aplicados 500kg ha⁻¹ da mistura de NPK (30-00-20).

Tabela 1 - Resultados da análise química do solo

Local	pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	H + Al	SB	V
		---mg/dm ³ ---		-----cmol _c /dm ³ -----				%
L1	5,7	5,0	105	2,01	0,98	1,98	3,26	62,2
L2	5,8	188,2	240	3,50	1,16	4,62	5,27	53,3
L3	6,0	15,84	135	2,36	0,94	3,96	3,65	48,0
L4	6,8	10,91	122	4,48	2,25	1,32	7,04	84,2
L5	5,7	12,4	35	2,78	0,96	2,3	3,83	62,5

L1: Canaã; L2: Coimbra; L3: Teixeira; L4: Viçosa e L5: Visconde do Rio Branco. pH em água, KCl e CaCl₂ relação: 1: 2,5. SB: soma de bases. V: saturação por bases

Tabela 2 - Doses (kg ha⁻¹) de adubos (NPK) aplicadas nos diferentes locais de cultivo do milho para ensilagem

Local	Dose	Adubo
L1	400	08-25-10
L2	350	08-28-16
L3	290	MAP
L4	450	08-28-16
L5	415	10-30-10

L1: Canaã; L2: Coimbra; L3: Teixeira; L4: Viçosa e L5: Visconde do Rio Branco. MAP: Fosfato monoamônico.

As datas de plantio e colheita (ensilagem), bem como, o tamanho da área cultivada em cada propriedade, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Datas de semeadura e colheita e tamanho da área cultivada nos diferentes locais

Local	Semeadura	Colheita	Área (ha)
L1	30/10/2019	17/02/2020	1
L2	18/10/2019	17/02/2020	10
L3	28/10/2019	18/02/2020	2
L4	23/10/2019	06/02/2020	2
L5	19/10/2019	07/02/2020	5

L1: Canaã; L2: Coimbra; L3: Teixeira; L4: Viçosa e L5: Visconde do Rio Branco.

Em cada local de estudo, o milho foi colhido manualmente, quando apresentava de 1/3 a 2/3 da linha de leite no grão, com colheitas realizadas em dias diferentes. Após a colheita, os materiais foram transportados ao Departamento de Zootecnia da UFV, onde foram triturados em máquina forrageira estacionária (modelo PN Plus 2000, Nogueira S.A., São João da Boa Vista, Brasil), em tamanho médio de partícula de 1,5 cm.

O material triturado foi dividido em pilhas de 10 kg cada (total de 80 pilhas), para a aplicação dos inoculantes, e, cada pilha foi ensilada em um balde. O inoculante foi diluído em 50 mL de água destilada e as pilhas foram tratadas individualmente, o qual foi aplicado com auxílio de borrifadores manuais. O mesmo volume de água destilada foi aplicado no tratamento controle. O material tratado foi ensilado em baldes plásticos de 10 L de capacidade, previamente pesados (peso vazio), e compactado manualmente, adotando-se densidade média de 550 kg/m³. Os baldes foram vedados, pesados (peso cheio inicial) e armazenados à temperatura ambiente até o momento da abertura. Os silos foram abertos após 60 dias de armazenamento.

No dia da abertura dos silos, os baldes foram novamente pesados (peso cheio final) e, em seguida, foram abertos. Após homogeneização, amostras foram coletadas para a avaliação de composição química, perfil fermentativo e populações microbianas. Para a avaliação da estabilidade aeróbia, 2 kg de silagem retornaram para seu respectivo balde. Uma segunda amostra foi usada para avaliação da composição química. Da mesma forma, outra amostra, de 25 g, foi usada para avaliação do perfil fermentativo e das populações microbianas das silagens após a exposição ao ar.

2.5. Perfil fermentativo e microbiologia

As análises referentes ao perfil fermentativo e à contagem das populações microbianas foram realizadas na forragem *in natura* e nas silagens. Para isso, foi obtido um extrato aquoso, a partir de 25g de amostra homogeneizada em 225 mL de solução estéril (Ring Solution®, Oxoid), por 1 min., em liquidificador industrial. O extrato aquoso obtido foi filtrado em camada dupla de gaze estéril e, imediatamente após, foi mensurado o pH, com o auxílio de um potenciômetro digital (Tecnal, SP, Brazil).

Uma alíquota de 15 mL do extrato aquoso foi acondicionada em tubos contendo 1 mL de ácido sulfúrico 50%, e armazenada em freezer a -20°C, para posteriores análises de ácidos orgânicos, carboidratos solúveis (CHOs, Nelson, 1944) e nitrogênio amoniacal (N-NH₃, Okuda et al., 1965). Para a quantificação de ácidos orgânicos, as amostras foram tratadas com hidróxido de cálcio e sulfato cúprico e analisadas de acordo com Siegfried et al. (1984). Utilizou-se o equipamento Waters alliance e2695 com Detector PAD 2998 (*photodiode array detector*), em sistema de separação constituído de coluna de reversa C18 ODS 80A (150×4,6 mm×5 µm). As condições de análise foram: Fase móvel isocrática constituída de 100% de solução aquosa de fosfórico, pH 2,35-2,55, temperatura do forno de 50 +/- 2 °C, volume de

injeção de amostra de 20 microlitros, tempo de corrida de 20 minutos detector com comprimento de excitação de onda em 210 nm.

Uma segunda alíquota do extrato aquoso foi submetida a diluições seriadas, variando de 10^{-1} a 10^{-7} , para contagem da população microbiana. O plaqueamento foi realizado pela técnica *pour plate* em placas de Petri estéreis. A população de BAL foi determinada em meio ágar MRS (Difco™ Lactobacilli MRS Agar, Detroit, MI, USA) e as placas foram incubadas a 37°C por 48 h. O cultivo de enterobactérias foi realizado em meio VRB ágar (Violet Red Bile Agar, Detroit, MI, USA) e incubadas a 37°C por 24 h. Mofos e leveduras foram cultivados em meio DRBC ágar (Dichloran Rose bengal Agar base, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) a 25°C por 120 h e 72 h, respectivamente. Foram consideradas passíveis de contagem, as placas contendo entre 30 e 300 UFC. Para avaliação e interpretação dos dados referentes à contagem microbiana, os resultados obtidos foram convertidos para base logarítmica (Log₁₀ UFC).

2.6. Estabilidade Aeróbia

Os baldes com as amostras para avaliação da estabilidade aeróbia foram armazenados em sala com temperatura controlada ($\pm 24^\circ\text{C}$). Um data logger foi inserido no centro da massa de silagem, em cada balde, para que a temperatura fosse registrada, a cada 10 min, por sete dias. Dois data loggers foram distribuídos na sala, para mensuração da temperatura ambiente. A estabilidade aeróbia foi definida como o número de horas que a silagem permaneceu estável, antes da temperatura subir 2°C acima da temperatura ambiente (Kung et al., 2021).

Ao final dos sete dias de exposição aeróbia, os baldes foram novamente pesados e a silagem foi homogeneizada e amostrada para mensuração do pH, temperatura máxima (T. máx) e quantificação dos teores de CHOs e de ácidos orgânicos e das populações de mofos e leveduras, como previamente descritos.

2.7. Análises químicas

Amostras da planta e da silagem foram submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada de ar, a 55°C por 72 horas, e moídas em moinho de facas (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil) com peneira de 1 mm. Após serem moídas, as amostras foram analisadas quanto aos seus teores de matéria seca (MS, método 934.01), matéria mineral (MM, método 942.05), proteína bruta (PB, método 984.13) e fibra em detergente ácido (FDA, método 973.18), conforme AOAC (1990). As concentrações de fibra em detergente neutro (FDN) foram

determinadas com a adição de α -amilase termoestável, sem a utilização de sulfito de sódio, conforme Van Soest et al. (1991), modificado por Senger et al. (2008) para autoclave. O teor de matéria orgânica (MO) foi obtido pela diferença (MO + MM = 100) e os compostos nitrogenados para a obtenção dos valores de proteína insolúvel em detergente ácido (PIDA) foram obtidos conforme Licitra et al. (1996).

2.8. Recuperação de Matéria Seca

Para a estimativa da recuperação de MS da silagem, os baldes foram pesados à ensilagem (peso inicial), após 60 dias de fermentação (peso final). A recuperação de MS foi calculada segundo Jobim et al. (2007), usando a equação: $RMS = MS_{ab}/MS_{fe} \times 100$, onde: RMS = Recuperação de matéria seca (%); MS_{ab} = Matéria seca da silagem na abertura (quantidade de silagem em kg \times % MS); MS_{fe} = Matéria seca da forragem no fechamento (quantidade de forragem em kg \times % MS).

2.9. Análise estatística

Os dados foram analisados por intermédio do procedimento GLM do SAS 9.4 (SAS System Inc., Cary, NC, USA). Os locais, os inoculantes e a interação entre os fatores, foram consideradas efeitos fixos no modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + I_j + (L \times I)_{ij} + e_{ijk}$$

Onde, Y_{ijk} = variável dependente; μ = média geral; L_i = efeito de local i ; I_j = efeito de inoculante j ; $(L \times I)_{ij}$ = interação entre os fatores i e j ; e_{ijk} = erro aleatório, assumindo uma distribuição normal independente (NID), $(0; \sigma^2\epsilon)$.

A homogeneidade das variâncias entre os tratamentos foi assumida e as variáveis referentes ao perfil fermentativo, população microbiana e composição química foram submetidas à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste Tukey, considerando-se 0,05 como nível crítico para ocorrência do erro tipo I.

3. RESULTADOS

3.1. Forragem antes da ensilagem

O teor de MS, a concentração de CHOs e a população de BAL na planta *in natura* variaram de 265,1 a 347,0 g kg⁻¹ MN, de 92,3 a 152,3 g kg⁻¹ MS, e, de 6,47 a 6,84 log UFC g⁻¹, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 - Composição química (g kg⁻¹ MS), população microbiana (log UFC g⁻¹) e pH da forragem de milho colhidas em diferentes locais antes da ensilagem

Itens ^a	LOCAL ^b				
	L1	L2	L3	L4	L5
MS (g kg ⁻¹ MN)	347,0	325,7	272,9	265,1	297,2
MM	39,7	50,8	56,0	42,0	41,9
PB	72,2	72,7	85,7	81,6	72,2
FDN	434,7	492,2	460,8	476,9	466,1
FDA	213,6	247,7	215,6	232,4	224,3
PIDA (g kg ⁻¹ PB)	19,6	24,6	19,1	13,4	22,3
CHOs	92,3	152,3	106,4	136,2	146,1
pH	5,75	5,61	5,81	5,78	5,59
Populações microbianas					
BAL	6,59	6,84	6,64	6,47	6,61
Enterobactérias	6,61	6,72	6,61	6,51	7,03
Leveduras	7,79	7,49	7,54	6,64	7,27
Mofos	5,77	5,92	4,73	4,5	4,50

^a MS: Matéria seca; MM: Matéria mineral; PB: Proteína bruta; FDN: Fibra em detergente neutro; FDA: Fibra em detergente ácido; PIDA: Proteína insolúvel em detergente ácido; CHOs: Carboidratos solúveis e BAL: Bactérias do ácido lático.

^b L1: Canaã; L2: Coimbra; L3: Teixeiras; L4: Viçosa e L5: Visconde do Rio Branco.

3.2. Composição química, perfil fermentativo e população microbiana das silagens

O erro padrão da média (EPM) e o *P*-valor das características químicas e fermentativas das silagens encontram-se na Tabela 5. Houve efeito de interação L×I (*P*≤0,05) sobre as variáveis PB, FDN, PIDA, CHOs, N-NH₃, pH e população de BAL. As variáveis MM, FDA, ácido lático, ácido acético, mofos e leveduras foram afetadas pelo local (*P*≤0,02) e pelo inoculante (*P*≤0,05), enquanto a MS foi influenciada apenas pelo local (*P*<0,001). A RMS não foi afetada pelas fontes de variação estudadas.

Tabela 5 - *P*-valor e erro padrão da média (EPM) das variáveis da composição química, recuperação de matéria seca (RMS), perfil fermentativo, populações microbianas e pH de silagens de milho de diferentes locais inoculadas com diferentes cepas de *Lactobacillus buchneri*

Itens ^a	<i>P</i> -valor ^b			EPM
	Local	Inoculante	Local×Inoculante	
Composição química				
MS	<0,001	0,051	0,517	0,396

MM	<0,001	0,003	0,149	0,078
PB	<0,001	0,001	0,005	0,098
FDN	<0,001	0,012	0,014	0,378
FDA	<0,001	0,032	0,087	0,292
PIDA	<0,001	<0,001	<0,001	0,095
CHOs	<0,001	0,554	0,018	0,010
Perfil fermentativo				
N-NH ₃	<0,001	<0,001	<0,001	0,102
Ácido láctico	0,001	<0,001	0,344	0,198
Ácido Acético	0,003	<0,001	0,621	0,120
pH	<0,001	<0,001	<0,001	0,019
RMS	0,270	0,100	0,853	0,542
Populações microbianas				
BAL	0,001	<0,001	0,005	0,079
Mofos	0,022	0,008	0,281	0,077
Leveduras	<0,001	0,050	0,080	0,070

^a MS: Matéria seca; MM: Matéria mineral; PB: Proteína bruta; FDN: Fibra em detergente neutro; FDA: Fibra em detergente ácido; PIDA: Proteína insolúvel em detergente ácido; CHOs: Carboidratos solúveis e BAL: Bactérias do ácido láctico.

^b Probabilidade de efeito de local, inoculante e de interação L×I.

O desdobramento do efeito de inoculante em cada local de estudo foi realizado para as variáveis afetadas pela interação L×I. No L1, observou-se menor teor de FDN ($P=0,032$) para a silagem LALSIL comparada a CON e aquela inoculada com LB 45.22, enquanto no L3, os maiores ($P=0,014$) valores foram observados para as silagens inoculadas (Tabela 6).

O teor de PB não diferiu ($P=0,406$) entre os inoculantes no L1. Entretanto, nos L2 e L3, as silagens inoculadas apresentaram maior teor de PB em relação à silagem CON. Foi observado maior teor de PIDA ($P\leq 0,017$) na silagem CON no L1. Nos L2 ($P=0,508$) e L4 ($P=0,474$), os teores de PIDA não diferiram entre as silagens.

Observou-se maior teor de N-NH₃ para a silagem inoculada com LB 90.14 e para a silagem controle, nos locais L1 e L3, respectivamente (Tabela 6), enquanto no L5, os valores deste constituinte foram semelhantes ($P=0,110$) entre as silagens.

Foi observado efeito de inoculante sobre os teores de CHOs apenas em L3, registrando-se maior valor ($P=0,039$) na silagem inoculada com LB 90.14 comparada à silagem inoculada com LALSIL (Tabela 6).

Foram registradas menores populações de BAL para a silagem CON em todos os locais, exceto em L5, onde a população desse grupo microbiano foi semelhante ($P=0,115$) entre as silagens (Tabela 6).

Tabela 6 - Composição química, perfil fermentativo e população microbiana de silagens de milho de diferentes locais inoculadas com diferentes cepas de *Lactobacillus buchneri*

Inoculante ^a	Local ^b				
	L1	L2	L3	L4	L5
FDN ^c (g kg ⁻¹ MS)					
CON	445,8 Aab	409,4 Ab	415,5 Bab	461,6 Aa	441,3 Aab
LALSIL	400,5 Bb	379,8 Ab	458,0 Aa	459,8 Aa	431,2 Aab
LB 45.22	445,6 Aabc	407,1 Ac	469,4 Aab	479,3 Aa	424,5 Abc
LB 90.14	425,2 ABbc	410,8 Ac	474,7 Aa	469,8 Aab	456,2 Aabc
PB ^c (g kg ⁻¹ MS)					
CON	80,0 Aab	65,4 Bc	85,0 Ba	77,3 Bb	69,7 Bc
LALSIL	78,3 Ab	69,3 Abc	92,9 Aa	81,6 ABb	75,4 ABbc
LB 45.22	76,7 Ac	71,8 Abc	95,1 Aa	84,8 Ab	73,9 ABc
LB 90.14	76,0 Abc	73,7 Ac	95,0 Aa	82,5 ABb	76,7 Abc
PIDA ^c (g kg ⁻¹ PB)					
CON	34,6 Aa	29,9 Aa	15,3 Ab	30,5 Aa	33,8 Aa
LALSIL	21,3 Bab	27,8 Aa	11,6 ABb	30,7 Aa	25,0 Ba
LB 45.22	13,3 Bb	28,8 Aa	13,9 ABb	28,9 Aa	25,5 Ba
LB 90.14	21,9 Bb	23,9 Ab	9,8 Bc	33,5 Aa	26,4 ABab
N-NH ₃ /NT					
CON	2,21 Cbc	1,72 Bc	3,07 Aab	1,64 Cc	3,34 Aa
LALSIL	2,14 Cbc	4,25 Aa	1,46 Bc	2,93 Ab	2,91 Ab
LB 45.22	2,94 Bb	1,50 Bd	1,99 Bcd	2,73 ABbc	3,83 Aa
LB 90.14	3,59 Aa	3,63 Aa	1,79 Bb	2,38 Bb	3,28 Aa
CHOs ^c (g kg ⁻¹ MS)					
CON	5,6 Ab	6,0 Aab	7,4 Aba	6,2 Aab	6,6 Aab
LALSIL	5,9 Aa	5,5 Aa	6,1 Ba	7,3 Aa	5,9 Aa
LB 45.22	5,9 Ab	5,3 Ab	7,5 Aba	6,3 Aab	6,2 Aab
LB 90.14	5,8 Ab	5,7 Ab	8,0 Aa	6,3 Ab	6,2 Ab
pH					
CON	3,60 Cab	3,63 Ba	3,56 Cbc	3,52 Dc	3,59 Dab
LALSIL	3,78 Ba	3,70 ABa	3,72 Ba	3,67 Ca	3,64 Ca
LB 45.22	3,99 Aa	3,85 Ab	3,89 Aab	4,02 Aa	3,96 Aab
LB 90.14	4,04 Aa	3,87 Ab	3,90 Aab	3,85 Bb	3,90 Bab
BAL ^c (log UFC g ⁻¹)					
CON	7,71 Ca	6,81 Bb	7,85 Ba	7,82 Ca	7,51 Aa
LALSIL	8,47 Ba	8,55 Aa	8,84 Aa	8,47 Ba	8,55 Aa
LB 45.22	8,78 Bab	8,96 Aab	9,06 Aa	9,04 Aa	8,15 Ab
LB 90.14	9,39 Aa	8,82 Aa	8,77 Aa	8,88 ABa	8,34 Aa

^a CON: silagem sem inoculante; LALSIL: Lalsil As.

^b L1: Canaã; L2: Coimbra; L3: Teixeiras; L4: Viçosa e L5: Visconde do Rio Branco.

^c PB: Proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; PIDA: proteína insolúvel em detergente ácido; CHOs: carboidratos solúveis em água e BAL: bactérias do ácido lático.

Letras iguais minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 0,05 de probabilidade para o erro tipo I.

Foi observado maior teor de MM ($P=0,003$) para a silagem inoculada com LB 45.22 em relação a silagem CON e LALSIL. Em relação aos ácidos orgânicos, as maiores concentrações de ácido lático ($P<0,001$) foram observadas para a silagem CON e LALSIL em relação a silagem inoculada com LB 45.22 e LB 90.14. Maiores concentrações de ácido acético

($P < 0,001$) foram observadas para a silagem LB 45.22 e LB 90.14 em relação ao CON e LALSIL. Menores populações de mofos ($P = 0,008$) foram observadas para LB 90.14 em relação a silagem CON e maior população de leveduras ($P = 0,05$) para as silagens CON em relação ao LALSIL e LB 45.22 (Tabela 7).

Em relação ao efeito de local, foi observado maior ($P < 0,001$) teor de MS para a silagem produzida em L1 em relação aos demais locais. As concentrações de ácido láctico ($P = 0,001$) e ácido acético ($P = 0,003$) foram maiores para a silagem do L4 em relação a silagem do L1 e L2, respectivamente. Os teores de MM ($P < 0,001$) e FDA ($P < 0,001$) foram maiores para a silagem do L4. Foram observadas maiores populações de mofos ($P < 0,001$) e leveduras ($P < 0,001$) para a silagem do L2 (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito de Local e Inoculante sobre a composição química (g kg^{-1} MS), recuperação de matéria seca (RMS; g kg^{-1} MS), perfil fermentativo (g kg^{-1} MS) e população microbiana ($\log \text{UFC g}^{-1}$) de silagens de milho de diferentes locais tratadas com diferentes cepas de *Lactobacillus buchneri*

Itens ^a	Inoculante ^b				Local ^c				
	CON	LALSIL	LB 45.22	LB 90.14	L1	L2	L3	L4	L5
MS (g kg^{-1} MN)	285,5	283,7	273,6	278,2	326,4 a	303,0 b	254,1 d	237,4 e	278,0 c
MM	35,1 b	35,7 b	40,7 a	36,9 ab	30,5 c	36,1 b	38,2 b	44,0 a	36,5 b
FDA	232,1	230,1	240,6	244,4	226,5 cd	211,9 d	247,7 b	265,6 a	232,3 bc
RMS	937,3	930,5	910,7	903,3	932,2	919,7	919,4	898,3	932,8
Ácido láctico	47,2a	43,2a	26,0b	22,6b	25,9c	38,7ab	32,3bc	42,8a	34,0abc
Ácido acético	14,2c	19,7b	30,2a	26,6a	20,6bc	17,5c	24,2ab	27,3a	21,6abc
Mofos	3,03 a	2,73 ab	2,89 ab	2,62 b	2,81 b	3,53 a	2,61 b	2,45 b	2,70 b
Leveduras	3,98 a	3,33 b	3,42 b	3,47 ab	3,40 b	4,06 a	3,48 ab	3,41 b	3,40 b

^a MS: Matéria seca; MM: Matéria mineral; FDA: Fibra em detergente ácido.

^b CON: silagem sem inoculante; LALSIL: Lalsil As.

^c L1: Canaã; L2: Coimbra; L3: Teixeiras; L4: Viçosa e L5: Visconde do Rio Branco.

Letras iguais minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 0,05 de probabilidade para o erro tipo I.

3.3. Estabilidade aeróbia

Foi observado efeito da interação L×I ($P<0,05$) para todas as variáveis avaliadas, exceto para T. máx. ($P=0,339$), que foi afetada por local ($P<0,001$) e por inoculante ($P<0,001$), e a RMS, que não foi afetada por nenhum dos fatores avaliados (Tabela 8).

Tabela 8 - P -valor e erro padrão da média (EPM) das variáveis matéria seca, perfil fermentativo, pH, estabilidade aeróbia e populações microbianas de silagens de milho de diferentes locais inoculadas com diferentes cepas de *Lactobacillus buchneri*, após sete dias de exposição aeróbia

Itens ^a	P -valor ^b			EPM
	Local	Inoculante	Local×Inoculante	
MS	<0,001	0,434	<0,001	0,436
CHOs	<0,001	<0,001	<0,001	0,010
Ácido lático	0,187	0,095	<0,001	0,102
Ácido acético	<0,001	<0,001	0,049	0,148
pH	<0,001	<0,001	0,005	0,140
RMS	0,080	0,365	0,078	0,297
EA	<0,001	<0,001	<0,001	5,948
T. máx.	<0,001	<0,001	0,339	0,584
Mofos	<0,001	<0,001	0,022	0,220
Leveduras	<0,001	<0,001	0,008	0,204

^a MS: Matéria Seca; CHOs: Carboidratos residuais; RMS: Recuperação de matéria seca; EA: Estabilidade aeróbia e T. máx.: Temperatura máxima.

^b Probabilidade de efeito de local, inoculante e de interação L×I.

No estudo do desdobramento do efeito de inoculante em cada local, observou-se menor EA ($P<0,001$) para a silagem CON em todos os locais, exceto em L2 e L4, em que a silagem CON apresentou menor valor após 7 dias de exposição aeróbia (Tabela 9).

Após a sete dias de exposição aeróbia, as concentrações de ácido lático ($P<0,001$) foram maiores para a silagem CON no L1 em relação a silagem inoculada com LB 45.22 e, a silagem LALSIL no L3 e L5 do que as demais silagens e a silagem CON, respectivamente. Quanto as concentrações de ácido acético ($P=0,049$), a silagem inoculada com LB 45.22 e LB 90.14 no L1 foram maiores em relação as demais silagens e a silagem LB 45.14, LB 90.14 e a CON tiveram maiores concentrações em relação a LALSIL no L5.

Os valores de pH ($P=0,004$), após a exposição aeróbia, foi maior na silagem inoculada com LB 45.22, no L1, comparada a silagem CON. Entretanto, nos locais L2 e L4, não houve diferença entre o pH ($P\geq 0,337$) das silagens. A silagem CON apresentou maior pH em L3 (Tabela 9).

Foi observada maior contagem de leveduras nas silagens CON produzidas em L3 e L5. Em L2, foi registrada maior população deste grupo microbiano, para a silagem CON e LALSIL,

comparada as silagens inoculadas LB 45.22 e LB 90.14. Em L4, foram observadas populações semelhantes de leveduras entre as silagens (Tabela 9). Observou-se maior contagem de mofos ($P \leq 0,001$) na silagem CON produzidas em L1 e L5. No L3, as silagens inoculadas com LB 45.22 e LB 90.14 apresentaram as menores ($P = 0,002$) contagens de mofos, comparadas a CON.

Os teores de CHOs residuais ($P = 0,002$) foram maiores para a silagem inoculada com LB 45.22 no L1. No entanto, não houve efeito de inoculante sobre os teores de CHOs residuais das silagens em L2 e L3. Por outro lado, observou-se maior teor de CHOs na silagem CON em relação às silagens inoculadas LB 45.22, em L4 e L5 (Tabela 9). As silagens CON e LALSIL apresentaram maiores teores de MS ($P = 0,012$) comparadas à LB 45.22, no L1. Nos locais L2, L4 e L5 os teores de MS ($P \geq 0,059$) não diferiram entre as silagens (Tabela 9).

Tabela 9 - Estabilidade aeróbia, perfil fermentativo, pH e população microbiana de silagens de milho de diferentes locais inoculadas com diferentes cepas de *Lactobacillus buchneri*, após sete dias de exposição aeróbia

Inoculante ^a	Local ^b				
	L1	L2	L3	L4	L5
Estabilidade aeróbia (h)					
CON	142,41 Ba	33,46 Bb	42,72 Cb	51,72 Bb	56,83 Bb
LALSIL	168 Aa	63,22 ABb	110,33 Bab	113,71 ABab	143,17 Aa
LB 45.22	168 Aa	80,63 ABb	168 Aa	145,83 ABa	168 Aa
LB 90.14	168 Aa	98,42 Ab	110,39 Bab	168 Aa	158,04 Aa
Ácido láctico (g kg ⁻¹ MS)					
CON	18,3A	13,3	0,7B	18,6	0,8B
LALSIL	11,9ABab	2,0b	15,4Aa	3,2b	17,2Aa
LB 45.22	00,8C	13,1	2,6B	3,7	9,5AB
LB 90.14	3,8BCab	2,0b	4,1Bab	3,3ab	11,8ABa
Ácido acético (g kg ⁻¹ MS)					
CON	5,0Bb	1,5b	24,1ab	6,7ab	26,4Aa
LALSIL	8,3ABab	2,7ab	14,5a	1,0b	10,2Bb
LB 45.22	21,4Aab	7,9c	22,6ab	14,3bc	27,6Aa
LB 90.14	22,1A	4,4	19,8	29,0	30,1A
pH					
CON	3,87 Cb	6,63 Aa	6,51 Aa	5,41 Aa	6,40 Aa
LALSIL	3,90 CBb	6,65 Aa	3,80 Cb	5,69 Aab	5,07 ABab
LB 45.22	4,26 Ab	5,79 Aa	4,10 Bb	4,47 Ab	4,20 Bb
LB 90.14	4,18 ABa	6,43 Aa	4,10 Ba	4,62 Aa	4,30 Ba
Leveduras (log UFC g ⁻¹)					
CON	7,06 Ab	9,09 Aa	9,23 Aa	7,80 Aab	8,91 Aa
LALSIL	6,55 ABab	8,84 Aa	6,72 Bab	6,26 Ab	6,54 Bab
LB 45.22	4,82 Cb	7,28 Ba	4,42 Cb	5,16 Ab	4,09 Cb
LB 90.14	5,13 BCb	7,70 Ba	4,58 Cb	6,02 Aab	4,88 BCb
Mofos (log UFC g ⁻¹)					
CON	5.49 Aab	7.11 Aa	5.15 Aab	4.42 Ab	7.32 Aa
LALSIL	3.23 Bb	7.15 Aa	3.47 ABb	4.68 Ab	4.10 Bb
LB 45.22	2.72 Bb	5.64 Aa	2.47 Bb	2.56 Ab	2.78 Bb

LB 90.14	2.53 Ba	4.53 Aa	2.39 Ba	4.31 Aa	2.76 Ba
CHOs ^c (g kg ⁻¹ MS)					
CON	2,40 Bb	4,45 Aa	3,23 Ab	4,85 Aa	4,88 Aa
LALSIL	2,25 Bc	3,60 Aab	2,78 Abc	4,28 ABa	3,73 ABab
LB 45.22	3,68 Aa	3,60 Aab	2,90 Aab	2,65 Cb	2,93 Bab
LB 90.14	2,40 Ba	3,55 Aa	3,05 Aa	3,50 BCa	3,45 ABa
MS ^c (g kg ⁻¹ MN)					
CON	353,8 Aa	309,9 Ab	253,6 Bc	247,7 Ac	266,4 Ac
LALSIL	348,9 Aa	315,7 Ab	266,2 ABcd	240,3 Ad	282,0 Ac
LB 45.22	320,5 Ba	317,7 Aa	259,0 ABc	238,3 Ac	284,1 Ab
LB 90.14	341,4 ABa	305,3 Ab	282,7 Ab	227,3 Ac	283,5 Ab

^a CON: silagem sem inoculante; LALSIL: Lalsil As.

^b L1: Canaã; L2: Coimbra; L3: Teixeiras; L4: Viçosa e L5: Visconde do Rio Branco.

^c MS: matéria seca; CHOs: carboidratos residuais

Letras iguais minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 0,05 de probabilidade para o erro tipo I.

As silagens produzidas em L2 apresentaram maior ($P<0,001$) T. máx. em relação às dos demais locais. Avaliando-se o efeito de inoculante, observou-se maior ($P<0,001$) T. máx. para a silagem CON, comparada aquelas inoculadas com LB 45.22 e LB 90.14 (Tabela 9).

Tabela 10 - Efeito de Local e Inoculante sobre a recuperação de matéria seca (g kg^{-1} MS) e temperatura máxima ($^{\circ}\text{C}$) de silagens de milho de diferentes locais inoculadas com diferentes cepas de *Lactobacillus buchneri*, após sete dias de exposição aeróbia.

Itens ^a	Inoculante ^b				Local ^c				
	COM	LALSIL	LB 45.22	LB 90.14	L1	L2	L3	L4	L5
T. máx.	30,83 a	28,43 ab	26,13 b	25,98 b	25,24 bc	33,29 a	24,45 c	28,32 b	27,89 bc

^a RMS: Recuperação de matéria seca; T. máx.: Temperatura máxima.

^b CON: silagem sem inoculante; LALSIL: Lalsil As.

^c L1: Canaã; L2: Coimbra; L3: Teixeiras; L4: Viçosa e L5: Visconde do Rio Branco.

Letras iguais minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 0,05 de probabilidade para o erro tipo I.

4. DISCUSSÃO

4.1. Composição química, perfil fermentativo e população microbiana das silagens

Os teores de MS inferiores a 300 g kg⁻¹, da forragem colhida nos locais L3, L4 e L5, não comprometeram a fermentação de suas respectivas silagens, provavelmente compensados pelo adequado teor de carboidratos solúveis em água (McDonald et al., 1991) e populações de BAL (Muck, 1990), uma vez que o êxito do processo de ensilagem depende da interação desses três fatores. É importante destacar que por ocasião da colheita (fevereiro), ocorreram chuvas intensas nos locais onde o milho foi colhido, superando em 227,28% a média histórica de 30 anos de precipitação, após um longo período de estiagem no mês de janeiro. Embora o mesmo híbrido tenha sido usado em todos os locais, possivelmente, as diferenças de ambiente de cultivo, podem ter influenciado o teor de MS das plantas (Gharechahi et al., 2017; Guan et al., 2018).

No geral, os teores de MS e de CHOs diminuíram após a fermentação, como resultado do consumo dos CHOs que são convertidos em ácido orgânicos, juntamente com formação de CO₂ e água, dependendo da rota metabólica utilizada pelos microrganismos envolvidos na fermentação (Dunière et al., 2013).

No presente estudo, silagens inoculadas com *L. buchneri* apresentaram, em geral, valores de pH mais elevados, maiores concentrações de ácido acético, menores populações de mofo e leveduras e maior estabilidade aeróbia. Altos valores de pH para silagens inoculadas com *L. buchneri* tem sido relacionado com a conversão do ácido láctico em ácido acético e 1,2 propanodiol (Oude Elferink et al., 2001). O ácido acético é um ácido mais fraco que o láctico e, portanto, menos eficiente em acidificar o meio (Kung et al., 2018). Contudo, independentemente do local e inoculante, todas as silagens apresentaram pH abaixo do limite superior de 4,0, referência para silagens de boa qualidade (Kung et al., 2018).

As maiores concentrações de ácido acético na silagem inculada com LB 45.22 e LB 90.14 inibiram a deterioração por mofo e leveduras (Driehuis et al., 1999; Nair et al., 2020; Arriola et al., 2021), uma vez que, as leveduras são assimiladoras de ácido láctico e são responsáveis por iniciar a deterioração aeróbia nas silagens (Pahlow et al., 2003). O ácido acético possui ação antifúngica maior que o ácido láctico, resultante da diferença de pKa entre eles. O ácido acético possui pKa de 4,76, permitido que ele fique na sua forma não dissociada na silagem, dessa forma ele se torna permeável na membrana das leveduras e ao entrar na célula,

o ácido se dissocia liberando prótons, causando acidificação do meio intracelular, levando a morte da levedura por exaustão energética ou desnaturação de suas proteínas (Moon, 1983; Stratford et al., 2013). Concentrações maiores de ácido acético (aprox. 3 a 4% MS) são frequentemente encontradas em silagens inoculadas com *L. buchneri* (Kung et al., 2018).

A RMS foi semelhante entre as silagens, com valor médio de 919,28 g kg⁻¹. Em estudos de meta-análise que avaliaram o efeito da inoculação com *L. buchneri* nas características fermentativas de silagens, Kleinschmit e Kung, (2006) e Arriola et al. (2021) reportaram perdas de MS de 1% e 0,7%, respectivamente, maiores em comparação à silagem não tratada. No entanto, esses autores sugeriram que as perdas são geralmente mínimas, ou seja, quase insignificantes, perante a melhoria da EA.

Os menores teores de FDN da silagem inoculada com LALSIL no L1, comparada ao CON e a LB45.22, e da silagem CON no L3, possivelmente decorra da hidrólise ácida da hemicelulose (Köhler et al., 2019; McDonald et al., 1991), uma vez que os inoculantes usados não apresentam enzimas fibrolíticas em sua composição.

Todas as silagens avaliadas apresentaram concentrações de N-NH₃ inferiores a 10% do NT, o que permite classificá-las como de boa qualidade, com base em critérios estabelecidos por McDonald et al. (1991) e Kung et al. (2018).

A maior contagem de BAL nas silagens inoculadas, com exceção do L5, indica que os microrganismos presentes nos inoculantes foram capazes de superar a microbiota epifítica. Esse resultado corrobora com os encontrados por Arriola et al. (2021b), que observaram aumento da população de BAL em silagem de milho inoculada com *L. buchneri*.

4.2. Estabilidade aeróbia

Segundo Muck et al. (2018) e Blajman et al. (2018), o *L. buchneri* é uma BAL heterofermentativa muito usada para melhorar a estabilidade aeróbia em silagens, a partir da produção de ácido acético, o qual possui atividade antifúngica. No nosso estudo, todas as silagens inoculadas produzidas nos locais L1, L3 e L5 apresentaram maior estabilidade aeróbia que as silagens CON. Nas silagens produzidas em L2 e L4, apenas a silagem tratada com LB 90.14 apresentou maior EA em comparação a CON. Kung et al. (1998) estimaram que a estabilidade aeróbia pode atingir zero, quando a população de leveduras é $\geq 6 \log \text{ UFC g}^{-1}$. Todas as silagens controle produzidas nos cinco locais do presente estudo, bem como, todas aquelas produzidas no local 2, inoculadas ou não, apresentaram populações superiores a esse valor. Além disso, apresentaram as maiores T. máx., estimulando ainda mais o crescimento de

leveduras (Kung et al., 2018). Populações de fungos superiores a $5 \log \text{ UFC g}^{-1}$ tornam as silagens propensas a maior deterioração aeróbia (Woolford, 1990). No nosso estudo, exceto no local L4, as silagens CON apresentaram valores superiores a este, bem como as silagens tratadas com LALSIL e LB 45.22, no L2.

As leveduras, geralmente são tolerantes ao meio ácido e utilizam, além dos CHOs residuais, o ácido lático como substrato para seu crescimento (Pahlow et al., 2003), o que explica os maiores valores de pH da silagem CON do L3 e L5, bem como, as menores concentrações de ácido lático, maiores populações de mofos e leveduras, e a maior T. máx. observada nas silagens CON, em relação as inoculadas. Esses aumentos indicam a intensa atividade metabólica desses microrganismos.

Além disso, as maiores concentrações de ácido acético na silagem inoculada com LB 45.22 e LB 90.14, após sete dias de exposição ao ar, foram suficientes para manter baixa a população de mofos e leveduras, refletindo em maior tempo de EA dessas silagens. Em revisão, Borreani et al. (2018) observaram alta correlação entre as perdas de MS e contagem de mofos. Entretanto, no presente estudo, não houve diferenças significativas para a RMS.

As silagens do L2 apresentaram maiores contagens de mofos e leveduras na abertura dos silos em relação aos demais locais, o que poderia explicar a menor EA das silagens desse local. Possivelmente, isso ocorreu devido às diferenças das condições da cultura em cada local. Pois, o local onde a cultura de milho foi cultivada influencia a população microbiana epifítica e o estágio de maturidade pode influenciar o conteúdo de MS, a concentração de CHOs, o resultado da inoculação de silagens e, conseqüentemente, podem afetar os resultados da EA (Schmidt and Kung, 2010; Wang et al., 2021a).

5. CONCLUSÃO

As cepas LB 45.22 e LB 90.14 foram eficientes em reduzir a população de leveduras e mofos, e melhorar a estabilidade aeróbia de silagens de milho, apresentando potencial de uso como inoculantes na produção de silagens.

REFERÊNCIAS

- AOAC. Official Methods of Analysis, fifteenth ed. Arlington, V. A., USA (1990).
- Arriola, K.G., Oliveira, A.S., Jiang, Y., Kim, D., Silva, H.M., Kim, S.C., Amaro, F.X., Ogunade, I.M., Sultana, H., Pech Cervantes, A.A., Ferraretto, L.F., Vyas, D., Adesogan, A.T., 2021a. Meta-analysis of effects of inoculation with *Lactobacillus buchneri*, with or without other bacteria, on silage fermentation, aerobic stability, and performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 104, 7653–7670. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19647>
- Arriola, K.G., Vyas, D., Kim, D., Agarussi, M.C.N., Silva, V.P., Flores, M., Jiang, Y., Yanlin, X., Pech-Cervantes, A.A., Ferraretto, L.F., Adesogan, A.T., 2021b. Effect of *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus buchneri*, or their combination on the fermentation and nutritive value of sorghum silage and corn silage. *J. Dairy Sci.* 104, 9664–9675. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19512>
- Auerbach, H., Nadeau, E., 2020. Effects of additive type on fermentation and aerobic stability and its interaction with air exposure on silage nutritive value. *Agronomy* 10, 1–16. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091229>
- Blajman, J.E., Páez, R.B., Vinderola, C.G., Lingua, M.S., Signorini, M.L., 2018. A meta-analysis on the effectiveness of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for corn silage. *J. Appl. Microbiol.* 125, 1655–1669. <https://doi.org/10.1111/jam.14084>
- Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R.J., Holmes, B.J., Muck, R.E., 2018. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *J. Dairy Sci.* 101, 3952–3979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>
- Costa, D.M., Carvalho, B.F., Bernardes, T.F., Schwan, R.F., Ávila, C.L. da S., 2021. New epiphytic strains of lactic acid bacteria improve the conservation of corn silage harvested at late maturity. *Anim. Feed Sci. Technol.* 274. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114852>
- Da Silva, N.C., Nascimento, C.F., Nascimento, F.A., de Resende, F.D., Daniel, J.L.P., Siqueira, G.R., 2018. Fermentation and aerobic stability of rehydrated corn grain silage treated with different doses of *Lactobacillus buchneri* or a combination of *Lactobacillus plantarum* and

- Pediococcus acidilactici*. *J. Dairy Sci.* 101, 4158–4167. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13797>
- Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H., Spoelstra, S.F., 1999. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *J. Appl. Microbiol.* 87, 583–594. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00856.x>
- Dunière, L., Sindou, J., Chaucheyras-Durand, F., Chevallier, I., Thévenot-Sergentet, D., 2013. Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 182, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.04.006>
- Gharechahi, J., Kharazian, Z.A., Sarikhan, S., Jouzani, G.S., Aghdasi, M., Hosseini Salekdeh, G., 2017. The dynamics of the bacterial communities developed in maize silage. *Microb. Biotechnol.* 10, 1663–1676. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12751>
- Guan, H., Shuai, Y., Yan, Y., Ran, Q., Wang, X., Li, D., Cai, Y., Zhang, X., 2020. Microbial community and fermentation dynamics of corn silage prepared with heat-resistant lactic acid bacteria in a hot environment. *Microorganisms* 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050719>
- Guan, H., Yan, Y., Li, Xiaoling, Li, Xiaomei, Shuai, Y., Feng, G., Ran, Q., Cai, Y., Li, Y., Zhang, X., 2018. Microbial communities and natural fermentation of corn silages prepared with farm bunker-silo in Southwest China. *Bioresour. Technol.* 265, 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.018>
- Heinl, S., Wibberg, D., Eikmeyer, F., Szczepanowski, R., Blom, J., Linke, B., Goesmann, A., Grabherr, R., Schwab, H., Pühler, A., Schlüter, A., 2012. Insights into the completely annotated genome of *Lactobacillus buchneri* CD034, a strain isolated from stable grass silage. *J. Biotechnol.* 161, 153–166. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.03.007>
- Jobim, C.C., Nussio, L.G., Reis, R.A., Schmidt, P., 2007. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada Methodological advances in evaluation. *Rev. Bras. Zootec.* 36, 101–119.
- Kleinschmit, D.H., Kung, L., 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. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72444-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72444-4)
- Köhler, B., Taube, F., Ostertag, J., Thurner, S., Kluß, C., Spiekers, H., 2019. Dry-matter losses and changes in nutrient concentrations in grass and maize silages stored in bunker silos. *Grass Forage Sci.* 74, 274–283. <https://doi.org/10.1111/gfs.12430>
- Kung, L., Savage, R.M., da Silva, E.B., Polukis, S.A., Smith, M.L., Johnson, A.C.B., Miller, M.A., 2021. The effects of air stress during storage and low packing density on the fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* 40788. *J. Dairy Sci.* 104, 4206–4222. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19746>
- Kung, L., Shaver, R.D., Grant, R.J., Schmidt, R.J., 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 101, 4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
- Kung, L., Sheperd, A.C., Smagala, A.M., Endres, K.M., Bessett, C.A., Ranjit, N.K., Glancey, J.L., 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. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75695-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75695-4)
- Licitra, G., Hernandez, T.M., Van Soest, P.J., 1996. Feedbunk management evaluation techniques. *Anim. Feed Sci. Technol.* 57, 347–358.
- McDonald P., Henderson, A. R. & Heron, S. J. E. *Biochemistry of Silage* 340 (Marlow Chalcombe Publications, 1991).
- Moon, N. J. (1983). Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate , lactate and propionate and their synergistic mixtures, 453–460.
- MUCK, R.E., 1990. Prediction of lactic acid bacterial numbers on lucerne. *Grass Forage Sci.* 45, 273–280. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1990.tb01950.x>
- Muck, R.E., Nadeau, E.M.G., McAllister, T.A., Contreras-Govea, F.E., Santos, M.C., Kung, L., 2018. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *J. Dairy Sci.* 101, 3980–4000. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>
- Nair, J., Huaxin, N., Andrada, E., Yang, H.E., Chevaux, E., Drouin, P., McAllister, T.A., Wang, Y., 2020. Effects of inoculation of corn silage with *Lactobacillus hilgardii* and

- Lactobacillus buchneri on silage quality, aerobic stability, nutrient digestibility, and growth performance of growing beef cattle. *J. Anim. Sci.* 98, 1–11. <https://doi.org/10.1093/JAS/SKAA267>
- Nelson, N., 1944. a Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375–380. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)71980-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)71980-7)
- O’Kiely, P., Muck, R.E., 1992. Aerobic deterioration of lucerne and maize silages-effects of yeasts. *J. Sci. Food Agric.* 59, 139–144.
- Oude Elferink, S.J.W.H., Krooneman, E.J., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F., Faber, F., Driehuis, F., 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 125–132. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-132.2001>
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Elfrink, S.J., Oude Elferink, S.J.W., Spoelstra, S.F., 2003. Microbiology of Ensiling. *Silage Sci. Technol.* 31–93.
- Reich, L.J., Kung, L., 2010. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 159, 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.06.002>
- SBCS, 2018. Sistema brasileiro de classificação de solos, Embrapa Solos.
- Schmidt, R.J., Kung, 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. *J. Dairy Sci.* 93, 1616–1624. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2555>
- Senger, C.C.D., Kozloski, G. V., Bonnacarrère Sanchez, L.M., Mesquita, F.R., Alves, T.P., Castagnino, D.S., 2008. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 146, 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.12.008>
- Siegfried, V. R., Ruckemann, H., Stumpf, G. (1984). Eine HPLC-methode zur bestimmung organischer säuren in silagen. *Landwirtsch Forsch*, 37, 298-304.
- Silva, L.D., Pereira, O.G., Silva, T.C., Leandro, E.S., Paula, R.A., Santos, S.A., Ribeiro, K.G., Valadares Filho, S.C., 2018. Effects of *Lactobacillus buchneri* isolated from tropical maize

- silage on fermentation and aerobic stability of maize and sugarcane silages. *Grass Forage Sci.* 73, 660–670. <https://doi.org/10.1111/gfs.12360>
- Stratford, M., Nebe-von-Caron, G., Steels, H., Novodvorska, M., Ueckert, J., & Archer, D. B. (2013). Weak-acid preservatives: pH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 161(3), 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.013>
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Wang, C., Han, H., Sun, L., Na, N., Xu, H., Chang, S., Jiang, Y., Xue, Y., 2021a. Bacterial succession pattern during the fermentation process in whole-plant corn silage processed in different geographical areas of northern China. *Processes* 9. <https://doi.org/10.3390/pr9050900>
- Wang, C., Sun, L., Xu, H., Na, N., Yin, G., Liu, S., Jiang, Y., Xue, Y., 2021b. Microbial communities, metabolites, fermentation quality and aerobic stability of whole-plant corn silage collected from family farms in desert steppe of North China. *Processes* 9. <https://doi.org/10.3390/pr9050784>
- Wang, S., Li, J., Dong, Z., Chen, L., Yuan, X., Shao, T., 2018. The effects of lactic acid bacteria strains isolated from various substrates on the fermentation quality of common vetch (*Vicia sativa* L.) in Tibet. *Grass Forage Sci.* 73, 639–647. <https://doi.org/10.1111/gfs.12363>
- Wilkinson, J.M., Muck, R.E., 2019. Ensiling in 2050: Some challenges and opportunities. *Grass Forage Sci.* 74, 178–187. <https://doi.org/10.1111/gfs.12418>
- Woolford, M.K., 1990. The detrimental effects of air on silage. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 101–116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02554.x>