

LEIDY DARMONY DE ALMEIDA RUFINO

**BACTÉRIAS LÁCTICAS BACTERIOCINOGENICAS EM SILAGEM DE
AMENDOIM FORRAGEIRO E DESEMPENHO DE BOVINOS DE CORTE
ALIMENTADOS COM SILAGEM E FENO DE ESTILOSANTES ASSOCIADOS
OU NÃO À SILAGEM DE MILHO**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, para
obtenção do título de Doctor Scientiae

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R926b
2014
Rufino, Leidy Darmony de Almeida, 1986-
Bactérias lácticas bacteriocinogênicas em silagem de
amendoim forrageiro e desempenho de bovinos de corte
alimentados com silagem e feno de estilosantes associados
ou não à silagem de milho / Leidy Darmony de Almeida
Rufino. - Viçosa, MG, 2014.
xiv, 107f. : il. ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador : Odilon Gomes Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Silagem. 2. Bovino de corte - Nutrição. 3. Bovino de
corte - Desempenho. 4. Bactérias produtoras de ácido láctico.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Zootecnia.
II. Título.

CDD 22. ed. 633.2

LEIDY DARMONY DE ALMEIDA RUFINO

BACTÉRIAS LÁCTICAS BACTERIOCINOGENÉICAS EM SILAGEM DE
AMENDOIM FORRAGEIRO E DESEMPENHO DE BOVINOS DE CORTE
ALIMENTADOS COM SILAGEM E FENO DE ESTILOSANTES ASSOCIADOS
OU NÃO À SILAGEM DE MILHO

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, para
obtenção do título de Doctor Scientiae

APROVADA: 2 de dezembro de 2014.

Sebastião de Campos Valadares Filho
(Coorientador)

Karina Guimarães Ribeiro
(Coorientadora)

Rilene Ferreira Diniz Valadares

José Augusto Gomes Azevêdo

Odilon Gomes Pereira
(Orientador)

Aos meus amados pais, Vanderlei e Elza, pelo apoio em todos os momentos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser presença constante em minha vida e por sempre ter-me dado mais do que pedi.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização do Curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo; e ao INCT-CA e à FAPEMIG, pelo apoio a esta pesquisa.

Ao Professor Odilon Gomes Pereira, pela oportunidade, orientação, confiança, pelos ensinamentos e pela amizade. Ser-lhe-ei sempre grata.

Ao Professor Sebastião de Campos Valadares Filho, pela colaboração na formulação das rações e pelas sugestões na realização deste trabalho.

À Professora Karina Guimarães Ribeiro, pela disponibilidade em me ajudar, pelas sugestões e pela amizade.

Ao Professor José Augusto Gomes Azevêdo, pela ajuda na Estatística, pelas sugestões e pela participação na banca examinadora.

À Professora Rilene Ferreira Diniz Valadares, pelas sugestões e pela participação na banca examinadora.

Ao Professor Fabyano Fonseca e Silva, pela ajuda na Estatística.

Aos demais professores do Departamento de Zootecnia, pelos valiosos ensinamentos.

Aos meus pais e às minhas irmãs Luana e Sâmara, pela torcida, pelo apoio e, principalmente, pela certeza de que posso contar com eles sempre. Agradecimento especial à Luana, por ter sido minha companheira em Viçosa durante todo o doutorado.

Ao Vinícios, por, mesmo distante, ter estado sempre presente em minha vida, pela paciência, pelo amor e pela compreensão; também à sua família, por todo o carinho.

A todos os meus familiares, especialmente os meus avós, pela torcida e por terem tanto orgulho de mim.

A toda equipe da CEPET, especialmente Zé Maria e Tião, pela ótima acolhida e ajuda durante o experimento.

Ao Rafael, por toda ajuda na CEPET e por ter cuidado do meu experimento como se fosse dele.

Ao Timão, pela ajuda no experimento, no laboratório, nas análises dos dados, na estatística... Enfim, por toda ajuda durante o doutorado.

À Mônica, ao Wemerson e, principalmente à Eliana, pela ajuda com a Microbiologia.

Aos amigos da Forragem: Vanessa, Mariele, Lucas, Leandro, Aline, Paula, Augusto, Douglas, Felipe, Néia, Lílían, Wender, Iana, Cássia, Helen e João Paulo, pela ajuda e, principalmente pela amizade.

À Ju, amiga querida, pelos bons momentos durante o doutorado e, por estar sempre disposta a ajudar.

Ao João Paulo (cunhado), por me ajudar sempre que precisei.

A todos os amigos do Departamento de Zootecnia, especialmente Gercino, pela amizade.

Ao Raimundo do Laboratório de Forragicultura e, aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal: Mário, Aline, Valdir, Vera, Wellington, Plínio, Fernando e, especialmente Monteiro, pelo auxílio nas análises.

Aos demais funcionários do Departamento de Zootecnia, pela ajuda nas mais diversas situações.

À Kelem, pela amizade e, por estar presente nos meus momentos importantes em Viçosa.

Aos professores da Unimontes, David e Virgílinho, pela amizade e pelo incentivo.

À querida Guae, por ter me acolhido de forma tão carinhosa em sua casa no período do estágio em 2009, quando minha história em Viçosa começou. Ser-lhe-ei sempre grata.

BIOGRAFIA

LEIDY DARMONY DE ALMEIDA RUFINO, filha de Vanderlei Rufino dos Santos e Elza Soares de Almeida Rufino, nasceu em 3 de janeiro de 1986, na cidade de Taiobeiras, Minas Gerais.

Em dezembro de 2003, concluiu o Curso Técnico em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Salinas, em Salinas, Minas Gerais.

Em julho de 2009, graduou-se em Agronomia pela Universidade Estadual de Montes Claros, em Janaúba, Minas Gerais.

Em agosto de 2009, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Zootecnia – na área de Forragicultura e Pastagens – da Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo-se à defesa da Dissertação em 15 de julho de 2011.

Em agosto de 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Zootecnia – na área de Forragicultura e Pastagens – da UFV, submetendo-se à defesa da Tese em 2 de dezembro de 2014.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	5

Capítulo I

EFEITO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS COM POTENCIAL BACTERIOCINOGENICO SOBRE A POPULAÇÃO DE MICRORGANISMOS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PERFIL FERMENTATIVO EM SILAGEM DE AMENDOIM FORRAGEIRO

Resumo	7
Abstract.....	9
1. Introdução.....	10
2. Material e métodos	11
2.1. Local do experimento e condições climáticas	11
2.2. Ensilagem do amendoim forrageiro	12
2.3. Delineamento experimental.....	12
2.4. Amostragens e procedimentos analíticos	13
3. Resultados.....	18
3.1. Composição química da planta antes da ensilagem.....	18
3.2. Características fermentativas, composição química e populações microbianas das silagens	18
3.3. Caracterização dos isolados de silagens de amendoim forrageiro	29
4. Discussão	31
5. Conclusões.....	35
Referências	36

Capítulo II

PARÂMETROS NUTRICIONAIS E DESEMPENHO PRODUTIVO DE BOVINOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO SILAGEM E FENO DE ESTILOSANTES CAMPO GRANDE ASSOCIADOS OU NÃO A SILAGEM DE MILHO

Resumo	41
Abstract.....	43
1. Introdução	45
2. Material e métodos	46
2.1. Local do experimento e condições climáticas	46
2.2. Dietas experimentais.....	47
2.3. Animais, manejo e coletas de amostras	49
2.4. Análises químicas	52
2.5. Análises estatísticas	54
3. Resultados.....	55
3.1. Digestibilidade aparente total, ruminal e intestinal dos nutrientes (EXP 2).....	55
3.2. Concentração de amônia e pH ruminal, e eficiência na utilização de nitrogênio (EXP 2).....	57
3.3. Consumo e digestibilidade total dos nutrientes (EXP 3).....	59
3.4. Desempenho produtivo (EXP 3)	62
4. Discussão	64
4.1. Digestibilidade aparente total, ruminal e intestinal dos nutrientes (EXP 2).....	64
4.2. Concentração de amônia e pH ruminal, e eficiência na utilização de nitrogênio (EXP 2).....	64
4.3. Consumo e digestibilidade total dos nutrientes (EXP 3).....	66
4.4. Desempenho produtivo (EXP 3)	68
5. Conclusões.....	70
Referências	70
Conclusões gerais	76

RESUMO

RUFINO, Leidy Darmony de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2014. **Bactérias lácticas bacteriocinogênicas em silagem de amendoim forrageiro e desempenho de bovinos de corte alimentados com silagem e feno de estilosantes associados ou não à silagem de milho.** Orientador: Odilon Gomes Pereira. Coorientadores: Sebastião de Campos Valadares Filho e Karina Guimarães Ribeiro.

Este estudo envolveu três experimentos, cujas informações são apresentadas em dois capítulos. No primeiro experimento (Capítulo I), foram avaliados isolados com potencial bacteriocinogênico obtidos de silagem de estilosantes Campo Grande, produzida em região de clima tropical, sobre as populações de microrganismos, composição química e perfil fermentativo em silagens de amendoim forrageiro. Além disso, foram identificadas, por método molecular, espécies de bactérias produtoras do ácido láctico (BAL) presentes na forragem e na silagem de amendoim forrageiro. Foi empregado um arranjo fatorial 6×5 (seis períodos de fermentação $\times$ cinco inoculantes), em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Foram avaliados os seguintes inoculantes: 1- Controle (sem inoculante); 2- Inoculante comercial na dose de 10^7 UFC (unidades formadoras de colônias)/g de matéria natural (MN); 3- Inoculante comercial na dose de 10^5 UFC/g MN; 4- Isolado bacteriocinogênico 10,6 (*Pediococcus acidilactici*) na dose de 10^7 UFC/g MN; e 5- Pool de isolados bacteriocinogênicos: 10,6 (*P. acidilactici*), 6,16 (*P. pentosaceus*), 10,4 (*P. acidilactici*), na dose de 10^7 UFC/g MN. As maiores populações de BAL foram observadas nas silagens produzidas com o isolado 10,6 (8,66 log UFC/g MN) e com o pool de isolados (8,69 log UFC/g MN); no final do processo fermentativo, verificou-se maior teor de matéria seca (222,53 g/kg) e ácido láctico (66,30 g/kg) e menores valores de pH (4,76) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (9,50% N-total) para a silagem produzida com o isolado 10,6. A identificação de isolados de BAL na silagem controle pelo sequenciamento do gene 16S rRNA revelou que a espécie *Pediococcus pentosaceus* prevaleceu nessa silagem. A

utilização do isolado 10,6 permitiu o estabelecimento de população microbiana desejável no decorrer do processo de fermentação, o que resultou em silagem com melhor qualidade, sendo esse isolado considerado estirpe promissora para utilização como inoculante microbiano na elaboração de silagem de amendoim forrageiro em regiões de clima tropical. Nos outros dois experimentos (Capítulo II), foram avaliados o efeito do fornecimento de diferentes volumosos sobre a digestibilidade parcial e total dos nutrientes, o pH e a amônia ruminal; e a eficiência de utilização de nitrogênio (Experimento 2), bem como o consumo e digestibilidade total dos nutrientes, além do desempenho produtivo (Experimento 3) de novilhos da raça Nelore. Foram avaliadas dietas contendo três volumosos: silagem de milho (SM), silagem de estilosantes Campo Grande (SSt) e feno de estilosantes Campo Grande (FSt) e duas dietas mistas (50% de SM + 50% de SSt e 50% de SM + 50% de FSt). Todas as dietas foram isoproteicas (12,5% PB, com base na MS) e consistiram de 50% de concentrado e 50% de forragem. No experimento 1, foram utilizados cinco bovinos com peso corporal inicial (PCi) de $251 \pm 42,6$, fistulados no rúmen e abomaso, distribuídos em um quadrado latino 5×5 . Esse experimento teve duração de 80 dias, divididos em cinco períodos de 16 dias cada, sendo 10 dias para adaptação e seis para coleta de dados. No experimento 2 foram utilizados 40 bovinos com PCi de $360 \pm 2,7$ kg, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e oito repetições. Esse experimento teve duração de 99 dias, sendo 15 dias para adaptação. A digestibilidade aparente total da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp) e os teores de nutrientes digestíveis totais (NDT) foram maiores ($P < 0,05$) na dieta contendo SM em relação às demais. Os animais alimentados com a dieta contendo SM apresentaram menores ($P < 0,05$) consumos de MS, MO, proteína bruta (PB), extrato etéreo, FDNcp, carboidratos não fibrosos (CNF), fibra

insolúvel em detergente neutro indigestível (FDNi) e fibra em detergente neutro não digerida (FDNND) em relação às dietas contendo SM + SSt ou SM + FSt, no entanto o consumo de NDT e matéria orgânica digerida (MOD) foi o mesmo ($P>0,05$). O ganho médio diário (GMD) e o ganho médio diário de carcaça (GMDC) foram maiores ($P<0,05$) nos animais alimentados com a dieta contendo SM (1,55 kg e 0,89 kg, respectivamente) em relação aos alimentados com as dietas contendo SSt ou FSt (1,30 kg e 0,67 kg e 1,11 kg e 0,65 kg, respectivamente). Não foram verificadas diferenças ($P>0,05$) para o GMD e GMDC dos animais alimentados com a dieta contendo SM em relação aos alimentados com as misturas. Contudo, a conversão alimentar foi menor ($P<0,05$) na dieta com SM (5,48) em relação às misturas SM + SSt ou SM + FSt (6,40 e 7,56, respectivamente). Conclui-se que as misturas de silagem de milho com silagem ou feno de estilosantes constituem boa alternativa de utilização de silagem de milho para alimentação de bovinos de corte na fase de terminação.

ABSTRACT

RUFINO, Leidy Darmony de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2014. **Bacteriocinogenic lactic bacteria in forage-peanut silage and productive performance of beef cattle fed Stylosanthes silage and hay associated or unassociated with corn.** Adviser: Odilon Gomes Pereira. Co-advisers: Sebastião de Campos Valadares Filho and Karina Guimarães Ribeiro.

The present study was developed upon the development of three experiments that generated information presented in two chapters. The first experiment (Chapter I) aimed to evaluate isolates with bacteriocinogenic potential obtained from a silage of *Stylosanthes* cv. Campo Grande produced in a tropical-climate region on populations of microorganisms, fermentation profile, and chemical composition of forage-peanut silages. In addition, species of lactic-acid-producing bacteria (LAB) present in the forage and in the forage-peanut silage were identified by molecular technique. A 6×5 factorial arrangement (six fermentation periods $\times$ five inoculants) was used in a completely randomized design with three replicates. The following treatments were evaluated: 1- Control (no inoculant); 2- Commercial inoculant (10^7 cfu/g fresh matter (FM)); 3- Commercial inoculant (10^5 cfu/g FM); 4- Bacteriocinogenic isolate 10.6; and 5- Pool of bacteriocinogenic isolates. The identification of LAB isolates in the control silage by the sequencing of gene 16S rRNA revealed that the *Pediococcus pentosaceus* prevails in this silage. The largest ($P < 0.05$) populations of LAB were observed in the silages produced with isolate 10.6 ($8.66 \log$ cfu/g FM) and with the pool of isolates ($8.69 \log$ cfu/g FM), and greater DM (222.53 g/kg) and lactic acid (66.30 g/kg) contents and lower ($P < 0.05$) pH (4.76) and ADIN (9.50% total N) values were observed in the silage produced with isolate 10.6 at the end of the fermentation process. The use of isolate 10.6 enabled the establishment of a desirable microbial population throughout the fermentation process, resulting in better-quality forage; this isolate was considered a promising strain for use as a microbial inoculant in the production of forage-peanut

silage in tropical regions. In the other two experiments (Chapter II), were evaluated the effect of supplying different roughages on partial and total digestibility of nutrients, rumen pH and ammonia, and efficiency of use of nitrogen (Experiment 2), as well as on intake and total digestibility of nutrients and productive performance (Experiment 3) of Nellore steers. Diets containing the following three roughages were evaluated: corn silage (CS); silage of *Stylosanthes* var. Campo Grande (SSt); and hay of *Stylosanthes* var. Campo Grande (HSt), plus two mixed diets (50% CS + 50% SSt; and 50% CS + 50% HSt). All diets were isoproteic (12.5% CP, on a DM basis), and consisted of 50% concentrate and 50% forage. In the experiment 2, five rumen- and abomasum-fistulated cattle with an average initial weight of 251 ± 42.6 kg were distributed in a 5×5 Latin square. This experiment lasted 80 days, divided into five 16-day periods, with 10 days for adaptation and six days for data collection. In the experiment 3, 40 cattle with an average initial weight of 360 ± 2.7 kg were distributed in a completely randomized design with five treatments and eight replicates. This experiment lasted 99 days, with 15 days for adaptation. The total apparent digestibility of dry matter (DM), organic matter (OM), neutral detergent fiber corrected for ash and protein (NDFap) and total digestible nutrients (TDN) were higher ($P < 0.05$) for CS as compared with the other diets. The animals fed CS showed lower ($P < 0.05$) intakes of DM, OM, crude protein (CP), ether extract, NDFap, non-fiber carbohydrates and indigestible neutral detergent insoluble fiber in relation to the diets containing CS + SSt or CS + HSt; however, TDN intake was the same ($P > 0.05$). Average daily gain was higher ($P < 0.05$) for the animals fed CS (1.55 kg) in relation to those fed SSt or HSt (1.30 and 1.11 kg, respectively). No difference ($P > 0.05$) was found for weight gain between the animals fed SM and those fed the combinations. Nevertheless, feed conversion ($P < 0.05$) was lower for CS (5.43) than combinations CS + SSt or CS + HSt (6.43 and 7.47, respectively). The

combinations of corn silage with Stylosanthes silage or hay are a good alternative to the use of corn silage to feed beef cattle in the finishing stage.

INTRODUÇÃO GERAL

A base da alimentação de animais ruminantes no Brasil, independentemente do sistema de suplementação adotado, é o alimento volumoso, e a utilização de animais em pastejo representa a forma mais prática e econômica de alimentação do rebanho. No entanto, os índices de produtividade obtidos nesse sistema de produção ainda são baixos, sendo esse fato atribuído à estacionalidade da produção de plantas forrageiras, que apresentam crescimento vigoroso durante a estação chuvosa, enquanto na estação fria diminuem ou paralisam o crescimento.

A estacionalidade na produção de forrageira reflete o desempenho produtivo dos animais mantidos em pastagens, com épocas de grande oferta de produtos de origem animal e épocas de sua escassez. Várias são as técnicas utilizadas visando solucionar os problemas ocasionados pela estacionalidade de produção de forragem, as quais devem ser coerentes com o nível de exploração pecuária de cada propriedade. Assim, a utilização de forragens conservadas, principalmente na forma de silagem, é alternativa capaz de garantir o fornecimento de forragem de alta qualidade, durante o período de escassez de alimentos.

O milho é a espécie mais utilizada no processo de ensilagem, pela facilidade de cultivo, alta produtividade e, principalmente, qualidade da silagem produzida. Porém, a silagem de milho apresenta baixo teor proteico, o que constitui limitação para o seu uso exclusivo, sobretudo, para animais com exigências nutricionais elevadas. Assim, a utilização de silagens de leguminosas é uma opção, por aumentar o teor proteico da dieta, além de supri-la com maior quantidade de cálcio e fósforo (Pereira et al., 2008). Em estudo comparando silagem de milho com silagem de amendoim forrageiro, Staples et al. (1997) verificaram que, além de maiores concentrações de cálcio e fósforo, a

silagem de amendoim forrageiro apresentou também maior quantidade de potássio, magnésio, enxofre, sódio, ferro, zinco, manganês e cobre. Além disso, as leguminosas contribuem nos sistemas de produção agrícola, mantendo e elevando o nível de fertilidade do solo, com a adição de nitrogênio ao sistema pela fixação biológica (FBN); e auxiliam no controle de pragas e doenças, no controle da erosão do solo e na manutenção de áreas de descanso. Leguminosas forrageiras tropicais podem fixar de 2 a 183 kg/ha/ano de N (Thomas, 1995), sendo esse processo indispensável para a manutenção da vida no planeta e estratégico para a sustentabilidade na agricultura. Em regiões com limitações ambientais, as leguminosas contribuem efetivamente para a produção agrícola e sustentam os sistemas de pastejo dentro da filosofia do baixo insumo (Maraschin, 1997).

Outra vantagem do uso de leguminosas está na mitigação de gases de efeito-estufa (GEE). Animais consumindo leguminosas geralmente emitem menos CH₄ em relação àqueles consumindo gramíneas, e esse efeito é frequentemente explicado pelo seu baixo teor de fibra e maior ingestão de matéria seca, com consequente aumento da taxa de passagem no rúmen (O'Mara et al., 2004), e pela presença de taninos condensados (Waghorn, 2007). A ação dos taninos condensados na metanogênese pode ser atribuída a um efeito indireto, pela diminuição na produção de H₂ como consequência da redução na digestibilidade da fibra e por efeito inibitório direto na população metanogênica (Woodward et al., 2001). As menores emissões de CO₂ e N₂O se dão através da diminuição do uso de adubos nitrogenados comerciais (que para sua produção emitem grandes quantidades desses gases), já que as leguminosas fornecem nitrogênio ao sistema pela FBN, que, além de ser considerada ferramenta para elevar a produtividade da área, aumenta o sequestro de carbono (Humphreys, 1997). Dessa

forma, grande parte do carbono emitido pela atividade pecuária é absorvida, tornando-se componente importante no balanço de GEE.

Apesar dessas vantagens, relatos da utilização de leguminosas tropicais no processo de ensilagem são escassos e evidenciam que as leguminosas apresentam alto poder tampão, baixos conteúdos de carboidratos solúveis e baixo teor de matéria seca, que são características indesejáveis para a produção de silagem. Sobre esse assunto, Evangelista et al. (2003) salientaram que, ao ensilar leguminosas, não se pode esperar silagens com características fermentativas semelhantes às de milho.

O avanço na tecnologia de produção de silagem tem aberto a possibilidade para a ensilagem de forrageiras alternativas, como as leguminosas (Keady et al., 2012). Trabalhos recentes com silagens de amendoim forrageiro (Paulino et al., 2009; Rosa et al., 2012) e estilosantes (Ribeiro et al., 2012; Rigueira et al., 2012) apresentaram resultados satisfatórios quanto às características fermentativas e químicas dessas silagens, com destaque para o potencial de ensilabilidade dessas leguminosas. Porém, a utilização de silagens dessas forrageiras ainda é pouco expressiva, necessitando de estudos acerca de sua fermentação e avaliação na alimentação animal.

Dessa forma, foram objetivos deste estudo:

- Avaliar isolados com potencial bacteriocinogênico obtidos de silagem de estilosantes Campo Grande sobre as populações de microrganismos, perfil fermentativo e composição química de silagens de amendoim forrageiro em diferentes períodos de fermentação. Além disso, identificar, por método molecular, espécies de BAL presentes no amendoim forrageiro e em suas silagens.
- Analisar as digestibilidades aparente total e parcial dos nutrientes, o pH e a concentração de amônia ruminal e a eficiência de utilização de nitrogênio, bem como o consumo de nutrientes e o desempenho produtivo de bovinos de corte alimentados com

dietas contendo silagem e feno de estilosantes Campo Grande associados ou não à silagem de milho.

Os capítulos I e II foram escritos de acordo com as normas das revistas Journal of Dairy Science e Animal Feed Science and Technology, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- Evangelista, A.R., Resende, P.M., Maciel, G.A., 2003. Uso da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) na forma de forragem. Lavras: UFLA, Boletim de extensão.
- Humphreys, L.R., 1997. The evolving science of grassland improvement. Cambridge: Cambridge University Press.
- Keady, T.W.J., Marley, C.M., Scollan, N.D., 2012. Grass and alternative forage silages for beef cattle and sheep: effects on animal performance. In: XVI International Silage Conference; Proceeding... Hämeenlinna, Finland.
- Maraschin, G.E., 1997. Oportunidade do uso de leguminosas em sistemas intensivos de produção animal a pasto. In: A.M. Peixoto, J.C. Moura e V.P. Faria (eds). Simpósio sobre o manejo da pastagem. Piracicaba. Anais... FEALQ. Piracicaba.
- O'Mara, F., 2004. Greenhouse gas production from dairying: reducing methane production. *Adv Dairy Tech.* 16, 295-309.
- Paulino, V.T., Ferrari Jr, E., Possenti, R.A., Lucenas, T.L., 2009. Silagem de Amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* cv. Belmonte) com diferentes aditivos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 66, 33-43.
- Pereira, O.G., Oliveira, A.S., Ribeiro, K.G., Rigueira, J.P.S., Melo Filho, O.L., Souza, W.F., 2008. Otimização de dietas à base de soja. In: VI Simcorte – VI Simpósio de Produção de Gado de Corte e II Simpósio Internacional de Gado de Corte, Viçosa. Anais... Viçosa.

- Ribeiro, K.G., Pereira, O.G., Rigueira, J.P.S., Souza, W.F., Cezario, A.S., Rufino, L.D.A., Rosa, L.O., Campos, A.F., 2012. Chemical composition and fermentative profile of elephant grass and Campo Grande Stylosanthes mixed silages In: International Silage Conference, Hämeenlinna, Finland. Proceedings of the XVI International Silage Conference. Hämeenlinna, Finland: Unigrafia, Helsinki.
- Rigueira, J.P.S., Pereira, O.G., Ribeiro, K.G., Cezario, A.S., Souza, W.F., 2012. Chemical composition and fermentation profile of Brachiaria brizantha and Campo Grande Stylosanthes mixed silages In: Joint Annual Meeting of American Society of Animal Science, Phoenix, Arizona. Journal of Animal Science. Phoenix, Arizona: Adsa-Asas.
- Rosa, L.O., Pereira, O.G., Rufino, L.D.A., Silva, T.C., Cardoso, L.L, Martins, R.M., 2012. Composição bromatológica de silagens de Amendoim forrageiro com inoculante e melaço em pó. In: 49ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Brasília. Anais... Brasília.
- Staples, C.R., Emanuele, S.M., Prine, G.M., 1997. Intake and nutritive value of florigraze rhizome peanut silage for lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 80, 541-549.
- Thomas, R.J., 1995. Role of legumes in providing N for sustainable tropical pasture. Plant Soil. 174, 103-118.
- Waghorn, G.C., 2007. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production: progress and challenges. Anim. Feed Sci. Technol. 147, 116-139.
- Woodward, S.L., Waghorn, G.C., Ulyatt, M.J., Lassey, K.R., 2001. Early indications that feeding Lotus will reduce methane emissions from ruminants. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. 61, 23-26.

Capítulo I

EFEITO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS COM POTENCIAL BACTERIOCINOGENICO SOBRE A POPULAÇÃO DE MICRORGANISMOS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PERFIL FERMENTATIVO EM SILAGEM DE AMENDOIM FORRAGEIRO

Resumo - Foram objetivos deste trabalho avaliar isolados com potencial bacteriocinogênico obtidos de silagem de estilosantes Campo Grande, produzida em região de clima tropical, sobre as populações de microrganismos, composição química e perfil fermentativo em silagens de amendoim forrageiro. Além disso, foi identificado por método molecular espécies de bactérias produtoras do ácido láctico (BAL) presentes na forragem e na silagem de amendoim forrageiro. Foi empregado um arranjo fatorial 6×5 (seis períodos de fermentação $\times$ cinco inoculantes), em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Foram avaliados os seguintes inoculantes: 1- Controle (sem inoculante); 2- Inoculante comercial na dose de 10^7 UFC (unidades formadoras de colônias)/g de matéria natural (MN); 3- Inoculante comercial na dose de 10^5 UFC/g MN; 4- Isolado bacteriocinogênico 10,6 (*Pediococcus acidilactici*) na dose de 10^7 UFC/g MN; e 5- Pool de isolados bacteriocinogênicos: 10,6 (*P. acidilactici*), 6,16 (*P. pentosaceus*), 10,4 (*P. acidilactici*), na dose de 10^7 UFC/g MN. As maiores populações de BAL foram observadas nas silagens produzidas com o isolado 10,6 (8,66 log UFC/g MN) e com o pool de isolados (8,69 log UFC/g MN); no final do processo fermentativo, verificou-se maior teor de matéria seca (222,53 g/kg) e ácido láctico (66,30 g/kg) e menores valores de pH (4,76) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (9,50% N-total) para a silagem produzida com o isolado 10,6. A identificação de isolados de BAL na silagem controle pelo sequenciamento do gene 16S rRNA revelou que a espécie *Pediococcus pentosaceus* prevaleceu nessa silagem. A utilização do isolado 10,6

permitiu o estabelecimento de população microbiana desejável no decorrer do processo de fermentação, o que resultou em silagem com melhor qualidade, sendo esse isolado considerado estirpe promissora para utilização como inoculante microbiano na elaboração de silagem de amendoim forrageiro em regiões de clima tropical.

EVALUATION OF LACTIC BACTERIA WITH BACTERIOCINOGENIC POTENTIAL ISOLATED FROM STYLOSANTHES CV. CAMPO GRANDE IN FORAGE-PEANUT SILAGE

Abstract – The aim with this study was to evaluate isolates with bacteriocinogenic potential obtained from a silage of *Stylosanthes* cv. Campo Grande produced in a tropical-climate region on populations of microorganisms, fermentation profile, and chemical composition of forage-peanut silages. In addition, species of lactic-acid-producing bacteria (LAB) present in the forage and in the forage-peanut silage were identified by molecular technique. A 6×5 factorial arrangement (six fermentation periods $\times$ five inoculants) was used in a completely randomized design with three replicates. The following treatments were evaluated: 1- Control (no inoculant); 2- Commercial inoculant 1 (10^7 cfu/g fresh matter (FM)); 3- Commercial inoculant 2 (10^5 cfu/g FM); 4- Bacteriocinogenic isolate 10.6; and 5- Pool of bacteriocinogenic isolates. The identification of LAB isolates in the control silage by the sequencing of gene 16S rRNA revealed that the *Pediococcus pentosaceus* prevails in this silage. The largest ($P < 0.05$) populations of LAB were observed in the silages produced with isolate 10.6 ($8.66 \log$ cfu/g FM) and with the pool of isolates ($8.69 \log$ cfu/g FM), and greater DM (222.53 g/kg) and lactic acid (66.30 g/kg) contents and lower ($P < 0.05$) pH (4.76) and ADIN (9.50% total N) values were observed in the silage produced with isolate 10.6 at the end of the fermentation process. The use of isolate 10.6 enabled the establishment of a desirable microbial population throughout the fermentation process, resulting in better-quality forage; this isolate was considered a promising strain for use as a microbial inoculant in the production of forage-peanut silage in tropical regions.

1. Introdução

As leguminosas, embora apresentem elevado valor nutritivo, são plantas com algumas características indesejáveis para o adequado processo de fermentação da massa ensilada, como elevado poder tampão, baixo conteúdo de carboidratos solúveis e baixo teor de matéria seca (McDonald et al., 1991). Acrescenta-se a isso uma baixa população autóctone de bactérias produtoras do ácido láctico (**BAL**), necessitando, então, ser ensiladas com aditivos que melhorem a qualidade da silagem produzida (Pereira et al., 2009). De acordo Keady et al. (2012), o avanço na tecnologia de silagem tem aberto a possibilidade para a ensilagem de forrageiras alternativas, como as leguminosas.

Trabalhos recentes com silagens de amendoim forrageiro (Paulino et al., 2009; Rosa et al., 2012) e estilosantes (Ribeiro et al., 2012; Rigueira et al., 2012) apresentaram resultados satisfatórios quanto às características fermentativas e químicas dessas silagens, destacando-se o potencial de ensilabilidade dessas leguminosas.

Entre as leguminosas tropicais, o amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) desperta interesse por ser persistente e apresentar elevado valor alimentício, com alto teor proteico e baixos teores de fibras com alta digestibilidade. O gênero *Arachis* possui aproximadamente 81 espécies, sendo a espécie *A. pintoi* exclusiva do Brasil e a mais utilizada no mundo (Ramos et al., 2010). Em estudo com vacas em lactação, de baixa e alta produção, Staples et al. (1997) verificaram que a silagem de amendoim forrageiro pode substituir a silagem de milho em até 70%, sem afetar a produção de leite, evidenciando a qualidade nutricional da silagem dessa leguminosa.

Na atualidade, grande variedade de aditivos microbianos é recomendada para melhorar a qualidade de silagens. O uso desses aditivos tem por objetivo inibir o crescimento de microrganismos deterioradores e patogênicos em silagens (Kung Jr. et al., 2003). No entanto, no Brasil as respostas desses aditivos sobre a qualidade das

silagens são pouco animadoras (Zopollatto et al., 2009). Acredita-se que a falta de resposta na maioria dos estudos com esses aditivos em regiões de clima tropical possa ser devida à utilização de inoculantes microbianos contendo cepas isoladas de plantas forrageiras de clima temperado. Portanto, a utilização de cepas de BAL isoladas de plantas forrageiras de clima tropical pode ser alternativa para melhorar o perfil fermentativo de silagem produzida nessa região. Além disso, a utilização de BAL bacteriocinogênicas, que apresentam capacidade de sintetizar peptídeos antimicrobianos, conhecidos como bacteriocinas, poderá acentuar ainda mais a inibição de microrganismos patogênicos e deterioradores em silagens.

Hipotetiza-se que o uso de BAL com atividade bacteriocinogênica isolada de silagem de uma leguminosa tropical favorece o perfil fermentativo de silagens de amendoim forrageiro. Portanto, foi objetivo deste trabalho avaliar isolados com potencial bacteriocinogênico obtidos de silagem de estilosantes Campo Grande sobre as populações de microrganismos, o perfil fermentativo e a composição química de silagens de amendoim forrageiro em diferentes períodos de fermentação. Objetivou-se, também, identificar, por método molecular, espécies de BAL presentes no amendoim forrageiro e em suas silagens.

2. Material e Métodos

2.1. Local do experimento e condições climáticas

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizada na cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, entre os meses de fevereiro e julho de 2012. Viçosa está situada na Região da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, com altitude média de 657 m, latitude Sul de 20°45' e longitude Oeste de 42° 51'. O clima é caracterizado por verões quentes e úmidos e

invernos frios e secos, com precipitação média anual de 1341 mm e temperatura média anual em torno de 21°C.

2.2. Ensilagem do amendoim forrageiro

O amendoim forrageiro foi colhido, com uma segadora costal, no início do florescimento, picado com auxílio de uma máquina ensiladora estacionária, e em seguida ensilado em bags medindo 25,40 cm x 35,56 cm (Doug Care Equipment, Springville, CA). Em cada bag foram adicionados 500 g de forragem. A condição de anaerobiose no interior dos bags foi estabelecida com a utilização de seladora a vácuo.

2.3. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, arranjado em esquema fatorial 5×6 , sendo cinco inoculantes e seis períodos de fermentação (1, 3, 7, 14, 28 e 56 dias), com três repetições. Os inoculantes avaliados foram: 1- Controle (sem inoculante); 2- Inoculante comercial Sil All 4x4 WS (Alltech, Brasil), na dose de 10^7 UFC (unidades formadoras de colônias)/g matéria natural (MN)); 3- Inoculante comercial Sil All 4x4 WS, na dose de 10^5 UFC/g MN; 4- Isolado bacteriocinogênico 10,6: *P. acidilactici* (10^7 UFC /g MN); e 5- Pool de isolados bacteriocinogênicos: 10,6 (*P. acidilactici*), 6,16 (*P. pentosaceus*), 10,4 (*P. acidilactici*) (10^7 UFC/g MN). Antes da ensilagem, foi quantificado o número de UFC de BAL por grama do amendoim forrageiro pelo método de plaqueamento Pour plate. A população de BAL encontrada foi de 10^6 UFC/g de MN; a partir desse dado, foi utilizada dose de 10^7 UFC/g de MN, exceto no inoculante 3, que correspondeu à dose recomendada pelo fabricante. O inoculante comercial é composto de *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *P. pentosaceus* e *P. acidilactici*, além de amilase, celulase, β glucanase e xilanase. As BAL com potencial

bacteriocinogênico utilizadas neste experimento foram isoladas de silagem de estilosantes Campo Grande e possuem atividade antimicrobiana comprovada (Silva, 2011).

2.4. Amostragens e Procedimentos Analíticos

Análises Microbiológicas

As populações microbianas foram quantificadas na forragem, antes da ensilagem e nas silagens, utilizando-se meios de cultura específicos para cada grupo microbiano: MRS Agar (DifcoTM) para as bactérias lácticas e Violet Red Bile (DifcoTM) para as enterobactérias. Para quantificação de mofo e leveduras foram utilizadas placas 3MTM PetrifilmTM YM (Sumaré, São Paulo State, Brazil). A enumeração dos grupos microbianos foi realizada a partir de 25 g de amostra, provenientes dos três silos experimentais de cada tratamento nos diferentes períodos de fermentação, às quais foram adicionados 225 mL de solução salina (0,85 %), e homogeneizadas em liquidificador industrial durante um minuto, obtendo-se a diluição de 10⁻¹. Após, diluições sucessivas foram realizadas e o cultivo foi feito em placas de Petri estéreis (BAL e enterobactérias) ou petrifilms (mofo e leveduras). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas para quantificação da população de BAL e de enterobactérias. Os petrifilms foram incubados a 25° por 48 horas para quantificação da população de mofo e leveduras. Foram consideradas passíveis de contagem as placas com valores entre 30 e 300 UFC.

As placas contendo colônias de BAL crescidas em MRS Agar, provenientes da planta forrageira e também da silagem controle (sem adição de inoculante), foram utilizadas para isolamento de BAL. Após o período de incubação, as colônias que apresentaram diferenças culturais foram transferidas para meio MRS sólido (1,5% de

Agar), acrescido de $0,04 \text{ gL}^{-1}$ de púrpura de bromocresol e $5,0 \text{ gL}^{-1}$ de carbonato de cálcio. As placas foram incubadas à 37°C , por 48 horas, em jarras de anaerobiose (GasPak TM Plus Anaerobic System, BBL, Franklin Lakes, NJ). Após este período, as colônias de bactérias lácticas que cresceram e apresentaram resultado positivo para a produção de ácido foram submetidas ao teste da catalase e coloração diferencial de Gram. Culturas estoques dos isolados obtidos foram preparadas, e a suspensão de células em meio MRS foi acrescida de 20 % de glicerol e imediatamente estocada a -20°C .

Análise Molecular

O DNA dos isolados, obtido da planta forrageira e suas silagens nos diferentes períodos de fermentação, foi extraído com a utilização do kit comercial (Wizard[®] Genomic DNA Purification kit, Promega), com modificações em alguns passos do protocolo. Os isolados foram cultivados em 5 mL de caldo MRS e incubados a 37°C por 14 horas. A cultura crescida foi centrifugada (Mikro 200 R) a 10.000 g por 5 minutos, e em seguida lavada, uma vez, com solução salina 0,85 %. O sedimento de células obtido foi ressuspenso em $480 \mu\text{L}$ de EDTA (50 mM) e imediatamente foi adicionado $50 \mu\text{L}$ de lisozima a 50 mg mL^{-1} . A partir desta etapa, o procedimento de extração de DNA foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração de DNA extraído foi avaliada em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific 2000) e estocado a -20°C .

A identificação das espécies foi realizada por sequenciamento do gene 16S rRNA. A região codificadora do 16S rDNA foi amplificada por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Dois microlitros do DNA diluído foram utilizados como template para as reações da PCR. O par de primers utilizados na PCR foram p027F

(GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1392R (TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT) (Heuer et al., 1997). A reação PCR foi realizada em tubos microcentrífuga de capacidade de 0.2 mL contendo 50 µL da mistura de reação: DNA (aproximadamente 60 ng); tampão 10X (Tris-HCl 0,1 mol l⁻¹, pH 8,0, KCl 0,5 mol l⁻¹; MgCl₂ 1,5 mmol l⁻¹, pH8,0); dNTP mix (Promega, Madison WI USA); Taq polimerase (Promega) (1 U); primer p027f (0,6 µmol l⁻¹) e 1492 (0,6 µmol l⁻¹). O volume da mistura de reação foi completado para 50 µL com água ultrapura autoclavada. A PCR foi realizada em termociclador (Eppendorff®), e as condições de reações empregadas na realização da PCR foram: 94°C/5 minutos; 30 ciclos (desnaturação: 94°C/30 segundos; 60°C por 30 segundos); polimerização: 72°C/2 minutos; extensão final: 72°C/5 minutos. Uma alíquota de 4 µL da mistura de reação PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose (1,4 %) em tampão de Tris Borato EDTA (TBE). O gel foi corado com 0,5 µg ml⁻¹ de brometo de etídio e as bandas foram visualizadas sobre iluminação UV. O produto PCR obtido foi encaminhado à empresa Macrogen, na Korea, para purificação e sequenciamento das amostras.

As sequências obtidas de cada isolado foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados do GenBank, e alinhadas usando o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos. As sequências do gene 16S rRNA que apresentaram similaridade igual ou maior que 97% foram consideradas como pertencentes a uma mesma Unidade Taxonômica Operacional (UTO) (Altschul et al., 1990). Além disso, alguns isolados foram selecionados para representar as espécies identificadas neste estudo para a realização de alinhamentos múltiplos de suas sequências do gene 16S rRNA com sequências de BAL já depositadas no banco de dados do GenBank. Este alinhamento foi criado com a utilização do programa CLUSTALW e MEGA 6.0® (Tamura et al., 2013). O método de Neighbor-

joining (Saitou and Nei, 1987) foi utilizado para reconstrução da árvore filogenética. O *Bacillus subtilis* NCDO 1769 foi utilizado como organismo pertencente ao grupo externo (Duan et al., 2008). A topologia da árvore foi avaliada pela análise de bootstrapping das sequências baseada em 1000 repetições.

Análises químicas

Amostras do material original picado foram congeladas em sacos plásticos para posterior determinação do poder tampão (PT), pelo método de Playne and McDonald (1966).

Em cada período de abertura, foram coletadas amostras das silagens para análise de pH e nitrogênio amoniacal de acordo com Bolsen et al. (1992). Para a determinação do pH, aproximadamente 25 g de silagem de cada silo foram colocadas em 100 mL de água e deixadas de repouso por uma hora antes da leitura do pH. Outros 25 g de silagem foram colocadas em 200 mL de uma solução de H₂SO₄ 0,2 N, permanecendo em repouso em geladeira por 48 horas para, em seguida, efetuar-se a filtração em filtro tipo Whatman® 54 (Whatman Inc., Clifton, NJ), e o filtrado foi armazenado em geladeira para posterior análise de N-amoniacal.

Para análise dos ácidos orgânicos, aproximadamente 25 g de silagem de cada silo foram diluídas em 225 mL de solução salina (0,85%) e homogeneizadas em liquidificador industrial durante 1 minuto e os extratos aquosos obtidos foram filtrados em filtro de papel do tipo Whatman® 54 (Whatman Inc., Clifton, NJ); posteriormente, os extratos foram acidificados com solução de ácido metafosfórico 20% e centrifugados por 15 minutos, segundo a metodologia descrita por Kung Jr. e Ranjit (2001). A análise foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC) (SHIMADZU, SPD-10 A VP) acoplado ao detector Ultra Violeta utilizando-se um comprimento de

onda de 210 nm. A identificação e quantificação dos ácidos láctico, acético, butírico e propiônico foram efetuadas utilizando-se a coluna C18 (Fase Reversa).

Foram coletadas amostras de aproximadamente 300 g da planta e das silagens nos diferentes períodos de fermentação. Estas amostras foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 60°C por 72 h e moídas em moinho de facas tipo Willey. Nas amostras da planta, foram determinados os carboidratos solúveis em água (Deriaz, 1961). Em todas as amostras das silagens nos diferentes períodos de fermentação foram realizadas as determinações de matéria seca (**MS**) (método 934.01; AOAC, 1990) e proteína bruta (**PB**), que foi obtida por determinação total de N (método 920.87; AOAC, 1990) e usando fator de conversão fixo (6,25). Na planta e na silagem aos 56 dias de fermentação, foram realizadas análises de extrato etéreo (**EE**) (método 920.85; AOAC, 1990), fibra insolúvel em detergente neutro (**FDN**) (Mertens, 2002) e fibra insolúvel em detergente ácido (**FDA**) (método 973.18; AOAC, 1990). As correções para cinzas e proteínas na FDN e FDA foram realizadas segundo Mertens (2002) e Licitra et al. (1996), respectivamente.

Análises estatísticas

Os dados foram analisados segundo um fatorial 5 × 6, por intermédio do procedimento MIXED do SAS (versão 9.1). Os inoculantes (I), os períodos de abertura (P) dos silos bem como a interação entre os fatores foram considerados efeitos fixos no modelo:

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

Onde, Y_{ijk} = variável dependente; μ = média geral; I_i = efeito de inoculante; P_j = efeito de período de abertura; $(I \times P)_{ij}$ = interação; e e_{ijk} = erro.

Para os períodos de abertura, os modelos de regressão foram ajustados de acordo com a significância dos parâmetros β_1 , β_2 e β_3 , através do PROC MIXED e as estimativas dos mesmos foram obtidas através do PROC REG do SAS (versão 9.1).

Para comparação entre inoculantes, as diferenças entre as médias de mínimos quadrados estimadas foram avaliadas utilizando-se o teste de Tukey, sendo considerado 0.05 como o nível de probabilidade máximo para ocorrência do erro tipo I. A composição química das silagens, avaliada apenas aos 56 dias de fermentação, também foi comparada entre inoculantes utilizando-se o teste de Tukey.

3. Resultados

3.1. Composição química da planta antes da ensilagem

A composição química do amendoim forrageiro antes da ensilagem é mostrada na Tabela 1.

3.2. Características fermentativas, composição química e populações microbianas das silagens

O valor-P e o erro padrão da média (**EPM**) para as características fermentativas e populações microbianas das silagens de amendoim forrageiro produzidas com diferentes inoculantes bacterianos são mostradas na Tabela 2. Foi observado efeito da interação $I \times P$ ($P < 0,05$) sobre os teores de PB, pH, conteúdos de ácidos láctico, acético e propiônico e populações de mofos e leveduras. Os conteúdos de nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) e ácido butírico e as populações de enterobactérias foram afetados ($P < 0,05$) apenas pelo fator período. O teor de MS e as populações de BAL foram afetados por inoculante ($P < 0,05$) e período ($P < 0,05$) de forma independente.

Tabela 1. Composição química do amendoim forrageiro antes da ensilagem

Parâmetro	Composição
Matéria seca (g/kg)	222,70 ± 1,56
Proteína bruta (g/kg de MS)	175,37 ± 0,84
Extrato etéreo (g/kg de MS)	13,24 ± 0,30
FDNcp ¹ (g/kg de MS)	404,57 ± 1,68
FDACP ² (g/kg de MS)	284,86 ± 2,56
NIDN ³ (g/kg do Nitrogênio total)	263,88 ± 2,67
NIDA ⁴ (g/kg do Nitrogênio total)	93,03 ± 1,99
pH	6,39 ± 0,02
Carboidratos solúveis em água (g/kg de MS)	38,76 ± 1,70
Poder tampão (e mg/100g de MS)	19,57 ± 0,61
Bactérias ácido lácticas (log UFC/g de MN)	7,02 ± 0,17
Enterobactérias (log UFC/g de MN)	5,45 ± 0,29
Mofo e leveduras (log UFC/g de MN)	6,78 ± 0,06

¹Fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; ²Fibra insolúvel em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína; ³Nitrogênio insolúvel em detergente neutro; ⁴Nitrogênio insolúvel em detergente ácido.

Tabela 2. Valor-P e erro padrão da média (EPM) de matéria seca, proteína bruta, pH, nitrogênio amoniacal, bactérias ácido lácticas, enterobactérias, mofo e leveduras e dos ácidos lático, acético, propiônico e butírico das silagens de amendoim forrageiro produzidas com diferentes inoculantes bacterianos

Item	P-valor			EPM
	I	P	I x P	
Matéria seca	<,0001	0,0060	0,3529	0,527
Proteína bruta	0,4899	<,0001	<,0001	0,654
pH	<,0001	<,0001	0,0001	0,014
Nitrogênio amoniacal	0,1532	<,0001	0,5444	0,262
Ácido Láctico	0,0979	<,0001	0,0003	1,312
Ácido Acético	<,0001	<,0001	<,0001	0,346
Ácido Propiônico	<,0001	<,0001	<,0001	0,110
Ácido Butírico	0,2199	0,0261	0,1118	0,016
Bactérias ácido lácticas	<,0001	<,0001	0,4108	0,057
Enterobactérias	0,9740	<,0001	0,8255	0,223
Mofo e Leveduras	0,0071	<,0001	0,0224	0,073

I = inoculante; P = período de fermentação.

Os maiores ($P < 0,05$) valores de MS foram observados para as silagens produzidas com o isolado 10,6 e com o pool de isolados (219,4 e 218,6 g/kg, respectivamente) as quais não diferiram entre si ($P > 0,05$), mas diferiram das demais silagens (Tabela 3).

Tabela 3. Teores médios de matéria seca (MS), pH e nitrogênio amoniacal (N-NH₃) de silagens de amendoim forrageiro tratadas com diferentes inoculantes bacterianos ao longo do período de fermentação

Item	Período	Inoculantes					Média
		Controle	IC-DA	IC-DB	I 10,6	Pool	
MS (g/kg)	1	210,6	220,7	218,0	219,7	224,0	218,6
	3	210,7	211,0	213,9	216,8	220,5	214,6
	7	210,4	215,3	214,3	217,9	216,2	214,8
	14	206,5	217,8	214,9	220,8	216,4	215,3
	28	210,5	216,2	213,6	218,7	215,3	214,9
	56	214,1	215,6	218,8	222,5	219,3	218,1
Média		210,5 c	216,1 b	215,6 b	219,4 a	218,6 a	
N-NH ₃	1	3,05	2,89	4,13	3,74	3,33	3,32
	3	5,71	5,63	7,44	6,42	4,96	6,03
	7	9,73	7,98	8,19	7,53	7,71	8,37
	14	9,94	7,69	8,16	7,56	7,59	8,05
	28	9,96	7,81	8,41	7,64	8,34	8,42
	56	12,00	10,09	9,37	8,05	8,97	9,12
Média		7,96	6,82	7,38	7,04	6,89	
pH	1	5,22 a	5,09 b	5,18 a	5,17 a	5,25 a	5,18
	3	5,00	5,01	5,03	5,05	4,99	5,02
	7	5,08	5,09	5,07	5,01	5,03	5,06
	14	5,07 a	5,02 ab	4,95 bc	4,89 c	4,92 c	4,97
	28	4,86	4,84	4,83	4,82	4,86	4,84
	56	4,98 a	4,89 b	4,84 b	4,76 c	4,84 b	4,86
Média		5,04	4,99	4,98	4,95	4,98	

IC-DA = Inoculante comercial dose alta; IC-DB = Inoculante comercial dose baixa; I 10,6 = Isolado bacteriocinogênico 10,6; Pool = Pool de isolados bacteriocinogênicos.

O teor de MS foi afetado pelo período de fermentação ($\hat{Y} = 0,003P^2 - 0,184P + 216,8$, $R^2 = 0,52$), com menor valor estimado (214 g/kg) aos 31 dias de fermentação. O teor de N-NH₃ aumentou linearmente com o avanço do período de fermentação ($\hat{Y} = 0,069P + 5,957$, $r^2 = 0,45$) independente do inoculante utilizado (Tabela 3). Foi observado menor ($P < 0,05$) valor de pH (5.09) para a silagem produzida com o inoculante comercial 1 (10^7) após um dia de fermentação. Ao final do processo fermentativo, 56 dias após a ensilagem, o pH foi menor ($P < 0,05$) (4,76) para a silagem produzida com o isolado 10,6 e maior ($P < 0,05$) (4,98) para a silagem controle (sem inoculante) (Tabela 3). Na Figura 1 pode ser observado o comportamento do pH em função de inoculantes e período de fermentação.

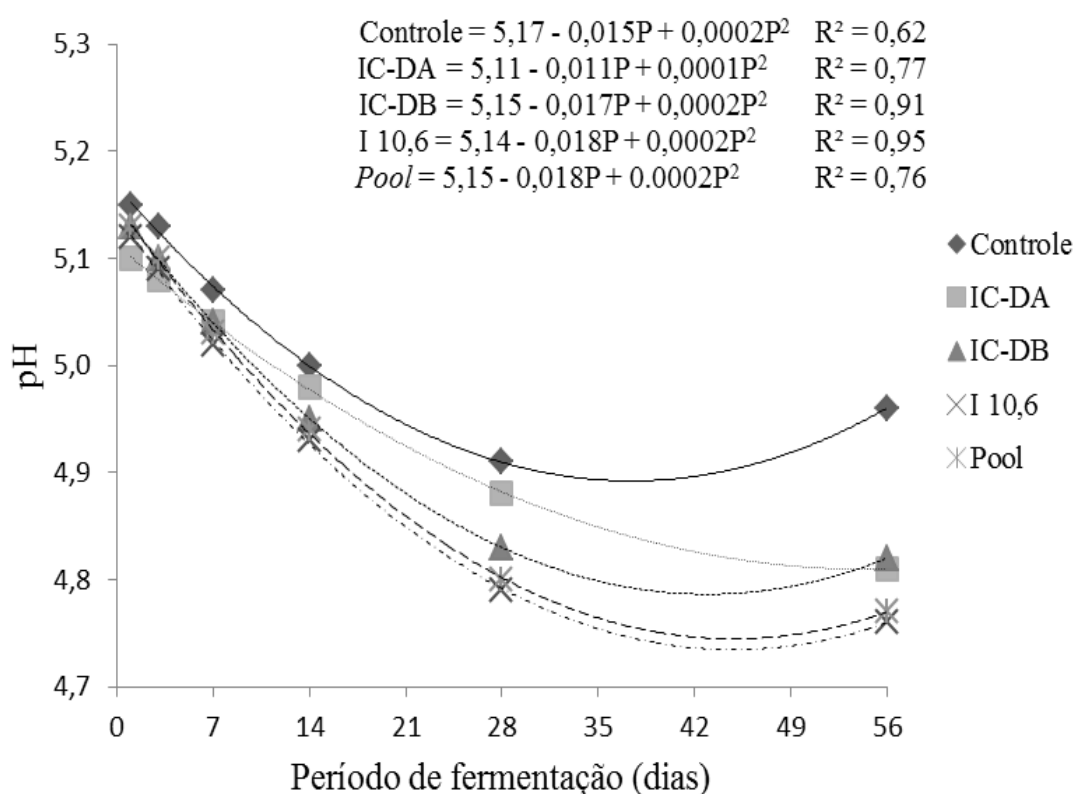


Figura 1. Estimativas dos valores de pH em função dos períodos (P) de fermentação, para as silagens de amendoim forrageiro produzidas com os diferentes inoculantes bacterianos

Foi registrado maior ($P<0,05$) teor de ácido láctico na silagem produzida com o inoculante comercial na dose baixa (IC-DB) (53,88 g/kg), no terceiro dia de fermentação. Contudo, no último dia foi observado maior ($P<0,05$) teor deste ácido para a silagem produzida com o inoculante 10,6 (66,30 g/kg), em comparação com a silagem controle (Tabela 4). Os menores teores dos ácidos acético e propiônico no último dia de fermentação foram registrados nas silagens tratadas com o inoculante comercial na dose alta (IC-DA) (7,30 g/kg) e IC-DB (3,34 g/kg), respectivamente (Tabela 4). O teor de ácido butírico foi afetado pelo período de fermentação ($\hat{Y} = -0,0002P^2 + 0,008P + 0,801$, $R^2 = 0,75$), com maior valor estimado (0,88 g/kg) aos 20 dias de fermentação. Na Figura 2 é mostrado o comportamento dos ácidos láctico (a), acético (b) e propiônico (c) em função de inoculantes e período de fermentação.

As maiores ($P<0,05$) populações de BAL foram observadas para as silagens produzidas com o inoculante 10,6 e com o pool de isolados, com médias de 8,66 e 8,69 log UFC/g, respectivamente (Tabela 5). A população de BAL foi afetada pelo período de fermentação ($\hat{Y} = 0,0005P^2 - 0,054P + 9,127$, $R^2 = 0,98$), com menor valor estimado (7,67 log UFC/g) aos 54 dias de fermentação. A presença de enterobactérias foi observada para as silagens produzidas com o isolado 10,6 e com o pool de isolados somente até o terceiro dia de fermentação e para as silagens produzidas com o IC-DA e IC-DB até o sétimo dia de fermentação. Para a silagem controle (sem inoculante), foi detectada a presença de enterobactérias até 28º dia de fermentação (Tabela 5). Ao final do processo fermentativo, 56 dias após a ensilagem, as maiores ($P<0,05$) populações de mofo e leveduras foram verificadas para a silagem controle (sem inoculante) (Tabela 5). Na Figura 3 encontra-se o comportamento das populações de mofos e leveduras em função de inoculantes e período de fermentação.

Tabela 4. Valores médios dos ácidos láctico, acético, propiônico e butírico das silagens de amendoim forrageiro tratadas com diferentes inoculantes bacterianos

Item	Período	Inoculantes					Média
		Controle	IC-DA	IC-DB	I 10,6	Pool	
Ácido láctico (g/kg MS)	1	22,07	19,71	22,46	21,60	21,51	21,47
	3	24,60 c	37,75 b	53,88 a	37,35 b	37,81 b	38,28
	7	41,27	37,06	34,36	31,86	38,04	36,52
	14	41,70	36,73	41,62	35,76	43,84	39,93
	28	48,11	46,12	47,83	45,56	49,61	47,45
	56	47,67 c	51,39 bc	50,84 bc	66,30 a	58,31 ab	54,90
Média		37,57	38,13	41,83	39,74	41,52	
Ácido acético (g/kg MS)	1	20,37 a	18,00 b	16,78 b	14,32 c	13,92 c	16,68
	3	13,44	13,44	14,99	12,79	11,69	13,27
	7	13,77 ab	12,03 bc	13,79 ab	15,60 a	10,57 c	13,15
	14	10,93 c	10,41 c	9,50 c	15,66 b	18,10 a	12,92
	28	11,02 d	14,13 bc	15,23 b	12,70 cd	22,44 a	15,10
	56	12,72 a	7,30 b	14,61 a	13,03 a	14,85 a	12,50
Média		13,71	12,55	14,15	14,02	15,26	
Ácido propiônico (g/kg MS)	1	4,32 b	4,14 b	3,35 c	2,66 d	5,98 a	4,09
	3	6,24 a	5,80 b	4,19 d	5,01 c	4,94 c	5,24
	7	5,22 bc	7,55 a	5,07 c	4,12 d	5,53 b	5,50
	14	4,66 a	4,06 b	4,67 a	3,53 c	3,32 c	4,05
	28	4,14 a	3,96 a	3,43 b	3,49 b	4,15 a	3,83
	56	5,08 ab	4,32 c	3,34 d	5,34 a	4,87 b	4,59
Média		4,94	4,97	4,01	4,03	4,80	
Ácido butírico (g/kg MS)	1	0,82	0,81	0,87	0,91	0,83	0,85
	3	0,85	0,79	0,89	0,74	0,78	0,81
	7	0,94	0,74	0,84	0,91	0,72	0,83
	14	0,82	0,90	0,87	0,90	0,88	0,87
	28	1,07	1,03	0,77	0,96	1,04	0,97
	56	1,10	0,83	0,97	0,76	0,73	0,88
Média		0,93	0,85	0,87	0,86	0,83	

IC-DA = Inoculante comercial dose alta; IC-DB = Inoculante comercial dose baixa; I

10,6 = Isolado bacteriocinogênico 10,6; Pool = Pool de isolados bacteriocinogênicos.

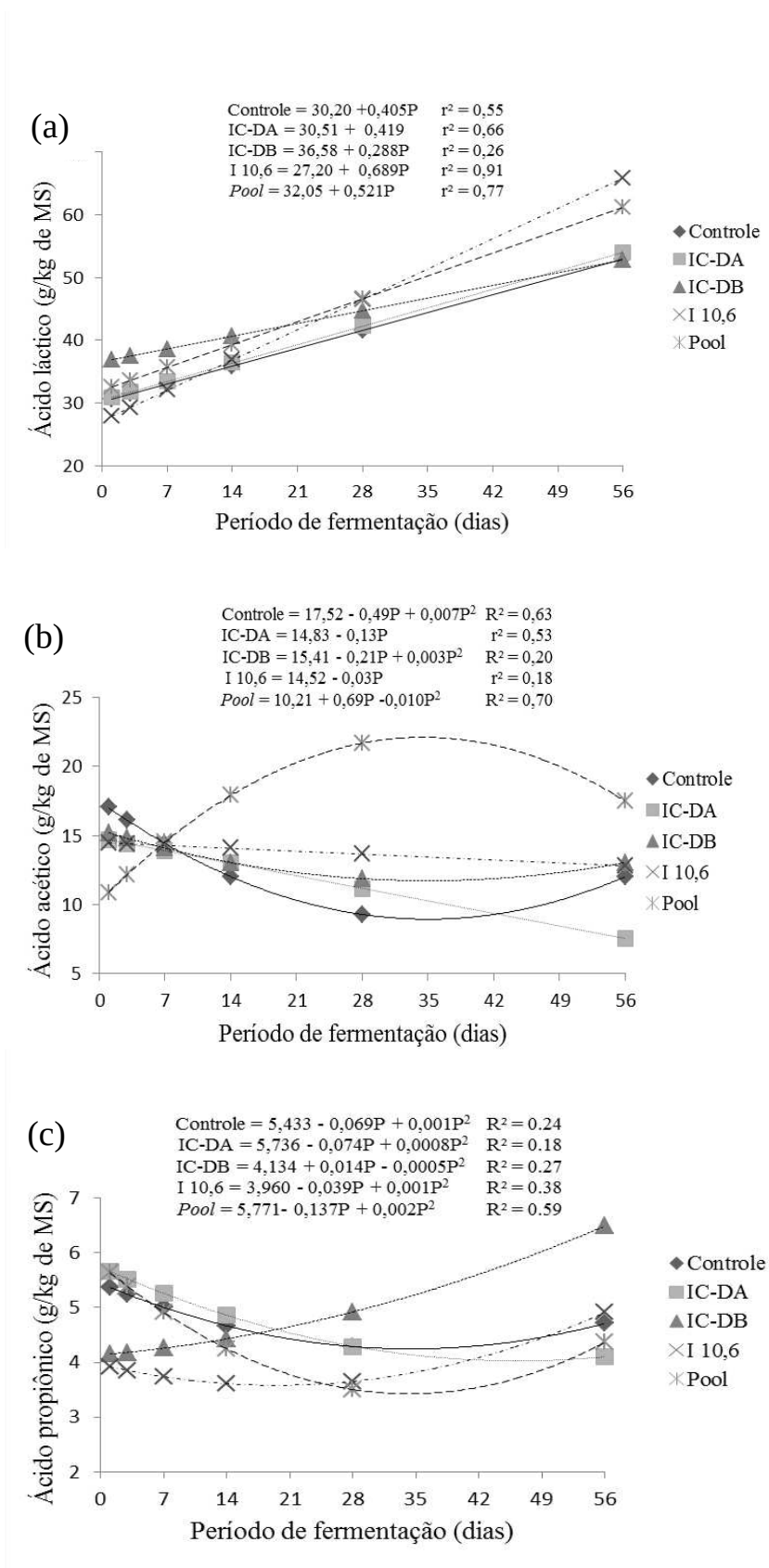


Figura 2. Estimativas dos teores dos ácidos láctico (a), acético (b) e propiônico (c) em função dos períodos (P) de fermentação, para as silagens de amendoim forrageiro produzidas com os diferentes inoculantes bacterianos

Tabela 5. Contagem de bactérias ácido lácticas (BAL), enterobactérias (ENT) e mofo e leveduras (ML) em silagens de amendoim forrageiro, ao longo do período de fermentação

Item	Período	Inoculantes					Média
		Controle	IC-DA	IC-DB	I 10,6	Pool	
BAL (log UFC/g MN)	1	8,81	8,88	8,91	9,15	9,05	8,96
	3	8,88	8,92	8,84	9,28	9,43	9,07
	7	8,83	8,79	8,65	8,96	8,93	8,83
	14	8,37	8,31	8,26	8,56	8,65	8,43
	28	7,93	7,72	7,94	8,22	8,22	8,01
	56	7,85	7,52	7,73	7,83	7,86	7,73
Média		8,43 b	8,36 b	8,39 b	8,66 a	8,69 a	
ENT (log UFC/g MN)	1	6,83	6,71	7,13	6,95	7,06	6,94
	3	5,93	5,82	6,03	5,82	5,63	5,85
	7	4,22	4,26	4,04	ND	ND	-
	14	2,35	ND	ND	ND	ND	-
	28	3,45	ND	ND	ND	ND	-
	56	ND	ND	ND	ND	ND	-
Média		-	-	-	-	-	
ML (log UFC/g MN)	1	5,98	5,84	5,80	5,82	6,11	5,91
	3	4,63	4,33	4,48	4,71	4,52	4,53
	7	4,01	4,07	4,07	3,99	4,00	4,03
	14	4,16	4,08	4,15	4,24	4,32	4,19
	28	4,05	3,99	4,12	4,12	4,12	4,08
	56	4,51 a	3,89 b	3,89 b	3,94 b	4,01 b	4,05
Média		4,56	4,37	4,43	4,47	4,51	

ND = Não detectado; IC-DA = Inoculante comercial dose alta; IC-DB = Inoculante comercial dose baixa; I 10,6 = Isolado bacteriocinogênico 10,6; Pool = Pool de isolados bacteriocinogênicos.

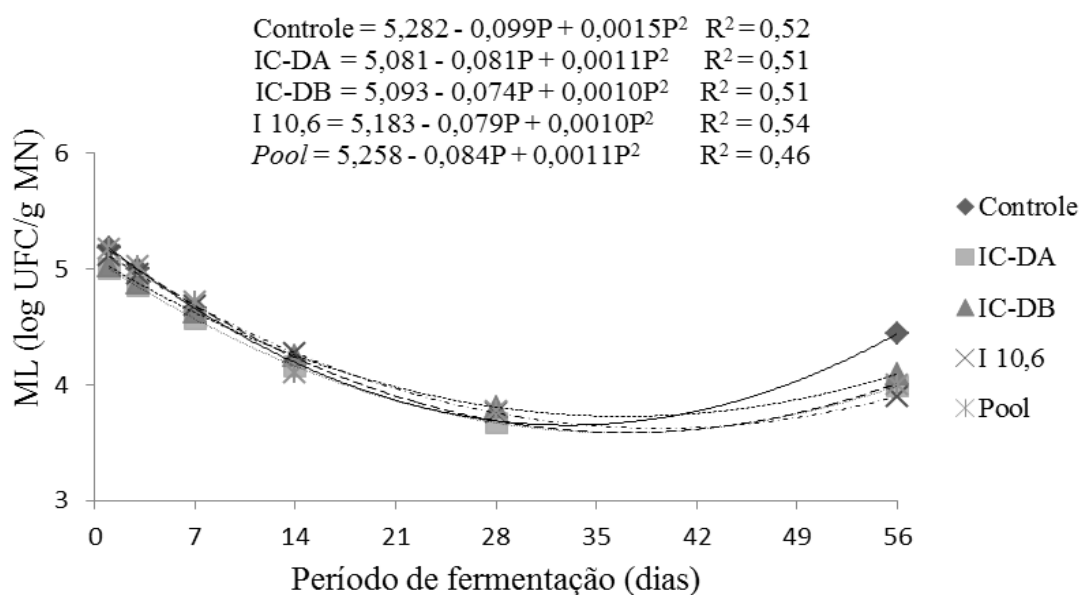


Figura 3. Estimativas das populações de mofo e leveduras em função dos períodos (P) de fermentação, para as silagens de amendoim forrageiro produzidas com os diferentes inoculantes bacterianos

A composição química das silagens no último dia de fermentação encontra-se na Tabela 6. O teor de MS foi maior ($P < 0,05$) para a silagem produzida com o isolado bacteriocinogênico 10,6 (222,53 g/kg), em comparação com a silagem controle (sem inoculante) e com a silagem produzida com o inoculante comercial 1 (10^7) (214,05 e 215,59 g/kg, respectivamente). A silagem produzida com o inoculante bacteriocinogênico 10,6 apresentou também menor teor ($P < 0,05$) de nitrogênio insolúvel em detergente ácido (**NIDA**) (9,50%), em comparação com a silagem produzida com o inoculante comercial 2 (10^5) (12,38%).

Tabela 6. Composição química e erro padrão da média (EPM) das silagens de amendoim forrageiro tratadas com diferentes inoculantes bacterianos, aos 56 dias de fermentação

Item	Inoculantes					EPM
	Controle	IC-DA	IC-DB	I 10,6	Pool	
MS (g/kg)	214,05 b	215,59 b	218,80 ab	222,53 a	219,30 ab	1,49
PB (g/kg MS)	169,23	172,65	170,31	175,72	175,48	1,31
EE (g/kg MS)	14,32	13,54	13,81	13,37	14,14	0,18
FDNcp (g/kg MS)	412,56	417,18	424,34	426,11	429,60	3,10
FDACP (g/kg MS)	299,73	297,40	298,98	305,39	302,75	1,43
NIDN (% N-total)	26,49	27,41	26,34	27,11	26,34	0,22
NIDA (% N-total)	11,67 ab	11,33 ab	12,38 a	9,50 b	10,78 ab	0,48

IC-DA = Inoculante comercial dose alta; IC-DB = Inoculante comercial dose baixa; I 10,6 = Isolado bacteriocinogênico 10,6; Pool = Pool de isolados bacteriocinogênicos. Médias seguidas por letras diferentes na linha diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Os teores de PB, EE, fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (**FDNcp**), fibra insolúvel em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína (**FDACP**) e nitrogênio insolúvel em detergente neutro (**NIDN**) não foram afetados ($P>0.05$) pelos diferentes inoculantes bacterianos, observando-se médias de 172,68, 13,84, 421,96, 300,85 g/kg e 26,74%, respectivamente.

3.3. Caracterização dos isolados de silagens de amendoim forrageiro

No decorrer do período de fermentação, as bactérias isoladas foram identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA (Tabela 7).

Foram obtidos 40 isolados, que tiveram a identificação confirmada pela análise das sequências de nucleotídeos obtidas do gene 16S rRNA. Dentre os 40 isolados selecionados para sequenciamento do produto PCR obtido, somente 17 isolados apresentaram sequências com identidade igual ou maior que 97 % com sequências já disponíveis no banco de dados do Genbank. Destas sequências foram identificadas bactérias pertencentes às espécies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus casei* ssp *casei* e *Pediococcus pentosaceus*. Bactérias pertencente ao gênero *Pediococcus* prevaleceram na silagem de amendoim forrageiro.

Pela análise da reconstrução da árvore filogenética pelo método de Neighbor-joining, observou-se que a sequência do isolado AML7.3 é estreitamente relacionada com a sequência de *Pediococcus pentosaceus* pertencentes ao banco de dados do GenBank, suportando um valor de bootstrap de 100 (Figura 4).

Tabela 7. Informações sobre as sequências obtidas do produto PCR do 16S rDNA das estirpes isoladas

Isolados	Identidade (%)	Estirpe referente	Nº acesso Genbank
0.11	97	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KF013201.1
0.14	97	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KF013201.1
0.16	97	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KF013201.1
1.2	98	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	FR873989.1
1.4	99	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	JF268321.1
3.1	98	<i>Lactobacillus plantarum</i>	EU559598.1
7.2	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	JQ322223.1
7.3	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KF697643.1
7.4	98	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KF149102.1
7.17	97	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KF013201.1
14.10	98	<i>Lactobacillus plantarum</i>	JX262241.1
14.16	97	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	JX477168.1
28.1	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KF697643.1
28.3	98	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	JQ322223.1
28.6	97	<i>Lactobacillus casei</i> ssp <i>casei</i>	AP012544.1
28.7	97	<i>Lactobacillus casei</i> ssp <i>casei</i>	AP012544.1
56.1	97	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	JX477168.1
56.2	97	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KF013201.1
56.4	97	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CP000422.1
56.5	98	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KF013201.1

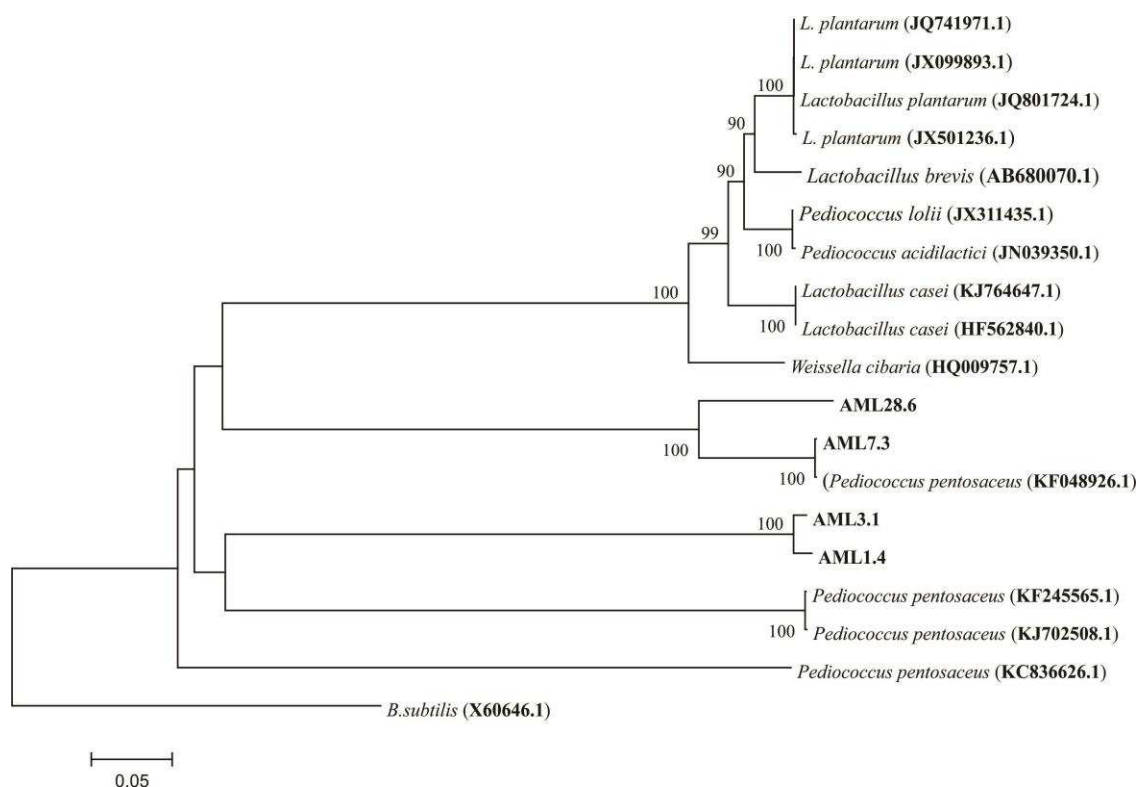


Figura 4. Árvore filogenética de sequencias parciais do 16S rDNA de estirpes isoladas e sequencias de bactérias identificadas pertencentes ao banco de dados de nucleotídeos do Genbanck. *Bacillus subtilis* (X60646.1) foi utilizado como grupo externo. A árvore foi reconstruída pelo método Neighbor-joining, e os números nos nós das ramificações da árvore referem aos valores de bootstrap (expresso como porcentagem de 1000 réplicas)

4. Discussão

O teor de MS desempenha papel fundamental na confecção da silagem ao aumentar a concentração de nutrientes, facilitar os processos fermentativos e diminuir a capacidade de ação dos clostrídeos (Haigh, 1990). Em espécies com alto teor de umidade, como a estudada nesta pesquisa (222,70 g/kg de MS), adequada acidificação é essencial para o êxito na preservação da massa ensilada, devido ao fato de a acidez

prevenir o desenvolvimento de microrganismos deterioradores, que são menos tolerantes às condições ácidas do que as BAL (Woolford, 1984; McDonald et al., 1991).

O baixo teor de carboidratos solúveis do amendoim forrageiro (38,76 g/kg) na ocasião da ensilagem é fator que interfere negativamente no processo fermentativo, uma vez que os carboidratos solúveis constituem os substratos prontamente disponíveis para o desenvolvimento das BAL, o que os torna essenciais para a produção de níveis adequados de ácido láctico e a rápida redução do pH, necessária para a inibição da atividade proteolítica das enzimas vegetais e do desenvolvimento das bactérias indesejáveis (Muck, 1993).

O alto poder tampão do amendoim forrageiro também é limitante da ensilagem. Neste estudo, o poder tampão verificado no amendoim forrageiro (19,57 eq.mg HCl/100 g MS) foi menor que os valores encontrados por Monteiro et al. (1998), que em estudo com 17 cultivares de alfafa, sem emurchecimento, obtiveram valores variando de 36,10 a 47,55 eq.mg HCl/100 g MS.

As BAL da microflora epifítica são essenciais para fermentação das silagens, entretanto nenhum grupo varia tanto em número quanto esse, indo do limite de detecção (10^1) a 10^5 UFC g⁻¹ na alfafa, 10^6 em gramíneas perenes e 10^7 em milho e sorgo (Pahlow et al., 2003). Comparando com esses valores, a população de BAL na planta de amendoim forrageiro antes da ensilagem de 7,02 log de UFC/g pode ser considerada elevada. Rosa et al. (2012) encontraram populações de BAL, na forragem dessa mesma leguminosa, de 3,31 log UFC/g em razão, provavelmente, da época de colheita do amendoim-forrageiro.

O isolado 10,6 e, ou, o pool de isolados proporcionaram melhoria no perfil microbiológico nos diferentes períodos de fermentação da silagem, e isso se deve, possivelmente, à capacidade de colonização e tolerância às várias condições de estresse

que prevalecem no decorrer da fermentação. Provavelmente, esses isolados apresentam características fisiológicas (velocidade de crescimento e tolerância à redução no valor de pH) mais acentuadas que as culturas presentes no inoculante comercial nas duas doses utilizadas. As estirpes usadas no inoculante comercial foram isoladas de culturas de clima temperado e, possivelmente, esses microrganismos não apresentam o mesmo desempenho metabólico em condições tropicais.

A eficiência do tratamento com o isolado 10,6 ou pool de isolados também se manifesta na inibição do crescimento de microrganismos entéricos (ex. *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*). Esses microrganismos crescem bem em ambientes neutros (Bearson et al., 1997), por isso se manifestam em maior número no início do período de fermentação. O decréscimo do valor de pH no decorrer da fermentação cria condições desfavoráveis para o crescimento de microrganismos entéricos, mas vale ressaltar que muitos desses microrganismos são capazes de desenvolver estratégias de sobrevivências a condições de estresse ácido, o qual pode ser descrito como o efeito biológico combinado do decréscimo de pH e ácido fraco (orgânico) presente no ambiente (Bearson et al., 1997). Nessa condição, já foram verificados vários mecanismos (ex. descarboxilação de aminoácidos, homeostase, proteínas chaperoninas) em microrganismos entéricos que permitem a sua sobrevivência em condições ácidas (Bearson et al., 1997). Por esse motivo, a utilização de culturas com potencial bacteriocinogênico (isolado 10,6 e pool de isolados) pode ter proporcionado imediata redução na população de microrganismos entéricos no início do período de fermentação. A redução desses microrganismos é interessante, pois pode indicar boas condições de ensilabilidade.

A população de mofos e leveduras em leguminosas normalmente é encontrada em baixo número. Neste estudo, essa população apresentou-se baixa no decorrer do

período de fermentação, mas foi constatado que, independentemente do tipo do inoculante utilizado, a sua adição favorece a redução da população desse grupo microbiano no final do período de fermentação.

A ausência do efeito de inoculantes sobre o teor de N-NH_3 , cujo valor médio foi de 7,2%, indicou que o processo de fermentação não resultou em quebra excessiva da proteína em amônia. Mahana e Chase (2003) consideraram que silagens de leguminosas com até 12-15% de $\text{NH}_3\text{-N} / \text{NT}$ podem ser classificadas como de boa qualidade.

O isolado 10,6 e o pool de isolados proporcionaram menores valores de pH aos 14 dias de fermentação, e esse comportamento se manteve até o último período de fermentação somente para o isolado 10,6. Isso demonstra que o isolado 10,6 tem grande potencial para ser utilizado como inoculante, por ter resultado em menor valor de pH (4,76) aos 56 dias de fermentação. Porém, esse valor está acima dos 4,5 considerados adequados em silagens tradicionais como as de milho (Mahana; Chase, 2003). No entanto, é fato reconhecido que as silagens de leguminosas estabilizam em pH mais elevado.

Os valores de ácido láctico encontrados neste trabalho vão de encontro às afirmações de Moisio e Heikonem (1994) de que o conteúdo desse ácido deve aparecer em maior porcentagem que os demais, uma vez que todos os ácidos produzidos durante o processo fermentativo contribuem para a redução do pH da silagem e o ácido láctico exerce fundamental importância nesse processo, em razão de apresentar maior constante de dissociação que os demais. Neste estudo, no final do processo fermentativo, o maior teor de ácido láctico foi verificado na silagem produzida com o isolado 10,6, em comparação com a silagem controle e as silagens tratadas com o inoculante comercial nas duas doses. Da mesma forma, Silva et al. (2013), trabalhando com isolados com potencial bacteriocinogênico em silagens de capim-elefante, também verificaram maior

teor de ácido láctico nas silagens produzidas com o isolado 10,6. Já as baixas concentrações de ácido butírico observadas em todas as silagens comprovam que não houve efetivamente fermentação clostrídica e indicam boa qualidade das silagens.

Altos valores de NIDA não são desejáveis em silagens, pois correspondem ao nitrogênio retido na fibra em detergente ácido, não sendo aproveitado pelas bactérias ruminais (Van Soest; Mason, 1991; Licitra et al., 1996). Neste estudo, a silagem produzida com o isolado 10,6 apresentou menor teor de NIDA em relação à silagem produzida com o inoculante comercial na dose mais baixa, indicando que a fermentação da silagem inoculada com esse isolado foi melhor.

Pediococcus pentosaceus é a espécie predominante entre os isolados selecionados para identificação, por sequenciamento, do gene 16S rRNA na silagem controle (sem inoculante) de amendoim-forrageiro. Essa espécie é muito comum em silagem, e alguns trabalhos têm demonstrado a seleção de estirpes com capacidade de sintetizar bacteriocinas em alimento vegetal fermentado e em marula (Shin et al., 2008; Todorov; Dicks, 2009). A presença de bactérias epifíticas com essa característica poderá acentuar ainda mais a qualidade da silagem em termos microbiológicos e, conseqüentemente, na composição química.

5. Conclusões

A utilização do isolado bacteriocinogênico 10,6 permitiu o estabelecimento de uma população microbiana desejável no decorrer do processo de fermentação, resultando em silagem com melhor qualidade. A espécie de BAL predominante na silagem de amendoim-forrageiro foi *Pediococcus pentosaceus*. O isolado bacteriocinogênico 10,6 pode ser considerado estirpe promissora para utilização como

inoculante microbiano na produção de silagem de amendoim-forrageiro em regiões de clima tropical.

Referências

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. AOAC, Arlington, VA.
- Bearson, S., B. Bearson, and J. W. Foster. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *Microbiology Letter*. 147: 173-180.
- Bolsen, K. K., C. Lin, C. R. Brent, A. M. Feyerherm, J. E. Urban, and W. R. Aimutis. 1992. Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silages. *J. Dairy Sci.* 75: 3066-3083.
- Deriaz, R. E. 1961. Routine analysis of carbohydrate and lignin in herbage. *J. Sci. Food Agric.* 12: 150-160.
- Duan, Y., Z. Tan, Y. Wang, Z. Li, G. Qin, Y. Huo, and Y. Cai. 2008. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Tibetan Qula cheese. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 54: 51-60.
- Haigh, P. M. 1990. Effect of herbage water-soluble carbohydrate content and weather conditions at ensilage on the fermentation of grass silages made on commercial farms. *Grass Forage Sci.* 45: 263-271.
- Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla, and E. M. H. Wellington. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3233-3241.

- Keady, T. W. J., C. M. Marley, and N. D. Scollan. 2012. Grass and alternative forage silages for beef cattle and sheep: effects on animal performance. XVI International Silage Conference; Proceeding... Hämeenlinna, Finland.
- Kung Jr., L., and N. K. Ranjit. 2001. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *J. Dairy Sci.* 84: 1149-1155.
- Kung Jr., L., M. R. Stokes, and C. J. Lin. 2003. Silage additives. In Buxton, D.R., R. E. Muck, and J. H. Harrison. (Eds.). *Silage science and technology*. Wisconsin.
- Licitra, G., T. M. Hernandez, and P. J. Van Soest. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Ani. Feed Sci. Technol.* 57: 347-358.
- Mahhana, B., and L. E. Chase. 2003. Practical application and solution to silage problems. In: *Silage science and technology*. Madison. Proceedings... Madison.
- McDonald, P., A. R. Henderson, and S. J. E. Heron. 1991. *The biochemistry of silage*. Chalcombe Publications, London.
- Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. *J. AOAC Int.* 85: 1217-1240.
- Moisio, T., and M. Heikonen. 1994. Lactic acid fermentation on silage preserved with formic acid. *Ani. Feed Sci. Technol.* 47: 107-124.
- Monteiro, A. L. G., C. Costa, and M. B. Arrigoni. 1998. Evaluation of ensilage potential of alfalfa cultivars (*Medicago sativa* L.). *R. Bras. de Zootecn.* 27: 1064-1068 (in Portuguese (English abstract)).
- Muck, R. E. 1993. The role of silage additives in making high quality silage. In: *Silage Production from Seed to Animal*. New York. Proceedings... New York.

- Pahlow, G., R. E. Muck, F. Driehuis, J. W. H. Stefanie, O. Elferink, and S. F. Spoelstra. 2003. Microbiology of ensiling. Buxton, D.R., R. E. Muck, and J. H. Harrison. (Eds.). Silage science and technology. 1.ed. Madison: American Society of Agronomy.
- Paulino, V. T., E. Ferrari Jr., R. A. Possenti, and T. L. Lucenas. 2009. Silagem de Amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* cv. Belmonte) com diferentes aditivos. B. Indústr. Anim. 66: 33-43 (in Portuguese (English abstract)).
- Pereira, O. G., A. S. Oliveira, and K. G. Ribeiro. 2009. Strategies to enable the use of legume silage in ruminant production. Proceedings of the International Symposium on Forage Quality and Conservation. Piracicaba: Fealq.
- Playne, M. J., and P. McDonald. 1966. The buffering constituents of herbage and of silage. J. Sci. Food Agric. 17: 262-268.
- Ramos, A. K. B., A. O. Barcellos, and F. D. Fernandes. 2010. Gênero *Arachis*. In: Fonseca, D.M., and J. A. Martuscello, editors, Plantas forrageiras (In Portuguese), Viçosa.
- Ribeiro, K. G., O. G. Pereira, J. P. S. Rigueira, W. F. Souza, A. S. Cezario, L. D. A. Rufino, L. O. Rosa, and A. F. Campos. 2012. Chemical composition and fermentative profile of elephant grass and Campo Grande *Stylosanthes* mixed silages In: International Silage Conference, Hämeenlinna, Finland. Proceedings of the XVI International Silage Conference. Hämeenlinna, Finland: Unigrafia, Helsinki.
- Rigueira, J. P. S., O. G. Pereira, K. G. Ribeiro, A. S. Cezario, and W. F. Souza. 2012. Chemical composition and fermentation profile of *Brachiaria brizantha* and Campo Grande *Stylosanthes* mixed silages In: Joint Annual Meeting of American Society of Animal Science, Phoenix, Arizona. Journal of Animal Science. Phoenix, Arizona.

- Rosa, L.O., O. G. Pereira, L. D. A. Rufino, T. C. Silva, L. L. Cardoso, and R. M. Martins. 2012. Chemical composition of Peanut forage silages with inoculants and powdered molasses. In: 49^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Anais... Brasília (in Portuguese (English abstract)).
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425.
- Shin, M. S., S. K. Han, J. S. Ryu, K. S. Kim, and W. K. Lee. 2008. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* K23-2 isolated from Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* 105: 331-339.
- Silva, M. P. 2011. Prospection of bacteriocinogenic lactic bacteria in estilosantes silage. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa (in Portuguese (English abstract)).
- Silva, M. P., T. C. Silva, L. D. A. Rufino, M. C. N. Agarussi, O. G. Pereira, and H. C. Mantovani. 2013. Influence of bacteriocinogenic lactic acid bacteria on the fermentation profile of elephant grass silage. ADSA-ASAS Joint Annual Meeting, Indianápolis. Abstracts... Indianapolis.
- Staples, C. R., S. M. Emanuele, and G. M. Prine. 1997. Intake and nutritive value of florigraze rhizome peanut silage for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 541-549.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013 MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Todorov, S. D., and L. M. T. Dicks. 2009. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). *Int. J. Food Microbiol.* 132: 117–126.

- Van Soest, P. J., and V. C. Mason. 1991. The influence of Maillard reaction upon the nutritive value of fibrous feeds. *Ani. Feed Sci. Technol.* 32: 45-53.
- Woolford, M. K. 1984. *The silage fermentation*. New York, Marcel Dekker.
- Zopolatto, M., J. L. P. Daniel, and L. G. Nussio. 2009. Microbial silage additives in Brazil: review of aspects of ensilage and animal performance. *Rev. Bras. Zootecn.* 38: 170-189 (in Portuguese (English abstract)).

Capítulo II

PARÂMETROS NUTRICIONAIS E DESEMPENHO PRODUTIVO DE BOVINOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO SILAGEM E FENO DE ESTILOSANTES CAMPO GRANDE ASSOCIADOS OU NÃO À SILAGEM DE MILHO

Resumo - Foram avaliados o efeito do fornecimento de diferentes volumosos sobre a digestibilidade parcial e total dos nutrientes, o pH e a amônia ruminal; e a eficiência de utilização de nitrogênio (Experimento 2), bem como o consumo e digestibilidade total dos nutrientes, além do desempenho produtivo (Experimento 3) de novilhos da raça Nelore. Foram avaliadas dietas contendo três volumosos: silagem de milho (SM), silagem de estilosantes Campo Grande (SSt) e feno de estilosantes Campo Grande (FSt) e duas dietas mistas (50% de SM + 50% de SSt e 50% de SM + 50% de FSt). Todas as dietas foram isoproteicas (12,5% PB, com base na MS) e consistiram de 50% de concentrado e 50% de forragem. No experimento 1, foram utilizados cinco bovinos com peso corporal inicial (PCi) de $251 \pm 42,6$, fistulados no rúmen e abomaso, distribuídos em um quadrado latino 5×5 . Esse experimento teve duração de 80 dias, divididos em cinco períodos de 16 dias cada, sendo 10 dias para adaptação e seis para coleta de dados. No experimento 2 foram utilizados 40 bovinos com PCi de $360 \pm 2,7$ kg, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e oito repetições. Esse experimento teve duração de 99 dias, sendo 15 dias para adaptação. A digestibilidade aparente total da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp) e os teores de nutrientes digestíveis totais (NDT) foram maiores ($P < 0,05$) na dieta contendo SM em relação às demais. Os animais alimentados com a dieta contendo SM apresentaram menores

($P < 0,05$) consumos de MS, MO, proteína bruta (PB), extrato etéreo, FDNcp, carboidratos não fibrosos (CNF), fibra insolúvel em detergente neutro indigestível (FDNi) e fibra em detergente neutro não digerida (FDNND) em relação às dietas contendo SM + SSt ou SM + FSt, no entanto o consumo de NDT e matéria orgânica digerida (MOD) foi o mesmo ($P > 0,05$). O ganho médio diário (GMD) e o ganho médio diário de carcaça (GMDC) foram maiores ($P < 0,05$) nos animais alimentados com a dieta contendo SM (1,55 kg e 0,89 kg, respectivamente) em relação aos alimentados com as dietas contendo SSt ou FSt (1,30 kg e 0,67 kg e 1,11 kg e 0,65 kg, respectivamente). Não foram verificadas diferenças ($P > 0,05$) para o GMD e GMDC dos animais alimentados com a dieta contendo SM em relação aos alimentados com as misturas. Contudo, a conversão alimentar foi menor ($P < 0,05$) na dieta com SM (5,48) em relação às misturas SM + SSt ou SM + FSt (6,40 e 7,56, respectivamente). Conclui-se que as misturas de silagem de milho com silagem ou feno de estilosantes constituem boa alternativa de utilização de silagem de milho para alimentação de bovinos de corte na fase de terminação.

**NUTRITIONAL PARAMETERS AND PRODUCTIVE PERFORMANCE OF
BEEF CATTLE FED DIETS CONTAINING STYLOSANTHES CV. CAMPO
GRANDE SILAGE AND HAY ASSOCIATED OR UNASSOCIATED WITH
CORN**

Abstract – The total apparent and partial digestibility of nutrients, pH, ruminal ammonia, and use efficiency of nitrogen (Experiment 2) and the intake of nutrients and productive performance (Experiment 3) of Nellore cattle fed diets containing different forages were evaluated. Diets containing the following three roughages were evaluated: corn silage (CS); silage of *Stylosanthes* var. Campo Grande (SSt); and hay of *Stylosanthes* var. Campo Grande (HSt), plus two mixed diets (50% CS + 50% SSt; and 50% CS + 50% HSt). All diets were isoproteic (12.5% CP, on a DM basis), and consisted of 50% concentrate and 50% forage. In the experiment 2, five rumen- and abomasum-fistulated cattle with an average initial weight of 251 ± 42.6 kg were distributed in a 5×5 Latin square. This experiment lasted 80 days, divided into five 16-day periods, with 10 days for adaptation and six days for data collection. In the experiment 3, 40 cattle with an average initial weight of 360 ± 2.7 kg were distributed in a completely randomized design with five treatments and eight replicates. This experiment lasted 99 days, with 15 days for adaptation. The total apparent digestibility of dry matter (DM), organic matter (OM), neutral detergent fiber corrected for ash and protein (NDFap) and total digestible nutrients (TDN) were higher ($P < 0.05$) for CS as compared with the other diets. The animals fed CS showed lower ($P < 0.05$) intakes of DM, OM, crude protein (CP), ether extract, NDFap, non-fiber carbohydrates and indigestible neutral detergent insoluble fiber in relation to the diets containing CS + SSt or CS + HSt; however, TDN intake was the same ($P > 0.05$). Average daily gain was

higher ($P<0.05$) for the animals fed CS (1.55 kg) in relation to those fed SSt or HSt (1.30 and 1.11 kg, respectively). No difference ($P>0.05$) was found for weight gain between the animals fed SM and those fed the combinations. Nevertheless, feed conversion ($P<0.05$) was lower for CS (5.43) than combinations CS + SSt or CS + HSt (6.43 and 7.47, respectively). The combinations of corn silage with *Stylosanthes* silage or hay are a good alternative to the use of corn silage to feed beef cattle in the finishing stage.

1. Introdução

Em regiões de clima tropical, a utilização de bovinos em pastejo representa a forma mais prática e econômica de alimentação do rebanho. No entanto, os índices de produtividade obtidos neste sistema são baixos, fato esse atribuído, principalmente, à estacionalidade da produção de plantas forrageiras, com reflexos no desempenho produtivo dos animais mantidos em pastagens. Dessa forma, têm-se épocas de grande oferta de produtos de origem animal e épocas de escassez desses produtos.

A utilização de forragens conservadas é alternativa capaz de garantir o fornecimento de alimento de alta qualidade, durante o período de escassez de forragem. O milho é a espécie mais utilizada no processo de ensilagem pela facilidade de cultivo, alta produtividade e, principalmente, pela qualidade da silagem produzida. Porém, a silagem de milho apresenta baixo teor proteico, o que constitui limitação para o seu uso exclusivo, sobretudo, para animais com exigências nutricionais elevadas. Assim, a utilização de silagem e, ou, feno de leguminosas é uma opção, pois, além de aumentar o teor proteico da dieta e supri-la com maior quantidade de cálcio e fósforo (Pereira et al., 2008), eleva o nível de fertilidade do solo, com a adição de nitrogênio ao sistema pela fixação biológica.

Entre as leguminosas tropicais, estilosantes Campo Grande, resultado da mistura física das sementes de *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*, destaca-se por produzir forragem em quantidade e qualidade, em solos de baixa fertilidade natural (Karia et al., 2010). No Brasil, esses estilosantes têm sido bastante difundidos em sistemas de pastagens (Barcellos et al., 2008).

O uso de estilosantes Campo Grande conservado como feno ainda é pouco estudado e, quanto ao seu uso para produção de silagens, historicamente as leguminosas sempre foram consideradas inadequadas para ensilagem, entretanto o avanço na

tecnologia de silagem tem aberto a possibilidade para a ensilagem de forrageiras alternativas, como as leguminosas (Keady et al., 2012). Trabalhos recentes com silagens de estilosantes Campo Grande (Ribeiro et al., 2012; Rigueira et al., 2012) apresentaram resultados satisfatórios quanto às características fermentativas e químicas dessas silagens, além de resultados satisfatórios também para desempenho animal (Souza et al., 2014).

A hipótese desta pesquisa é de que a utilização de silagem ou feno de estilosantes Campo Grande em dietas com relação volumoso:concentrado de 50:50 promove desempenho animal semelhante ao obtido quando se utiliza a silagem de milho.

Portanto, foram objetivos deste estudo avaliar dietas contendo silagem e feno de estilosantes Campo Grande associados ou não à silagem de milho sobre a digestibilidade aparente total e parcial dos nutrientes, o pH e a concentração de amônia ruminal e a eficiência de utilização de nitrogênio, bem como o consumo de nutrientes e o desempenho produtivo de bovinos de corte.

2. Material e métodos

2.1. Local do experimento e condições climáticas

Os experimentos foram conduzidos na Central de Experimentação, Pesquisa e Extensão do Triângulo Mineiro (CEPET), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, Brasil, de julho a outubro de 2012. A CEPET é localizada no município de Capinópolis, MG, Brasil, em uma altitude média de 620.2 m, com latitude de 18°41'S e longitude de 49°34'W. O clima é o Aw, segundo a classificação proposta por Köppen, quente e úmido, com temperatura média do mês mais frio acima de 18°C, com estação

chuvosa no verão e seca no inverno, com precipitações médias anuais entre 1400 a 1600 mm.

2.2. Dietas experimentais

As dietas foram formuladas para serem isoprotéicas (12,5% de proteína bruta (PB), na matéria seca (MS) e formuladas para ganhos diários de 1kg, conforme BR-CORTE (Valadares Filho et al., 2010).

Os tratamentos foram constituídos de dietas contendo 50% de concentrado e 50% de cada um dos volumosos avaliados, sendo: silagem de milho (SM); silagem de estilosantes Campo Grande (SSt); feno de estilosantes Campo Grande (FSt); 50% de SM + 50% de SSt; 50% de SM + 50% de FSt. O concentrado utilizado foi o mesmo para todos os tratamentos. Como a silagem de estilosantes apresentava teor de PB maior que as demais forragens utilizadas, para as dietas contendo silagem de milho e feno de estilosantes o teor de PB foi corrigido para 12,5% adicionando-se ureia:sulfato de amônio (9:1) durante o fornecimento da ração.

A alimentação foi fornecida em duas refeições diárias, às 8h00 e às 15h00 e as sobras foram pesadas diariamente para regular a quantidade de alimento de forma a obter no máximo 100 g/kg do total fornecido. As sobras foram amostradas, acondicionadas em sacos identificados e armazenadas em freezer a -18°C para posteriores análises. As forragens e os concentrados foram amostrados três vezes por semana.

A composição química do concentrado e das forragens está apresentada na Tabela 1 e a composição química e a proporção dos ingredientes nas dietas experimentais, na Tabela 2.

Tabela 1

Composição químico-bromatológica do concentrado e dos volumosos (g/kg MS).

Itens ^b	Concentrado	Volumosos ^a		
		SM	SSt	FSt
MS	868,7	239,5	316,2	88,76
MO	966,4	957,5	934,2	934,5
PB	136,8	67,7	108,2	90,6
EE	29,1	14,0	15,9	10,4
FDNcp	184,9	607,1	640,4	643,4
FDACP	33,9	357,1	471,0	460,6
FDNi	12,9	241,5	41,74	39,34
LIG	16,0	47,3	147,6	110,8
MM	33,6	42,5	65,8	65,5
CNF	615,6	268,7	169,7	190,1

^a SM: Silagem de milho; SSt: Silagem de estilosantes; FSt: Feno de estilosantes.^b MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDNcp: fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinza e proteína; FDACP: fibra insolúvel em detergente ácido corrigida para cinza e proteína; FDNi: Fibra insolúvel em detergente neutro indigestível; LIG: lignina; MM: matéria mineral; CNF: carboidratos não fibrosos.

Tabela 2

Composição químico-bromatológica e proporção dos ingredientes nas dietas experimentais (g/kg MS).

Ingredientes	Dietas experimentais ^a				
	SM	SSt	FSt	SM + SSt	SM + FSt
Silagem de milho	49,06	50,00	49,57	24,76	24,66
Silagem de estilosantes	-	-	-	24,76	-
Feno de estilosantes	-	-	-		24,66
Uréia/SA ^b	0,94	-	0,43	0,48	0,68
Grão de milho moído	42,61	42,61	42,61	42,61	42,61
Farelo de soja	6,56	6,56	6,56	6,56	6,56
Mistura Mineral ^c	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Calcário calcítico	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
Composição químico-bromatológica das dietas					
Matéria seca	548,3	587,6	883,3	568,0	715,8
Matéria orgânica	962,3	950,3	950,7	956,3	956,5
Proteína bruta	125,1	122,5	124,1	123,8	124,6
Extrato etéreo	21,4	22,5	19,7	22,0	20,6
FDNcp ^d	390,3	412,7	411,4	401,5	400,9
FDACP ^e	192,1	252,5	245,3	222,3	218,7
FDNi ^f	124,8	241,7	220,7	183,3	231,2
Lignina	31,2	81,8	62,9	56,5	47,1
Matéria mineral	37,7	49,7	49,3	43,7	43,5
CNF ^g	439,6	392,7	402,0	416,2	420,8
NDT ^h	740,9	566,2	617,8	615,8	539,3

^a SM: Silagem de milho; SSt: Silagem de estilosantes; FSt: Feno de estilosantes; SM + SSt: 500 g/kg silagem de milho + 500 g/kg silagem de estilosantes; SM + FSt: 500 g/kg silagem de milho + 500 g/kg feno de estilosantes.

^b Uréia e sulfato de amônio na proporção de 9:1.

^c Composição por kg de produto: zinco (3,800mg); sódio (163g); manganês (1,005mg); cobalto (72mg); cobre (1.045mg); enxofre (13g); selênio (27mg); magnésio (12g); iodo (75mg); cálcio (130g); flúor (650mg); fósforo (65g).

^d FDNcp: fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína.

^e FDACP: fibra insolúvel em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína.

^f FDNi: fibra insolúvel em detergente neutro indigestível.

^g CNF: carboidratos não fibrosos.

^h NDT: nutrientes digestíveis totais.

2.3. Animais, manejo e coleta das amostras

O manejo e os cuidados com os animais foram realizados de acordo com as diretrizes e recomendações do Comitê de Ética em Estudos com Animais da UFV.

Cinco bovinos Nelore, fistulados no rúmen e abomaso, não castrados, com peso inicial médio de $251 \pm 42,6$ kg e distribuídos em um Quadrado Latino 5×5 foram usados para determinação da digestibilidade total e parcial dos nutrientes, eficiência na utilização de nitrogênio, e concentração de amônia e pH ruminal (EXP 2).

Os animais foram pesados antes de receberem a alimentação matinal, ao início e ao final de cada período experimental, num total de cinco períodos, com duração de 16 dias cada, sendo 10 para adaptação dos animais às dietas (1º ao 10º dia) e seis para coletas de digesta abomasal, líquido de rúmen, fezes, alimento fornecido e sobras (11º ao 16º dia) e coleta de urina spot e sangue no último dia.

Foi utilizado o sistema de indicador duplo (Co-EDTA indicador de fase líquida e FDNi indicador de fase de partículas), de acordo com France e Siddons (1986), para determinação do fluxo de MS e componentes da digesta abomasal. O Co-EDTA (5 g/dia), preparado de acordo com Úden et al. (1980), foi introduzido via fístula ruminal durante 8 dias, iniciando-se 2 dias antes do período de coletas e estendendo-se até o final de cada período experimental. As introduções de Co-EDTA (1.25 g) foram feitas às 00h00, 06h00, 12h00 e 18h00.

As 8 coletas de amostras de digesta de abomaso e de fezes foram realizadas a intervalos de 15 horas (Allen e Linton, 2007), totalizando cinco dias de coletas por período experimental. Os horários de coletas foram: 21h00, 12h00, 3h00, 18h00, 9h00, 0h00, 15h00 e 6h00, iniciando-se às 21h00 do 11º dia até as 6h00 do 16º dia. Foram coletados 200 g de fezes (diretamente do reto) e 800 mL de digesta abomasal (via fístula) para estimar o fluxo da digesta, que foram filtrados em filtro de náilon a 100 μ m com área de poros de 44% de superfície (Sefar Nitex 100/44, Sefar, Thal, Switzerland) obtendo-se assim duas fases: a fase retida no filtro foi denominada fase de partículas e a fase filtrada foi denominada fase líquida.

Também foram coletadas a cada 15 horas, amostras (50 mL) de líquido ruminal em cada animal. Imediatamente após a coleta foi efetuada a leitura do pH utilizando-se um peagâmetro digital. Em seguida, foi acrescentado 1 mL de solução de ácido sulfúrico 1:1, em cada amostra, sendo estas armazenadas em freezer a -18°C para posterior análise de nitrogênio amoniacal.

Quatro horas após a alimentação matinal, no 16º dia de cada período experimental, foram coletadas amostras de sangue por punção da veia jugular em um tubo de ensaio contendo um gel separador com ativador de coagulação (SST II Advance, BD Vacutainer, São Paulo city, São Paulo state, Brazil). Estas amostras foram estocadas à -18°C para análise de uréia no soro sanguíneo. Concomitantemente, 50 mL de amostra spot de urina foram obtidas para cada animal.

Para determinação do consumo e digestibilidade total dos nutrientes, e do desempenho produtivo, 40 bovinos Nelore, não castrados, com peso corporal inicial (PCi) de $360 \pm 2,7$ kg, foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e oito repetições (EXP 3). O experimento teve duração de 99 dias, divididos em três períodos experimentais de 28 dias, após 15 dias de período de adaptação. Cinco animais referência foram abatidos ao final do período de adaptação para estimativa do rendimento de carcaça inicial dos animais confinados.

A pesagem dos animais foi realizada ao final do período de adaptação, após 16 horas de jejum de sólidos, e repetida ao final do período experimental. No final do experimento, todos os animais foram abatidos para determinação do rendimento de carcaça (RC), que foi calculado pela razão percentual entre o peso da carcaça quente (PCQ) e o peso corporal final (PCf) em jejum, e ganho médio diário de carcaça (GMDC) que foi calculado através da equação:

$$\text{GMDC (kg/dia)} = [(\text{PCf} \times (\text{RC\%/100}) - (\text{PCi} \times (\text{RCR\%/100}))]/n$$

onde: PCf é o peso corporal final após jejum (kg), PCi é o peso corporal inicial após jejum (kg), RC é o rendimento de carcaça obtido após abate dos animais ao final do experimento (%), RCR é o rendimento de carcaça relativo aos animais do abate referência no início do período experimental (%), e “n” é o número de dias de avaliação.

Ao final dos experimentos, as amostras de alimentos fornecidos, sobras, fezes e de digesta abomasal foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 60°C, por 72 a 96 horas, e moídas em moinho de faca tipo Willey (TE-625, TECNAL, Piracicaba, São Paulo, Brasil) com peneira de 1 e 2 mm.

2.4. Análises químicas

As análises de MS, matéria orgânica (MO), e PB foram realizadas de acordo com a AOAC (1990), método número 934.01 para MS, 930.05 para MO, e 981.10 para PB. O extrato etéreo (EE) foi analisado de acordo com a AOAC (1990), método número 920.39. As análises de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) de acordo com Mertens (2002) e fibra insolúvel em detergente ácido (FDA) de acordo com a AOAC (1990), método número 973.18. As correções para cinzas e proteínas na FDN e FDA segundo Mertens (2002) e Licitra et al. (1996), respectivamente. A lignina foi extraída com ácido sulfúrico 720 mL/L (Van Soest e Wine, 1967).

Os carboidratos não fibrosos (CNF) foram calculados pela equação preconizada por Detmann e Valadares Filho (2010): $\text{CNF} = 100 - [(\% \text{PB} - \% \text{PB derivada da uréia} + \% \text{ de uréia}) + \% \text{FDNcp} + \% \text{EE} + \% \text{MM}]$. Os valores de nutrientes digestíveis totais (NDT) observados foram calculados para as diferentes dietas, conforme descrito por

Weiss et al. (1992), e adotado pelo NRC (2001): $NDT = PBD + (EED \times 2,25) + FDNcpD + CNFD$, em que PBD, EED, FDNcp e CNFD significam, respectivamente, proteína bruta digestível, extrato etéreo digestível, fibra em detergente neutro (isenta de cinzas e proteína) digestível e carboidratos não fibrosos digestíveis.

As amostras de digesta abomasal, fezes, alimentos e sobras, utilizadas para determinação da FDNi foram moídas à 2 mm e incubadas no rúmen (in situ) de bovinos, via fístula ruminal, em sacos de Ankom® (filter bags F57), por um período de 288 horas (Valente et al., 2011). No material remanescente da incubação foi realizada a determinação do teor de FDN, que corresponde ao FDNi. A produção de matéria seca fecal (MSF) foi calculada segundo a equação: $MSF (kg) = kg \text{ indicador ingerido} / \% \text{ do indicador nas fezes}$.

As análises de cobalto foram realizadas por leitura em espectrofotômetro de absorção atômica (Williams et al., 1962).

As amostras de bactérias e digesta abomasal (fase partículas e fase líquida) foram avaliadas quanto aos teores de PB (AOAC, 1990), método número 934.01 e bases púricas (Ushida et al., 1985).

Os coeficientes de digestibilidade aparente ruminal e intestinal da MS, MO, FDNcp, e CNF foram calculados em relação à digestibilidade total da MS, enquanto os coeficientes de digestibilidade ruminal e intestinal da PB e EE foram calculados também em relação às quantidades que chegaram em cada local de estudo.

A determinação das concentrações de nitrogênio amoniacal nas amostras de líquido ruminal foi realizada segundo a técnica colorimétrica descrita por Chaney & Marbach (1962).

As amostras de urina após o descongelamento e homogeneização foram analisadas para nitrogênio (N) total. O balanço de N (BN) foi obtido subtraindo-se o total de N excretado nas fezes e na urina do total de N ingerido.

2.5. Análises estatísticas

A comparação entre as dietas foi realizada por meio de contrastes, segundo metodologia de Gill (1978) (Tabela 3). Os contrastes C1 e C2 foram realizados para avaliar o efeito da silagem de milho em relação à silagem de estilosantes ou ao feno de estilosantes, respectivamente. O contraste C3 foi realizado para avaliar o efeito da silagem de estilosantes em relação ao feno de estilosantes. Os contrastes C4, C5 e C6 possibilitaram avaliar o efeito da silagem de milho ou silagem de estilosantes ou feno de estilosantes em relação à silagem de estilosantes na presença da silagem de milho e ao feno de estilosantes na presença da silagem de milho, respectivamente.

Tabela 3

Distribuição dos coeficientes nos contrastes não ortogonais empregados

Contrastes	SM ^a	SSt ^b	FSt ^c	SM+SSt ^d	SM+FSt ^e
C1	1	-1	0	0	0
C2	1	0	-1	0	0
C3	0	1	-1	0	0
C4	2	0	0	-1	-1
C5	0	2	0	-1	-1
C6	0	0	2	-1	-1

^a SM = silagem de milho.

^b SSt = silagem de estilosantes.

^c FSt = feno de estilosantes.

^d SM+SSt = 50% silagem de milho + 50% silagem de estilosantes.

^e SM+FSt = 50% silagem de milho + 50% feno de estilosantes.

Os dados referentes ao experimento 2 foram analisados segundo delineamento em quadrado latino 5×5 , incluindo os efeitos fixos (tratamentos) e aleatórios (animal e período). Os dados referentes ao experimento 3 foram analisados segundo delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 8 repetições, utilizando-se o peso vivo inicial como variável concomitante, assumindo-se os requisitos para utilização deste.

Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos utilizando o PROC MIXED do programa SAS (Statistical Analysis System), adotando-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

3. Resultados

3.1. Digestibilidade aparente total, ruminal e intestinal dos nutrientes (EXP 2)

A digestibilidade total da MS, MO e FDNcp das dietas contendo SM foram maiores ($P < 0,05$) que as dietas contendo SSt e FSt como fontes únicas de forragem ou associadas com à SM (Tabela 4). A dieta contendo SM apresentou também maior ($P < 0,05$) digestibilidade de PB em comparação com a SSt e com as dietas contendo SSt e FSt associados a SM.

A digestibilidade total dos nutrientes das dietas contendo SSt ou FSt como fontes exclusivas de forragem não diferiram ($P > 0,05$) das dietas contendo essas forragens associadas com 50% de SM, exceto para a digestibilidade da FDNcp, que foi menor ($P < 0,05$) para a dieta contendo SSt como fonte única de forragem.

Quando as dietas à base de estilosantes, na forma de silagem ou feno, foram comparadas, foi observada maior ($P < 0,05$) digestibilidade total de FDNcp para o FSt.

A digestibilidade ruminal da FDNcp foi maior ($P < 0,05$) para a dieta contendo SM em comparação com aquelas contendo SSt como fonte exclusiva de forragem. A digestibilidade intestinal dos nutrientes não diferiu ($P > 0,05$) entre as dietas.

Tabela 4

Valores médios para digestibilidade total, ruminal e intestinal dos nutrientes em dietas contendo silagem e feno de estilosantes Campo Grande associados ou não à silagem de milho (EXP 2).

	Tratamentos ^a					EPM	Contrastes ^b					
	SM	SSt	FSt	SM + SSt	SM + FSt		C1	C2	C3	C4	C5	C6
Digestibilidade total (g/kg)												
MS	705,3	603,5	612,2	633,7	575,0	15,2	0,0016	0,0032	0,7500	0,0005	0,9697	0,7415
MO	726,1	632,1	634,4	659,3	597,2	15,2	0,0021	0,0026	0,9305	0,0005	0,8643	0,7861
PB	645,7	511,1	533,2	559,3	494,9	19,3	0,0259	0,0569	0,6921	0,0239	0,7394	0,9004
FDNcp	619,6	424,0	492,8	514,5	518,3	17,4	<,0001	0,0007	0,0385	0,0013	0,0030	0,3843
Digestibilidade ruminal (g/kg)												
MS	469,4	413,2	381,3	409,9	358,8	24,3	0,4719	0,2669	0,6807	0,2189	0,6679	0,9632
MO	567,0	542,2	487,0	508,7	405,8	31,4	0,7867	0,3899	0,5498	0,1828	0,2953	0,7079
PB	197,7	184,4	163,7	199,9	183,8	22,9	0,8658	0,6676	0,7938	0,9318	0,9128	0,6814
FDNcp	571,1	380,2	460,4	486,7	473,6	22,8	0,0067	0,0898	0,2094	0,1060	0,0781	0,7145
Digestibilidade intestinal (g/kg)												
MS	235,9	190,2	230,9	223,8	216,2	24,7	0,5724	0,9505	0,6148	0,8195	0,6704	0,8756
MO	159,1	90,0	147,4	150,6	191,4	30,1	0,4708	0,9015	0,5486	0,8855	0,3326	0,7744
PB	448,0	326,7	369,5	359,5	311,1	29,7	0,2196	0,4205	0,6582	0,1894	0,9179	0,6830
PB ^c	547,8	389,0	428,1	440,8	370,7	29,7	0,1007	0,2077	0,6736	0,0908	0,8349	0,7804
FDNcp	48,5	43,8	32,3	27,8	44,7	19,3	0,9206	0,7326	0,8084	0,7648	0,8537	0,9237

^a SM: Silagem de milho; SSt: Silagem de estilosantes; FSt: Feno de estilosantes; SM + SSt: 500 g/kg silagem de milho + 500 g/kg silagem de estilosantes; SM + FSt: 500 g/kg silagem de milho + 500 g/kg feno de estilosantes.

^b C1 = contraste SM vs SSt; C2 = contraste SM vs FSt; C3 = SSt vs FSt; C4 = contraste SM vs SM+SSt e SM+FSt; C5 = contraste SSt vs SM+SSt e SM+FSt; C6 = contraste FSt vs SM+SSt e SM+FSt.

^b quantidade que chegou ao abomaso.

3.2. Concentração de amônia e pH ruminal, e eficiência na utilização de nitrogênio (EXP 2)

Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) para as concentrações de nitrogênio amoniacal ruminal em função das diferentes fontes de forragem (Tabela 5). Os valores de pH ruminal para os animais alimentados com as dietas contendo SSt ou FSt como fontes exclusivas de forragem foram maiores ($P<0,05$) em comparação com aqueles dos animais alimentados com as misturas (SM + SSt e SM + FSt).

Os animais que consumiram as dietas com SM ou SSt ou FSt como fontes exclusivas de forragem apresentaram menores ($P<0,05$) valores de nitrogênio ingerido (NI) em comparação com aqueles que receberam as misturas (50% de SM + 50% de SSt e 50% de SM + 50% de FSt).

Os valores de NF foram menores ($P<0,05$) para os animais que consumiram a dieta com SM em comparação com os que consumiram SSt ou as misturas (50% de SM + 50% de SSt e 50% de SM + 50% de FSt). A excreção fecal de N foi menor também para os animais que consumiram FSt em comparação com os que receberam as misturas.

Foi observado menor valor ($P<0,05$) de NUS para os animais alimentados com a dieta contendo SM em comparação com os alimentados com FSt.

Tabela 5

Valores médios para pH, N-NH₃ e eficiência de uso do nitrogênio para bovinos alimentados com dietas contendo silagem e feno de estilosantes Campo Grande associados ou não à silagem de milho (EXP 2).

	Tratamentos ^a					EPM	Contrastes ^b					
	SM	SSt	FSt	SM + SSt	SM + FSt		C1	C2	C3	C4	C5	C6
pH	6,37	6,50	6,44	6,27	6,34	0,03	0,0764	0,3298	0,4218	0,2994	0,0022	0,0314
N-NH ₃ , mg/dL	24,33	25,57	24,73	23,24	22,40	0,62	0,4921	0,8253	0,6408	0,3318	0,0787	0,2209
NI, g/dia	94,48	104,03	100,15	104,74	129,51	7,04	0,1128	0,3295	0,5006	0,0005	0,0189	0,0043
NF, g/dia	33,53	50,32	45,20	49,31	65,25	4,24	0,0131	0,0659	0,3924	0,0005	0,1889	0,0325
NU, g/dia	38,53	37,55	38,20	36,10	41,55	2,85	0,9145	0,9707	0,9436	0,9701	0,8717	0,9363
NR/NI, %	23,20	15,10	16,16	15,46	16,80	2,42	0,2913	0,3568	0,8886	0,2875	0,8750	0,9965
NUU, g/dia	29,46	30,43	31,39	29,21	31,43	2,31	0,8906	0,7833	0,8904	0,8876	0,9861	0,8599
NUS, mg/dL	12,58	14,82	15,89	14,07	14,35	0,52	0,0872	0,0174	0,3898	0,1430	0,5705	0,1326
BN, g/dia	22,42	16,16	16,75	19,33	22,71	2,77	0,4229	0,4674	0,9382	0,8343	0,4710	0,5261

^a SM: Silagem de milho; SSt: Silagem de estilosantes; FSt: Feno de estilosantes; SM + SSt: 500 g/kg silagem de milho + 500 g/kg silagem de estilosantes; SM + FSt: 500 g/kg silagem de milho + 500 g/kg feno de estilosantes.

^b C1 = contraste SM vs SSt; C2 = contraste SM vs FSt; C3 = SSt vs FSt; C4 = contraste SM vs SM+SSt e SM+FSt; C5 = contraste SSt vs SM+SSt e SM+FSt; C6 = contraste FSt vs SM+SSt e SM+FSt.

3.3. Consumo e digestibilidade total dos nutrientes (EXP 3)

Os consumos de MS (g/kg PC), MO (g/kg PC), EE, FDNcp, FDNi (kg/dia) e FDNND foram menores ($P<0,05$) para os animais alimentados com a dieta contendo SM em comparação com àqueles que receberam as dietas contendo SSt ou as misturas (SM + SSt e SM + FSt) (Tabela 6). Os animais que consumiram SM também apresentaram menores ($P<0,01$) consumos de PB e CNF em relação àqueles alimentados com SM + SSt e SM + FSt. Apesar do menor consumo de MS, o consumo de NDT foi maior ($P<0,05$) para os animais alimentados com SM em comparação com os animais alimentados com SSt. Quando a SM foi comparada com o FSt, foi observado maior ($P<0,05$) consumo de PB, CNF, NDT e MOD, e menor ($P<0,05$) consumo de FDNi e FDNND para a SM.

Quando as dietas à base de estilosantes, na forma de silagem ou feno, foram comparadas, foi observado maiores ($P<0,05$) consumos de todos os nutrientes para a dieta com SSt.

Na comparação da SSt com as misturas (SM + SSt e SM + FSt), foram observados menores ($P<0,05$) consumos de MS (kg/dia), MO (kg/dia), PB, FDNcp, CNF e NDT, e maior ($P<0,05$) consumo de FDNi (g/kg PC) para a SSt. Já na comparação do FSt com as misturas (SM + SSt e SM + FSt), foram verificados menores ($P<0,05$) consumos de todos os nutrientes para o FSt.

A dieta contendo SM apresentou maiores ($P<0,05$) digestibilidade de todos os nutrientes, bem como maior teor de NDT em comparação com as dietas contendo SSt e FSt associadas ou não à SM, exceto para a digestibilidade de CNF da dieta contendo SSt, que não teve diferença ($P>0,05$) da dieta com SM.

Quando as dietas contendo SSt ou FSt de forma exclusiva foram comparadas, foi observado menor ($P < 0,05$) digestibilidade de EE e menor teor de NDT para a dieta com SSt.

A dieta contendo SSt apresentou menor ($P < 0,05$) digestibilidade de FDNcp quando comparada com a dieta contendo as misturas.

A dieta contendo FSt apresentou maior digestibilidade ($P < 0,05$) de MS, MO, PB e CNF em comparação com as misturas.

Tabela 6

Valores médios para os consumo e digestibilidade total dos nutrientes em bovinos alimentados com dietas contendo silagem e feno de estilosantes Campo Grande associados ou não a silagem de milho (EXP 3).

	Tratamentos					EPM	Contrastes ^a					
	SM	SSt	FSt	SM + SSt	SM + FSt		C1	C2	C3	C4	C5	C6
Consumo (kg/dia)												
MS	8,81	9,76	7,54	10,26	11,72	0,29	0,0816	0,0723	0,0008	0,0001	0,0323	<,0001
MO	8,44	9,24	7,18	9,81	11,21	0,28	0,1206	0,0602	0,0012	0,0001	0,0201	<,0001
PB	1,14	1,17	0,94	1,28	1,37	0,03	0,4550	0,0153	0,0021	0,0028	0,0253	<,0001
EE	0,19	0,22	0,16	0,23	0,24	0,01	0,0085	0,1184	<,0001	0,0001	0,2516	<,0001
FDNcp	3,15	3,69	3,01	3,78	4,99	0,14	0,0287	0,7881	0,0151	<,0001	0,0061	<,0001
CNF	4,20	4,16	3,22	4,73	4,85	0,12	0,9938	0,0006	0,0003	0,0084	0,0040	<,0001
FDNi	0,81	1,86	1,40	1,51	1,97	0,08	<,0001	<,0001	0,0009	<,0001	0,2231	0,0059
NDT	6,47	5,51	4,63	6,32	6,30	0,12	0,0070	<,0001	0,0115	0,5989	0,0087	<,0001
MOD	6,06	5,34	4,36	5,95	5,93	0,17	0,1846	<,0001	0,0030	0,9629	0,1165	<,0001
FDNND	1,09	1,98	1,55	1,85	2,48	0,12	<,0001	0,0100	0,0141	<,0001	0,2205	0,0002
Consumo (g/kg PC)												
MS	20,61	23,66	18,72	24,17	27,25	0,61	0,0226	0,1736	0,0006	<,0001	0,0810	<,0001
MO	19,76	22,40	17,84	23,11	26,07	0,58	0,0371	0,1464	0,0008	<,0001	0,0512	<,0001
FDNcp	7,37	8,96	7,48	8,90	11,60	0,30	0,0073	0,7963	0,0138	<,0001	0,0134	<,0001
FDNi	1,89	4,51	3,47	3,55	4,58	0,18	<,0001	<,0001	0,0010	0,0798	0,0254	0,0063
Digestibilidade total (g/kg)												
MS	704,9	562,9	596,0	583,2	499,6	32,4	<,0001	<,0001	0,1674	<,0001	0,3148	0,0125
MO	724,2	580,0	610,1	605,6	530,1	31,1	<,0001	<,0001	0,1959	<,0001	0,5788	0,0456
PB	708,8	500,2	616,0	577,1	435,2	47,1	<,0001	0,0009	0,0001	<,0001	0,7906	<,0001
EE	754,1	614,7	623,5	614,4	449,3	48,4	0,0195	0,0248	0,9245	0,0001	0,1347	0,1110
FDNcp	659,7	465,6	489,0	510,3	503,3	31,4	<,0001	<,0001	0,3266	<,0001	0,0399	0,3314
CNF	789,9	701,7	738,1	706,1	613,0	28,8	0,0062	0,0894	0,2528	<,0001	0,1292	0,0067
NDT	740,9	566,2	617,8	615,8	539,3	34,5	<,0001	<,0001	0,0245	<,0001	0,5018	0,0503

^a C1 = contraste SM vs SSt; C2 = contraste SM vs FSt; C3 = SSt vs FSt; C4 = contraste SM vs SM+SSt e SM+FSt; C5 = contraste SSt vs SM+SSt e SM+FSt; C6 = contraste FSt vs SM+SSt e SM+FSt.

3.4. Desempenho produtivo (EXP 3)

O peso corporal final (PCf), o ganho médio diário (GMD) e o ganho médio diário de carcaça (GMDC) foram maiores ($P<0,05$) para os animais alimentados com SM em relação àqueles alimentados com SSt ou FSt como fontes únicas de forragem (Tabela 7). Contudo, ao se comparar SM com as misturas (SM + SSt e SM + FSt), não foram verificadas diferenças ($P>0,05$) para estas variáveis. Os animais alimentados com SM apresentaram maior ($P<0,05$) rendimento de carcaça (RC) em comparação com àqueles alimentados com SSt e menor ($P<0,05$) conversão alimentar (CA) em comparação com os animais alimentados com as demais fontes de forragem.

Na comparação da SSt com o FSt, foi observado maior ($P<0,05$) GMD e menor ($P<0,05$) RC para os animais alimentados com a SSt.

Foram observados menores ($P<0,05$) PCf, GMD e GMDC para os animais alimentados com SSt ou FSt em comparação com àqueles alimentados com as misturas (SM + SSt e SM + FSt). Os animais alimentados com SSt apresentaram também menor ($P<0,05$) RC em comparação com àqueles alimentados com as misturas.

Tabela 7

Valores médios para peso corporal inicial (PCi), peso corporal final (PCf), ganho médio diário (GMD), ganho médio diário de carcaça (GMDC), rendimento de carcaça (RC) e conversão alimentar (CA) de bovinos alimentados com dietas contendo silagem e feno de estilosantes Campo Grande associados ou não a silagem de milho (EXP 3).

	Tratamentos					EPM	Contrastes ^a					
	SM	SSt	FSt	SM + SSt	SM + FSt		C1	C2	C3	C4	C5	C6
Desempenho produtivo												
PCi, kg	361,50	358,13	356,13	358,13	363,63	2,70	0,7091	0,6013	0,8450	0,9354	0,7500	0,6127
PCf, kg	491,63	467,50	449,50	492,00	492,13	8,67	0,0479	0,0010	0,1352	0,9660	0,0214	0,0002
GMD, kg	1,55	1,30	1,11	1,59	1,53	0,04	0,0101	<,0001	0,0469	0,8860	0,0023	<,0001
GMDC, kg	0,89	0,67	0,65	0,90	0,92	0,02	<,0001	<,0001	0,7944	0,6674	<,0001	<,0001
RC, %	54,15	52,64	54,17	53,90	54,83	0,23	0,0313	0,9217	0,0248	0,7035	0,0053	0,7908
CA	5,48	7,64	6,85	6,40	7,56	0,19	<,0001	0,0023	0,1043	0,0004	0,0750	0,9304

^aC1 = contraste SM vs SSt; C2 = contraste SM vs FSt; C3 = SSt vs FSt; C4 = contraste SM vs SM+SSt e SM+FSt; C5 = contraste SSt vs SM+SSt e SM+FSt; C6 = contraste FSt vs SM+SSt e SM+FSt

4. Discussão

4.1. Digestibilidade aparente total, ruminal e intestinal dos nutrientes (EXP 2)

Os maiores valores de digestibilidade total da MS e da maioria dos nutrientes para a dieta à base de SM, em comparação com as demais dietas, podem estar relacionados à fração fibrosa da SM, pois os teores de FDNi e lignina são menores que nas outras dietas (Tabela 2). Considerando que a FDNi é indisponível tanto no rúmen quanto nos intestinos, sua concentração nos alimentos pode ser inversamente relacionada à digestibilidade (Cabral et al., 2006). Além disso, a concentração de lignina é conhecida por limitar a digestão dos carboidratos fibrosos no rúmen, pois exerce papel de proteção sobre os componentes da parede celular, tornando-a hidrofóbica e impermeável (Van Soest, 1994; Jung; Allen, 1995).

Diferentemente dos resultados deste estudo, Souza et al. (2014), avaliando a substituição de até 100% da silagem de milho pela silagem de estilosantes Campo Grande, não observaram diferenças na digestibilidade aparente total dos nutrientes entre as dietas avaliadas.

A digestibilidade aparente ruminal foi maior nos animais alimentados com SM, em comparação com aqueles alimentados com SSt como fonte exclusiva de forragem em razão, provavelmente, da maior fração potencialmente degradável da fibra para as dietas com SM (Tabela 2).

4.2. Concentração de amônia e pH ruminal e eficiência de utilização de nitrogênio (EXP 2)

Os maiores valores de pH para as dietas à base de SSt ou FSt como fontes exclusivas de forragem, em comparação com as misturas, podem ser explicados devido à maior concentração de sais aniônicos em leguminosas, o que aumenta a capacidade

tamponante dessas plantas (Playne; McDonald, 1966; Heinritz et al., 2012). Valores de pH abaixo de 6,2 podem comprometer a taxa de digestão e aumentar o lag time para a degradação da parede celular (Van SOEST, 1994). Neste estudo, o pH ruminal de todas as dietas ficou acima de 6,2, indicando que o crescimento de microrganismos celulolíticos não foi prejudicado.

A concentração de N-NH₃ é consequência do equilíbrio entre a sua produção, absorção e utilização pelos microrganismos. Neste estudo, as concentrações de amônia ruminal não foram influenciadas pelas dietas, e todos os valores encontram-se acima dos 5 mg/dL preconizados por Satter e Slyter (1974) e dos 23 mg/dL (exceto para a mistura SM + FSt, com 22,40 mg/dL) preconizados por Mehrez e Ørskov (1977), para que ocorra máximo crescimento microbiano.

A menor ingestão de N para as dietas à base de SM ou SSt ou FSt nas formas exclusivas, em comparação com as misturas, se deve, provavelmente, ao menor consumo de MS observado nos animais que consumiram as forragens exclusivas, já que as dietas eram isoproteicas. De acordo com Hoffman et al. (2001), há relação linear entre o consumo de N e as excreções, tanto nas fezes quanto na urina. Neste estudo, a excreção de N nas fezes dos animais alimentados com SM ou FSt foi menor, em comparação com os animais alimentados com as misturas. No entanto, apesar da menor ingestão de N pelos animais consumindo as forragens exclusivas, em comparação com as misturas, a excreção urinária de N foi a mesma em todas as dietas.

A avaliação do balanço de nitrogênio no animal e da concentração de ureia no soro e na urina permite a obtenção de informações a respeito da nutrição proteica dos ruminantes, o que pode ser importante para evitar prejuízos produtivos, reprodutivos e ambientais, decorrente do fornecimento de quantidades excessivas de proteína ou da inadequada sincronia energia-proteína no rúmen (Pessoa et al., 2009). É importante

salientar que não foi verificado BN negativo em nenhuma das dietas, o que é indicativo de que o consumo de proteína atendeu às exigências proteicas dos animais.

O menor valor de NUS na dieta com SM, em comparação com dietas com FSt, não era esperado, já que a ingestão de nitrogênio foi a mesma nas duas dietas. De acordo com Valadares et al. (1997) e Valadares et al. (1999), a concentração sérica de ureia está positivamente relacionada à ingestão de nitrogênio.

4.3. Consumo e digestibilidade dos nutrientes (EXP 3)

O maior consumo de NDT e o menor de FDNi dos animais alimentados com SM, em comparação com aqueles alimentados com SSt ou FSt como fontes exclusivas de forragem, podem ser explicados devido ao maior teor de NDT da dieta à base de SM (740,9 g/kg), em comparação com as dietas à base de SSt ou FSt (566,2 g/kg e 617,8 g/kg, respectivamente) e ao menor teor de FDNi da dieta à base de SM (124,8%), em comparação com as dietas à base de SSt e FSt (241,7% e 220,7%, respectivamente) (Tabela 2). O menor consumo de MS pelos animais alimentados com SM, em comparação com aqueles alimentados com SSt, pode explicar os menores consumos de MO, EE e FDNcp pela SM.

De acordo com Mertens (1994), quando a densidade energética da ração é alta, em relação às exigências do animal, o consumo é limitado pela demanda energética do animal, e, se a ração apresenta baixa densidade energética, o consumo é limitado pelo efeito de enchimento. Isso pode explicar o menor consumo de MS pelos animais alimentados com a dieta à base de SM, em comparação com aqueles alimentados com as misturas (50% SM + 50% SSt e 50% SM + 50% FSt), e possivelmente o consumo desses animais foi limitado pelo suprimento da demanda energética, já que a dieta à base de SM apresentava maior teor de NDT, em comparação com as dietas que

continham as misturas SM + SSt e SM + FSt (615,8 e 539,3 g/kg, respectivamente) (Tabela 2). Entretanto, os animais alimentados com as misturas tiveram que consumir mais para que suas demandas energéticas fossem atendidas. Dessa forma, o consumo de NDT não diferiu entre os animais alimentados com SM ou com as misturas.

Detmann et al. (2014), em estudo com meta-análise avaliando a regulação do consumo voluntário em bovinos alimentados com forragem tropical basal, mostraram que o consumo de MS é simultaneamente regulado por limitações físicas e metabólicas. De acordo com o BR-CORTE (Valadares Filho et al., 2010), as exigências de PB e NDT, para animais da raça Nelore na categoria estudada, com ganho médio diário de 1,56 kg, é de 1,35 e 6,50 kg/dia, respectivamente. Os consumos de PB e NDT observados neste estudo ficaram próximos dos valores preconizados, com médias de 1,14; 1,28; e 1,37 kg/dia para PB e 6,47; 6,32; e 6,30 kg/dia para NDT nas dietas à base de SM, SM + SSt e SM + FSt, respectivamente.

Os menores consumos de MO, PB, EE, FDNcp, CNF, FDNi e FDNND nos animais alimentados com SM, em comparação com aqueles alimentados com as misturas, deu-se, provavelmente, ao resultado encontrado para o consumo de MS.

Quando o consumo dos animais alimentados com estilosantes nas suas formas conservadas, silagem e feno foi comparado, observaram-se maiores consumos de MS naqueles alimentados com SSt (9,76 kg/dia x 7,54 kg/dia) (Tabela 6). Há evidência de que o consumo de MS da silagem seja menor do que o do material verde ou do feno produzido com a mesma cultura, no entanto esse comportamento não foi verificado neste estudo. E esse maior consumo da dieta à base de SSt pode ser explicado pela alta aceitabilidade da SSt pelos animais, observada durante o período experimental. Os maiores consumos de MO, PB, EE, FDNcp, FDNi e CNF pelos animais alimentados com SSt se devem, provavelmente, ao resultado encontrado para o consumo de MS.

O menor consumo de MS pelos animais alimentados com dieta contendo SSt, em comparação com os alimentados com as misturas, pode explicar os menores consumos de MO, PB, FDNcp, CNF, FDNi (G/kg PC) e NDT. Os menores consumos de todos os nutrientes pelos animais alimentados com FSt como fonte única de forragem, em comparação com aqueles alimentados com as misturas, foram possivelmente em decorrência do menor consumo de MS para os animais alimentados com FSt.

Souza et al. (2014), avaliando a substituição de até 100% da silagem de milho pela silagem de estilosantes Campo Grande, não observaram diferenças no consumo de MS e NDT dos animais avaliados.

Assim como no experimento 1, os maiores valores de digestibilidade total da MS e da maioria dos nutrientes para a dieta à base de SM, em comparação com as demais dietas, podem estar relacionados à fração fibrosa da SM, pois os teores de FDNi e lignina são menores que nas outras dietas (Tabela 2).

4.4. Desempenho produtivo (EXP 3)

O consumo de MS é considerado uma das variáveis mais importantes que afetam o desempenho animal, devido ao maior ou menor fornecimento de nutrientes (Mertens, 1994). No entanto, neste experimento, apesar do menor consumo de MS pelos animais alimentados com a dieta à base de SM, em comparação com aqueles alimentados com as misturas (SM + SSt e SM + FSt), o ganho médio diário (GMD) e o ganho médio diário de carcaça (GMDC) foram semelhantes entre os animais. Possivelmente, isso foi devido ao fato de o consumo de NDT ter sido o mesmo tanto para os animais alimentados com a SM quanto para os animais alimentados com as misturas.

Os menores ganhos de peso pelos animais alimentados com SSt ou FSt em relação aos alimentados com SM ou com as misturas podem ser explicados devido ao menor consumo de NDT pelos animais alimentados com SSt ou FSt. Comparando o ganho de peso dos animais alimentados com estilosantes nas suas duas formas conservadas, silagem e feno, o GMD foi maior para SSt, no entanto o GMDC foi o mesmo nas duas forragens. Mais importante que avaliar o GMD dos animais é avaliar o GMDC, que é característica de grande importância para os produtores de gado de corte, devido ao fato de a remuneração feita pelo frigorífico ao produtor ser baseada no peso da carcaça quente.

Souza et al. (2014) avaliaram o desempenho produtivo de bovinos Nelore em confinamento recebendo dietas contendo diferentes níveis de silagens de estilosantes Campo Grande, substituindo a silagem de milho em até 100%, e não observaram efeito de dietas sobre o GMD, com valor médio de 1,25 kg/dia. Diferentemente do ocorrido neste estudo, o fornecimento da SSt como fonte única de forragem não comprometeu o GMD dos animais.

Apesar do GMD e GMDC semelhantes entre os animais alimentados com SM ou com as misturas, a conversão alimentar (CA) para aqueles que receberam SM foi menor. A CA é importante parâmetro, pois está relacionado com a eficiência de que o animal converteu o alimento consumido em carne.

O rendimento de carcaça (RC) (52,64%) dos animais alimentados com SSt como fonte única de forragem foi menor do que o dos animais alimentados com SM (54,15%) ou FSt (54,17%) ou as misturas (53,90 e 54,83% para SM + SSt e SM + FSt, respectivamente). Esse RC ficou abaixo também do valor observado por Souza et al. (2014), que foi de 55,15% nos animais alimentados com SSt como fonte única de forragem.

5. Conclusões

A digestibilidade da dieta à base de silagem de milho é maior do que a das dietas à base de silagem ou feno de estilosantes Campo Grande associados ou não à silagem de milho.

As misturas de silagem de milho com silagem ou feno de estilosantes Campo Grande são boa alternativa de utilização de silagem de milho para alimentação de bovinos de corte na fase de terminação, pois não comprometem o ganho médio diário de carcaça nem a fermentação ruminal.

Referências

- Allen, M.S., Linton, J.A.V., 2007. In vivo methods to measure digestibility and digestion kinetics of feed fractions in the rumen. In: Rennó, F.P., Silva, L.F.P. (Eds.) Simpósio Internacional Avanços em Técnicas de Pesquisa em Nutrição de Ruminantes, Pirassununga. Anais... Pirassununga.
- Association of Official Analytical Chemistry (AOAC), 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC Internacional, Arlington.
- Barcellos, A.O., Ramos, A.K.B., Vilela, L., Martha Júnior, G.B., 2008. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. Rev. Bras. Zoot. 37, 51-67 (in Portuguese).
- Cabral, L.S., Valadares Filho, S.C., Detmann, E., Malafaia, P.A.M., Zervoudakis, J.T., Souza, A.L., Veloso, R.G., Nunes, P.M.M., 2006. Intake and digestibility in cattle fed tropical forage based diets. Rev. Bras. Zootec. 35, 2406-2412.

- Chaney, A.L., Marbach, E.P., 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clin. Chem. 8, 130-132.
- Detmann, E., Valadares Filho, S.C., 2010. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 62, 980-984.
- Detmann, E., Gionbelli, M.P., Huhtanen, P., 2014. A meta-analytical evaluation of the regulation of voluntary intake in cattle fed tropical forage-based diets. J. Anim. Sci. 92, 4632-4641.
- France, J., Siddons, R.C. 1986. Determination of digesta flow by continuous marker infusion. J. Theor. Biol. 121, 105-119.
- Gill, J.L., 1978. Design and analysis of experiments in the animal and medical sciences. Ames, Iowa, The Iowa State University Press. 408p.
- Heinritz, S.N., Hoedtke, S., Martens, S.D., Peters, M., Zeyner, A., 2012. Evaluation of ten tropical legume forages for their potential as pig feed supplement. Livest. Res. Rural Dev. 24, 1.
- Hoffman, P.C., Esser, N.M., Bauman, L.M., Denzine, S.L., Engstrom, M., Chester-Jones, H., 2001. Short communication: Effect of dietary protein on growth and nitrogen balance of Holstein heifers. J. Dairy Sci. 84, 843-847.
- Jung, H.G., Allen, M.S., 1995. Characteristics of plant cell wall affecting intake and digestibility forages by ruminants. J. Anim. Sci. 73, 2774-2790.
- Karia, C.T., Andrade, R.P., Fernandes, C.D., Schunke, R.M., 2010. Gênero *Stylosanthes*. In: Fonseca, D.M. Martuscello, J.A. Plantas forrageiras. Viçosa: UFV, 2010 (in Portuguese).

- Keady, T.W.J., Marley, C.M., Scollan, N.D., 2012. Grass and alternative forage silages for beef cattle and sheep: effects on animal performance. IN: XVI International Silage Conference; Proceeding... Hämeenlinna, Finland.
- Licitra, G., Hernandez, T.M., Van Soest, P.J., 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminal feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 57, 347-358.
- Mehrez, A.Z., Ørskov, E.R., McDonald, I., 1977. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *BR. J. Nutr.* 38, 437-443.
- Mertens, D.R., 1994. Regulation of forage intake. In: Fahey Jr., G.C. (Ed.), *Forage Quality, Evaluation and utilization*. American Society of Agronomy, Madison, pp. 450-493.
- Mertens, D.R., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *J. AOAC* 85, 1217-1240.
- NRC, National Research Council, 2001. *Nutrients Requirements of Beef Cattle*, seventh ed. National Academy of Sciences, Washington.
- Pereira, O.G., Oliveira, A.S., Ribeiro, K.G., Rigueira, J.P.S., Melo Filho, O.L., Souza, W.F., 2008. Otimização de dietas à base de soja. In: VI Simcorte – VI Simpósio de Produção de Gado de Corte e II Simpósio Internacional de Gado de Corte. Viçosa. *Anais... Viçosa*, pp. 213-244 (in Portuguese).
- Pessoa, R.A.S., Leão, M.I., Ferreira, M.A., Valadares Filho, S.C., Valadares, R.F.D., Queiroz, A.C., 2009. Nitrogenous compounds balance and microbial protein production in crossbred heifers fed forage cactus, sugar cane bagasse and urea associated to different supplements. *Rev. Bras. Zootec*, 38, 941-947.

- Playne, M.J., McDonald, P., 1966. The buffering constituents of herbage and of silage. *J. Sci. Food Agric.* 17, 264-268.
- Ribeiro, K.G., Pereira, O.G., Rigueira, J.P.S., Souza, W.F., Cezario, A.S., Rufino, L.D.A., Rosa, L.O., Campos, A.F., 2012. Chemical composition and fermentative profile of elephant grass and Campo Grande Stylosanthes mixed silages In: International Silage Conference, 2012, Hämeenlinna, Finland. Proceedings of the XVI International Silage Conference. Hämeenlinna, Finland: Unigrafia, Helsinki, pp. 406-407.
- Rigueira, J.P.S., Pereira, O.G., Ribeiro, K.G., Cezario, A.S., Souza, W.F., 2012. Chemical composition and fermentation profile of *Brachiaria brizantha* and Campo Grande Stylosanthes mixed silages In: Joint Annual Meeting of American Society of Animal Science, Phoenix, Arizona. *J. Ani. Sci.* 90, 540-540.
- Satter, L.D., Slyter, L.L., 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Brit. J. Nutr.* 32, 199-208.
- Souza, W.F., Pereira, O.G., Ribeiro, K.G., Santos, S.A., Valadares Filho, S.C., 2014. Intake, digestibility, nitrogen efficiency, and animal performance of growing and finishing beef cattle fed warm-season legume (*Stylosanthes capitata* plus *Stylosanthes macrocephala*) silage replacing corn silage. *J. Anim. Sci.* 92, 4099-4107.
- Udén, P., Colucci, P.E., Van Soest, P.J., 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *J. Sci. Food Agric.* 31, 625-632.

- Ushida, K., Lassalas, B., Jouany, J.P., 1985. Determination of assay parameters for RNA analysis in bacterial and duodenal samples by spectrophotometry. Influence of sample treatment and preservation. *Reprod. Nutr. Develop.* 25, 1037-1046.
- Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.C., Gonçalves, L.C., Sampaio, I.B.M., 1997. Protein levels in cattle diets. 4. Ruminant ammonia N concentration, plasma urea N, and urea and creatinine excretions. *Rev. Bras. Zootec.* 26, 1270-1278 (in Portuguese (English abstract)).
- Valadares, R.F.D., Broderick, G.A., Valadares Filho, S.C., Clayton, M.K., 1999. Effect of replacing alfalfa with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *J. Dairy Sci.* 8, 2686-2696.
- Valadares Filho, S.C., Marcondes, M.I., Chizzotti, M.L., Paulino, P.V.R., 2010. Nutritional Requirements of Pure and Crossbred Zebu cattle, second Ed. Suprema Gráfica Ltda, Viçosa.
- Valente, T.N.P., Detmann, E., Valadares Filho, S.C., Cunha, M., Queiroz, A.C., Sampaio, C.B., 2011. In situ estimation of indigestible compounds contents in cattle feed and feces using bags made from different textiles. *Rev. Bras. Zootec.* 40, 666-675.
- Van Soest, P.J., Wine, R.H., 1967. Use of detergents in analysis of fibrous feeds. IV. Determinations of plant cell-wall constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 50, 50-55.
- Van Soest, P.J., 1994. *Nutritional Ecology of The Ruminant*, second ed. Cornell University Press, Ithaca.
- Weiss, W.P., Conrad, H.R., Pierre, N.R., 1992. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 39, 95-110.

Williams, C.H., David, D.J., Iismaa, O., 1962. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *J. Agric. Sci.* 59, 381-385.

Conclusões Gerais

O isolado bacteriocinogênico 10.6 pode ser considerado uma estirpe promissora para utilização como inoculante microbiano na produção de silagem de amendoim forrageiro em regiões de clima tropical.

As misturas de silagem de milho com silagem ou feno de estilosantes Campo Grande são uma boa alternativa à utilização de silagem de milho, para alimentação de bovinos de corte na fase de terminação.

APÊNDICE

Capítulo I

Experimento 1

Tabela 1. Inoculante (I), dias de fermentação (D), teores de matéria seca (MS) (g/kg), nitrogênio amoniacal (N-NH₃) (% N total), pH, ácidos láctico (LAT), acético (ACE), propiônico (PROP) e butírico (BUT) (g/kg MS) e contagem de bactérias ácido lácticas (BAL), enterobactérias (ENT) e mofos e leveduras (ML) (log UFC/g MN) de silagens de amendoim forrageiro tratadas com diferentes inoculantes bacterianos ao longo do período de fermentação.

I	D	MS	N-NH ₃	pH	LAT	ACE	PROP	BUT	BAL	ENT	ML
1	1	211,38	3,84	5,16	22,90	20,27	4,29	0,84	8,63	6,81	5,92
1	1	213,50	2,58	5,16	20,65	20,50	4,35	0,76	8,85	6,85	5,97
1	1	207,05	2,72	5,33	22,67	20,34	4,32	0,86	8,96	6,83	6,06
1	3	214,44	4,26	4,96	23,22	10,74	5,95	0,83	8,92	6,05	4,70
1	3	209,59	6,76	5,05	26,03	14,68	5,89	0,85	8,83	6,09	4,60
1	3	208,18	6,10	4,99	24,56	14,91	6,87	0,85	8,88	5,65	4,60
1	7	208,66	10,73	5,12	44,51	14,02	5,32	1,11	8,89	5,33	3,81
1	7	212,56	9,18	5,06	38,71	13,99	5,21	0,85	8,65	3,72	3,89
1	7	210,08	9,29	5,05	40,58	13,28	5,13	0,85	8,93	3,60	4,32
1	14	208,34	7,79	5,06	36,60	10,91	4,29	0,74	8,43	2,36	4,28
1	14	205,78	9,99	5,07	46,35	10,74	4,89	0,86	8,38	2,30	4,16
1	14	205,30	9,88	5,09	42,15	11,13	4,81	0,87	8,29	2,38	4,04
1	28	211,01	8,53	4,87	53,47	10,03	4,20	0,99	7,85	4,05	4,02
1	28	211,05	9,68	4,87	41,57	11,31	4,00	1,11	8,04	3,42	3,98
1	28	209,46	10,23	4,85	49,31	11,73	4,22	1,12	7,91	2,88	4,16
1	56	215,85	7,72	4,97	49,78	12,82	5,09	1,07	8,03	-	5,08
1	56	213,43	12,03	5,02	42,63	11,65	5,23	1,16	7,61	-	4,11

1	56	212,89	11,97	4,94	50,61	13,69	4,91	1,07	7,54	-	4,33
2	1	224,53	3,07	5,10	20,30	18,66	4,21	0,94	8,87	6,58	5,88
2	1	220,63	2,46	5,08	20,40	18,49	4,16	0,81	8,80	6,61	5,68
2	1	216,82	3,13	5,10	18,44	16,87	4,05	0,70	8,98	6,95	5,96
2	3	209,48	5,01	5,02	33,46	13,49	5,92	0,73	8,89	5,86	4,30
2	3	207,27	5,17	5,04	43,66	14,18	5,83	0,86	9,09	5,72	4,70
2	3	216,38	6,71	4,97	36,12	12,66	5,64	0,77	8,78	5,88	4,00
2	7	217,01	9,14	5,10	36,17	12,36	7,35	0,71	8,76	3,85	4,08
2	7	217,20	8,21	5,06	39,15	12,10	7,84	0,78	8,82	3,90	4,06
2	7	211,76	6,58	5,12	35,85	11,63	7,47	0,72	8,79	5,03	4,08
2	14	218,22	7,96	5,03	34,63	9,66	3,73	0,95	8,31	-	4,05
2	14	215,90	5,02	5,03	34,25	11,79	4,04	0,83	8,31	-	4,08
2	14	219,17	7,41	5,00	41,31	9,79	4,41	0,94	8,32	-	4,11
2	28	216,22	6,96	4,84	47,42	16,48	3,82	1,08	7,66	-	3,89
2	28	218,34	7,28	4,82	48,06	10,84	4,07	0,82	7,82	-	4,02
2	28	214,11	8,33	4,86	42,88	15,06	3,99	1,20	7,69	-	4,06
2	56	217,53	9,51	4,85	52,15	7,72	4,25	0,93	7,25	-	3,95
2	56	211,92	11,81	4,96	43,73	7,30	4,46	0,86	7,75	-	3,80
2	56	217,33	8,96	4,86	58,28	6,88	4,26	0,71	7,56	-	3,92
3	1	212,67	2,61	5,13	20,69	16,79	3,55	0,96	9,09	7,04	5,85
3	1	229,75	3,96	5,24	23,16	16,65	3,16	0,66	8,74	7,43	5,68
3	1	211,48	4,30	5,16	23,54	16,92	3,36	0,98	8,89	6,93	5,86
3	3	212,44	8,32	5,04	49,88	14,53	4,05	0,79	8,72	5,88	4,48
3	3	215,88	9,27	5,02	59,52	14,95	4,16	0,93	8,88	6,11	4,48
3	3	213,23	4,72	5,02	52,25	15,49	4,36	0,96	8,92	6,10	4,48

3	7	212,22	8,67	5,08	30,20	15,76	5,28	0,86	8,76	3,65	4,11
3	7	217,60	7,71	5,08	38,01	11,85	5,03	0,94	8,79	3,53	4,08
3	7	213,02	10,26	5,06	34,88	13,77	4,92	0,72	8,40	4,93	4,02
3	14	211,98	8,37	4,86	46,07	10,23	5,02	0,84	8,32	-	4,18
3	14	215,75	7,72	4,99	42,29	8,49	4,61	0,83	8,20	-	4,06
3	14	216,93	7,94	4,99	36,49	9,78	4,38	0,95	8,27	-	4,20
3	28	208,75	9,18	4,84	46,00	15,57	3,41	0,74	7,98	-	4,10
3	28	213,46	8,31	4,82	48,91	15,23	3,61	0,75	7,89	-	4,09
3	28	218,63	7,75	4,82	48,57	14,90	3,28	0,83	7,94	-	4,16
3	56	219,12	5,06	4,87	42,36	12,13	3,52	0,81	7,90	-	3,85
3	56	215,62	9,49	4,87	65,87	15,09	3,33	0,96	7,63	-	3,90
3	56	221,66	9,25	4,78	44,29	16,60	3,16	1,15	7,66	-	3,92
4	1	222,06	4,37	5,11	16,76	14,40	2,60	0,58	9,10	6,98	5,71
4	1	216,43	3,37	5,23	24,52	14,28	2,76	1,09	9,13	6,99	6,02
4	1	220,72	3,47	5,18	23,51	14,27	2,63	1,05	9,22	6,87	5,74
4	3	214,82	6,75	5,10	39,76	13,48	5,10	0,71	9,31	6,69	5,04
4	3	218,90	7,82	5,05	33,09	11,42	4,86	0,94	9,20	5,18	4,78
4	3	216,74	4,70	5,00	39,21	13,48	5,07	0,57	9,31	5,58	4,30
4	7	214,18	7,70	4,99	36,07	12,54	4,12	0,83	9,06	-	3,95
4	7	222,27	9,76	5,00	28,44	18,08	4,04	0,96	9,04	-	4,00
4	7	217,22	5,14	5,04	31,07	16,16	4,20	0,94	8,77	-	4,03
4	14	218,17	7,51	4,88	36,72	16,58	3,54	1,09	8,45	-	4,35
4	14	223,17	9,25	4,91	39,26	16,22	3,52	0,68	8,83	-	4,19
4	14	221,13	5,91	4,88	31,31	14,19	3,53	0,94	8,40	-	4,17
4	28	217,94	11,60	4,83	45,27	10,91	3,63	0,694	8,14	-	4,03

4	28	217,57	7,65	4,82	47,32	14,05	3,46	1,09	8,24	-	4,11
4	28	220,45	7,63	4,81	44,10	13,14	3,37	1,09	8,29	-	4,22
4	56	223,95	8,65	4,75	43,46	14,44	5,53	0,80	7,92	-	3,94
4	56	222,34	8,23	4,77	78,89	12,67	5,39	0,68	7,94	-	3,93
4	56	221,31	7,26	4,77	76,55	11,98	5,12	0,81	7,62	-	3,96
5	1	232,45	3,83	5,31	22,21	14,36	6,07	0,87	8,83	7,03	6,21
5	1	215,53	3,55	5,21	22,75	15,26	5,62	0,70	9,06	7,12	6,10
5	1	224,07	2,60	5,22	19,57	12,12	6,24	0,92	9,25	7,03	6,01
5	3	218,68	4,36	4,96	36,50	11,14	5,10	0,69	9,47	5,73	4,48
5	3	220,79	5,23	5,03	38,87	12,39	4,93	0,70	9,35	5,52	4,48
5	3	222,15	5,30	4,98	38,06	11,55	4,79	0,95	9,48	5,65	4,60
5	7	213,41	6,94	5,07	43,07	9,94	5,89	0,71	9,06	-	4,04
5	7	214,75	9,04	5,01	36,66	11,10	5,09	0,87	8,94	-	3,92
5	7	220,47	7,15	5,02	34,40	10,68	5,61	0,58	8,80	-	4,04
5	14	212,34	6,65	4,95	50,43	17,63	3,43	0,84	8,42	-	4,25
5	14	218,94	8,52	4,89	44,14	18,74	3,22	1,09	8,41	-	4,23
5	14	217,90	10,84	4,93	36,95	17,94	3,31	0,71	9,11	-	4,47
5	28	213,23	9,33	4,85	48,47	22,46	4,11	1,09	8,12	-	4,11
5	28	215,62	7,35	4,86	47,84	21,10	4,16	1,09	8,28	-	4,13
5	28	217,03	6,46	4,87	52,53	23,77	4,18	0,95	8,25	-	4,11
5	56	220,07	6,53	4,74	58,31	13,52	4,65	0,61	7,72	-	3,92
5	56	220,20	8,23	4,81	58,31	16,09	4,91	0,64	7,91	-	4,06
5	56	217,62	12,15	4,97	58,31	14,94	5,04	0,93	7,93	-	4,05

Inoculantes: 1- Controle (sem inoculante); 2- Inoculante comercial dose alta (10^7 UFC/g MN)); 3- Inoculante comercial dose baixa (10^5 UFC/g MN); 4- Isolado bacteriocinogênico 10.6 e 5- Pool de isolados bacteriocinogênicos.

Tabela 2. Teores de matéria seca (MS) (g/kg), proteína bruta (PB) (g/kg MS), extrato etéreo (EE) (g/kg MS), fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp) (g/kg MS), fibra insolúvel em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína (FDAcP) (g/kg MS), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) (% N total) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) (% N total) de silagens de amendoim forrageiro tratadas com diferentes inoculantes bacterianos ao longo do período de fermentação.

Inoculante	Repetição	MS	PB	EE	FDNcp	FDAcP	NIDN	NIDA
1	1	215,85	173,00	13,50	408,57	290,93	26,45	9,66
1	2	213,42	166,77	14,79	414,18	305,28	25,93	13,30
1	3	212,89	167,92	14,66	414,93	302,98	27,09	12,04
2	1	217,53	173,10	13,56	421,48	302,78	27,60	11,48
2	2	211,92	174,47	12,45	409,53	295,74	28,03	11,46
2	3	217,33	170,40	14,63	420,51	293,69	26,61	11,04
3	1	219,12	165,57	14,91	421,23	300,75	25,67	11,82
3	2	215,62	174,98	13,11	426,75	311,94	26,88	13,10
3	3	221,66	170,38	13,41	425,05	284,24	26,47	12,22
4	1	223,95	175,88	13,62	427,96	304,25	26,64	9,73
4	2	222,34	171,80	13,66	434,98	304,62	28,69	9,52
4	3	221,31	179,47	12,82	415,40	307,28	26,01	9,27
5	1	220,07	176,21	14,03	424,74	301,26	27,12	9,77
5	2	220,20	178,38	13,79	427,35	297,78	26,60	10,34
5	3	217,62	171,84	14,60	436,72	309,21	25,29	12,22

Inoculantes: 1- Controle (sem inoculante); 2- Inoculante comercial dose alta (10^7 UFC/g MN)); 3- Inoculante comercial dose baixa (10^5 UFC/g MN); 4- Isolado bacteriocinogênico 10.6 e 5- Pool de isolados bacteriocinogênicos.

Capítulo II

Experimento 2

Tabela 3. Tratamento (Trat), período (Per), animal (Ani), valores de digestibilidade total da matéria seca (DTMS), matéria orgânica (DTMO), proteína bruta (DTPB) e fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (DTFDNcp) (g/kg) para dietas contendo silagem e feno de estilosantes Campo Grande associados ou não a silagem de milho.

Trat	Per	Ani	DTMS	DTMO	DTPB	DTFDNcp
T1	1	1	632,44	654,48	590,84	539,66
T1	2	2	678,68	696,61	665,12	575,13
T1	3	3	733,44	754,75	672,20	632,32
T1	4	4	724,87	748,29	632,51	672,80
T1	5	5	757,09	776,56	668,10	678,13
T2	1	2	604,72	623,57	560,00	440,39
T2	2	3	585,29	626,52	478,73	381,38
T2	3	4	596,63	629,59	478,50	378,05
T2	4	5	647,10	676,27	500,71	475,62
T2	5	1	583,57	604,64	537,38	444,44
T3	1	3	607,95	643,50	321,17	496,56
T3	2	4	652,36	675,86	590,31	541,35
T3	3	5	668,35	689,53	635,03	524,86
T3	4	1	518,56	529,99	522,23	385,60
T3	5	2	613,73	633,13	597,22	515,37
T4	1	4	748,95	776,32	652,66	627,69
T4	2	5	730,63	753,84	627,05	611,06
T4	3	1	517,76	543,74	428,65	426,02

T4	4	2	544,45	569,50	516,51	421,89
T4	5	3	626,60	653,34	571,88	485,63
T5	1	5	593,24	612,80	370,81	572,22
T5	2	1	452,12	481,15	395,29	478,60
T5	3	2	612,97	629,71	519,77	494,63
T5	4	3	576,88	595,09	568,01	514,33
T5	5	4	639,96	667,17	620,76	531,94

T1: Silagem de milho; T2: Silagem de estilosantes; T3: Feno de estilosantes; T4: 50% Silagem de milho + 50% Silagem de estilosantes; T5: 50% Silagem de milho + 50% Feno de estilosantes.

Tabela 4. Tratamento (Trat), período (Per), animal (Ani), valores de digestibilidade ruminal da matéria seca (DRMS), matéria orgânica (DRMO), proteína bruta (DRPB) e fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (DRFDNcp) (g/kg) para dietas contendo silagem e feno de estilosantes Campo Grande associados ou não a silagem de milho.

Trat	Per	Ani	DRMS	DRMO	DRPB	DRFDNcp
T1	1	1	538,57	602,42	47,26	607,84
T1	2	2	369,57	460,50	232,77	470,54
T1	3	3	626,26	764,12	443,87	634,77
T1	4	4	307,76	384,61	111,98	622,80
T1	5	5	504,88	623,34	152,70	519,65
T2	1	2	459,28	564,86	130,34	438,77
T2	2	3	580,69	889,01	338,03	308,27
T2	3	4	446,69	500,43	133,02	392,27
T2	4	5	173,66	310,70	49,80	321,04
T2	5	1	405,74	445,89	270,80	440,62
T3	1	3	422,21	587,08	265,87	554,14
T3	2	4	381,67	461,35	236,83	545,61
T3	3	5	584,13	761,87	179,09	282,00
T3	4	1	328,19	379,77	123,55	448,26
T3	5	2	190,26	245,08	13,13	471,92
T4	1	4	524,60	610,63	321,95	613,92
T4	2	5	411,33	521,31	183,66	623,25
T4	3	1	421,98	509,88	291,05	464,89
T4	4	2	370,36	475,80	150,95	319,16
T4	5	3	321,36	426,13	51,89	412,10

T5	1	5	428,68	483,85	292,55	317,08
T5	2	1	284,52	326,10	102,98	640,85
T5	3	2	195,61	224,93	1,09	432,13
T5	4	3	503,51	553,74	186,78	420,96
T5	5	4	381,92	440,26	335,65	557,03

T1: Silagem de milho; T2: Silagem de estilosantes; T3: Feno de estilosantes; T4: 50% Silagem de milho + 50% Silagem de estilosantes; T5: 50% Silagem de milho + 50% Feno de estilosantes.

Tabela 5. Tratamento (Trat), período (Per), animal (Ani), valores de digestibilidade intestinal da matéria seca (DIMS), matéria orgânica (DIMO), proteína bruta (DIPB) e fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (DIFDNcp) (g/kg) para dietas contendo silagem e feno de estilosantes Campo Grande associados ou não a silagem de milho.

Trat	Per	Ani	DIMS	DIMO	DIPB	DIPB*	DIFDNcp
T1	1	1	93,87	52,06	543,59	570,55	-68,17
T1	2	2	309,11	236,11	432,35	563,53	104,59
T1	3	3	107,17	-9,37	228,33	410,58	-2,45
T1	4	4	417,11	363,68	520,52	586,16	49,99
T1	5	5	252,21	153,22	515,40	608,28	158,48
T2	1	2	145,45	58,71	429,66	494,06	1,62
T2	2	3	4,59	-262,49	140,70	212,55	73,11
T2	3	4	149,94	129,16	345,48	398,49	-14,21
T2	4	5	473,45	365,57	450,91	474,54	154,58
T2	5	1	177,83	158,75	266,59	365,59	3,82
T3	1	3	185,74	56,42	55,29	75,32	-57,59
T3	2	4	270,69	214,51	353,48	463,17	-4,26
T3	3	5	84,21	-72,34	455,94	555,41	242,86
T3	4	1	190,37	150,22	398,68	454,88	-62,66
T3	5	2	423,48	388,05	584,09	591,87	43,45
T4	1	4	224,35	165,70	330,71	487,74	13,77
T4	2	5	319,30	232,54	443,39	543,14	-12,19
T4	3	1	95,77	33,87	137,59	194,08	-38,87
T4	4	2	174,10	93,69	365,56	430,55	102,73
T4	5	3	305,23	227,20	519,99	548,45	73,53

T5	1	5	164,55	128,95	78,26	110,62	255,13
T5	2	1	167,60	155,05	292,31	325,87	-162,26
T5	3	2	417,36	404,79	518,68	519,25	62,51
T5	4	3	73,37	41,35	381,23	468,79	93,37
T5	5	4	258,04	226,90	285,11	429,16	-25,09

T1: Silagem de milho; T2: Silagem de estilosantes; T3: Feno de estilosantes; T4: 50% Silagem de milho + 50% Silagem de estilosantes; T5: 50% Silagem de milho + 50% Feno de estilosantes; * % quantidade que chegou ao abomaso.

Tabela 6. Valores de pH e nitrogênio amoniacal ruminal (N-NH₃) para dietas contendo silagem e feno de estilosantes Campo Grande associados ou não a silagem de milho.

Tratamento	Período	Animal	Hora	pH	N-NH ₃
1	1	1	0	6,61	14,50
1	1	1	3	6,91	13,29
1	1	1	6	6,62	16,98
1	1	1	9	6,72	18,92
1	1	1	12	6,86	34,97
1	1	1	15	6,83	36,49
1	1	1	18	6,03	25,12
1	1	1	21	6,64	10,29
1	2	2	0	5,44	33,88
1	2	2	3	6,06	27,38
1	2	2	6	6,26	22,87
1	2	2	9	6,75	35,01
1	2	2	12	5,77	21,73
1	2	2	15	5,63	29,12
1	2	2	18	5,67	20,83
1	2	2	21	5,75	30,43
1	3	3	0	6,37	27,04
1	3	3	3	6,96	23,83
1	3	3	6	6,70	18,47
1	3	3	9	6,68	31,20
1	3	3	12	6,49	7,54
1	3	3	15	6,40	33,14

1	3	3	18	6,59	25,78
1	3	3	21	6,18	19,51
1	4	4	0	6,39	13,59
1	4	4	3	6,62	18,97
1	4	4	6	6,85	20,21
1	4	4	9	6,67	24,23
1	4	4	12	6,71	13,70
1	4	4	15	6,58	28,02
1	4	4	18	6,47	24,61
1	4	4	21	6,54	20,07
1	5	5	0	6,32	37,19
1	5	5	3	6,05	31,78
1	5	5	6	6,33	33,72
1	5	5	9	6,53	23,79
1	5	5	12	6,40	18,65
1	5	5	15	6,23	25,43
1	5	5	18	5,80	38,06
1	5	5	21	5,46	22,93
2	1	2	0	6,41	30,79
2	1	2	3	6,69	16,12
2	1	2	6	7,06	43,17
2	1	2	9	6,95	28,27
2	1	2	12	6,63	34,51
2	1	2	15	6,59	36,86
2	1	2	18	5,80	40,21

2	1	2	21	5,68	37,33
2	2	3	0	6,37	28,30
2	2	3	3	6,64	42,24
2	2	3	6	6,93	20,37
2	2	3	9	6,82	27,28
2	2	3	12	6,56	23,19
2	2	3	15	6,01	24,32
2	2	3	18	5,89	20,71
2	2	3	21	6,02	28,81
2	3	4	0	6,78	25,02
2	3	4	3	6,98	20,15
2	3	4	6	7,00	34,39
2	3	4	9	6,68	29,76
2	3	4	12	6,76	10,06
2	3	4	15	6,41	24,71
2	3	4	18	6,55	10,87
2	3	4	21	6,32	24,17
2	4	5	0	5,74	32,55
2	4	5	3	6,59	27,96
2	4	5	6	6,47	41,69
2	4	5	9	6,64	41,44
2	4	5	12	6,29	14,11
2	4	5	15	6,10	14,37
2	4	5	18	5,84	11,20
2	4	5	21	5,72	27,92

2	5	1	0	6,75	16,98
2	5	1	3	7,03	25,75
2	5	1	6	6,97	26,71
2	5	1	9	6,91	32,45
2	5	1	12	6,82	12,42
2	5	1	15	6,62	14,00
2	5	1	18	6,54	7,49
2	5	1	21	6,60	14,05
3	1	3	0	5,95	34,37
3	1	3	3	6,57	26,66
3	1	3	6	6,83	20,24
3	1	3	9	6,39	29,45
3	1	3	12	6,46	32,79
3	1	3	15	6,49	34,61
3	1	3	18	6,52	13,98
3	1	3	21	6,30	39,41
3	2	4	0	6,33	13,06
3	2	4	3	6,76	10,50
3	2	4	6	6,69	18,32
3	2	4	9	6,73	22,54
3	2	4	12	6,63	26,98
3	2	4	15	6,66	17,09
3	2	4	18	6,29	17,00
3	2	4	21	6,69	13,76
3	3	5	0	6,66	24,57

3	3	5	3	6,76	27,55
3	3	5	6	6,85	31,22
3	3	5	9	6,90	36,55
3	3	5	12	5,83	19,12
3	3	5	15	6,61	37,17
3	3	5	18	6,38	11,50
3	3	5	21	5,43	24,20
3	4	1	0	6,80	17,63
3	4	1	3	7,04	25,19
3	4	1	6	7,01	20,88
3	4	1	9	7,12	27,25
3	4	1	12	6,86	9,46
3	4	1	15	6,75	20,32
3	4	1	18	6,45	9,80
3	4	1	21	6,64	18,99
3	5	2	0	5,52	30,82
3	5	2	3	5,71	36,54
3	5	2	6	6,76	22,78
3	5	2	9	6,27	35,54
3	5	2	12	5,59	27,66
3	5	2	15	6,13	30,64
3	5	2	18	5,51	39,26
3	5	2	21	5,90	33,74
4	1	4	0	6,39	15,68
4	1	4	3	6,26	15,92

4	1	4	6	6,58	23,57
4	1	4	9	6,70	33,18
4	1	4	12	6,69	15,59
4	1	4	15	6,82	29,37
4	1	4	18	6,65	20,78
4	1	4	21	6,62	20,83
4	2	5	0	6,44	31,96
4	2	5	3	5,58	32,71
4	2	5	6	6,30	19,49
4	2	5	9	6,06	37,32
4	2	5	12	5,76	34,34
4	2	5	15	5,85	29,30
4	2	5	18	5,56	36,35
4	2	5	21	5,61	26,17
4	3	1	0	6,76	12,74
4	3	1	3	6,76	26,21
4	3	1	6	7,17	27,70
4	3	1	9	6,92	36,11
4	3	1	12	6,67	11,19
4	3	1	15	6,58	24,63
4	3	1	18	6,58	6,34
4	3	1	21	6,58	10,21
4	4	2	0	5,79	18,34
4	4	2	3	6,15	15,20
4	4	2	6	6,53	18,00

4	4	2	9	6,52	42,19
4	4	2	12	5,49	11,92
4	4	2	15	5,91	29,22
4	4	2	18	5,39	18,37
4	4	2	21	5,56	22,20
4	5	3	0	6,57	15,89
4	5	3	3	6,49	17,02
4	5	3	6	6,40	18,58
4	5	3	9	6,56	35,10
4	5	3	12	6,02	12,66
4	5	3	15	6,17	41,04
4	5	3	18	5,63	23,00
4	5	3	21	5,74	13,18
5	1	5	0	5,52	38,56
5	1	5	3	6,24	28,71
5	1	5	6	6,65	18,90
5	1	5	9	6,25	38,65
5	1	5	12	5,97	16,71
5	1	5	15	6,29	31,79
5	1	5	18	5,73	29,65
5	1	5	21	6,06	19,50
5	2	1	0	6,68	24,39
5	2	1	3	7,00	13,55
5	2	1	6	6,91	21,00
5	2	1	9	7,00	34,75

5	2	1	12	6,85	14,73
5	2	1	15	6,40	21,94
5	2	1	18	6,41	26,98
5	2	1	21	6,24	12,28
5	3	2	0	6,18	16,52
5	3	2	3	6,05	27,73
5	3	2	6	6,53	18,90
5	3	2	9	6,31	37,38
5	3	2	12	6,22	12,39
5	3	2	15	6,20	33,99
5	3	2	18	5,60	31,49
5	3	2	21	5,43	22,04
5	4	3	0	6,15	13,95
5	4	3	3	6,37	13,62
5	4	3	6	6,57	11,78
5	4	3	9	6,78	32,47
5	4	3	12	6,41	17,66
5	4	3	15	6,35	23,05
5	4	3	18	5,87	23,34
5	4	3	21	6,06	17,68
5	5	4	0	6,04	29,86
5	5	4	3	6,61	12,52
5	5	4	6	6,63	19,14
5	5	4	9	6,86	26,28
5	5	4	12	6,71	12,18

5	5	4	15	6,55	18,08
5	5	4	18	6,33	19,98
5	5	4	21	6,57	11,81

T1: Silagem de milho; T2: Silagem de estilosantes; T3: Feno de estilosantes; T4: 50% Silagem de milho + 50% Silagem de estilosantes; T5: 50% Silagem de milho + 50% Feno de estilosantes.

Tabela 7. Tratamento (Trat), período (Per), animal (Ani), valores de nitrogênio ingerido (NI) (g/dia), nitrogênio fecal (NF) (g/dia), nitrogênio urinário (NU) (g/dia), nitrogênio retido/nitrogênio ingerido (NR/NI) (%), nitrogênio uréico na urina (NUU) (g/dia), nitrogênio uréico no soro (NUS) (mg/dL) e balanço de nitrogênio (BN) (g/dia) para animais consumindo dietas contendo silagem e feno de estilosantes Campo Grande associados ou não a silagem de milho.

Trat	Per	Ani	NI	NF	NU	NR/NI	NUU	NUS	BN
T1	1	1	105,47	43,15	28,35	32,21	19,84	9,88	33,97
T1	2	2	128,98	43,19	57,22	22,15	46,32	13,05	28,57
T1	3	3	84,01	27,54	31,71	29,47	24,12	13,75	24,76
T1	4	4	75,51	27,75	36,91	14,38	25,87	13,65	10,86
T1	5	5	78,44	26,04	38,46	17,78	31,15	12,58	13,95
T2	1	2	106,44	46,83	45,22	13,51	34,53	15,38	14,38
T2	2	3	76,02	39,63	8,54	36,65	9,66	15,61	27,86
T2	3	4	104,56	54,53	40,72	8,91	28,83	18,22	9,31
T2	4	5	75,44	37,67	40,78	-3,99	33,76	12,12	-3,01
T2	5	1	157,67	72,94	52,50	20,44	45,35	12,77	32,23
T3	1	3	55,25	37,51	11,47	11,35	8,31	16,78	6,27
T3	2	4	79,89	32,73	33,27	17,39	24,43	19,57	13,90
T3	3	5	78,46	28,63	35,89	17,75	32,35	17,06	13,93
T3	4	1	153,23	73,21	50,58	19,21	43,52	11,88	29,44
T3	5	2	133,93	53,94	59,77	15,10	48,36	14,17	20,22
T4	1	4	72,53	25,66	48,14	-1,76	37,91	16,31	-1,27
T4	2	5	55,62	21,30	36,21	-3,40	22,75	11,65	-1,89
T4	3	1	157,99	90,27	56,24	7,27	50,56	19,48	11,49
T4	4	2	137,21	66,34	22,90	34,96	19,90	11,74	47,97

T4	5	3	100,34	42,96	17,01	40,24	14,91	11,18	40,38
T5	1	5	79,13	49,78	26,24	3,92	23,93	15,52	3,10
T5	2	1	167,92	101,54	37,14	17,41	32,16	15,47	29,24
T5	3	2	161,69	77,65	53,98	18,59	38,34	14,91	30,07
T5	4	3	126,91	54,83	56,74	12,09	37,51	11,42	15,35
T5	5	4	111,89	42,43	33,66	31,99	25,23	14,45	35,79

T1: Silagem de milho; T2: Silagem de estilosantes; T3: Feno de estilosantes; T4: 50% Silagem de milho + 50% Silagem de estilosantes; T5: 50% Silagem de milho + 50% Feno de estilosantes.

Experimento 3

Tabela 8. Animal (Ani), tratamento (Trat), consumos de matéria seca (CMS), matéria orgânica (CMO), proteína bruta (CPB), extrato etéreo (CEE), fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (CFDNcp), fibra em detergente neutro indigestível (CFDNi), carboidratos não fibrosos (CCNF), nutrientes digestíveis totais (CNDT), matéria orgânica digerida (MOD) e fibra insolúvel em detergente neutro não digerida (kg/dia) para animais consumindo dietas contendo silagem e feno de estilosantes Campo Grande associados ou não a silagem de milho.

Ani	Trat	CMS	CMO	CPB	CEE	CFDNcp	CFDNi	CCNF	CNDT	CMOD	CFDNND
29	1	6,57	6,35	0,88	0,14	2,23	0,68	3,27	5,64	5,30	0,60
30	2	10,42	9,88	1,23	0,23	4,04	2,33	4,39	5,34	5,22	2,12
31	3	7,32	6,98	0,97	0,16	2,92	1,40	3,13	4,36	4,05	1,40
32	4	10,22	9,78	1,28	0,22	3,71	1,49	4,76	6,72	6,33	1,44
33	5	9,68	9,27	1,13	0,20	4,11	1,62	4,03	5,71	5,35	2,00
34	1	9,71	9,38	1,25	0,21	3,56	1,11	4,61	7,18	6,73	0,99
35	2	8,11	7,69	0,98	0,18	3,00	1,51	3,52	5,18	5,03	1,41
36	3	9,82	9,35	1,18	0,21	4,06	1,95	4,09	6,00	5,68	2,09
37	4	10,07	9,61	1,26	0,22	3,70	1,58	4,63	5,93	5,60	1,83
38	5	11,45	10,95	1,34	0,23	4,90	2,06	4,72	5,74	5,41	2,62
39	1	8,88	8,56	1,14	0,19	3,21	0,97	4,25	6,45	6,04	1,13
40	2	9,71	9,18	1,18	0,22	3,70	1,99	4,08	5,81	5,59	1,92
41	3	6,61	6,30	0,82	0,15	2,57	1,20	2,88	4,19	3,94	1,35
42	4	10,16	9,72	1,26	0,23	3,76	1,68	4,66	6,15	5,75	2,12
43	5	13,17	12,60	1,55	0,26	5,60	2,37	5,45	7,11	6,78	2,99
44	1	8,66	7,93	1,08	0,18	2,93	0,90	3,97	6,68	6,28	0,97
45	2	10,32	9,76	1,25	0,23	3,95	2,18	4,34	5,57	5,43	2,06
46	3	6,97	6,63	0,87	0,15	2,74	1,30	3,00	4,39	4,13	1,45

47	4	10,57	10,11	1,30	0,23	3,93	1,61	4,84	6,73	6,31	1,85
48	5	9,58	9,17	1,13	0,20	4,01	1,63	4,03	5,70	5,37	1,83
49	1	9,08	8,76	1,17	0,19	3,31	0,99	4,32	6,31	5,88	1,20
50	2	9,85	9,31	1,18	0,22	3,71	2,08	4,19	5,56	5,39	2,02
51	3	6,45	6,14	0,80	0,14	2,51	1,16	2,81	4,37	4,13	1,24
52	4	11,16	10,67	1,39	0,24	4,13	1,75	5,12	6,77	6,38	2,02
53	5	9,71	9,29	1,15	0,20	4,12	1,82	4,03	4,82	4,47	2,26
54	1	9,79	9,43	1,26	0,21	3,57	1,09	4,64	6,75	6,29	1,47
55	2	8,96	8,46	1,09	0,20	3,39	1,85	3,80	4,92	4,74	1,86
56	3	7,73	7,36	0,96	0,17	3,08	1,47	3,30	4,26	4,00	1,68
57	4	9,76	9,35	1,21	0,22	3,57	1,55	4,54	5,63	5,26	1,87
58	5	11,84	11,32	1,38	0,24	5,06	2,15	4,88	6,34	5,91	2,29
59	1	9,87	9,51	1,28	0,21	3,57	1,10	4,71	6,60	6,18	1,52
60	2	9,03	8,56	1,08	0,20	3,35	1,81	3,94	5,11	4,95	1,92
61	3	8,96	8,53	1,09	0,19	3,66	1,77	3,77	5,19	4,88	2,04
62	4	10,74	10,27	1,34	0,23	3,98	1,72	4,92	7,06	6,66	1,97
63	5	13,52	12,93	1,58	0,27	5,77	2,62	5,59	6,93	6,58	2,95
64	1	7,90	7,62	1,02	0,16	2,84	0,87	3,81	6,14	5,78	0,82
65	2	11,70	11,07	1,41	0,26	4,42	2,56	4,98	6,56	6,35	2,54
66	3	6,44	6,14	0,81	0,14	2,54	1,19	2,77	4,26	4,03	1,12
67	4	9,40	8,99	1,17	0,21	3,43	1,36	4,36	5,61	5,31	1,70
68	5	14,84	14,19	1,74	0,30	6,37	2,74	6,09	8,07	7,56	2,87

T1: Silagem de milho; T2: Silagem de estilosantes; T3: Feno de estilosantes; T4: 50% Silagem de milho + 50% Silagem de estilosantes; T5: 50% Silagem de milho + 50% Feno de estilosantes.

Tabela 9. Animal, tratamento e consumos de matéria seca (CMSPC), matéria orgânica (CMOPC), fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (CFDNcpPC) e fibra em detergente neutro indigestível (CFDNIcPC) (g/kg PC) para animais consumindo dietas contendo silagem e feno de estilosantes Campo Grande associados ou não a silagem de milho.

Animal	Tratamento	CMSPC	CMOPC	CFDNcpPC	CFDNIcPC
29	1	16,62	16,08	5,65	1,72
30	2	26,50	25,14	10,27	5,92
31	3	18,51	17,64	7,39	3,55
32	4	24,13	23,08	8,77	3,53
33	5	23,99	22,96	10,18	4,01
34	1	23,07	22,27	8,46	2,64
35	2	19,82	18,80	7,34	3,69
36	3	24,73	23,56	10,23	4,91
37	4	23,94	22,86	8,80	3,77
38	5	27,17	25,99	11,62	4,88
39	1	20,17	19,45	7,29	2,21
40	2	23,50	22,22	8,96	4,81
41	3	17,19	16,38	6,69	3,13
42	4	24,63	23,56	9,12	4,07
43	5	30,64	29,30	13,03	5,52
44	1	20,74	19,00	7,02	2,16
45	2	25,13	23,78	9,62	5,30
46	3	17,70	16,86	6,97	3,31
47	4	24,75	23,67	9,21	3,76
48	5	23,86	22,84	9,99	4,05

49	1	21,60	20,84	7,86	2,35
50	2	25,25	23,88	9,52	5,33
51	3	16,01	15,27	6,24	2,89
52	4	26,76	25,59	9,91	4,20
53	5	24,12	23,07	10,23	4,52
54	1	22,62	21,80	8,25	2,52
55	2	21,10	19,93	7,98	4,36
56	3	18,97	18,07	7,56	3,60
57	4	22,39	21,45	8,19	3,55
58	5	28,60	27,35	12,23	5,19
59	1	21,84	21,05	7,90	2,44
60	2	21,61	20,47	8,01	4,33
61	3	21,58	20,56	8,81	4,26
62	4	25,67	24,53	9,51	4,10
63	5	29,23	27,95	12,47	5,67
64	1	18,20	17,57	6,54	2,00
65	2	26,33	24,91	9,95	5,75
66	3	15,09	14,37	5,94	2,79
67	4	21,09	20,18	7,69	3,05
68	5	30,44	29,10	13,06	5,62

T1: Silagem de milho; T2: Silagem de estilosantes; T3: Feno de estilosantes; T4: 50% Silagem de milho + 50% Silagem de estilosantes; T5: 50% Silagem de milho + 50% Feno de estilosantes.

Tabela 10. Animal (Ani), tratamento (Trat), digestibilidades de matéria seca (DMS), matéria orgânica (DMO), proteína bruta (DPB), extrato etéreo (DEE), fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (DFDNcp), carboidratos não fibrosos (DCNF) e nutrientes digestíveis totais (NDT) (%) para animais consumindo dietas contendo silagem e feno de estilosantes Campo Grande associados ou não a silagem de milho.

Ani	Trat	DMS	DMO	DPB	DEE	DFDNcp	DCNF	DNDT
29	1	82,12	83,39	82,85	88,48	73,03	91,28	85,84
30	2	50,91	52,86	41,69	41,29	47,38	61,63	51,26
31	3	56,63	57,99	54,63	60,21	52,19	67,01	59,61
32	4	61,35	64,71	55,38	68,40	61,34	71,17	65,73
33	5	54,27	57,77	49,70	64,82	51,43	68,24	59,03
34	1	69,34	71,75	72,05	76,12	72,31	72,61	73,96
35	2	64,21	65,44	60,41	65,93	53,10	77,34	63,92
36	3	59,35	60,68	64,02	56,26	48,48	73,81	61,14
37	4	56,56	58,29	56,46	46,10	50,44	67,42	58,89
38	5	45,13	49,38	41,85	30,37	46,58	57,94	50,09
39	1	67,70	70,52	65,91	74,42	64,88	77,48	72,69
40	2	58,24	60,91	54,12	79,67	48,17	73,43	59,81
41	3	61,42	62,60	64,30	71,46	47,44	76,77	63,44
42	4	56,79	59,13	52,34	72,90	43,77	74,44	60,56
43	5	50,32	53,78	38,18	20,04	46,56	69,58	54,00
44	1	78,61	79,08	78,67	82,74	66,74	89,31	77,20
45	2	53,91	55,67	41,48	47,43	47,83	67,31	53,99
46	3	60,89	62,31	64,40	68,57	46,98	77,02	63,09
47	4	60,02	62,46	61,65	72,51	53,07	71,41	63,70

48	5	55,93	58,58	51,72	52,89	54,31	67,09	59,52
49	1	65,00	67,15	66,95	74,70	63,61	71,38	69,44
50	2	56,00	57,86	50,89	62,06	45,47	70,58	56,44
51	3	66,13	67,25	67,58	66,03	50,70	83,39	67,78
52	4	57,53	59,83	59,09	53,85	51,15	69,05	60,66
53	5	45,68	48,13	40,66	58,80	45,17	55,35	49,65
54	1	64,10	66,71	64,60	75,21	58,81	74,82	68,97
55	2	54,75	55,99	53,88	66,71	45,10	65,94	54,97
56	3	52,71	54,36	55,03	56,47	45,41	64,39	55,17
57	4	54,90	56,22	59,91	67,04	47,60	63,34	57,71
58	5	49,72	52,19	45,68	59,37	54,76	53,43	53,52
59	1	63,05	65,00	62,98	58,15	57,34	73,61	66,87
60	2	56,42	57,88	47,77	63,86	42,73	73,21	56,56
61	3	55,85	57,25	59,98	57,46	44,31	70,90	57,90
62	4	61,94	64,83	59,16	65,56	50,42	79,49	65,70
63	5	47,96	50,92	36,86	20,60	48,89	60,90	51,29
64	1	73,99	75,76	73,08	73,46	71,09	81,39	77,73
65	2	55,84	57,30	49,92	64,77	42,70	71,96	56,04
66	3	63,84	65,63	62,84	62,34	55,71	77,15	66,11
67	4	57,48	59,03	57,72	45,12	50,45	68,54	59,71
68	5	50,64	53,31	39,89	52,53	54,92	57,85	54,37

T1: Silagem de milho; T2: Silagem de estilosantes; T3: Feno de estilosantes; T4: 50% Silagem de milho + 50% Silagem de estilosantes; T5: 50% Silagem de milho + 50% Feno de estilosantes.

Tabela 11. Animal, tratamento, ganho médio diário (GMD) (kg/dia), ganho médio diário de carcaça (GMDC) (kg/dia), conversão alimentar (CA) (kg) e rendimento de carcaça (RC) (%) para animais consumindo dietas contendo silagem e feno de estilosantes Campo Grande associados ou não a silagem de milho.

Animal	Tratamento	PCi	PCf	GMD	GMDC	CA	RC
29	1	340	450	1,31	0,71	4,84	53,24
30	2	342	444	1,21	0,74	8,58	54,80
31	3	341	450	1,30	0,64	5,64	52,00
32	4	347	500	1,82	1,05	5,52	54,38
33	5	342	465	1,46	0,88	6,53	54,80
34	1	358	484	1,50	0,90	6,27	54,77
35	2	350	468	1,40	0,64	5,77	51,15
36	3	339	455	1,38	0,78	7,11	53,85
37	4	357	484	1,51	0,77	6,55	52,36
38	5	357	486	1,54	0,91	7,36	54,63
39	1	380	500	1,43	0,83	6,01	54,10
40	2	355	471	1,38	0,68	7,03	52,04
41	3	341	428	1,04	0,58	6,38	53,62
42	4	355	470	1,37	0,84	7,31	55,09
43	5	370	490	1,43	0,85	9,11	54,55
44	1	355	480	1,49	0,84	5,35	53,90
45	2	346	475	1,54	0,81	6,72	52,93
46	3	345	442	1,15	0,71	6,03	54,73
47	4	350	504	1,83	1,00	5,68	53,37
48	5	345	458	1,35	0,84	7,03	55,24
49	1	345	496	1,80	1,01	4,89	53,85

50	2	345	435	1,07	0,60	9,19	53,49
51	3	358	447	1,06	0,55	6,08	52,71
52	4	348	486	1,64	0,87	6,69	53,02
53	5	346	459	1,35	0,94	7,12	57,06
54	1	364	501	1,63	0,96	5,81	54,59
55	2	363	486	1,46	0,59	6,12	49,71
56	3	371	444	0,87	0,65	8,89	56,44
57	4	372	500	1,52	1,00	6,30	56,24
58	5	350	478	1,52	0,92	7,67	54,92
59	1	377	527	1,79	1,06	5,35	54,82
60	2	375	461	1,02	0,60	8,82	53,99
61	3	365	465	1,19	0,69	7,52	54,04
62	4	360	477	1,39	0,73	7,59	52,83
63	5	384	541	1,87	0,95	7,14	52,29
64	1	373	495	1,45	0,83	5,26	53,94
65	2	389	500	1,32	0,70	8,86	52,98
66	3	389	465	0,90	0,65	7,12	55,96
67	4	376	515	1,65	0,94	5,59	53,90
68	5	415	560	1,73	1,06	8,49	55,16

T1: Silagem de milho; T2: Silagem de estilosantes; T3: Feno de estilosantes; T4: 50% Silagem de milho + 50% Silagem de estilosantes; T5: 50% Silagem de milho + 50% Feno de estilosantes.