

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Efeitos de *Lentilactobacillus buchneri* e monensina sódica na ensilagem de dieta total e avaliação de consumo, digestibilidade e microbiota ruminal em bovinos de corte

Felipe Almeida Soares
Doctor Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

FELIPE ALMEIDA SOARES

Efeitos de *Lentilactobacillus buchneri* e monensina sódica na ensilagem de dieta total e avaliação de consumo, digestibilidade e microbiota ruminal em bovinos de corte

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*.

Orientador: Odilon Gomes Pereira

Coorientadores: Karina G. Ribeiro
Sebastiao de C. V. Filho

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

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

T

S676e
2025 Soares, Felipe Almeida, 1989-
Efeitos de *Lentilactobacillus buchneri* e monensina sódica na ensilagem de dieta total e avaliação de silagens de dieta total com diferentes proporções de forragem na alimentação de bovinos de corte / Felipe Almeida Soares. – Viçosa, MG, 2025.
1 tese eletrônica (86 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Odilon Gomes Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia, 2025.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.193>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bovinos - Alimentação e rações. 2. Bactérias lácticas.
3. Ionóforos. 4. Rúmen - Fermentação. 5. Rumém -
Microbiologia. I. Pereira, Odilon Gomes, 1960-. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 636.2085

FELIPE ALMEIDA SOARES

Efeitos de *Lentilactobacillus buchneri* e monensina sódica na ensilagem de dieta total e avaliação de consumo, digestibilidade e microbiota ruminal em bovinos de corte

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: 4 de fevereiro de 2025.

Assentimento:

Felipe Almeida Soares
Autor

Odilon Gomes Pereira
Orientador

Essa tese foi assinada digitalmente pelo autor em 25/04/2025 às 22:21:58 e pelo orientador em 26/04/2025 às 09:30:18. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **HJ8G.88FK.84B8** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

A minha família, especialmente a minha mãe Clarice Celeste de Almeida, minha irmã Bárbara Almeida Soares e meu sobrinho Emanuel Silva Almeida que tanto admiro e que me deram todo o apoio e carinho para me tornar a pessoa que sou hoje. AMO VOCÊS!!

A minha companheira Daiana Quirino pela paciência, simpatia e disposição que foi determinante para eu conseguir chegar até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Odilon Gomes Pereira, pela confiança, respeito, conselhos e ensinamentos no decorrer da minha formação.

Ao Prof. Dr. João Carlos de Carvalho Almeida, vulgo “DELEGADO” e sua mulher Eliane Márcia de Andrade P. da Rocha por ter acreditado em meu potencial e por despertar em mim o interesse pela Pós-Graduação. Serei eternamente grato por tudo o que fizeram e fazem por mim.

Aos amigos do Laboratório de Forragicultura e Microbiologia da Silagem da UFV em que tive a oportunidade de conhecer e que auxiliaram para a realização desta tese: Alberto, Wagner, Renan, Gabriela D., Thiago N., Eloy, Patrícia, Thiago S., Gabriel, Gabriela B., Rafael B., Gabriela F., João Paulo e José Flávio. Agradeço a todos pelo empenho e auxílio na condução dos experimentos. Muito Obrigado!!!

Aos amigos dos laboratórios adjacentes que também me ajudaram nessa jornada: Nathália, Felipe, Adailton, Thamys e Pâmela.

Aos meus companheiros de república Jardeson, Paulo, Luiz, Raphaela e Dhones em que tive o privilégio de conviver durante esses quatro anos em Viçosa. Agradeço de coração pela amizade, carinho e companheirismo.

Aos funcionários do departamento de Zootecnia da UFV por todo o apoio.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Zootecnia e a todos os professores pelos conhecimentos ministrados, por tornarem possível a condução desta tese e pela oportunidade de realizar meu doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

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

RESUMO

SOARES, Felipe Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2025. **Efeitos de *Lentilactobacillus buchneri* e monensina sódica na ensilagem de dieta total e avaliação de consumo, digestibilidade e microbiota ruminal em bovinos de corte.** Orientador: Odilon Gomes Pereira. Coorientadores: Karina Guimaraes Ribeiro e Sebastiao de Campos Valadares Filho.

Esta tese foi dividida em dois capítulos. Capítulo 1 - Objetivou-se avaliar os efeitos da monensina e de inoculantes microbianos à base de *Lentilactobacillus buchneri* sobre o perfil fermentativo, estabilidade aeróbia, composição química e digestibilidade in vitro de silagem de TMR usando o sorgo forrageiro como fonte de volumoso para bovinos de corte. Os tratamentos foram: TMR controle, sem inoculante, mineral ou monensina (TMRc); TMR com inclusão de mineral (TMRm); TMR com a inclusão de mineral acrescido de monensina (TMRmo), sendo todos os tratamentos inoculados ou não com inoculante a base de *L. buchneri*, com quatro repetições, totalizando 24 unidades experimentais. Foi observado menores valores de fungos filamentosos (FUN) e leveduras (LEV) em silagens TMRmo. Silagens inoculadas apresentaram maiores valores para a contagem de bactérias do ácido láctico (BAL), FUN e ácido acético, além de menores valores de N-NH₃ e digestibilidade in vitro da fibra em detergente neutro DIVFDN. A utilização de núcleo mineral com inclusão de monensina não comprometeu o processo fermentativo de silagens de TMR. A utilização de núcleo mineral com inclusão de monensina e presença de inoculante microbiano a base de *L. buchneri* não afeta o processo fermentativo de silagens de TMR, contribuindo para a redução da população de fungos filamentosos e leveduras nas silagens. Capítulo 2 - Avaliou-se o consumo, a digestibilidade e a microbiota ruminal de bovinos de corte, alimentados com TMR ensiladas ou não, contendo duas proporções de volumoso:concentrado (V:C). Quatro touros F1 Nelore × Angus canulados no rumen receberam quatro tratamentos dietéticos em um delineamento experimental quadrado latino 4x4. Os tratamentos consistiram em TMR com duas diferentes V:C (80:20 e 20:80), e dois diferentes tipos de processamento: ensilada (TMRs) ou não (TMRn). O experimento durou 80 dias, com 4 períodos de 20 dias, 14 dias para adaptação e 6 dias de coleta. O consumo de fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDN_cp), consumo de amido, consumo de carboidratos não fibrosos (CCNF) e o consumo de nutrientes digestíveis totais (CNDT) foram influenciadas pela relação V:C. O aumento da proporção de concentrado aumentou o consumo de amido, CCNF, CNDT e reduziu o consumo de FDN_cp. A digestibilidade do amido (DAmido) foi

influenciada pela interação processamento × V:C. As digestibilidades da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), carboidratos não fibrosos (CNF) e matéria orgânica (MO) foram maiores para as TMR com relação V:C de 20:80. Foi observado maiores populações de *Lachnospiraceae_NK3A20_group*, *Atopobium*, para a relação V:C de 20:80. Enquanto que para a relação V:C 80:20 foram observadas maiores populações de *Candidatus_Soleaferrea*, *Family_XIII_UCG_001*, *Pseudobutyrvibrio*, *Lactobacillus*, *Shuttleworthia*, *Fibrobacter*, *Butyrivibrio*, *Acetobacter*, *Lachnospiraceae_ACC2044_group*, *Lachnospiraceae_XPB1014_group*, *Candidatus_Saccharimonas*, *Saccharofermentans* e *Succiniclasticum*. A maior proporção de concentrado na dieta (20:80) proporciona impacto positivo no consumo e na digestibilidade da maioria dos nutrientes, sem comprometer a fermentação ruminal. A abundância relativa dos táxons bacterianos a nível de gênero, na fase líquida e sólida, mostrou predominância de *Prevotella*, *Rikenellaceae_RC9_gut_group* e *Christensenellaceae_R7_group* para todos os tratamentos analisados

Palavras-chave: Bactérias lácticas; Ionóforos; Perfil fermentativo; Bactérias ruminais

ABSTRACT

SOARES, Felipe Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2025. **Effects of *Lentilactobacillus buchneri* and sodium monensin on total diet ensiling and assessment of consumption, digestibility and ruminal microbiota in beef cattle.** Adviser: Odilon Gomes Pereira. Co-advisers: Karina Guimaraes Ribeiro and Sebastiao de Campos Valadares Filho.

This thesis was divided into two chapters. Chapter 1 - The objective was to evaluate the monensin and microbial inoculants based on *Lentilactobacillus buchneri* effects on the fermentation profile, aerobic stability, chemical composition, and in vitro digestibility of TMR silage using forage sorghum as a roughage source for beef cattle. The treatments were: TMR control, without inoculant, mineral, or monensin (TMRc); TMR with mineral inclusion (TMRm); TMR with mineral plus monensin inclusion (TMRmo), where all treatments were inoculated or not with *L. buchneri* inoculant. It was adopted with four replicates per treatment, totaling 24 experimental units. For TMRmo silages we observed lower values of filamentous fungi (FUN), and yeast (LEV). We observed higher counts for lactic acid bacteria (BAL), FUN, higher acetic acid concentration, lower N-NH₃ values, and in vitro neutral detergent fiber digestibility (IVFDN) for inoculated silages. A mineral nucleus with monensin inclusion use did not compromise the fermentation process of TMR silages. The mineral nucleus with monensin and a microbial inoculant based on *L. buchneri* inclusion does not affect the fermentation process of TMR silages, contributing to the filamentous fungi and yeasts population reduction in the silages. Chapter 2 – This study aimed to evaluate intake, digestibility and ruminal microbiota of beef cattle fed TMR ensiled or not, containing two forage:concentrate (V:C) ratios. Four F1 Nellore × Angus bulls cannulated in the rumen received four dietary treatments in a 4x4 latin square experimental design. The treatments consisted of TMR with two different V:C (80:20 and 20:80), and two different processing: types ensiled (TMRs) or not (TMRn). The experiment lasted 80 days, with four periods of 20 days with 14 days for adaptation and 6 days of collection. The neutral detergent fiber corrected for ash and protein (NDFcp) intake, starch intake, non-fibrous carbohydrate (NFCC) intake, and total digestible nutrient (TDNc) intake were influenced by the V:C ratio. Increasing the concentrate proportion in TMR increased the starch, NFCC, and NDFcp intake, and reduced the NDFcp intake. Starch digestibility (DStarch) was influenced by the processing × V:C interaction. The digestibilities of dry matter (DM), crude protein (CP), ether extract (EE), non-fibrous carbohydrates (NFC), and organic matter (OM) were higher for TMR with a

20:80 V:C ratio. Higher populations of Lachnospiraceae_NK3A20_group and Atopobium were observed for a 20:80 V:C ratio. While for the 80:20 V:C ratio, higher populations of Candidatus_Soleaferrea, Family_XIII_UCG_001, Pseudobutyrvibrio, Lactobacillus, Shuttleworthia, Fibrobacter, Butyrvibrio, Acetobacter, Lachnospiraceae_ACC2044_group, Lachnospiraceae_XPB1014_group, Candidatus_Saccharimonas, Saccharofermentans, and Succiniclasticum were observed. The higher concentrate proportion (20:80) in the diet has a positive impact on the intake and digestibility of most nutrients, without compromising ruminal fermentation. The relative abundance in the liquid and solid phase of bacterial taxa at the genus level, showed a predominance of Prevotella, Rikenellaceae_RC9_gut_group, and Christensenellaceae_R7_group for all treatments analyzed.

Keywords: Lactic acid bacteria; Ionophores ; Fermentation profile; Ruminant bacteria.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	10
REFERÊNCIAS.....	13
CAPÍTULO 1: EFEITOS DE <i>LENTILACTOBACILLUS BUCHNERI</i> E MONENSINA SÓDICA NA ENSILAGEM DE TMR	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1. Localização do experimento e cultivo do sorgo	18
2.2. Delineamento experimental, colheita e ensilagem.....	19
2.3. Processamento e análises químicas	20
2.4. Análises do perfil fermentativo	21
2.5. Quantificação das populações microbianas.....	21
2.6. Análise da digestibilidade <i>in vitro</i>	22
2.7. Estabilidade aeróbia	23
3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Caracterização das TMR antes da ensilagem	24
4.2. Perfil fermentativo	25
4.3. Composição química	27
5. DISCUSSÃO	29
5.1. Perfil fermentativo	29
5.2. Composição química e digestibilidade <i>in vitro</i>	32
6. CONCLUSÕES	33
7. REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO 2: CONSUMO, DIGESTIBILIDADE E MICROBIOTA RUMINAL DE BOVINOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETA TOTAL ENSILADA OU NÃO, CONTENDO DUAS PROPORÇÕES DE VOLUMOSO:CONCENTRADO	40
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1. Local do experimento.....	43
2.2. Ensilagem, dietas, animais e delineamento experimental	43
2.3. Fornecimento das dietas, mensuração do consumo, amostragem de ingredientes e sobras	45
2.4. Coleta total de urina e fezes	46
2.5. Coleta de líquido ruminal	46

2.6.	Extração e purificação de DNA do líquido ruminal para análise metataxonômica ..	47
2.7.	Análises químicas e cálculos.....	48
3.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	49
3.1.	Análises de diversidade microbiana	50
4.	RESULTADOS	50
4.1.	Consumo e digestibilidade.....	50
4.2.	Parâmetros ruminais	53
4.3.	População microbiana ruminal.....	57
5.	DISCUSSÃO	63
6.	CONCLUSÕES	69
7.	REFERÊNCIAS.....	70
8.	MATERIAL SUPLEMENTAR	78
	CONCLUSÃO GERAL	86

INTRODUÇÃO GERAL

A pecuária moderna atualmente objetiva atender à crescente demanda mundial por alimentos, tendo em vista que até 2050, a população poderá atingir nove bilhões de pessoas (OECD/FAO, 2021). Nesse contexto, o Brasil surge como uma alternativa promissora para atender a essa demanda e ocupar lugar de destaque como um dos principais fornecedores de carne bovina, principalmente para os mercados em ascensão como a Ásia (OECD/FAO, 2021).

A terminação de bovinos em confinamento tem como característica a utilização de elevadas quantidades de alimentos concentrados, variando de 70 a 90%) (Oliveira & Millen, 2014). Este fato é observado principalmente pela alta produtividade de grãos, aumento na disponibilidade de resíduos e coprodutos agroindustriais, além de questões de operacionalidade nos confinamentos de grande porte (Santos *et al.*, 2011). a crescente pressão da sociedade moderna para que os sistemas produtivos sejam mais sustentáveis, e as preocupações em relação ao atendimento das questões econômicas, socioambientais e de bem estar animal impõem ao setor a busca por tecnologias que visam intensificar a produção de carne (Carvalho *et al.*, 2018).

Atualmente, os sistemas de criação de bovinos têm objetivado reduzir os custos da alimentação, melhorar os índices econômicos, expandir o uso de recursos forrageiros e melhorar a tecnologia de armazenamento de forragem (Zhang *et al.*, 2021). Neste sentido, a utilização de silagens de dietas totais (TMR) pode ser uma opção para a otimização do manejo alimentar dos animais (Bueno *et al.*, 2020). A silagem de TMR é caracterizada pela ensilagem de uma mistura de alimentos volumosos, concentrados, minerais, vitaminas e aditivos, com o objetivo de atender a demanda nutricional de uma determinada categoria animal (Xie *et al.*, 2022). Além disso, a ensilagem de TMR contribui com a melhoria da estabilidade aeróbia e características sensoriais de subprodutos de baixa aceitabilidade, aumento da digestibilidade da proteína e amido, além de promover a redução da mão de obra e maquinário quando esta é adquirida no comércio (Hao *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

O consumo e o desempenho animal estão diretamente relacionados com a composição química e as características da dieta. A proporção de volumoso, a composição nutricional e o método de conservação da dieta são fatores que podem afetar a microbiota ruminal (Belanche *et al.*, 2012; Pitta *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021). Desta forma, para que a saúde ruminal seja mantida, é necessário entender como se dão as mudanças fisiológicas neste ecossistema. A partir disso, seria possível traçar estratégias alimentares com o objetivo de melhorar o desempenho produtivo de animais, que são desafiados durante o período de confinamento.

A aplicação de inoculantes microbianos que contêm bactérias do ácido lático (BAL) é reconhecida por melhorar a qualidade e a estabilidade aeróbia de silagens de diferentes culturas (Agarussi *et al.*, 2022). As BAL heterofermentativas (*Lentilactobacillus buchneri*) convertem o ácido lático (AL) principalmente em ácido acético e 1,2 propanodiol que possuem potencial antifúngico e inibem o crescimento de fungos filamentosos e leveduras (Restelatto *et al.*, 2019), que são indesejáveis durante a ensilagem. Recentemente, seu uso em silagens de TMR vem sendo considerado, apresentando resultados promissores (Liu *et al.*, 2016; Restelatto *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2024).

Outro produto muito utilizado nas TMRs *in natura* são os aditivos nutricionais. Seu uso está relacionado com a melhoria do desempenho dos animais, tornando-se indispensáveis para o desenvolvimento da pecuária com menor ciclo de produção. Segundo estudo conduzido por Oliveira e Millen, (2014) aproximadamente 99,2% dos sistemas de confinamento incorporam aditivos alimentares em suas dietas, sendo os ionóforos os principais, presentes em 93,9% das dietas. Vários desses compostos são produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces*, sendo a monensina uma das mais empregadas na criação comercial de bovinos (Ovchinnikov, 1979; Romero-Pérez *et al.*, 2017).

Os ionóforos tem a capacidade de modificar a fermentação ruminal e, com isso, incrementar a eficiência na utilização de nitrogênio e retenção da energia proveniente da dieta (Weiss *et al.*, 2020). Além disso, seu uso está relacionado com reduções na produção de metano e alterações na produção dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos no rúmen (Oliveira & Millen, 2014; Ovchinnikov, 1979; Romero-Pérez *et al.*, 2017; Weiss *et al.*, 2020). Outro efeito inerente da inclusão de monensina está relacionado a sua capacidade de modificar a microbiota ruminal devido a sua eficácia em inibir o desenvolvimento de bactérias Gram-positivas (produtoras de AL; Gadberry *et al.*, 2022).

Entretanto, nos casos em que o *L. buchneri* é adicionado a TMRs contendo aditivos nutricionais como a monensina, sua capacidade de atuação pode ser comprometida pelo seu efeito inibitório, o que poderia contribuir para o aumento das perdas e diminuição da estabilidade aeróbia do material ensilado. Desta forma, a inclusão de monensina em silagens de TMR poderia alterar o curso da fermentação destas silagens por meio da sua ação antagônica sobre as bactérias Gram-positivas fermentadoras.

Embora façam parte de diversos tipos de misturas e suplementos para a produção de ração total, os efeitos dos aditivos melhoradores de desempenho animal na conservação do alimento ainda são pouco compreendidos. Tendo em vista a escassez de trabalhos na literatura que avaliaram o metabolismo de bovinos de corte recebendo silagens de TMR com diferentes

proporções de volumoso, a condução de estudos desta magnitude torna-se necessária para elucidar os efeitos da TMR na fermentação ruminal. Além da ampliação do conhecimento acerca do tema, este estudo pode resultar em recomendações práticas que podem ser adotadas a campo, contribuindo para o incremento na produtividade dos animais.

Diante da importância da bovinocultura de corte no país e as pressões sociais para que os sistemas produtivos se tornem mais sustentáveis, nossa primeira hipótese é que a inclusão de monensina para a ensilagem de TMR, inoculadas ou não com *Lentilactobacillus buchneri* afetam o perfil fermentativo, estabilidade aeróbia, composição química e digestibilidade *in vitro* da TMR ensilada. E, no segundo momento, hipotetizamos que diferentes proporções de volumoso nas silagens de TMR promovem alterações na microbiota ruminal, bem como na digestibilidade dos nutrientes e desempenho de bovinos de corte.

Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram: avaliar os efeitos da monensina e de inoculantes microbianos à base de *Lentilactobacillus buchneri* sobre o perfil fermentativo, estabilidade aeróbia, composição química e digestibilidade *in vitro* de silagem de TMR usando o sorgo forrageiro como fonte de volumoso para bovinos de corte; e avaliar o consumo, a digestibilidade aparente dos nutrientes, o balanço de nitrogênio e a população bacteriana ruminal em bovinos de corte, alimentados com TMR ensilada ou não, contendo duas proporções de volumoso:concentrado.

REFERÊNCIAS

- AGARUSSI, M. C. N.; PEREIRA, O. G.; PIMENTEL, F. E.; AZEVEDO, C. F.; DA SILVA, V. P.; E SILVA, F. F. Microbiome of rehydrated corn and sorghum grain silages treated with microbial inoculants in different fermentation periods. **Scientific Reports**, [s. l.], vol. 12, n° 1, p. 1–17, 2022. DOI 10.1038/s41598-022-21461-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21461-4>.
- BELANCHE, A.; DOREAU, M.; EDWARDS, J. E.; MOORBY, J. M.; PINLOCHE, E.; NEWBOLD, C. J. Shifts in the Rumen Microbiota Due to the Type of Carbohydrate and Level of Protein Ingested by Dairy Cattle Are Associated with Changes in Rumen Fermentation. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], vol. 142, n° 9, p. 1684–1692, 1 set. 2012. DOI 10.3945/jn.112.159574. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article/142/9/1684/4630931>.
- BUENO, J. L.; BOLSON, D. C.; JACOVACI, F. A.; GOMES, A. L. M.; RIBEIRO, M. G.; BUENO, A. V. I.; JOBIM, C. C.; DANIEL, J. L. P. Storage length interacts with maturity to affect nutrient availability in unprocessed flint corn silage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s. l.], vol. 49, 30 abr. 2020. <https://doi.org/10.37496/rbz4920190247>.
- CARVALHO, R. M. S.; BOARI, C. A.; VILLELA, S. D. J.; PIRES, A. V.; MOURTHÉ, M. H. F.; OLIVEIRA, F. R.; DUMONT, M. A.; GONTIJO, R. P.; LOBO-JR, A. R.; MARTINS, P. G. M. A. Differences between sexes, muscles and aging times on the quality of meat from Wagyu × Angus cattle finished in feedlot. **Animal Production Science**, [s. l.], vol. 58, n° 2, p. 350, 2018. <https://doi.org/10.1071/AN15804>.
- GADBERRY, S.; LALMAN, D.; WHITE, F.; LINNEEN, S.; BECK, P. Meta-analysis of the effects of monensin on growth and bloat of cattle on pasture. **Translational Animal Science**, [s. l.], vol. 6, n° 2, 1 abr. 2022. <https://doi.org/10.1093/tas/txac031>.
- HAO, W.; TIAN, P.; ZHENG, M.; WANG, H.; XU, C. Characteristics of proteolytic microorganisms and their effects on proteolysis in total mixed ration silages of soybean curd residue. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, [s. l.], vol. 33, n° 1, p. 100–110, 1 jan. 2020. DOI 10.5713/ajas.18.0933. Disponível em: <http://ajas.info/journal/view.php?doi=10.5713/ajas.18.0933>.
- LI, X.; CHENG, Y.; YANG, F.; HU, J.; MA, R.; LIU, H.; SHAO, T. Improving Total Mixed Ration Silage: Effects of Lactic Acid Bacteria Inoculants and Antimicrobial Additives on Fermentation Quality and Aerobic Stability. **Agronomy**, [s. l.], vol. 14, n° 8, p. 1602, 23 jul. 2024. <https://doi.org/10.3390/agronomy14081602>.
- LIU, Q.; LI, X.; DESTA, S. T.; ZHANG, J.; SHAO, T. Effects of *Lactobacillus plantarum* and fibrolytic enzyme on the fermentation quality and in vitro digestibility of total mixed rations silage including rape straw. **Journal of Integrative Agriculture**, [s. l.], vol. 15, n° 9, p. 2087–2096, set. 2016. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61233-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61233-3).
- OECD/FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030. OECD-FAO Agricultural Outlook. Paris, 5 jul. 2021. <https://doi.org/10.1787/19428846-en>.

- OLIVEIRA, C. A.; MILLEN, D. D. Survey of the nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists in Brazil. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], vol. 197, p. 64–75, 2014a. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.08.010>.
- OVCHINNIKOV, Y. A. Physico-chemical Basis of Ion Transport through Biological Membranes: Ionophores and Ion Channels. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], vol. 94, n° 2, p. 321–336, 28 mar. 1979. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb12898.x>.
- PITTA, D. W.; INDUGU, N.; KUMAR, S.; VECCHIARELLI, B.; SINHA, R.; BAKER, L. D.; BHUKYA, B.; FERGUSON, J. D. Metagenomic assessment of the functional potential of the rumen microbiome in Holstein dairy cows. **Anaerobe**, [s. l.], vol. 38, p. 50–60, abr. 2016. DOI 10.1016/j.anaerobe.2015.12.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996415300913>.
- RETELATTO, R.; NOVINSKI, C. O.; PEREIRA, L. M.; SILVA, E. P. A.; VOLPI, D.; ZOPOLLATTO, M.; SCHMIDT, P.; FACIOLA, A. P. Chemical composition, fermentative losses, and microbial counts of total mixed ration silages inoculated with different *Lactobacillus* species. **Journal of Animal Science**, [s. l.], vol. 97, n° 4, p. 1634–1644, 3 abr. 2019. DOI 10.1093/jas/skz030. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/advance-article-abstract/doi/10.1093/jas/skz030/5306102>.
- ROMERO-PÉREZ, A.; OKINE, E. K.; GUAN, L. L.; DUVAL, S. M.; KINDERMANN, M.; BEAUCHEMIN, K. A. Rapid Communication: Evaluation of methane inhibitor 3-nitrooxypropanol and monensin in a high-grain diet using the rumen simulation technique (Rusitec)1,2. **Journal of Animal Science**, [s. l.], vol. 95, n° 9, p. 4072–4077, 1 set. 2017. <https://doi.org/10.2527/jas.2017.1896>.
- SANTOS, F. A. P.; CARARETO, R.; MARQUES, R. S. Processamento de grãos para bovinos de corte. 2011. **Simpósio Sobre Nutrição De Bovinos [...]**. Piracicaba: [s. n.], 2011. p. 403–432.
- WANG, S.; ZHAO, J.; YU, C.; LI, J.; TAO, X.; CHEN, S.; SHAO, T. Nutritional evaluation of wet brewers' grains as substitute for common vetch in ensiled total mixed ration. **Italian Journal of Animal Science**, [s. l.], vol. 19, n° 1, p. 1015–1025, 14 dez. 2020. DOI 10.1080/1828051X.2020.1810141. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1828051X.2020.1810141>.
- WEISS, C. P.; BECK, P. A.; GADBERRY, M. S.; RICHESON, J. T.; WILSON, B. K.; ROBINSON, C. A.; ZHAO, J.; HESS, T.; HUBBELL, D. Effects of intake of monensin during the stocker phase and subsequent finishing phase on performance and carcass characteristics of finishing beef steers. **Applied Animal Science**, [s. l.], vol. 36, n° 5, p. 668–676, out. 2020. <https://doi.org/10.15232/aas.2020-02031>.
- XIE, Y.; WANG, L.; LI, W.; XU, S.; BAO, J.; DENG, J.; WU, Z.; YU, Z. Fermentation quality, in vitro digestibility, and aerobic stability of total mixed ration silage in response to varying proportion alfalfa silage. **Animals**, [s. l.], vol. 12, n° 8, p. 1039, 16 abr. 2022. DOI 10.3390/ani12081039. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/12/8/1039>.
- ZHANG, X.; WANG, H.; GUO, X. Comparative analysis of rumen fermentation parameters and bacterial profiles during adaption to different fattening stages in beef cattle fed TMR with

various forage silage. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], vol. 278, n° February, p. 115006, ago. 2021. DOI 10.1016/j.anifeedsci.2021.115006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115006>.

CAPÍTULO 1: EFEITOS DE *LENTILACTOBACILLUS BUCHNERI* E MONENSINA SÓDICA NA ENSILAGEM DE TMR

Resumo

Objetivou-se avaliar os efeitos da monensina e de inoculantes microbianos à base de *Lentilactobacillus buchneri* sobre o perfil fermentativo, estabilidade aeróbia, composição química e digestibilidade *in vitro* de silagem de TMR, usando o sorgo forrageiro como fonte de volumoso. O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2×3, sendo o primeiro fator o uso ou não de inoculante microbiano à base de *L. buchneri* (I) e, o segundo fator, diferentes núcleos minerais adicionados à TMR (S), no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, totalizando 24 unidades experimentais. As silagens de TMR consistiram em: TMR controle, sem mineral ou monensina (TMRc); TMR com inclusão de mineral (TMRm); TMR com a inclusão de mineral e monensina (TMRmo), sendo todos os tratamentos inoculados ou não com inoculante comercial a base de *L. buchneri*, antes da ensilagem, e alocados em minisilos de polietileno com aproximadamente 10kg de capacidade. Houve efeito da interação I × S sobre os conteúdos de carboidratos solúveis em água (CHO) e de ácido lático (AL). Houve efeito de tipo de suplementação mineral sobre bactérias do ácido lático (BAL), fungos filamentosos (FUN), leveduras (LEV), pH, matéria mineral (MM) e digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS). Foi observado efeito de inoculante sobre BAL, FUN, nitrogênio amoniacal (N-NH₃), ácido acético, fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína (FDNcp) e digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN). Silagens TMRm e TMRmo apresentaram maiores valores de BAL e pH, enquanto que a TMRmo apresentou menores populações de FUN e LEV. Nas silagens inoculadas foram registradas maiores contagens de BAL e FUN, e menores valores de N-NH₃ e DIVFDN. Não houve efeito de silagem, de inoculante, nem da interação destes (P>0,05) sobre a estabilidade aeróbia (h), contagem de LEV, FUN e pH das silagens durante a exposição aeróbia das silagens. As variáveis matéria seca (MS), proteína bruta PB, proteína bruta solúvel (PBS) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) não foram afetadas pelos fatores em estudo, apresentando médias de 605,84 g/kg MN, 143,23; 86,15 e 4,43 g/kg MS, respectivamente. A utilização de núcleo mineral com inclusão de monensina não afeta o processo fermentativo de silagens de TMR, contribuindo para a redução da população de fungos filamentosos e leveduras nas silagens. Portanto, a ensilagem da TMR, pode ser realizada com a inclusão de monensina na dieta, associada a presença de inoculante microbiano a base de *L. buchneri*.

1. INTRODUÇÃO

O uso de silagens de dieta total (TMR) pode ser uma opção para a otimização do manejo alimentar dos ruminantes. Alvo de estudos desde a década de 60 nos EUA, as silagens de TMR tem sido foco de pesquisas em diversos países nos últimos anos, impulsionada, principalmente, pelo aumento da disponibilidade de subprodutos agroindustriais (Bueno *et al.*, 2020).

Silagens de TMR são caracterizadas pela mistura de alimentos volumosos, concentrados, minerais, vitaminas e aditivos com o objetivo de atender a demanda nutricional de uma determinada categoria animal (Lazzari *et al.*, 2021). Além disso, a ensilagem de TMR contribui com a melhora na estabilidade aeróbia, nas características sensoriais de subprodutos de baixa aceitabilidade, aumento na digestibilidade da proteína e amido, além de promover a redução da mão de obra e maquinário quando esta é adquirida no comércio (Bueno *et al.*, 2020; Hao *et al.*, 2020; Lazzari *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2022).

Dentre os diversos produtos utilizados nas TMR, destacam-se os aditivos nutricionais cujo uso está relacionado com a melhora no desempenho dos animais, tornando-se indispensáveis para o desenvolvimento da pecuária com menor ciclo de produção. Um dos aditivos mais utilizados na dieta dos ruminantes são os ionóforos (Oliveira & Millen, 2014), que são produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces*, sendo a monensina um dos mais empregados na dieta de bovinos (Ovchinnikov, 1979).

Os ionóforos, como exemplo a monensina, possuem a capacidade de modificar a fermentação ruminal e, com isso, incrementar a eficiência na utilização de nitrogênio e retenção de energia proveniente da dieta (Weiss *et al.*, 2020). Além disso, seu uso está relacionado com reduções na produção de metano e alterações na produção dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos no rúmen (Romero-Pérez *et al.*, 2017; Weiss *et al.*, 2020). Outro efeito inerente a inclusão de monensina está relacionado a sua capacidade de modificar a microbiota ruminal devido a sua eficácia em inibir o desenvolvimento de bactérias Gram-positivas (por exemplo as produtoras de lactato) com pouco efeito em bactérias gram-negativas (Gadberry *et al.*, 2022). Desta forma, sua inclusão na confecção de silagens de TMR poderia alterar o curso da fermentação destas silagens por meio de sua ação nos microrganismos fermentadores.

A aplicação de inoculantes microbianos que contêm bactérias do ácido lático (BAL) é reconhecida por melhorar a qualidade e a estabilidade aeróbia de silagens de diferentes culturas (Agarussi *et al.*, 2022). As BAL heterofermentativas (*Lentilactobacillus buchneri*) têm a capacidade de converter o AL principalmente em ácido acético e 1,2 propanodiol que possuem potencial antifúngico e inibem o crescimento de fungos filamentosos e leveduras (Restelatto *et*

al., 2019). Recentemente, seu uso em silagens de TMR vem sendo considerado, apresentando resultados promissores (Liu *et al.*, 2016; Restelatto *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2024). No entanto, nos casos em que o *L. buchneri* é adicionado a TMRs contendo aditivos nutricionais, como a monensina, sua capacidade de atuação pode ser comprometida pelo efeito inibitório da monensina, o que poderia contribuir para o aumento das perdas, e diminuição da estabilidade aeróbia do material ensilado.

Ao avaliar o efeito da inclusão de lasalocida, um antibiótico ionóforo, em silagem de milho, Hoon e Meeske (2011), observaram redução nas concentrações de AL e aumento nas perdas fermentativas, além de redução na digestibilidade *in vitro* dessas silagens. Por outro lado, a utilização de monensina não afetou silagens de TMR para bovinos de corte, apresentando pH abaixo de 4,8, produção de AL acima de 23 g kg⁻¹ e estabilidade aeróbia elevada, acima de 240 horas (Lazzari, 2020).

Embora façam parte de diversos tipos de misturas e suplementos para a produção de TMR não ensilada, os efeitos dos aditivos melhoradores de desempenho animal na conservação do alimento ou dieta conservada na forma de silagem, bem como a inclusão do núcleo mineral e o uso de aditivo microbiano, ainda são pouco compreendidos em silagens de TMR. Nossa hipótese é que a inclusão de monensina em silagem de TMR, inoculada ou não, afeta o perfil fermentativo, a estabilidade aeróbia, a composição química e a digestibilidade *in vitro* da silagem. Sendo assim, objetivou-se avaliar os efeitos da monensina e de inoculantes microbianos à base de *Lentilactobacillus buchneri* sobre o perfil fermentativo, estabilidade aeróbia, composição química e digestibilidade *in vitro* de silagem de TMR usando o sorgo forrageiro como fonte de volumoso para bovinos de corte.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Localização do experimento e cultivo do sorgo

O cultivo do sorgo volumax (Agrocere®[®], Santa Cruz das Palmeiras-SP, Brasil) foi realizado no setor de Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão-UEPE em Forragicultura e as análises laboratoriais no Laboratório de Forragicultura e Microbiologia da Silagem, ambos pertencentes ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, Brasil. O município de Viçosa situa-se na Região da Zona da Mata- Minas Gerais, com altitude de \cong 649 m, latitude Sul de 20°45'14'' e longitude Oeste de 42°52'54''. O clima é

caracterizado como subtropical úmido conforme a classificação Köppen-Geiger (Cwa; Climate, 2022).

Antecedendo a semeadura do sorgo, foi realizada a amostragem (0-20 cm profundidade) e análise do solo com uso de trado do tipo sonda, para avaliar a necessidade de calagem, e calcular a quantidade de adubo necessária (Tabela 1).

Tabela 1. Atributos químicos do solo da área do plantio do sorgo

pH	P	K ⁺	H ⁺ +Al ³⁺	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SB	t	T	V	P-rem	
H ₂ O	mg/dm ³		-----Cmol _c /dm ³ -----								%	mg/L
5,4	2,2	123,0	4,3	0,1	1,9	0,8	3,0	3,1	7,3	41,5	26,1	

pH: potencial hidrogeniônico; P: fósforo; K⁺: potássio; H⁺+Al³⁺: acidez potencial; Al³⁺: alumínio; Ca²⁺: cálcio; Mg²⁺: magnésio; SB: soma de bases; t: capacidade de troca catiônica efetiva; T: capacidade de troca catiônica em pH 7,0; V: índice de saturação de bases; P-rem: fósforo remanescente.

A calagem e a adubação foram determinadas com base nos resultados da análise de solo, visando atender as necessidades da cultura, conforme as diretrizes do Manual de Cultivo Agrícola (5ª Aproximação) para o estado de Minas Gerais, Brasil (Ribeiro *et al.*, 1999). Para a correção do solo, foram aplicadas 1,8 toneladas por hectare de calcário dolomítico (75% PRNT; Minasol®, Arcos-MG, Brasil). A semeadura foi feita em uma área de aproximadamente 800m², com espaçamento de 0,7 m entre linhas, distribuindo-se 11 sementes por metro linear, com o objetivo de alcançar um estande de aproximadamente 125 mil plantas por hectare. Na semeadura, foram aplicados 285 kg/ha de fórmula NPK 08:28:16 no sulco de plantio, e 100 kg/ha de nitrogênio na forma de ureia, foram aplicados em cobertura 20 dias após a semeadura.

2.2. Delineamento experimental, colheita e ensilagem

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2×3, sendo o primeiro fator o uso ou não de inoculante microbiano à base de *L. buchneri* CNCM I-4323 (Lalsil AS, Lallemand®, Brasil) (I) e o segundo fator, diferentes núcleos minerais adicionados às TMRs, em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, totalizando 24 unidades experimentais. Os tratamentos consistiram em:

- TMR controle (TMRC), com e sem inoculante;
- TMR + mineral (TMRm) com e sem inoculante;
- TMR + mineral + monensina (TMRmo) com e sem inoculante;

As rações foram formuladas adotando-se relação volumoso:concentrado de 20:80, na base da MS, utilizando-se o manual BR-Corte 4.0 (Valadares Filho *et al.*, 2016), para atender as exigências nutricionais de novilhos de corte, da raça Nelore, não-castrados, em terminação, com ganho médio diário de 1,5 kg.

Foi realizada a colheita manual da planta inteira de sorgo, a 10 cm do nível do solo, com auxílio de facão, quando o mesmo atingiu ± 300 g/kg MS. O material colhido foi processado em ensiladora estacionária (PN Plus 2000, Nogueira®, São João da Boa Vista-SP, Brasil), a fim de atingir o tamanho de partículas de ± 2 cm.

Os ingredientes do concentrado (farelo de soja, fubá de milho, ureia + sulfato de amônio 9:1 e núcleo mineral) foram processados na Fábrica de Ração da UFV.

O núcleo mineral foi composto de (%MS): 44,24% calcário, 16,36% fosfato bicálcico, 18,99% sal comum, 18,78% flor de enxofre, 1,21% sulfato de zinco, 0,24% sulfato de manganês, 0,12% sulfato de cobre, 0,022% sulfato de cobalto, 0,008% iodato de potássio e 0,008% selenito de sódio. A inclusão de monensina nas dietas foi realizada na quantidade de 20 ppm com base na inclusão da mesma em produtos comerciais (20 mg de Rumensin™ 200).

Considerando as devidas proporções dos alimentos, estes foram pesados e misturados manualmente à forragem para a confecção das TMR em pilhas de 10 kg. O inoculante microbiano foi aplicado, quando necessário, usando um pulverizador manual. A taxa de aplicação do aditivo comercial foi utilizada conforme a recomendação do fabricante para a obtenção de 1×10^5 unidade formadora de colônia log UFC/g, e 50 mL água destilada foi usada para diluir os produtos, com a dose aplicada de 1 g/ tonelada. O TMRc recebeu o mesmo volume de água (sem nenhum aditivo) usado na diluição do aditivo microbiano. A aplicação seguiu de forma sequencial, considerando as repetições de cada tratamento. Após a aplicação do aditivo, o material foi homogeneizado e ensilado em mini-silos com capacidade para 10 kg objetivando a densidade de 700 kg/ m³, totalizando 24 mini-silos, que foram vedados e armazenados por 60 dias.

Foram coletadas amostras do material antes da ensilagem, que foram processadas para a caracterização do material.

2.3. Processamento e análises químicas

As amostras coletadas antes da ensilagem e na data de abertura dos silos (60 dias), foram submetidas a secagem parcial em estufa com circulação forçada de ar a 55°C, até peso

constante. Posteriormente as amostras foram moídas usando o moinho de facas (R-TE-650/1, Tecnal®, Piracicaba-SP, Brasil) em peneira de 1mm.

As amostras foram usadas para estimar os teores de teores de matéria seca (MS, método 934.01), matéria orgânica (MO, método 972.43), cinzas ou matéria mineral (MM, método 942.05), proteína bruta (PB, método 984.13) e extrato etéreo (EE, método 920.39), de acordo com procedimentos descritos pela (AOAC, 1990). Os teores de fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteínas (FDNcp), utilizando-se α -amilase termoestável sem o uso de sulfito de sódio, foram estimados conforme descrito por Van Soest *et al.* (1991) e o nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA; Licitra *et al.*, 1996).

2.4. Análises do perfil fermentativo

Após a abertura dos mini-silos, 25 g de amostra de cada mini-silo foram homogeneizadas com 225 mL de solução estéril de Ringer's (Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) usando um liquidificador industrial durante 1 min. O extrato aquoso foi dividido em três alíquotas: uma para aferição do pH, utilizando-se potenciômetro digital (W38/Tecnal®, São Paulo-SP, Brasil); 10 mL do extrato aquoso foram filtrados, acidificados com H₂SO₄ 1:1 e armazenados a -20 °C, para as análises das concentrações de carboidratos solúveis em água (CHOs; Nelson, 1944), nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total (N-NH₃), pelo método fenol-hipoclorito (Okuda *et al.*, 1965), e ácidos orgânicos (lático, acético, butírico e propiônico) conforme descrito por Siegfried *et al.* (1984), e 10 mL do extrato aquoso foram usados para a quantificação das populações microbianas conforme descrito a seguir.

2.5. Quantificação das populações microbianas

A terceira alíquota do extrato foi usada para a quantificação das populações microbianas (enterobactérias, bactérias lácticas, leveduras e fungos filamentosos). Foram realizadas diluições seriadas 10⁻¹ a 10⁻⁹. Em seguida, foi realizado o plaqueamento em placas de *Petri* estéreis (método *pour-plate*) em meio MRS ágar (De Man, Rogosa & Sharpe, Merck®, Darmstadt, Alemanha), para o cultivo de bactérias lácticas (37 °C/48 h), VRB ágar (Violet Red Bile Agar, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) para o cultivo de enterobactérias (37 °C/24 h) e DRBC ágar (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol Base Agar, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) para cultivo de leveduras (25 °C/72 h) e fungos filamentosos (25 °C/120 h). Foram consideradas para a

determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) as placas contendo de 25 a 250 colônias.

2.6. Análise da digestibilidade *in vitro*

Foram avaliadas a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e a digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN) das silagens de TMR referente aos 60 dias após ensilagem, seguindo a metodologia de (Tilley and Terry, 1963).

As amostras previamente secas e processadas 1 mm, pesadas em duplicata (0,5 g/frasco) foram colocadas em frascos de 60 mL de penicilina juntamente com 10 mL de líquido ruminal e 40 mL de solução tampão (McDougall, 1948) para uma relação 1:4 inoculo e solução tampão, segundo (Silva *et al.*, 2017), realizando o processo de fermentação a 39 °C, em ambiente anaeróbio por 48h.

Nos dias que antecederam os procedimentos, foi preparada a solução tampão de McDougall, (1948), que foi mantida em uma sala climatizada a 39°C para estabilização da temperatura. Antes do início de cada incubação experimental, foi coletada a digesta (líquido e sólidos) de diferentes pontos da interface líquido-sólido no ambiente ruminal, de dois machos Nelore não castrados (peso corporal médio de 595 ±20 kg) e fistulados no rúmen. Os procedimentos para o uso de animais foram autorizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Viçosa conforme o protocolo 40/2024. Os animais doadores foram alocados em baias individuais dispostas de comedouro e bebedouro. Foi fornecida a esses animais uma dieta a base de silagem de milho e concentrado (relação volumoso: concentrado de 20:80, base da MS). O concentrado era composto por milho fubá, soja farelo, núcleo mineral e ureia com 140g PB/kg MS. Os animais foram adaptados a dieta padrão por 14 dias antes da coleta de digesta ruminal (Machado *et al.*, 2016). Após a coleta, a digesta ruminal foi acondicionada em recipientes térmicos adequados para manter a temperatura de 39°C (garrafas térmicas pré-aquecidas). Em seguida, a digesta foi transferida para um liquidificador, em uma sala climatizada a 39°C, e homogeneizada por 30 segundos. O material homogeneizado foi filtrado com camadas de gaze em frascos Erlenmeyer de 2 L (Castro *et al.*, 2021).

O espaço livre nos frascos foi imediatamente saturado com CO₂. Posteriormente, foram vedados com tampas de borracha e lacres de alumínio. Os frascos foram mantidos sob agitação em uma mesa agitadora orbital (40 rpm), em uma sala climatizada a 39°C. A remoção dos gases resultantes da fermentação foi realizada a cada três horas, utilizando agulhas. Após 48 horas, o

conteúdo dos frascos foi então transferido para cadinhos filtrantes de porosidade grossa, com o auxílio de água destilada a mais de 90°C. Em seguida, os cadinhos foram secos a 105°C por 24 horas e pesados, obtendo-se o resíduo aparentemente não digerido da matéria seca.

Para a avaliação da digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN), os cadinhos contendo o resíduo de incubação foram colocados dentro de coletores universais autoclaváveis (120 mL), aos quais foram adicionados 80 mL de solução de detergente neutro, preparada conforme (Mertens, 2002), sem a adição de sulfito de sódio, e 250 µL de α-amilase termoestável (Termamyl 2X). Os coletores, com os cadinhos no interior, foram fechados e autoclavados a 105°C por 1 hora, seguindo o método descrito por (Detmann *et al.*, 2021; INCT-CA F-002/1). Após a autoclavagem, os cadinhos foram lavados novamente com água destilada quente e, ao final, com 30 mL de acetona. Posteriormente, foram secos a 105°C por 24 horas, e pesados para a obtenção do resíduo de FDN.

A DIVMS e DIVFDN foram obtidas através da equação:

$$D = \frac{M - (R - B)}{M} \times 100$$

Onde: M= massa de MS ou FDN incubada (g); R= resíduo de MS ou FDN da incubação (g); B= resíduo de MS ou FDN obtido nos “brancos” (g).

2.7. Estabilidade aeróbia

Após 60 dias de ensilagem os mini-silos foram abertos e, após homogeneização do material, uma amostra de 2 kg de silagem retornou aos mini-silos para avaliação da estabilidade aeróbia. Os mini-silos foram armazenados em sala com temperatura controlada ($\pm 22^\circ\text{C}$), e no centro da massa de silagem, foi inserido um *data logger* (Cryopark iMINI™, Cryopark Company Inc., VA, USA) para mensuração da temperatura, a cada 10 minutos, por dez dias. Dois *data loggers* foram distribuídos na sala para mensuração da temperatura ambiente. A estabilidade aeróbia foi definida como o número de horas que a silagem permaneceu estável antes da temperatura da mesma elevar 2°C acima da temperatura ambiente (Kung *et al.*, 2003).

3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados foram analisados por intermédio do procedimento GLM do SAS® versão 9.4 (SAS, 2010). Os dados foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2×3 , no qual o teor de MS e os tipos de aditivos, bem como

suas interações foram considerados efeitos fixos, e o erro experimental o efeito aleatório, de acordo com o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + I_j (C_i + I_j)ij + e_{ijk}$$

em que: Y_{ijk} = variável de resposta; μ = média geral; C_i = inclusão de monensina i; I_j = efeito do inoculante j; $(C_i + I_j)ij$ = efeito da interação entre os níveis i do fator C e j do fator I; e_{ijk} = erro residual aleatório.

Os dados da avaliação microbiológica foram transformados para a base logarítmica (Log10 UFC) e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-wilk. Após a adequação, os dados de análise microbiológica, assim como os referentes ao perfil de fermentação, composição química, DIVMS, DIFDN e de estabilidade aeróbia foram submetidos à análise de variância e as médias dos efeitos foram comparadas utilizando-se os testes F e de Tukey-Kramer. A matriz de covariância foi escolhida por meio do critério de Akaike corrigido (AICC). Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos utilizando-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das TMR antes da ensilagem

As características químicas e microbiológicas das TMR antes da ensilagem são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Proporção dos ingredientes, composição química e população microbiana das TMR com e sem monensina e inoculante microbiano antes da ensilagem.

Proporção dos ingredientes (% MS)				
Item		TMRc	TMRm	TMRmo
Sorgo forrageiro		20,00	20,00	20,00
Farelo de milho		73,40	71,80	71,70
Farelo de soja		5,00	5,00	5,00
Ureia		1,60	1,60	1,60
Núcleo mineral ¹		0,00	1,65	1,65
Monensina		0,00	0,00	0,015
Composição química (g/kg MS)				
Item	Inoculante	TMRc	TMRm	TMRmo
Matéria seca ²	Com	559,86	542,23	579,04
	Sem	560,21	542,95	578,79
Matéria mineral	Com	29,01	35,98	33,24
	Sem	28,96	36,11	33,52
Proteína bruta	Com	116,73	121,12	115,35
	Sem	116,08	120,89	115,67
Extrato etéreo	Com	36,53	37,07	36,14
	Sem	37,1	37,6	36,8
FDNcp	Com	163,22	165,07	150,12
	Sem	162,95	164,63	149,64
NIDA	Com	3,69	4,55	4,31
	Sem	3,75	4,69	4,70
pH	Com	6,15	6,11	6,05
	Sem	6,12	6,07	6,09
CHOs	Com	62,01	61,32	61,07
	Sem	61,23	60,87	60,53
População microbiana (Log10 UFC/g forragem)				
BAL	Com	6,81	6,92	6,79
	Sem	5,70	5,90	5,90
Mofos	Com	4,33	4,15	4,21
	Sem	4,70	4,60	4,70
Leveduras	Com	6,5	6,72	6,11
	Sem	6,80	7,00	6,40
Enterobactérias	Com	5,23	5,51	5,76
	Sem	5,40	5,10	5,10

TMRc: Silagem de dieta total sem núcleo mineral e monensina; TMRm: Silagem de dieta total com adição de núcleo mineral e sem monensina; TMRmo: Silagem de dieta total com adição de núcleo mineral e monensina; ²: g/kg Matéria natural; MS: matéria seca; FDNcp: fibra insolúvel em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; NIDA: nitrogênio insolúvel em detergente ácido; CHOs: Carboidratos solúveis em água (g/kg MS); BAL: Bactérias ácido láticas. ¹: Composição do núcleo mineral (% MS): 44,242% Calcário, 16,364% fosfato bicálcico, 18,788% sal comum, 18,788% flor de enxofre, 1,212 sulfato de zinco, 0,242% sulfato de manganês, 0,121% sulfato de cobre, 0,022% sulfato de cobalto, 0,008% iodato de potássio e 0,008% selenito de sódio. A inclusão de monensina nas dietas foi feita tomando como base a inclusão da mesma em produtos comerciais (0,015% na MS).

4.2. Perfil fermentativo

Foi observado efeito da interação inoculante x tipo de suplemento mineral $I \times S$ ($P < 0,05$) sobre os teores de CHOs e AL, em que a TMRmo apresentou os maiores valores de CHOs, com ou sem inoculante (Figura 1a), enquanto que a TMRc e a TMRm com inoculante apresentaram maiores conteúdos de AL comparados a TMRmo (Figura 1b.).

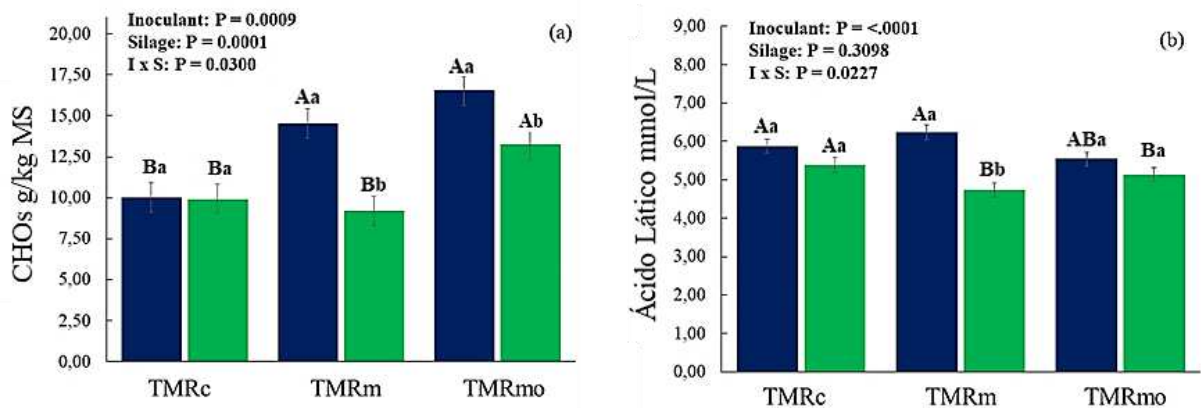


Figura 1. Efeito da interação $I \times S$ sobre o conteúdo de carboidratos solúveis em água (CHOs) (a); e de ácido láctico (b); ; barras azuis: sem inoculante; barras verdes: com inoculante (*L. buchneri*); letras maiúsculas: efeito para o tipo de silagem (S); letras minúsculas: efeito para o tipo de inoculante (I); DM: matéria seca; TMRc: Silagem de dieta total sem núcleo mineral e monensina; TMRm: Silagem de dieta total com adição de núcleo mineral e sem monensina; TMRmo: Silagem de dieta total com adição de núcleo mineral e monensina. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não foi observado efeito da interação $I \times S$ sobre as variáveis mostradas na Tabela 3. Contudo, observou-se efeito de I e de S, sobre as populações de BAL e FUN, enquanto que as concentrações de ácido acético e amônia foram afetadas apenas por inoculante (Tabela 3), registrando-se, respectivamente, maior e menor valor na silagem inoculada. Por outro lado, a população de leveduras e o pH das silagens foram afetados apenas pelo tipo de mineral adicionado às TMRs. Não foram observados efeitos de interação $I \times S$, nem dos fatores individuais sobre as concentrações de AB e etanol, cujos valores médios foram 0,4 e 15,5 g/kg MS, respectivamente (Tabela 3). Comportamento semelhante foi observado para as variáveis avaliadas na estabilidade aeróbia das silagens, que não foram afetadas por nenhum dos fatores estudados (Tabela 3).

Tabela 3. Perfil fermentativo, populações microbianas e estabilidade aeróbia de silagens de TMR com e sem monensina e inoculante microbiano.

Item	Inoculante		Silagem			EP	P-valor ⁴		
	NI	I	TMRc	TMRm	TMRmo		I	S	I×S
BAL ¹	7,39	7,52	7,31b	7,56a	7,49ab	0,039	0,0303	0,0076	0,0634
FUN ¹	4,10	4,62	4,59 ^a	4,55a	3,94b	0,133	0,0260	0,0382	0,2746
LEV ¹	4,12	4,16	4,64 ^a	4,20ab	3,58b	0,162	0,8588	0,0062	0,1650
N-NH ₃ ²	12,23	10,56	11,44	11,15	11,59	0,317	0,0123	0,8406	0,9754
pH	4,47	4,40	4,36b	4,49a	4,47a	0,020	0,0531	0,0112	0,9288
AAc ³	10,4	14,3	12,0	11,9	13,2	0,585	0,0002	0,3564	0,2423
ET ³	13,6	17,4	15,4	16,5	14,6	1,703	0,0876	0,6287	0,5231
AB ³	0,5	0,4	0,5	0,3	0,4	0,063	0,0996	0,7922	0,6802
Estabilidade aeróbia									
EA (h)	240	240	240	240	240	-	-	-	-
pH est	4,53	4,36	4,45	4,45	4,44	0,050	0,1385	0,9962	0,5290
Lev est ¹	5,76	5,06	5,84	5,8	4,59	0,285	0,1586	0,0788	0,0712
FUN est ¹	3,39	4,29	3,60	4,27	3,64	0,241	0,1064	0,4692	0,1075

¹: log ufc/g forragem; ²:g/kg nitrogênio total; ³: g/kg de matéria seca; P-valor: Probabilidade de efeitos para inoculante (I), silagem (S) e interação I com S (I × S); NI: sem inoculante; I: com inoculante; EPM: erro padrão da média TMRc: Silagem de dieta total sem núcleo mineral e monensina; TMRm: Silagem de dieta total com adição de núcleo mineral e sem monensina; TMRmo: Silagem de dieta total com adição de núcleo mineral e monensina, BAL: bactérias do ácido láctico; FUN: fungos filamentosos; LEV: leveduras; N-NH₃/N total: nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total; AAc: ácido acético; ET: Etanol; AB: Ácido butírico; pH est: potencial hidrogeniônico na estabilidade aeróbia; Lev est: Leveduras na estabilidade aeróbia; FUN est: Fungos filamentosos na estabilidade aeróbia.

4.3. Composição química

Na Tabela 4 são mostradas a composição química e as digestibilidades *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIFDN) das silagens. Os conteúdos de MS, PB, PBS, EE e NIDA não foram afetadas pelos fatores em estudo, apresentando valores médios de 605,84; 143,23; 86,15, 50,37 e 4,43 g/kg MS, respectivamente (Tabela 4).

Observou-se efeito de silagem sobre os conteúdos de MM, DIVMS e DIVFDN, bem como de inoculante sobre a FDN e DIFDN. As silagens TMRm e TMRmo apresentaram maiores teores de MM do que a controle, sem diferirem entre si (Tabela 4).

As silagens inoculadas apresentaram maior conteúdo de FDN (P=0,0307) e DIVFDN (<,0001) (Tabela 4). As silagens TMRm e TMRmo, apresentaram menores valores de DIVMS e DIVFDN quando comparadas a silagem TMRc (Tabela 4).

Tabela 4. Composição química de silagens de TMR com e sem monensina e inoculante microbiano.

Item ¹	Inoculante		Silagem			EPM	P-valor ⁴		
	NI	I	TMRc	TMRm	TMRmo		I	S	I×S
MS ²	604,27	607,47	604,08	601,14	612,33	0,586	0,6661	0,4363	0,510
MM	33,27	34,14	28,51b	37,03a	35,58a	0,083	0,1906	<,0001	0,3256
PB	140,94	145,53	143,62	145,51	140,58	0,134	0,0946	0,2926	0,2652
PBS ³	84,24	88,05	86,00	89,53	82,91	0,118	0,0962	0,0740	0,4874
EE	50,21	50,53	49,13	49,67	51,72	0,108	0,5000	0,1106	0,0547
FDNcp	161,58	178,73	173,45	177,24	159,78	0,430	0,0307	0,1303	0,1041
NIDA	4,62	4,23	4,33	3,94	5,01	0,021	0,2792	0,0601	0,7841
DIVMS	899,40	894,71	904,84a	892,65b	893,69b	2,928	0,1952	0,0223	0,7516
DIVFDN	603,69	664,62	668,45a	618,75b	615,28b	6,811	<,0001	0,0004	0,0704

¹: g/kg MS; ²: g/kg MN ³: g/kg PB; P-valor: Probabilidade de efeitos para inoculante (I), silagem (S) e interação I com S (I × S); NI: sem inoculante; I: com inoculante; EPM: Erro padrão da média TMRc: Silagem de dieta total sem núcleo mineral e monensina; TMRm: Silagem de dieta total com adição de núcleo mineral e sem monensina; TMRmo: Silagem de dieta total com adição de núcleo mineral e monensina; MS: matéria seca; MM: matéria mineral; PB: Proteína bruta; PBS: proteína solúvel; FDNcp: Fibra insolúvel em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; NIDA: Nitrogênio insolúvel em detergente ácido; DIVMS: Digestibilidade *in vitro* da matéria seca; DIVFDN: Digestibilidade *in vitro* da fibra insolúvel em detergente neutro.

5. DISCUSSÃO

5.1. Perfil fermentativo

A acidificação do material ensilado é essencial para preservar o material dentro do silo e inibir a atuação de microrganismos indesejáveis. Para tanto, é fundamental que as BAL dominem o processo fermentativo, produzindo principalmente ácido láctico, pela utilização dos CHOs como substrato, o que resultará na redução do pH e preservação do material em meio ácido e anaeróbio (McDonald *et al.*, 1991; Restelatto *et al.*, 2019)).

O conteúdo médio de CHOs nas TMR antes da ensilagem, de 60,8 g/kg MS, pode ser considerado adequado para que haja o crescimento de microrganismos favoráveis e assim promover o sucesso no processo fermentativo (Wang *et al.*, 2023). Os menores teores de CHOs residuais observados nas silagens TMRm e TMRmo, na presença de inoculante pode ser resultante do maior consumo de CHOs durante a fermentação, devido ao aumento da população de BAL nessas silagens inoculadas.

A eficácia do uso de BAL como inoculante depende da habilidade das bactérias inoculadas de crescerem rapidamente na massa ensilada, da presença de substratos adequados, da proporção da população de bactérias inoculadas em relação à população epífita presente na forragem, como também fatores que possam suprimir o desenvolvimento das mesmas (McDonald *et al.*, 1991; Xie *et al.*, 2022). Nesse contexto, a inclusão de monensina poderia afetar o desenvolvimento das BAL devido a sua ação inibitória em bactérias Gram-positivas (Gadberry *et al.*, 2022), fato este não verificado em nosso estudo, uma vez que silagens contendo 0,015% monensina na base da MS (TMRmo) apresentaram populações de BAL semelhante às demais TMRs, sem monensina.

Outro fator que poderia influenciar na qualidade de silagens está relacionado ao conteúdo de MS do material original, pois valores elevados como os 605,8 g/kg MS, observados em nosso estudo, podem inibir o crescimento e metabolismo das BAL o que pode reduzir a quantidade de ácidos orgânicos produzidos durante a ensilagem (Buenno *et al.*, 2020). No entanto, a população de BAL observada no nosso estudo foi semelhante à média (7,78 log UFC/g) observada por Wang *et al.* (2023) e superior aos 6,6 log UFC/g observados por Restelatto *et al.* (2019), para silagens de TMR inoculadas com diferentes aditivos microbianos.

O aumento da população de BAL na massa ensilada está diretamente relacionado com a concentração de ácidos orgânicos encontrado nessas silagens (Muck *et al.*, 2018). Os ácidos orgânicos são resultantes do metabolismo das BAL e indicam a natureza do processo de fermentação em silagens (Muck *et al.*, 2018; Restelatto *et al.*, 2019), sendo o ácido láctico o que promove a rápida redução do pH, inibindo fermentações indesejáveis e diminuindo as perdas de nutrientes na ensilagem. O conteúdo de AL variou de 47,3 a 62,3 g/kg MS e encontra-se dentro da faixa de 37,0 a 97,2 g/kg MS, reportada na literatura para silagens de TMR (Restelatto *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2023) .

A redução das concentrações de AL nas silagens inoculadas é resultante do metabolismo do *L. buchneri* que utiliza AL e CHO produzindo, principalmente ácido acético (Oude Elferink *et al.*, 2001). Isso explica o aumento de ácido acético observado em nosso estudo quando o inoculante foi utilizado. O aumento das concentrações de ácido acético são desejáveis afim de obter ganhos em estabilidade aeróbia devido a sua ação inibitória contra microrganismos indesejáveis. As concentrações de ácido acético observadas em nosso estudo corroboram com as observadas na literatura quando silagens de TMR são inoculadas com *L. buchneri* (Xie *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2023).

O pH da silagem embora seja um importante indicador da qualidade da fermentação da massa ensilada, não deve ser interpretado de forma isolada, uma vez que é influenciado pelas concentrações de ácidos orgânicos produzidos pelas BAL, sendo o AL o mais eficaz na redução deste durante a fermentação (Kung *et al.*, 2018). Além disso, outros fatores como teor de MS, capacidade tampão, teor de CHOs, bem como os ingredientes que compõem a TMR e o período de ensilagem, também podem afetar o pH (Bueno *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2023).

Para silagens de TMR com alto teor de MS (maior que 40%), o pH normal pode variar de 4,0 a 5,0 (Chen *et al.*, 2015). A presença de ingredientes como calcário, fosfato bicálcico, sal comum, flor de enxofre, sulfato de zinco, sulfato de manganês, sulfato de cobre, sulfato de cobalto, iodato de potássio e selenito de sódio, podem aumentar o poder tampão, dificultando assim a queda do pH das silagens (Tian *et al.*, 2020). Contudo, tal fato não se verificou em nosso estudo, cujos valores de pH que variaram de 4,36 (TMRc) a 4,49 (TMRm) estão dentro da faixa indicadora de adequado processo fermentativo (Kung *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2023).

A quantificação da população microbiana em silagens é importante para identificar se ocorreram atividades microbianas indesejáveis (Muck *et al.*, 2018). Leveduras, enterobactérias e fungos filamentosos prejudicam a fermentação da silagem por meio da degradação de açúcares e ácidos orgânicos. A ação desses microrganismos resulta no aumento das perdas de

MS e produção de micotoxinas, as quais podem ser nocivas para a saúde animal e humana (Ávila e Carvalho, 2020; Kalúzová *et al.*, 2022). A inclusão de monensina na dieta de ruminantes pode inibir a população de fungos no rúmen por meio da desestabilização do equilíbrio interno desses microrganismos (Newbold *et al.*, 1986; Elliott *et al.*, 1987; McGuffey *et al.*, 2001). Da mesma forma, acredita-se que a população desses microrganismos foi afetada dentro do silo, resultando na redução de suas populações. A população de leveduras em todos os tratamentos apresentou-se abaixo de 5 log UFC/g, preconizado para obtenção de maior estabilidade aeróbia (Pahlow *et al.*, 2003). Por outro lado, a população de fungos filamentosos se mostrou superior a 2,0 log UFC/g, o que pode indicar perda de estabilidade aeróbia da silagem (Borreani *et al.*, 2018). Em contrapartida, a ausência de enterobactérias no nosso estudo é considerada benéfica para o processo fermentativo (Weiss *et al.*, 2016). Isto provavelmente se deve ao fato deste grupo microbiano ser sensível a pH abaixo de 4,5 (Kung *et al.*, 2018).

A menor concentração de N-NH₃ na silagem inoculada (105,6 g/kg NT), comparada aquela não inoculada (122,3 g/kg NT), provavelmente se deve a redução no pH dessas silagens, inibindo a proteólise por microrganismos indesejáveis. No entanto, os valores de N-NH₃ observados estão um pouco acima do preconizado (<100 g/kg MS) para silagens de TMR sem adição de ureia (Liu *et al.*, 2016b). Isto, provavelmente se deve a inclusão de 16,00 g/kg MS de ureia nas silagens do nosso estudo, pois durante o processo fermentativo a ureia pode ser hidrolisada pela ação da enzima urease, resultando no aumento do N-NH₃ (Lazzari *et al.*, 2021).

A presença de ácido butírico na silagem é indesejável, pois sua formação implica em desperdício de energia metabólica (Dong *et al.*, 2021). Concentrações de ácido butírico acima de 5 g/kg de matéria seca indicam considerável atividade clostridial (McDonald *et al.*, 1991). Contudo, em nosso estudo, todas as silagens avaliadas apresentaram concentrações deste ácido inferiores a este valor, sugerindo uma fermentação satisfatória. Silagens com presença de clostrídios tendem a apresentar elevadas concentrações de fibras de baixa digestibilidade devido a degradação de grande parte dos nutrientes solúveis (McDonald *et al.*, 1991). Além disso, essas silagens podem conter altos níveis de aminas biogênicas (putrescina, cadaverina, tiramina e histamina) o que pode resultar em redução da ingestão de alimentos e problemas de saúde (McDonald *et al.*, 1991).

A transformação de CHOs em etanol pode resultar em perdas significativas de MS (McDonald *et al.*, 1991). No entanto, quando o etanol é consumido por ruminantes, o mesmo pode ser absorvido ou metabolizado por microrganismos ruminais como fonte de energia (Restelatto *et al.*, 2019). Culturas com alto teor de matéria seca e alto teor de açúcar às vezes

produzem silagens mais alcoólicas (Wang *et al.*, 2019). Conseqüentemente, a silagem de TMR pode ser mais propensa à fermentação alcoólica do que a silagem convencional (Restelatto *et al.*, 2019). Para silagens com elevado teor de matéria seca, valores de etanol abaixo de 30,0 g/kg de MS são considerados satisfatórios, indicando que não houve elevada proliferação de leveduras no material ensilado (Kung *et al.*, 2018). Portanto, considerando o conteúdo médio de etanol de 15,5 g/kg MS observado no nosso estudo, podemos inferir que a fermentação alcoólica foi adequada.

A estabilidade aeróbia alta é esperada em silagens que possuem baixo teor residual de CHOs e alto teor de MS (Pahlow *et al.*, 2015). No geral, silagens de TMR apresentam elevada estabilidade aeróbia mesmo sem a presença de inoculantes (Restelatto *et al.*, 2019). Os valores de pH reduzido e as concentrações de ácido acético observadas podem ter contribuído para inibir o desenvolvimento de microrganismos deterioradores resultando em silagem de alta EA (240 horas).

5.2. Composição química e digestibilidade *in vitro*

O aumento na concentração de FDN_{cp} nas silagens inoculadas pode ser atribuído ao maior consumo de CHOs pelos microrganismos durante o processo de fermentação das silagens, pois o decréscimo de CHOs favorece o aumento proporcional nos constituintes da fração fibrosa na silagem (Pedroso *et al.*, 2008; Diepersloot *et al.*, 2022).

A digestibilidade tornou-se amplamente aceita na avaliação do valor nutricional e do consumo de alimentos por ruminantes (Zhao *et al.*, 2020; Xie *et al.*, 2022). Em nosso estudo, a redução de aproximadamente 8% na DIVMS das silagens TMR_m e TMR_{mo}, quando comparadas com a TMR_c, pode ser resultante da inclusão de núcleo mineral nesses tratamentos, pois a inclusão de misturas minerais pode influenciar de forma negativa a DIVMS por meio da diminuição da digestão da fibra e de outros nutrientes, conforme sugerem Bonhomme *et al.* (1979) e Genter e Hansen (2015), o que pode explicar a redução na DIVFDN das silagens TMR_m e TMR_{mo}, quando comparadas a TMR_c.

O aumento na digestibilidade da fibra em silagens inoculadas com o *L. buchneri* possivelmente pode estar relacionada com a síntese da enzima ferulato esterase por esses microrganismos (Kang *et al.*, 2009), fato este que provavelmente pode explicar a maior DIVFDN observada na silagem inoculada no nosso estudo. Esta enzima quebra a ligação do ácido ferúlico na parede celular, o que pode aumentar a digestão das fibras ou tornar a parede celular mais suscetível a hidrólise celulolítica (Kang *et al.*, 2009).

A ausência de efeito dos fatores analisados sobre os conteúdos de MS, PB, PS e NIDA indica que a ensilagem na forma de TMR contribui para a preservação do valor nutricional dos alimentos, sem comprometer a qualidade nutricional das dietas, se configurando como uma alternativa promissora de conservar dietas devidamente formuladas na forma de silagem para bovinos de corte confinados.

Por fim, a monensina se mostrou eficaz no controle de fungos filamentosos no material ensilado, o que pode contribuir para a redução das perdas nas silagens. Além disso, sua inclusão não comprometeu o perfil fermentativo e o valor nutricional das silagens. Observamos que as silagens que não foram tratadas com inoculantes microbianos a base de *L. buchneri* apresentaram comportamento semelhante as silagens inoculadas. Desta forma, com base nos achados nesse estudo podemos salientar que a monensina poderia ser utilizada juntamente com os demais constituintes da dieta, na forma de silagem, sem afetar a ação do inoculante microbiano.

6. CONCLUSÕES

A utilização de núcleo mineral com inclusão de monensina não afeta o processo fermentativo de silagens de TMR, contribuindo para a redução da população de fungos filamentosos e leveduras nas silagens. O inoculante a base de *L. buchneri* avaliado proporciona menor concentração de amônia e favoreceu a DIVFDN. Desta forma, a ensilagem da TMR, pode ser realizada com a inclusão de monensina na dieta, associada a presença de inoculante microbiano a base de *L. buchneri*.

7. REFERÊNCIAS

- AGARUSSI, M. C. N.; PEREIRA, O. G.; PIMENTEL, F. E.; AZEVEDO, C. F.; DA SILVA, V. P.; E SILVA, F. F. Microbiome of rehydrated corn and sorghum grain silages treated with microbial inoculants in different fermentation periods. **Scientific Reports**, [s. l.], vol. 12, nº 1, p. 1–17, 2022. DOI 10.1038/s41598-022-21461-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21461-4>.
- AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. 1º ed. Arlington, Virginia, USA: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, INC, 1990. <https://doi.org/10.7312/seir17116-004>.
- ÁVILA, C. L. S.; CARVALHO, B. F. Silage fermentation—updates focusing on the performance of micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], vol. 128, nº 4, p. 966–984, 1 abr. 2020. <https://doi.org/10.1111/jam.14450>.
- BONHOMME, A.; DURAND, M.; DUMAY, C.; BEAUMATIN, P. **Etude in vitro du comportement des populations microbiennes du rumen en présence de zinc sous forme de sulfate**. [S. l.: s. n.], 1979.
- BORREANI, G.; TABACCO, E.; SCHMIDT, R. J.; HOLMES, B. J.; MUCK, R. E. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 101, nº 5, p. 3952–3979, maio 2018. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>.
- BUENO, A. V. I.; LAZZARI, G.; JOBIM, C. C.; DANIEL, J. L. P. Ensiling total mixed ration for ruminants: A review. **Agronomy**, [s. l.], vol. 10, nº 6, 2020. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060879>.
- CASTRO, M. M. D.; CARDOSO, M. A.; DETMANN, E.; FONSECA, M. A.; SAMPAIO, C. B.; MARCONDES, M. I. In vitro ruminal fermentation and enteric methane production of tropical forage added nitrogen or nitrogen plus starch. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], vol. 275, p. 114878, maio 2021. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114878>.
- CHEN, L.; GUO, G.; YU, C.; ZHANG, J.; SHIMOJO, M.; SHAO, T. The effects of replacement of whole-plant corn with oat and common vetch on the fermentation quality, chemical composition and aerobic stability of total mixed ration silage in Tibet. **Animal Science Journal**, [s. l.], vol. 86, nº 1, p. 69–76, 1 jan. 2015. <https://doi.org/10.1111/asj.12245>.
- CLIMATE-DATA.ORG. **Clima: Viçosa**. Disponível em: < <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/minas-gerais/vicosa-25021/> > Acessado em: 12 de fevereiro de 2025.
- DETMANN, E.; COSTA E SILVA, L. F.; ROCHA, G. C.; PALMA, M. N. N.; RODRIGUES, J. P. P. Métodos para análise de alimentos. **Editora: Produção Independente**, [s. l.], vol. 2º Edição, p. 350 p, 2021.
- DIEPERSLOOT, E. C.; HEINZEN, C.; SAYLOR, B. A.; FERRARETTO, L. F. Effect of cutting height, microbial inoculation, and storage length on fermentation profile and nutrient composition of whole-plant corn silage. **Translational Animal Science**, [s. l.], vol. 6, nº 2, 1 abr. 2022. <https://doi.org/10.1093/tas/txac037>.

- DONG, Z.; WANG, S.; ZHAO, J.; LI, J.; LIU, Q.; BAO, Y.; SHAO, T. Evaluating fermentation quality, in vitro digestibility and aerobic stability of a total mixed ration ensiled with different additives on Tibet plateau. **Animal Bioscience**, [s. l.], vol. 34, n° 2, p. 223–232, 1 fev. 2021. <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0972>.
- ELLIOTT, R.; ASH, A. J.; CALDERON-CORTES, F.; NORTON, B. W.; BAUCHOP, T. **The influence of anaerobic fungi on rumen volatile fatty acid concentrations in vivo**. [S. l.: s. n.], 1987.
- GADBERRY, S.; LALMAN, D.; WHITE, F.; LINNEEN, S.; BECK, P. Meta-analysis of the effects of monensin on growth and bloat of cattle on pasture. **Translational Animal Science**, [s. l.], vol. 6, n° 2, 1 abr. 2022. <https://doi.org/10.1093/tas/txac031>.
- GENTHER, O. N.; HANSEN, S. L. The effect of trace mineral source and concentration on ruminal digestion and mineral solubility. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 98, n° 1, p. 566–573, 1 jan. 2015. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8624>.
- GUO, X.; GUO, W.; YANG, M.; SUN, Y.; WANG, Y.; YAN, Y.; ZHU, B., 2022. Effect of Bacillus Additives on Fermentation Quality and Bacterial Community during the Ensiling Process of Whole-Plant Corn Silage. **Processes** 10, 978. <https://doi.org/10.3390/pr10050978>
- HAO, W.; TIAN, P.; ZHENG, M.; WANG, H.; XU, C. Characteristics of proteolytic microorganisms and their effects on proteolysis in total mixed ration silages of soybean curd residue. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, [s. l.], vol. 33, n° 1, p. 100–110, 1 jan. 2020. DOI 10.5713/ajas.18.0933. Disponível em: <http://ajas.info/journal/view.php?doi=10.5713/ajas.18.0933>.
- HOON, J.H.; MEESKE, R. The effect of the inclusion of an ionophore as a silage additive on maize silage characteristics. **Grootfontein Agriculture**, [s. l.], vol. 11, n° 75, 2011. .
- KALÚZOVÁ, M.; KAČÁNIOVÁ, M.; BÍRO, D.; ŠIMKO, M.; GÁLIK, B.; ROLINEC, M.; HANUŠOVSKÝ, O.; FELŠÖCIOVÁ, S.; JURÁČEK, M. The Change in Microbial Diversity and Mycotoxins Concentration in Corn Silage after Addition of Silage Additives. **Diversity**, [s. l.], vol. 14, n° 8, p. 592, 23 jul. 2022. DOI 10.3390/d14080592. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-2818/14/8/592>.
- KANG, T. W.; ADESOGAN, A. T.; KIM, S. C.; LEE, S. S. Effects of an esterase-producing inoculant on fermentation, aerobic stability, and neutral detergent fiber digestibility of corn silage. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 92, n° 2, p. 732–738, 2009. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0780>.
- KUNG, L.; TAYLOR, C. C.; LYNCH, M. P.; NEYLON, J. M. The Effect of Treating Alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on Silage Fermentation, Aerobic Stability, and Nutritive Value for Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 86, n° 1, p. 336–343, jan. 2003. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73611-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73611-X).
- KUNG, L.; SHAVER, R. D.; GRANT, R. J.; SCHMIDT, R. J. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 101, n° 5, p. 4020–4033, 1 maio 2018. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>.

- LAZZARI, G. **Efeitos da fonte de proteína e suplementação lipídica sobre o desempenho de bovinos em terminação alimentados com silagens de ração total misturada**. 2020. 101 f. Dissertação – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2020.
- LAZZARI, G.; POPPI, A. C. O.; MACHADO, J.; BUENO, A. V. I.; GOMES, A. L. M.; JOBIM, C. C.; DANIEL, J. L. P. Effects of protein source and lipid supplementation on conservation and feed value of total mixed ration silages for finishing beef cattle. **Journal of Animal Science**, [s. l.], vol. 99, nº 2, 1 fev. 2021. DOI 10.1093/jas/skab032. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article/doi/10.1093/jas/skab032/6126771>.
- LI, X.; CHENG, Y.; YANG, F.; HU, J.; MA, R.; LIU, H.; SHAO, T. Improving Total Mixed Ration Silage: Effects of Lactic Acid Bacteria Inoculants and Antimicrobial Additives on Fermentation Quality and Aerobic Stability. **Agronomy**, [s. l.], vol. 14, nº 8, p. 1602, 23 jul. 2024. <https://doi.org/10.3390/agronomy14081602>.
- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], vol. 57, nº 4, p. 347–358, mar. 1996. DOI 10.1016/0377-8401(95)00837-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0377840195008373>.
- LIU, Q.; LI, X.; DESTA, S. T.; ZHANG, J.; SHAO, T. Effects of *Lactobacillus plantarum* and fibrolytic enzyme on the fermentation quality and in vitro digestibility of total mixed rations silage including rape straw. **Journal of Integrative Agriculture**, [s. l.], vol. 15, nº 9, p. 2087–2096, set. 2016. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61233-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61233-3).
- MACHADO, M. G.; DETMANN, E.; MANTOVANI, H. C.; VALADARES FILHO, S. C.; BENTO, C. B. P.; MARCONDES, M. I.; ASSUNÇÃO, A. S. Evaluation of the length of adaptation period for changeover and crossover nutritional experiments with cattle fed tropical forage-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], vol. 222, p. 132–148, dez. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.10.009>.
- MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The Biochemistry of Silage**. 2^o ed. Marlow: Chalcombe Publications, 1991.
- MCDOUGALL, E. I. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. **The Biochemical journal**, [s. l.], vol. 43, nº 1, p. 99–109, 1948. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16748377>.
- MCGUFFEY, R. K.; RICHARDSON, L. F.; WILKINSON, J. I. D. Ionophores for Dairy Cattle: Current Status and Future Outlook. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 84, p. E194–E203, jun. 2001. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(01\)70218-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(01)70218-4).
- MUCK, R. Inoculation of silage and its effects on silage quality. set. 1996. **Proceedings of the Informational Conference on Dairy and Forage Industry** [...]. Madison, WI.: Dairy Research Centre, set. 1996. p. 43–51.
- MUCK, R. E.; NADEAU, E. M. G.; MCALLISTER, T. A.; CONTRERAS-GOVEA, F. E.; SANTOS, M. C.; KUNG, L. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 101, nº 5, p. 3980–4000, maio 2018. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>.

- NELSON, N. A PHOTOMETRIC ADAPTATION OF THE SOMOGYI METHOD FOR THE DETERMINATION OF GLUCOSE. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], vol. 153, n° 2, p. 375–380, maio 1944. DOI 10.1016/S0021-9258(18)71980-7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818719807>.
- NEWBOLD, C. J.; CHAMBERLAIN, D. G.; WILLIAMS, A. G. **The Effects of Defaunation on the Metabolism of Lactic Acid in the Rumen**. [S. l.: s. n.], 1986.
- OKUDA, H.; FUJII, S.; KAWASHIMA, Y. A direct colorimetric determination of blood ammonia. **Tokushima Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], vol. 12, p. 11–23, 1965. .
- OLIVEIRA, C. A.; MILLEN, D. D. Survey of the nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists in Brazil. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], vol. 197, p. 64–75, 2014. DOI 10.1016/j.anifeedsci.2014.08.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.08.010>.
- OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; KROONEMAN, E. J.; GOTTSCHAL, J. C.; SPOELSTRA, S. F.; FABER, F.; DRIEHUIS, F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], vol. 67, n° 1, p. 125–132, 2001. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-132.2001>.
- OVCHINNIKOV, Y. A. Physico-chemical Basis of Ion Transport through Biological Membranes: Ionophores and Ion Channels. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], vol. 94, n° 2, p. 321–336, 28 mar. 1979. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb12898.x>.
- PAHLOW, G.; MUCK, R. E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; SPOELSTRA, S. F. Microbiology of ensiling. *In*: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (orgs.). **Silage Science and Technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 31–93.
- PAHLOW, Günter; MUCK, R. E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; SPOELSTRA, S. F. Microbiology of ensiling. **Silage Science and Technology**. [S. l.]: wiley, 2015. p. 31–93. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c2>.
- PEDROSO, A. F.; NUSSIO, L. G.; LOURES, D. R. S.; PAZIANI, S. F.; RIBEIRO, J. L.; MARI, L. J.; ZOPOLLATTO, M.; SCHMIDT, P.; MATTOS, W. R. S.; HORII, J. Fermentation, losses, and aerobic stability of sugarcane silages treated with chemical or bacterial additives. **Scientia Agricola**, [s. l.], vol. 65, n° 6, p. 589–594, dez. 2008. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000600004>.
- RETELATTO, R.; NOVINSKI, C. O.; PEREIRA, L. M.; SILVA, E. P. A.; VOLPI, D.; ZOPOLLATTO, M.; SCHMIDT, P.; FACIOLA, A. P. Chemical composition, fermentative losses, and microbial counts of total mixed ration silages inoculated with different *Lactobacillus* species. **Journal of Animal Science**, [s. l.], vol. 97, n° 4, p. 1634–1644, 3 abr. 2019. DOI 10.1093/jas/skz030. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/advance-article-abstract/doi/10.1093/jas/skz030/5306102>.
- RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; VIANA, V. H. A. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais - 5a Aproximação**. Viçosa, MG: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999.

- ROMERO-PÉREZ, A.; OKINE, E. K.; GUAN, L. L.; DUVAL, S. M.; KINDERMANN, M.; BEAUCHEMIN, K. A. Rapid Communication: Evaluation of methane inhibitor 3-nitrooxypropanol and monensin in a high-grain diet using the rumen simulation technique (Rusitec)1,2. **Journal of Animal Science**, [s. l.], vol. 95, nº 9, p. 4072–4077, 1 set. 2017. <https://doi.org/10.2527/jas.2017.1896>.
- SAS INSTITUTE INC. **SAS**® 9.4. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc, 2010.
- SILVA, T. E.; DETMANN, E.; CAMACHO, L. F.; SALIBA, E. O. S.; PALMA, M. N. N.; VALADARES FILHO, S. C. Comparação de métodos in vitro para a quantificação da digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro de forragens e concentrados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], vol. 69, nº 6, p. 1635–1644, nov. 2017. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9096>.
- TIAN, P.; VYAS, D.; NIU, D.; ZUO, S.; JIANG, D.; XU, Ch. Effects of calcium carbonate on the fermentation quality and aerobic stability of total mixed ration silage. **Journal of Animal and Feed Sciences**, [s. l.], vol. 29, nº 2, p. 167–174, 30 jun. 2020. DOI 10.22358/jafs/124047/2020. Disponível em: <http://www.journalssystem.com/jafs/Effects-of-calcium-carbonate-on-the-fermentation-quality-and-aerobic-stability-of-124047,0,2.html>.
- TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A TWO-STAGE TECHNIQUE FOR THE *IN VITRO* DIGESTION OF FORAGE CROPS. **Grass and Forage Science**, [s. l.], vol. 18, nº 2, p. 104–111, 27 jun. 1963. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>.
- VALADARES FILHO, S. C.; SILVA, L. F. C.; GIONBELLI, M. P.; ROTTA, P. P.; MARCONDES, M. I.; CHIZZOTTI, M. L.; PRADOS, L. F. **Exigências Nutricionais de Zebuínos Puros e Cruzados - BR-CORTE**. Editora UF. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2016. vol. 3, . <https://doi.org/10.5935/978-85-8179-111-1.2016B001>.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 74, nº 10, p. 3583–3597, out. 1991. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
- WANG, C.; HE, L.; XING, Y.; ZHOU, W.; YANG, F.; CHEN, X.; ZHANG, Q. Fermentation quality and microbial community of alfalfa and stylo silage mixed with Moringa oleifera leaves. **Bioresource Technology**, [s. l.], vol. 284, p. 240–247, jul. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.129>.
- WANG, S.; ZHANG, G.; ZHAO, J.; DONG, Z.; LI, J.; SHAO, T. Fermentation quality, aerobic stability and in vitro gas production kinetics and digestibility in total mixed ration silage treated with lactic acid bacteria inoculants and antimicrobial additives. **Italian Journal of Animal Science**, [s. l.], vol. 22, nº 1, p. 429–440, 2023. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2023.2206422>.
- WEISS, C. P.; BECK, P. A.; GADBERRY, M. S.; RICHESON, J. T.; WILSON, B. K.; ROBINSON, C. A.; ZHAO, J.; HESS, T.; HUBBELL, D. Effects of intake of monensin during the stocker phase and subsequent finishing phase on performance and carcass characteristics of finishing beef steers. **Applied Animal Science**, [s. l.], vol. 36, nº 5, p. 668–676, out. 2020. <https://doi.org/10.15232/aas.2020-02031>.

WEISS, K.; KROSCHEWSKI, B.; AUERBACH, H. Effects of air exposure, temperature and additives on fermentation characteristics, yeast count, aerobic stability and volatile organic compounds in corn silage. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 99, n° 10, p. 8053–8069, out. 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10323>.

XIE, Y.; WANG, L.; LI, W.; XU, S.; BAO, J.; DENG, J.; WU, Z.; YU, Z. Fermentation Quality, In Vitro Digestibility, and Aerobic Stability of Total Mixed Ration Silage in Response to Varying Proportion Alfalfa Silage. **Animals**, [s. l.], vol. 12, n° 8, 1 abr. 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12081039>.

ZHAO, J.; DONG, Z.; CHEN, L.; WANG, S.; SHAO, T. The replacement of whole-plant corn with bamboo shoot shell on the fermentation quality, chemical composition, aerobic stability and in vitro digestibility of total mixed ration silage. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], vol. 259, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114348>.

CAPÍTULO 2: CONSUMO, DIGESTIBILIDADE E MICROBIOTA RUMINAL DE BOVINOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETA TOTAL ENSILADA OU NÃO, CONTENDO DUAS PROPORÇÕES DE VOLUMOSO:CONCENTRADO

Resumo

Avaliou-se o consumo, a digestibilidade e a microbiota ruminal de bovinos de corte, alimentados com TMR ensiladas ou não, contendo duas proporções de volumoso:concentrado. Foram usados quatro touros F1 nelore x angus canulados no rúmen (PC inicial de 300 ± 16 kg, e idade média de 14 ± 2 meses) distribuídos em um fatorial 2×2 , num quadrado latino 4×4 . Os tratamentos dietéticos consistiram da combinação de duas relações volumoso:concentrado (V:C; 20:80 e 80:20, na base da MS) e dois tipos de processamento, TMR ensilada (TMRs) ou não (TMRn). O experimento durou 80 dias, com 4 períodos de 20 dias, sendo 14 dias para adaptação dietética e seis dias de coleta de dados. A coleta total de fezes e urina foi realizada para estimar a ingestão e a digestibilidade de nutrientes e estimar o balanço de N. A coleta de digesta ruminal foi realizada para estimar os parâmetros ruminais e caracterizar as populações microbianas. A relação V:C influenciou ($P < 0,05$) o consumo dos animais. O consumo de fibra em detergente neutro, corrigida para cinzas e proteína (CFDNcp) foi menor ($P < 0,01$) para a dieta com maior proporção de concentrado 20:80. Enquanto que maiores ($P < 0,05$) consumos de amido (CAMido), carboidratos não fibrosos (CCNF) e nutrientes digestíveis totais (CNDT) foram observados para a mesma dieta (20:80). A digestibilidade do amido (DAmido) foi influenciada pela interação SxR ($P = 0,0016$). As digestibilidades da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), carboidratos não fibrosos (CNF) e matéria orgânica (MO) foram afetadas pela relação V:C, registrando-se maiores valores para a dieta 20:80. Foram observadas maiores populações de *Lachnospiraceae_NK3A20_group* e *Atopobium* para a relação V:C 20:80. Além disso, a relação 80:20 proporcionou maiores quantidades dos gêneros *Candidatus_Soleaferrea*, *Family_XIII_UCG_001*, *Pseudobutyrvibrio*, *Lactobacillus*, *Shuttleworthia*, *Fibrobacter*, *Butyrvibrio*, *Acetobacter*, *Lachnospiraceae_ACC2044_group*, *Lachnospiraceae_XPB1014_group*, *Candidatus_Saccharimonas*, *Saccharofermentans* e *Succiniclasticum*. A proporção de concentrado na dieta proporciona impacto positivo no consumo e na digestibilidade da maioria dos nutrientes, sem comprometer a fermentação ruminal. A abundância relativa dos táxons bacterianos a nível de gênero, na fase líquida e sólida, mostrou predominância de *Prevotella*, *Rikenellaceae_RC9_gut_group* e *Christensenellaceae_R7_group* para todos os tratamentos analisados.

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de criação de bovinos têm buscado a redução dos custos com alimentação ao longo dos anos, visando melhorias dos índices econômicos, expansão do uso de recursos forrageiros por meio de melhorias da tecnologia de armazenamento de forragem (Zhang *et al.*, 2021). Nesse sentido, a utilização de silagens de dietas totais (TMR) pode ser uma técnica de conservação que otimiza o manejo alimentar dos animais, uma vez que é realizada a ensilagem de uma mistura de forragens, alimentos proteicos e energéticos, minerais, vitaminas e aditivos, cujos componentes são balanceados para atender a demanda nutricional dos animais (Yuan *et al.*, 2015). Além disso, a ensilagem de TMR permite a utilização de subprodutos com alto teor de umidade, podendo aumentar a digestibilidade da proteína e do amido, bem como melhorar as características sensoriais de subprodutos de baixa aceitabilidade pelos ruminantes (Bueno *et al.*, 2020).

De maneira geral, as silagens de TMR apresentam condições adequadas para que haja um bom processo fermentativo (Jobim e Nussio, 2013). A preservação das silagens de TMR durante o armazenamento e alimentação está diretamente relacionada aos produtos finais gerados pela fermentação (Kung *et al.*, 2018; Bueno *et al.*, 2020). Assim como nas silagens exclusivas de forragens, as bactérias do ácido láctico (BAL) dominam a fermentação, sendo o ácido láctico o principal produto nas silagens de TMR (Bueno *et al.*, 2020). Entretanto, vários outros produtos podem ser produzidos durante a fermentação como álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas e ácidos graxos voláteis (Kung *et al.*, 2018), os quais são resultantes dos diferentes ingredientes da ração, do teor de MS, do tempo de armazenamento, da temperatura e da aplicação de aditivos (Chen *et al.*, 2014; Hao *et al.*, 2015).

Os benefícios da ensilagem de TMR também estão relacionados com o aumento da digestibilidade do amido, principalmente em cereais com elevado conteúdo de prolaminas em seu endosperma (grãos vítreos de milho e sorgo; Hoffman *et al.*, 2011; Der Bedrosian *et al.*, 2012; Junges *et al.*, 2017), pois durante o armazenamento, a concentração de prolaminas é reduzida, proporcionando aumento da disponibilidade do amido, o que tem sido associado a maior eficiência alimentar em animais consumindo silagens de TMR (Lazzari *et al.*, 2021).

Os produtos da fermentação da silagem podem afetar positivamente o metabolismo animal por meio das mudanças provocadas no ecossistema ruminal. Essas alterações podem estar relacionadas com o fornecimento de maiores quantidades nutrientes, ou mudanças do padrão de consumo dos animais devido as diferentes dietas fornecidas no período de confinamento (Bueno *et al.*, 2020).

Em função da complexidade do ambiente ruminal e da interação dos microrganismos existentes, a caracterização dos microrganismos pelos métodos convencionais é dificultada pois muitos deles não são cultiváveis em laboratórios (Morgavi *et al.*, 2013). Desta forma, as análises das populações microbianas usando técnicas independentes de cultivo surgem como alternativa para a caracterização da comunidade microbiana ruminal (Morgavi *et al.*, 2013; Kibegwa *et al.*, 2023). A partir da identificação das populações microbianas envolvidas nos processos fermentativos é possível avaliar quais são suas funções na degradação dos diferentes componentes da dieta, bem como os produtos de sua fermentação, permitindo a manipulação da composição das dietas para favorecer a saúde ruminal e, conseqüentemente melhorar o desempenho animal.

É reconhecido que a proporção de volumoso, a composição nutricional e o método de conservação da dieta são fatores que podem afetar a microbiota ruminal (Belanche *et al.*, 2012; Pitta *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021). Estudos demonstram que dietas de alto grão para bovinos reduzem a riqueza, homogeneidade e diversidade das bactérias presentes no trato digestivo de bovinos (Petri *et al.*, 2013; Plaizier *et al.*, 2017; Kibegwa *et al.*, 2023) alterando a composição da comunidade microbiana (Chen *et al.*, 2021).

Diante do exposto, entender as mudanças fisiológicas no ecossistema ruminal torna-se necessário para elucidar quais microrganismos estão envolvidos nos processos fermentativos e traçar estratégias para melhorar o desempenho produtivo de animais, que são desafiados durante o período de confinamento. Além disso, estudos avaliando o metabolismo e a microbiota ruminal de bovinos de corte alimentados com TMR ensilada ou não variando a proporção de concentrado são escassos na literatura. Desta forma, a hipótese deste trabalho é que dietas à base de silagens de TMR ensiladas ou não, contendo duas proporções de forragem afetam o consumo, a fermentação ruminal e as populações bacterianas ruminais de bovinos de corte.

Portanto, objetivou-se avaliar o consumo, a digestibilidade aparente dos nutrientes, o balanço de nitrogênio e a população bacteriana ruminal em bovinos de corte, alimentados com TMR ensilada ou não, contendo duas proporções de volumoso:concentrado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos relacionados aos cuidados dos animais durante a realização do experimento foram encaminhados previamente para a Comissão de Ética no Uso de Animais

de Produção (CEUAP) da Universidade Federal de Viçosa e aprovados sob o protocolo 40/2024.

2.1. Local do experimento

O experimento foi conduzido na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão (UEPE) em Nutrição e Produção de Ruminantes e no Laboratório de Microbiologia da Silagem do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG. O município está situado a 20°45' de latitude sul, 42°51' de longitude oeste e 648 m de altitude. O clima da região é caracterizado por verões quentes e úmidos e invernos frios e secos.

2.2. Ensilagem, dietas, animais e delineamento experimental

A cultura do milho foi usada como recurso forrageiro para a composição da TMR. O milho foi cultivado de maneira convencional no setor de Agrostologia do Departamento de Zootecnia, e foi adubado conforme as análises de solo e seguindo as recomendações da Embrapa Milho e Sorgo (Coelho *et al.*, 2010). A colheita foi realizada quando o grão atingiu aproximadamente 30% de matéria seca.

Posteriormente, o material foi reduzido em partículas de tamanho médio de 9 mm, usando máquina forrageira estacionária (JF-60, JF-Máquinas®, Itapira-SP, Brasil) devidamente regulada. Em seguida, foram formadas pilhas de 500 kg de material para mistura dos ingredientes da ração e, ou, aplicação do inoculante em todos os tratamentos. O inoculante LalSil AS (*Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323; Lallemand Animal Nutrition) foi ressuspendido em 50 mL de água destilada e aplicado com borrifadores manuais. Foi usada uma taxa de aplicação de 1×10^5 UFC (Unidades formadoras de colônias) para cada grama de forragem, seguindo as recomendações do fabricante. A mistura dos ingredientes que compuseram os tratamentos ensilados foi realizada de forma manual, por pessoal treinado, afim de obter material homogêneo objetivando minimizar possíveis problemas durante a fermentação. A ensilagem do material foi realizada em manilhas com capacidade de 500 kg. Após a compactação, cada manilha foi vedada com filme plástico de polietileno dupla face com 200 micras, envolta com arame de zinco 1,24 mm e coberta com 10 cm de areia para proteção do filme plástico.

Para a avaliação das dietas, foram utilizados quatro novilhos mestiços Nelore x Angus, não castrados, fistulados no rúmen, com peso corporal inicial médio (PCm) de 300 ± 16 kg, e

idade média de 14 ± 2 meses. Os animais foram previamente tratados com medicamentos contra ecto e endoparasitas e alojados em baias individuais cobertas, com piso cimentado, dispostas de comedouro e bebedouro. Os animais foram alimentados com quatro dietas diferentes, que consistiram nos tratamentos experimentais. Os mesmos foram previamente formulados usando duas proporções de volumoso: concentrado (V:C), com base na MS, e são descritos a seguir:

- Tratamento 1 – TMR não ensilada, contendo 80% de milho planta inteira e 20% de concentrado (TMRn 80:20);
- Tratamento 2 TMR não ensilada, contendo 20% de milho planta inteira e 80% de concentrado (TMRn 20:80);
- Tratamento 3 - Silagem de TMR composta de 80% de milho planta inteira e 20% de concentrado (TMRs 80:20)
- Tratamento 4 – Silagem de TMR com 20% de milho planta inteira e 80% de concentrado (TMRs 20:80).

Para a TMR não ensilada (TMRn) a silagem de milho foi misturada ao concentrado na proporção V:C de 80:20 e 20:80 no momento de fornecimento da dieta aos animais. Para a TMR ensilada, a mistura foi realizada no momento da ensilagem, como descrito previamente. O concentrado foi composto de farelo de milho, farelo de soja, ureia/sulfato de amônio (9:1) e núcleo mineral-vitamínico.

As dietas com relação V:C de 80: 20 foram formuladas com 12% de proteína bruta e 67% de NDT para atender ganho médio diário de 0,6 kg, conforme recomendado pelo BR-Corte 4.0® (Valadares Filho *et al.*, 2016). Outras duas dietas foram formuladas com relação V:C de 20:80, 12% de proteína bruta, 80% NDT para atender ganho médio diário de 1,2 kg, de acordo com o BR-Corte 4.0® (Valadares Filho *et al.*, 2016). As características químicas, bromatológicas, perfil fermentativo e caracterização microbiológicas das dietas experimentais estão apresentadas na Tabela 1.

Foi utilizado o esquema fatorial 2 x 2, com dois tipos de TMR (TMR não ensilada e silagem de TMR) e duas proporções de V:C (80:20 e 20:80), no delineamento em quadrado latino 4x4, com 4 dietas, 4 animais e 4 períodos experimentais. O período experimental foi composto por 80 dias, divididos em 4 períodos de 20 dias cada: 14 dias para adaptação dos animais às dietas e às condições experimentais, 5 dias de coleta total de urina e fezes, e 1 dia para coleta e medição do pH do líquido ruminal (Machado *et al.*, 2016).

Tabela 1. Proporção dos ingredientes, composição química, perfil fermentativo e caracterização microbiológica das dietas experimentais.

Item	Proporção dos ingredientes (%MS)			
	TMRn 80:20	TMRn 20:80	TMRs 80:20	TMRs 20:80
Silagem de milho	80,00	20,00	80,00	20,00
Farelo de milho	13,63	70,54	13,63	70,54
Farelo soja	2,46	5,54	2,46	5,54
Ureia/S.A.	0,91	0,91	0,91	0,91
Núcleo Mineral	3,00	3,00	3,00	3,00
Composição química (g/kg MS)				
MS (g/kg MN)	258,4	549,7	253,4	573,0
Matéria Mineral	73,5	61,8	65,0	48,1
Proteína Bruta	106,4	116,4	94,9	114,4
Extrato Etéreo	31,3	40,3	36,8	37,9
FDNcp	435,4	178,8	460,7	127,7
Amido	294,8	550,5	283,2	560,9
CNF	353,4	602,7	342,6	671,8
NDT	705,0	839,3	725,9	869,4
CSA	98,7	88,9	126,2	105,8
N-NH ₃ (g/kg N total)	149,6	152,5	172,6	142,5
pH	3,5	3,4	4,5	3,8
Ácido Lático ¹	56,4	46,9	70,3	84,1
Ácido Acético ¹	13,3	12,3	16,7	19,5
Ácido Butírico ¹	1,1	0,3	1,7	1,4
Etanol ¹	5,3	1,1	8,2	5,4
Ácido Propiônico ¹	0,8	1,6	3,3	8,3
1,2 Propanodiol ¹	0,4	0,1	0,5	1,1
Populações microbianas (log ufc/g forragem)				
BAL	7,11	7,13	7,40	7,46
Mofos	4,22	4,12	4,61	3,80
Leveduras	4,65	4,59	4,54	3,88

¹: g/kg MS, MS: matéria seca, MN: matéria natural, ureia/S.A.: ureia mais sulfato de amônio, FDNcp: fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína, CNF: carboidratos não fibrosos, NDT: nutrientes digestíveis totais, CSA: carboidratos solúveis em água, N: nitrogênio, BAL: bactérias do ácido lático, ufc: unidades formadoras de colônia. TMRn 80:20, ração em mistura total não ensilada 80:20; TMRn 20:80, ração em mistura total não ensilada 20:80; TMRs 80:20, silagem de ração em mistura total 80:20, TMRs 20:80, silagem de ração em mistura total 20:80

2.3. Fornecimento das dietas, mensuração do consumo, amostragem de ingredientes e sobras

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia (08h00 e 16h00). As dietas referentes aos tratamentos TMRn 80:20 e TMRn 20:80 foram previamente pesadas em balança digital (Balança digital 150 kg, RAZUMA) e misturadas no momento do fornecimento aos animais. As dietas dos tratamentos TMRn 80:20 e TMRn 20:80, por se tratar de silagem de TMR, foram pesadas e fornecidas diretamente aos animais. As dietas foram ofertadas *ad libitum* e calculadas

para a obtenção de 5% de sobras no cocho. Além disso, os animais tinham acesso livre à água limpa e fresca.

A mensuração do consumo dos animais foi quantificada pela diferença entre o alimento ofertado e as sobras. Os alimentos e as sobras foram amostrados diariamente do 14º até 20º dia de cada período experimental. Ao final do período de coleta, foi feita uma amostra composta de ofertado e sobras por animal e por período. Estas amostras foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar (55 °C) por 72 h e moídas em moinho de facas com peneira de 2 e 1 mm para posteriores análises.

2.4. Coleta total de urina e fezes

A coleta total de fezes e de urina foi realizada do 15º ao 19º dia de cada período experimental. As amostras de urina foram coletadas com o auxílio de funis coletores presos aos animais e acoplados a galões de polietileno com 20 litros de capacidade, contendo 200 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 20% (Hristov *et al.*, 2019). As fezes foram coletadas diretamente do piso de concreto e acondicionadas em baldes previamente pesados e com tampa. Os animais permaneceram em constante observação por pessoal treinados durante os 5 dias (120 horas) de coleta total. Ao final de 24 horas de coleta, os baldes contendo as fezes foram pesados, homogeneizados e uma amostra de aproximadamente 250 gramas foi acondicionada em bandeja de alumínio previamente pesada, para secagem em estufa com ventilação forçada a 55°C. Após o período de secagem, as amostras dos cinco dias de coleta foram moídas em moinho de facas a 2 e a 1 mm para a confecção de uma amostra composta por animal, por período. Os pesos e os volumes urinários foram mensurados com a utilização de proveta graduada após 24 h de coleta, e duas amostras proporcionais ao volume urinário foram retiradas: Uma amostra de urina concentrada e outra que foi diluída em ácido sulfúrico na concentração de 0,036N. Ao final de cada período experimental, amostras compostas de urina por animal, dentro de cada período foram preparadas para posteriores análises de nitrogênio total (amostras de urina concentrada), alantoína e ácido úrico (amostras de urina diluída) para aferição do balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana (Hristov *et al.*, 2019).

2.5. Coleta de líquido ruminal

A coleta de líquido ruminal foi realizada no 20º dia de cada período experimental, compreendendo os horários de 0, 2, 4 e 6 horas após alimentação dos animais. A digesta foi

coletada em diferentes pontos do rúmen, e retirada para separação das frações líquida e sólida. O pH foi mensurado utilizando-se potenciômetro digital (W38/Tecnal®, São Paulo-SP, Brasil) na fração líquida, imediatamente após a filtração (Deusch *et al.*, 2017). Além disso, amostras das frações líquidas em todos os períodos de tempos avaliados foram coletadas para avaliação de N-NH₃ (Okuda *et al.*, 1965) e de ácidos graxos voláteis Siegfried *et al.* (1984). No período de 6 horas, amostras das duas frações (líquida e sólida) foram retiradas e armazenadas em tubos falcon de 50 mL para congelamento à -80°C para posterior extração do DNA, e análise metataxonômica.

2.6. Extração e purificação de DNA do líquido ruminal para análise metataxonômica

O DNA genômico do líquido ruminal foi extraído das amostras compostas de cada animal, sendo separadas as fases líquida e sólida. A extração do DNA bacteriano foi realizada usando o Kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep (Zymo Research), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante, após a extração as amostras foram mantidas a -20°C até a realização das análises moleculares. As regiões hipervariáveis V3 e V4 do gene bacteriano que codifica o rRNA 16S foi amplificada usando os primers 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') e 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3'), (Ma *et al.*, 2021). Os amplicons bacterianos foram amplificados pela Illumina Novaseq 6000 platform (PE 250, 50-100 mil reads por amostra). O processo de extração e sequenciamento foi realizado pela empresa Neopropecta Microbiome Technologies® (Florianópolis-SC, Brasil).

As análises das sequências brutas foram realizadas utilizando o ambiente RStudio (v4.3.2 R Core Team 2023). As sequências foram pré-processadas para remoção de *primers* e *barcodes* usando o pacote Cutadapt (v1.15). As etapas de filtração, *trimming*, *denoising*, *dereplication*, identificação de quimeras e *merging* de *paired-ends* foram executadas utilizando o DADA2 (v1.30.0; Callahan *et al.*, 2016). Brevemente, as leituras foram truncadas em 240 pb de comprimento, por meio de aprendizado de máquina e as sequências de baixa qualidade foram removidas. As sequências *forward* e *reverse* foram mescladas, as quimeras foram removidas, e a atribuição taxonômica foi realizada utilizando o banco de dados SILVA (v132; Quast *et al.*, 2012), sendo que as Variantes de Sequências de Amplicons (ASVs) foram agrupadas por 99% de similaridade. Os táxons atribuídos como “*Mitochondria*” e “*Chloroplast*” foram removidos. As análises da comunidade bacteriana das amostras foram realizadas utilizando o pacote

Phyloseq 1.24.2 (McMurdie and Holmes, 2013) no RStudio. Em seguida, usando o servidor online do Microbiome Analyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>).

2.7. Análises químicas e cálculos

Amostras de ingredientes, dietas, fezes e sobras foram submetidas à secagem parcial em estufa de circulação forçada de ar (55 C) até peso constante. Posteriormente, as amostras foram moídas em moinho de facas (R-TE-650 / 1, Tecnal®, Piracicaba-SP, Brasil), com peneira de crivo de 1 mm, para análises da composição química.

As amostras foram analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS, método 934,01), matéria orgânica (MO, método 972,43), matéria mineral (MM, método 942,05), proteína bruta (PB = N x 6,25, método 984,13), extrato etéreo (EE, método 920,39) e acordo com a AOAC (1990). Foram estimados também, os tores de fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), utilizando-se α -amilase termoestável sem o uso de sulfito de sódio (Mertens, 2002), e amido (Silva *et al.*, 2019).

Os teores de CNF foram estimados conforme Detmann e Valadares Filho, (2010) pela fórmula:

$$100 - [(\%PB - \%PB_{ureia} + \%ureia) + \%FDNcp + \%EE + \%MM],$$

O cálculo do NDT foi realizado conforme proposto pelo *Nutrient Requirements of Beef Cattle* (NRC, 2016). Foram estimados os consumos de MS, MO, PB, FDNcp, EE, CNF, NDT e amido, bem como suas respectivas digestibilidades, exceto para NDT (Mertens e Grant, 2020).

No fluido ruminal, a concentração de N-NH₃ foi estimada conforme (Okuda *et al.*, 1965) e dos ácidos graxos voláteis (lático, acético, butírico e propiônico) de acordo com Siegfried *et al.* (1984), por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; spd-10 avp, Shimadzu®, Oregon, USA), com detector ultravioleta em 210 nm. A coluna utilizada foi HPX 87H (fase reserva), e utilizado o H₂SO₄ como fase móvel, com fluxo de 1,5 mL/ min, pressão da coluna de 168 kgf e volume injetado de 20µl (Siegfried *et al.*, 1984).

A urina foi analisada para estimar a concentração de nitrogênio (N) e os derivados de purina, como alantoína e ácido úrico (Chen e Gomes, 1992). Os derivados de purina (DP) e o volume total de urina foram empregados para estimar a absorção de purinas e a síntese de proteína microbiana no rúmen. A quantidade de derivados de purina foi calculada

multiplicando-se o volume total urinário pelas concentrações urinárias de alantoína e ácido úrico (Barbosa *et al.*, 2011).

As purinas absorvidas (PA) foram calculadas pela equação:

$$PA = \frac{[DP - (0,301 PC^{0,75})]}{0,80}$$

em que: DP= Derivados de purina; PCpeso corporal; $0,301 * PC^{0,75}$ = excreção endógena de DP; 0,80 = recuperação de purinas absorvidas.

A síntese de N microbiano (NMic) foi calculada pela equação:

$$NMic = \left[\frac{70 \times PA}{0,93 \times 100 \times 0,137} \right]$$

em que: 70 = concentração de nitrogênio nas purinas; 0,93 = digestibilidade das purinas; 0,137 = Taxa média de N-RNA pelo nitrogênio total para bactérias ruminais (Barbosa *et al.*, 2011).

O balanço de nitrogênio (BN) foi estimado pela diferença entre o nitrogênio total ingerido e nitrogênio total excretado nas fezes e urina (Hristov *et al.*, 2019)

3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade e homogeneidade. Os dados da avaliação microbiológica foram transformados para a base logarítmica (Log UFC). O experimento foi realizado em delineamento em quadrado latino 4×4 , com quatro tratamentos e quatro períodos experimentais. Os tratamentos nesse estudo foram comparados seguindo o esquema fatorial 2×2 , sendo duas TMRs (TMR não ensilada e ensilada) e duas proporções de volumoso: concentrado (80:20 e 20:80), no delineamento em quadrado latino 4×4 , com quatro tratamentos e quatro períodos experimentais, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + I_j + A_{\kappa} + Pl + (S * I)_{ij} + \epsilon_{ijkl}$$

em que: Y_{ijkl} = é a resposta medida no animal k e período l, e submetido ao tratamento i e j; μ = constante geral; S_i = efeito fixo da silagem i; I_j = efeito fixo da relação V:C j; $S * I_{ij}$ = efeito fixo da interação entre a silagem e a relação V:C ij; A_{κ} = efeito aleatório do animal κ ; Pl

= efeito aleatório do período experimental l ; ϵ_{ijkl} = erro aleatório residual, que supostamente é DNII (μ , σ^2_ϵ).

Os dados de pH, ácidos graxos voláteis e N-NH₃ do líquido ruminal foram analisados como medidas repetidas no tempo (0, 2, 4 e 6 h após alimentação), em cada unidade experimental.

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o PROC MIXED do SAS 9.4 (SAS Institute Inc., 2010). Para os dados avaliados em medidas repetidas no tempo, a matriz de covariância foi escolhida por meio do critério de Akaike corrigido (AICC). Efeitos significativos foram declarados quando $P < 0,05$.

3.1. Análises de diversidade microbiana

A alfa diversidade foi estimada através do cálculo dos índices de diversidade de Chao, Shannon e Simpson. Para a beta diversidade, a Análise de Coordenada Principal (PCoA) baseada na distância de Bray Curtis foi calculada. Os táxons bacterianos mais abundantes, classificados aos níveis taxonômicos de filo e gênero, foram plotados em gráficos de barras. Os diagramas de Venn foram desenhados considerando como presente em um tratamento, a ASV que apresentou valor de abundância maior ou igual a dois (absoluto) em pelo menos metade mais um do número de repetições. Ou seja, para as comparações entre todas as amostras, foi considerada como presente naquele tratamento, a ASV com abundância maior ou igual a dois em pelo menos três das quatro repetições; e para as comparações dentro de cada grupo de tratamentos, ensilada e natural ou volumoso e concentrado, foi considerada como presente em um determinado tratamento, a ASV com abundância maior ou igual a dois em pelo menos cinco das oito repetições. Os índices de alfa diversidade foram comparados pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis, a beta diversidade foi comparada usando PERMANOVA. A análise de efeito de tamanho discriminante linear (LEfSe, do inglês *Linear discriminant analysis effect size*), foi usada para identificar os grupos taxonômicos classificados em nível de gênero que diferiram significativamente em abundância entre os diferentes tratamentos (Segata *et al.*, 2011).

4. RESULTADOS

4.1. Consumo e digestibilidade

Apenas o consumo de EE foi afetado ($P = 0,030$) pela interação $S \times R$ (Tabela 2), enquanto que o consumo de PB foi afetado pelo tipo de processamento da TMR ($P = 0,041$) e pela relação V:C ($P = 0,048$; Tabela 2). Os consumos de MS e MO não foram afetados ($P > 0,05$) pela interação, nem pelo tipo processamento da TMR e relação V:C. Por outro lado, os consumos voluntários de CFDNcp, CAMido, CCNF e CNDT foram influenciadas somente pela relação V:C ($P < 0,050$; Tabela 2).

Tabela 2. Consumo de nutrientes de dietas de TMR ensiladas ou não, fornecidas a bovinos de corte, em duas relações de volumoso:concentrado.

Item ²	Proporção volumoso:concentrado	TMR		EPM	P-valor ¹		
		Não ensilada (TMRn)	Ensilada (TMRs)		S	R	S × R
CMS	80:20	5,18	5,31	0,3154	0,1788	0,6505	0,1113
	20:80	6,15	4,75				
CPB	80:20	0,549	0,502	0,03443	0,0416	0,0485	0,2178
	20:80	0,712	0,545				
CFDNcp	80:20	2,25	2,45	0,1135	0,3456	<,0001	0,0527
	20:80	1,20	0,60				
CAMido	80:20	1,53	1,50	0,1576	0,1256	<,0001	0,1560
	20:80	3,38	2,67				
CEE	80:20	0,161	0,195	0,02031	0,3989	0,0994	0,0308
	20:80	0,249	0,180				
CCNF	80:20	1,84	1,82	0,1951	0,3318	0,0002	0,3684
	20:80	3,71	3,19				
CNDT	80:20	3,65	3,85	0,3637	0,2658	0,0325	0,1130
	20:80	5,16	4,12				
CMO	80:20	4,80	4,96	0,4238	0,2236	0,5460	0,1206
	20:80	5,77	4,52				
g/kg PC							
CMS	80:20	13,59	14,33	1,3243	0,2546	0,8971	0,0895
	20:80	15,78	12,42				
CPB	80:20	1,46	1,35	0,1557	0,0713	0,1060	0,2621
	20:80	1,83	1,43				
CFDNcp	80:20	5,96	6,66	0,6291	0,5671	<,0001	0,0752
	20:80	2,82	1,58				
Camido	80:20	3,99	4,05	0,5810	0,1804	<,0001	0,1521
	20:80	8,68	6,99				
CMO	80:20	12,59	13,40	1,2439	0,3124	0,7621	0,0944
	20:80	14,80	11,82				

CMS, consumo de matéria seca; CPB, consumo de proteína bruta; CFDNcp, consumo de fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; CAMido, consumo de amido; CEE, consumo de extrato etéreo; CCNF, consumo de carboidratos não fibrosos; NDT, nutrientes digestíveis totais; TMRn 80:20, ração em mistura total não ensilada 80:20; TMRn 20:80, ração em mistura total não ensilada 20:80; TMRs 80:20, silagem de ração em mistura total 80:20; TMRs 20:80, silagem de ração em mistura total 20:80; ¹, S, R e S × R, efeitos para silagem, relação volumoso: concentrado e suas interações, respectivamente; ², kg/dia.

No geral, as TMRs não afetaram o consumo de extrato etéreo dos animais ($P = 0,622$), no entanto houve maior consumo de extrato etéreo com a maior proporção de concentrado na

dieta ($P = 0,037$; Tabela 2). Por outro lado, o CPB foi reduzido em 16,13% quando a proporção de volumoso na dieta dos animais foi mais elevada (0,52 kg/d – V:C 80:20 vs. 0,62 kg/d – V:C 20:80). O CFDNcp foi aumentado em média 161,10% quando a proporção de volumoso foi aumentada de 20:80 para 80:20 (V:C), respectivamente 0,90 vs. 2,35 g/kg de MS. O consumo de Amido, CNF e NDT nos tratamentos com relação V:C de 80:20 foram 50,08; 47,0 e 19,2 % menores que nos tratamentos com relação V:C 20:80, respectivamente.

Os dados de consumo voluntário relativos (g/kg PC) não foram afetados pela interação entre o processamento da TMR, relação V:C, nem pelo tipo de processamento das TMRs ($P > 0,050$; Tabela 2). No entanto, foi observado efeito da relação V:C ($P < 0,001$; Tabela 2) para o CFDNcp e o CAMido relativos (g/ kg de PC. O CFDNcp foi em média 4,11 g/kg de PC mais elevado para o 80:20 (6,31 g/kg de PC) quando comparado ao 20:80 (2,20 g/kg de PC). Para o CAMido, o efeito inverso foi notado sendo aproximadamente 48 % menor para a relação 80:20 (4,02 g/kg de PC) quando comparado a 20:80 (7,84 g/kg de PC).

Apenas a digestibilidade do amido foi afetada ($P=0,0016$) pela interação tipo de processamento \times relação V:C, enquanto que a DFDNcp não foi afetada pelo processamento da TMR e nem pela relação V:C ($P > 0,050$; Tabela 3). Contudo, a digestibilidade dos demais nutrientes foi afetada ($P<0,05$) apenas pela relação volumoso:concentrado. (Tabela 3).

Tabela 3. Digestibilidade aparente total dos nutrientes de dietas totais mistas ensiladas ou não, fornecidas a bovinos de corte, em duas relações de volumoso:concentrado

Item ²	Proporção volumoso:concentrado	TMR		EPM	P-valor ¹		
		Não ensilada (TMRn)	Ensilada (TMRs)		S	R	S \times R
DMS	80:20	63,69	65,15	2,248	0,2668	0,0002	0,6615
	20:80	77,62	80,85				
DPB	80:20	66,83	67,97	2,9083	0,5641	0,0023	0,7963
	20:80	80,38	83,37				
DFDNcp	80:20	64,97	67,04	3,4406	0,4877	0,7402	0,8684
	20:80	63,06	66,40				
Damido	80:20	92,91	93,23	0,3507	0,0003	<,0001	0,0016
	20:80	94,03	97,18				
DEE	80:20	84,70	88,17	1,1668	0,4291	0,0021	0,1361
	20:80	93,00	91,87				
DCNF	80:20	82,12	81,24	1,3837	0,7684	0,0004	0,3957
	20:80	91,00	92,77				
DMO	80:20	72,49	79,30	2,2269	0,4163	0,0002	0,7308
	20:80	84,48	86,43				

DMS, digestibilidade da matéria seca; DPB, digestibilidade da proteína bruta; DFDNcp, digestibilidade da fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; DEE, digestibilidade do extrato etéreo; DCNF, carboidratos não fibrosos; TMRn 80:20, ração em mistura total não ensilada 80:20; TMRn 20:80, ração em mistura total não ensilada 20:80; TMRs 80:20, silagem de ração em mistura total 80:20, TMRs 20:80, silagem de ração em mistura

total 20:80; ¹, S, R e S × R, efeitos para tipo de processamento, relação volumoso: concentrado e suas interações, respectivamente; ², (% da matéria seca).

Foi observado efeito ($P < 0,05$) da interação tipo de processamento e relação volumoso: concentrado apenas sobre o N-Urina ($P = 0,0366$; Tabela 4). O N-Fezes foi afetado pelo tipo de processamento ($P = 0,0347$), enquanto que as variáveis Nabs, Nret e Nret/Ncons foram afetadas ($P < 0,05$) pela da relação volumoso: concentrado (Tabela 4).

Tabela 4. Balanço de nitrogênio de bovinos de corte alimentados com silagens de TMR ou TMR não ensilada com duas relações de volumoso:concentrado.

Item ²	Proporção volumoso: concentrado	TMR		EPM	P-valor ¹		
		Não ensilada (TMRn)	Ensilada (TMRs)		S	R	S × R
N-Fezes ²	80:20	26,24	21,18	3,725	0,0347	0,1009	0,7406
	20:80	22,74	16,06				
N-Urina ³	80:20	38,32	42,42	5,355	0,1484	0,9663	0,0366
	20:80	49,26	31,83				
Nabs ²	80:20	61,60	59,10	4,158	0,0798	0,0041	0,1625
	20:80	91,12	71,12				
Nret ²	80:20	23,29	16,68	5,942	0,5700	0,0268	0,8019
	20:80	41,86	39,28				
Nret/Nabs ²	80:20	33,19	28,08	7,656	0,8109	0,0524	0,4279
	20:80	45,50	54,94				
Nret/Ncons ²	80:20	24,69	20,10	6,539	0,8069	0,0234	0,3881
	20:80	37,46	45,59				
N microbiano ²	80:20	55,70	57,93	5,631	0,7991	0,4647	0,8227
	20:80	60,20	60,34				
NDT gMCP/kg	80:20	96,85	95,89	7,659	0,6875	0,2419	0,5421
	20:80	88,51	93,09				

N, nitrogênio; Nabs, nitrogênio absorvido; Nret, nitrogênio retido; Ncons, nitrogênio consumido; ¹, S, R e S × R, efeitos para silagem, relação volumoso: concentrado e suas interações, respectivamente; ², g/dia; ³, g/litro. TMRn 80:20, ração em mistura total não ensilada 80:20; TMRn 20:80, ração em mistura total não ensilada 20:80; TMRs 80:20, silagem de ração em mistura total 80:20, TMRs 20:80, silagem de ração em mistura total 20:80.

4.2. Parâmetros ruminais

A concentração de acetato, propionato e a relação acetato/propionato foram influenciadas pela interação ($P < 0,05$) tipo de processamento e a relação V:C. A produção de butirato foi afetada pela interação entre o tipo de processamento e tempo ($P = 0,0418$), enquanto que a produção de AGV totais foi afetada apenas pelo tempo ($P < 0,0001$) registrando-se maior concentração 6 horas após a alimentação dos animais (Figura 1a). Para o butirato, foram registradas menores concentrações nos tempos de 0, 4 e 6 horas para as TMRn ($P < 0,05$) comparadas às TMRs (Figura 1b).

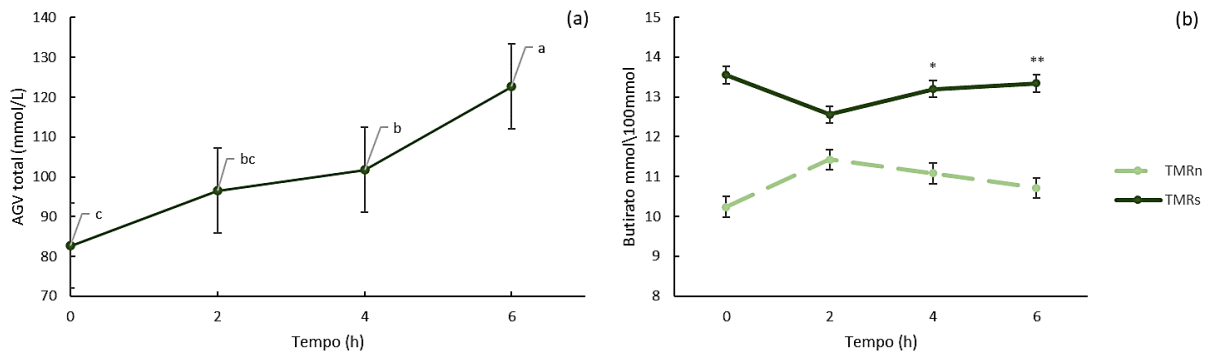


Figura 1. Efeito da alimentação de bovinos de corte com silagens de TMR ou TMR não ensilada com diferentes relações de volumoso:concentrado na produção de AGV total **(a)** e concentração de Butirato **(b)** ao longo do tempo (0, 2, 4 e 6 horas após a alimentação). Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste F de Fisher a 5% de probabilidade.

Independentemente do tipo de processamento (não ensilado ou ensilado), as dietas com maior relação de volumoso (TMRn 80:20 e TMRs 80:20) proporcionaram maiores ($P < 0,05$) concentrações de acetato (Figura 2a). No entanto, ao se comparar o efeito do tipo de processamento dentro das relações V:C, foi observado maior produção de acetato ($P = 0,0182$) para a TMRn 80:20 quando comparada à TMRs 80:20 (Figura 2b). Por outro lado, não houve diferença ($P = 0,1017$) na produção de acetato quando os tratamentos com alta proporção de concentrado foram comparados entre si (TMRn 20:80 vs TMRs 20:80; Figura 2b).

Avaliando as TMRs não ensiladas, foi observada maior ($P < 0,0001$) concentração de propionato para os animais que receberam a TMRn 20:80 comparada a TMRn 80:20 (Figura 2c). No entanto, foi observado que a ensilagem não afetou ($P = 0,3611$) a concentração de propionato entre os tratamentos (Figura 2c). Por outro lado, quando comparamos o efeito do tipo de processamento dentro das diferentes relações V:C, foi observado que não houve efeito do tipo de processamento para os tratamentos com relação V:C 80:20 ($P = 0,1723$; Figura 2d), enquanto que na relação V:C 20:80, maiores concentrações de propionato foram observadas na TMR ensilada ($P < 0,0001$; Figura 2d).

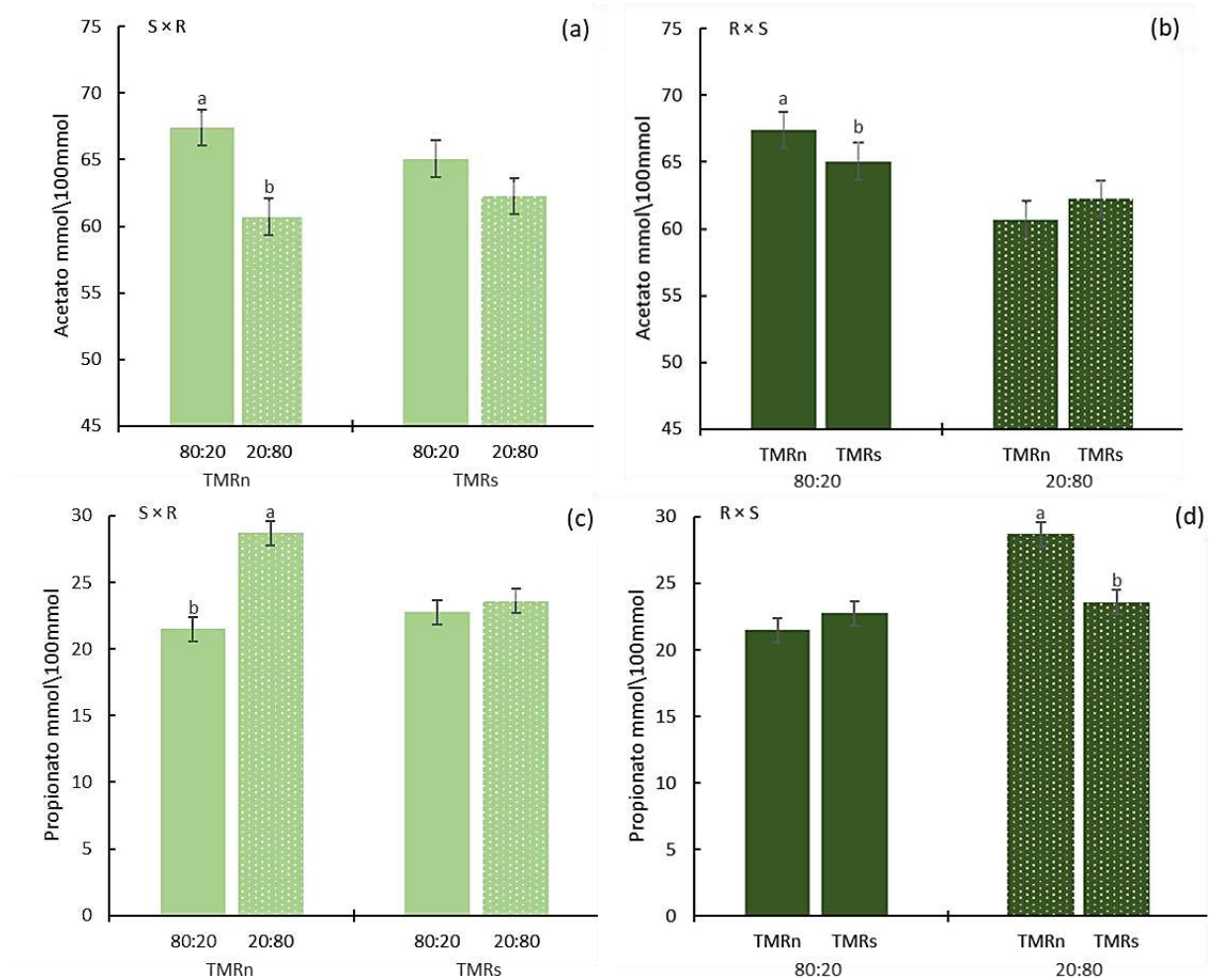


Figura 2. Concentrações de acetato em função do tipo de processamento (S) (a) e da relação volumoso: concentrado (R) (b); e de propionato em função do efeito do tipo de processamento (S) (c) e da relação volumoso : concentrado (R) (d) em bovinos de corte alimentados com TMR ensiladas ou não. Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste F de Fisher a 5% de probabilidade.

A proporção molar de acetato/propionato foi influenciada pelo tipo de processamento ($P=0,0309$) quando altas proporções de concentrado (20:80) foram utilizadas na dieta (Figura 3), observando-se menor valor na TMRn 20:80 comparada à TMRs 20:80 (Figura 3a). Ao avaliarmos o efeito da relação V:C sobre o tipo de processamento, foi observado maior ($P<0,0001$) proporção acetato/propionato na TMRn 80:20, comparada à TMRn 20:80 (Figura 3b). No entanto, quando o material foi ensilado, não foram observadas diferenças ($P=0,1087$) entre as diferentes relações V:C (80:20 e 20:80; Figura 3b).

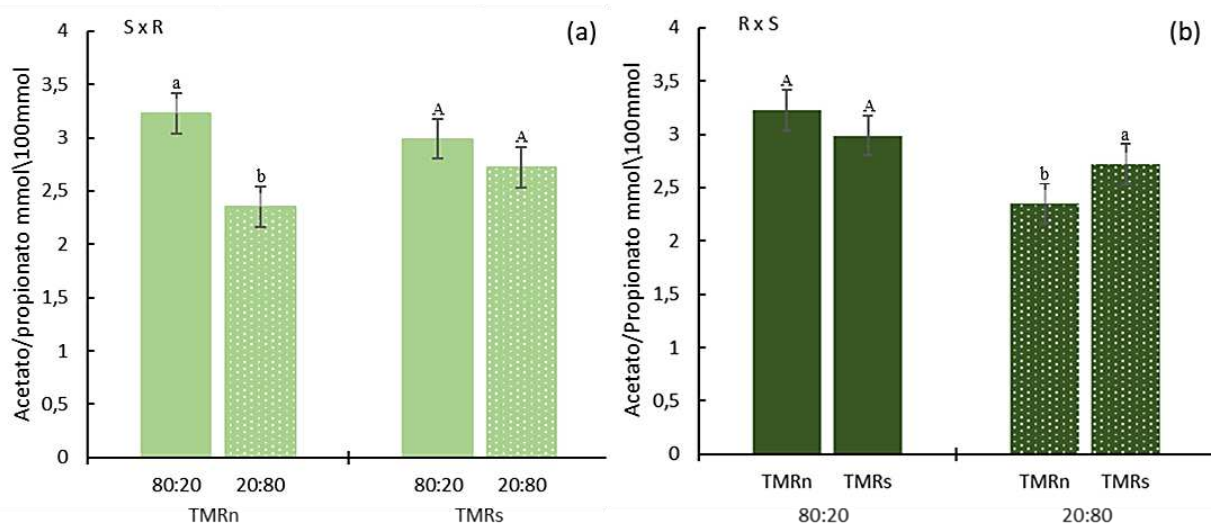


Figura 3. Relação Acetato/Propionato em função do tipo de processamento (S) (a) e da relação volumoso:concentrado (R) (b) em bovinos de corte alimentados com TMR ensiladas ou não. Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste F de Fisher a 5% de probabilidade.

Foi observado efeito ($P < 0,0384$) da relação V:C sobre a concentração de amônia (N-NH₃) ruminal (Figura 4), registrando-se maiores concentrações de N-NH₃ (9,98 mg/dL) nas dietas com alta inclusão de concentrado (20:80) comparadas àquelas com alta inclusão de volumoso (80:20; 6,79 mg/dL). Além disso, observou-se efeito de tempo ($P < 0,011$) sobre as concentrações de amônia ruminal registrando-se valor mais elevado 2h após a alimentação (11,59 mg/dL; Figura 4).

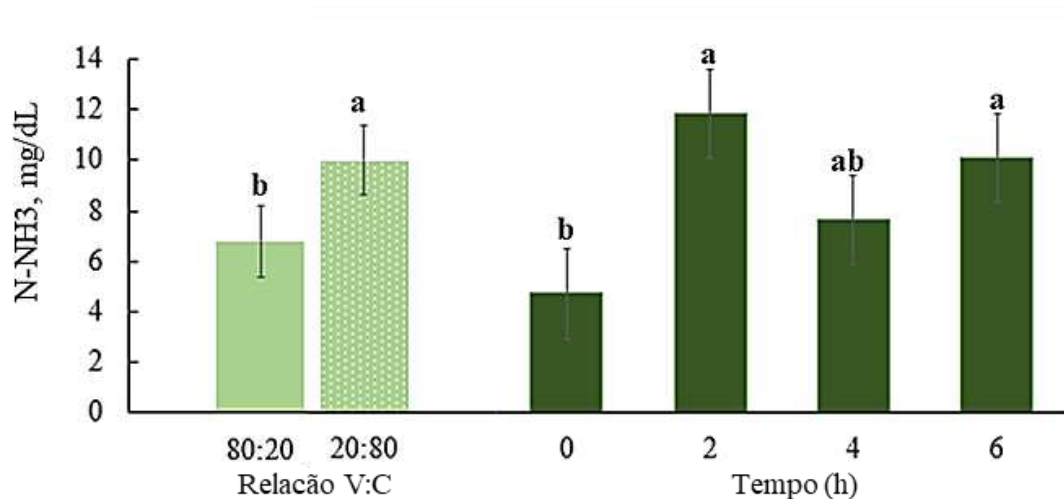


Figura 4: Concentração de amônia ruminal em função da relação volumoso:concentrado (V:C, $P < 0,038$) e do tempo ($P < 0,011$) de coleta após a alimentação em bovinos de corte alimentados com TMR ensiladas ou não. Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste F de Fisher a 5% de probabilidade.

Observou-se efeito ($P < 0,010$) da interação relação V:C e tempo de coleta sobre o pH ruminal (Figura 5). Avaliando a interação, não foi observada diferença ($P > 0,721$) no valor de pH para o tempo de 0 horas entre os tratamentos. Por outro lado, houve diferença entre os tratamentos no período de 2h ($P < 0,021$), 4h ($P < 0,0001$) e 6h ($P < 0,0001$), onde as TMR 20:80 apresentaram menores valores de pH, quando comparadas às TMR 80:20 (Figura 5).

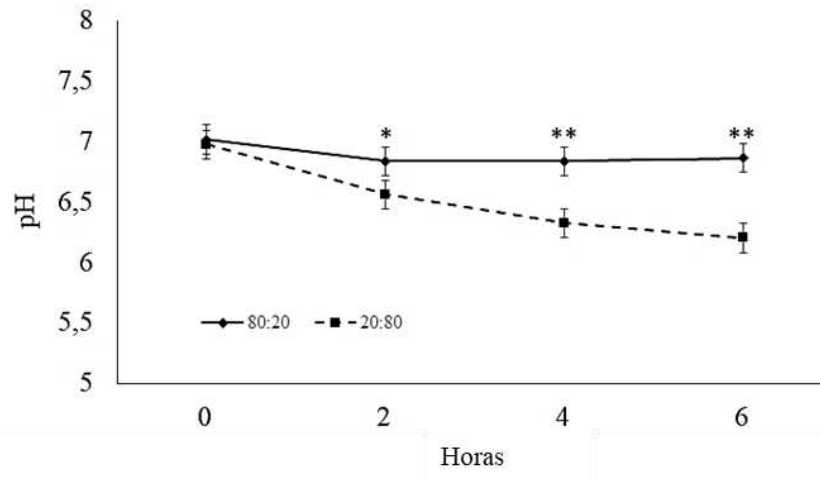


Figura 5. pH ruminal em bovinos de corte alimentados com TMR ensilada ou não, com duas relações volumoso:concentrado em função do tempo coleta após a alimentação. Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste F de Fisher a 5% de probabilidade.

4.3. População microbiana ruminal

Um total de 3.938.526 sequências verificadas quanto à qualidade foram obtidas de todas as 32 amostras, e 102.695 a 132.348 sequências foram retornadas para cada amostra, com uma média de 123.078 sequências por amostra. Após a seleção de ASVs e a verificação de quimera, um total de 9.913 ASVs foram calculados para todas as amostras. As coberturas de Good's para todas as amostras excederam 99% (Figura 1, supl.), o que indica precisão e reprodutibilidade do sequenciamento.

A atribuição taxonômica das sequências bacterianas revelou um total de 30 filos, 64 classes, 119 ordens, 198 famílias e 427 gêneros. Para as fases líquida e sólida, os filos mais abundantes para todos os tratamentos avaliados foram Firmicutes, Bacteroidota e Euryarcheota (Figuras 2 e 3supl.)

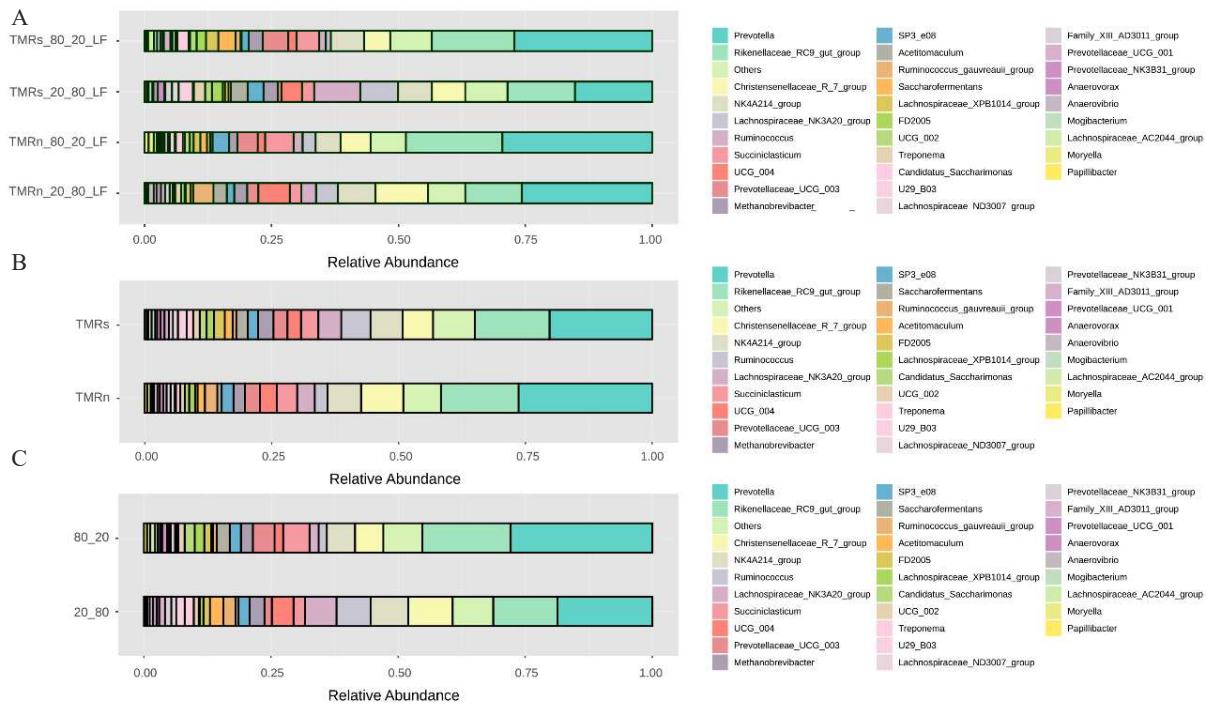


Figura 6. Abundância relativa dos gêneros da comunidade bacteriana da fase líquida ruminal em função de todos tratamentos (A), tipo de processamento (ensilado ou não, B), e da relação volumoso:concentrado (20:80 ou 80:20, C).

A abundância relativa dos táxons bacterianos a nível de gênero, na fase líquida e sólida, mostrou predominância de *Prevotella*, *Rikenellaceae_RC9_gut_group* e *Christensenellaceae_R7_group* para todos os tratamentos analisados (Figuras 6 e 7). Para a fase líquida, as porcentagens médias para *Prevotella*, *Rikenellaceae_RC9_gut_group* e *Christensenellaceae_R7_group* foram 18,7%, 11,43% e 5,45%, respectivamente (Figura 6). As médias para abundância relativa da fase sólida para os gêneros *Prevotella*, *Rikenellaceae_RC9_gut_group* e *Christensenellaceae_R7_group* foram 26,7%, 10,73 e 5,48 respectivamente (Figura 7).

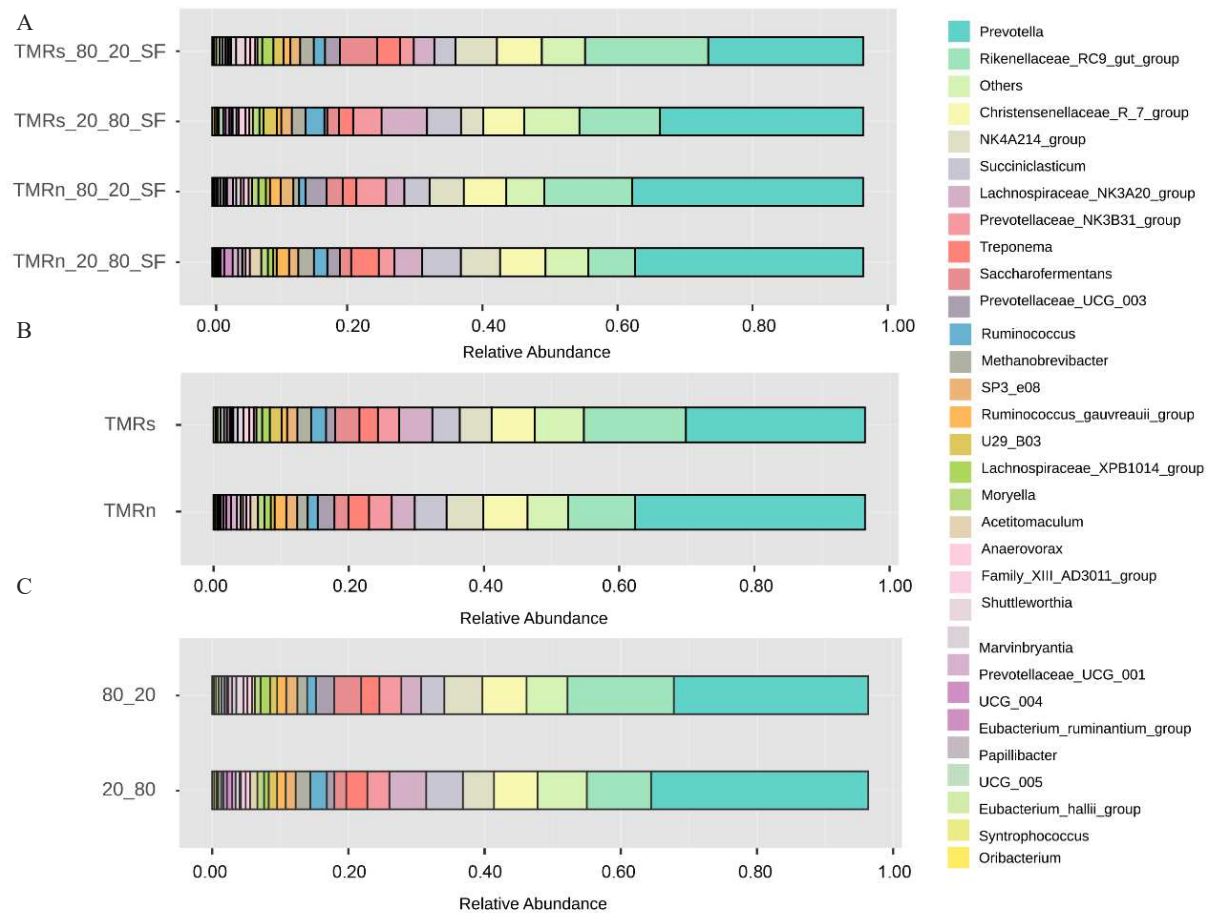


Figura 7. Abundância relativa dos gêneros da comunidade bacteriana da fase sólida da digesta ruminal em função de todos tratamentos (**A**), tipo de processamento (ensilado ou não, **B**), e da relação volumoso:concentrado (20:80 ou 80:20, **C**).

Avaliando a β -diversidade baseada nas coordenadas de componentes principais (PCoA), não foram observados efeitos para a população na fase sólida ($P > 0,302$; Figura 8A) bem como na fase líquida ($P > 0,105$; Figura 8D), quando todos os tratamentos foram comparados entre si. Além disso, na fase sólida, também não foram observados efeitos para o tipo de processamento ($P > 0,416$; Figura 8B), bem como para as diferentes proporções de V:C ($P > 0,051$, Figura 8C), observando-se claramente a proximidade entre os grupos. Para a fase líquida, foi observado efeito ($P < 0,009$) da relação V:C para as análises, com os eixos variando de 10,5 e 13,6 %, em que se pode verificar a formação de dois grupos distintos bem definidos (Figura 8F).

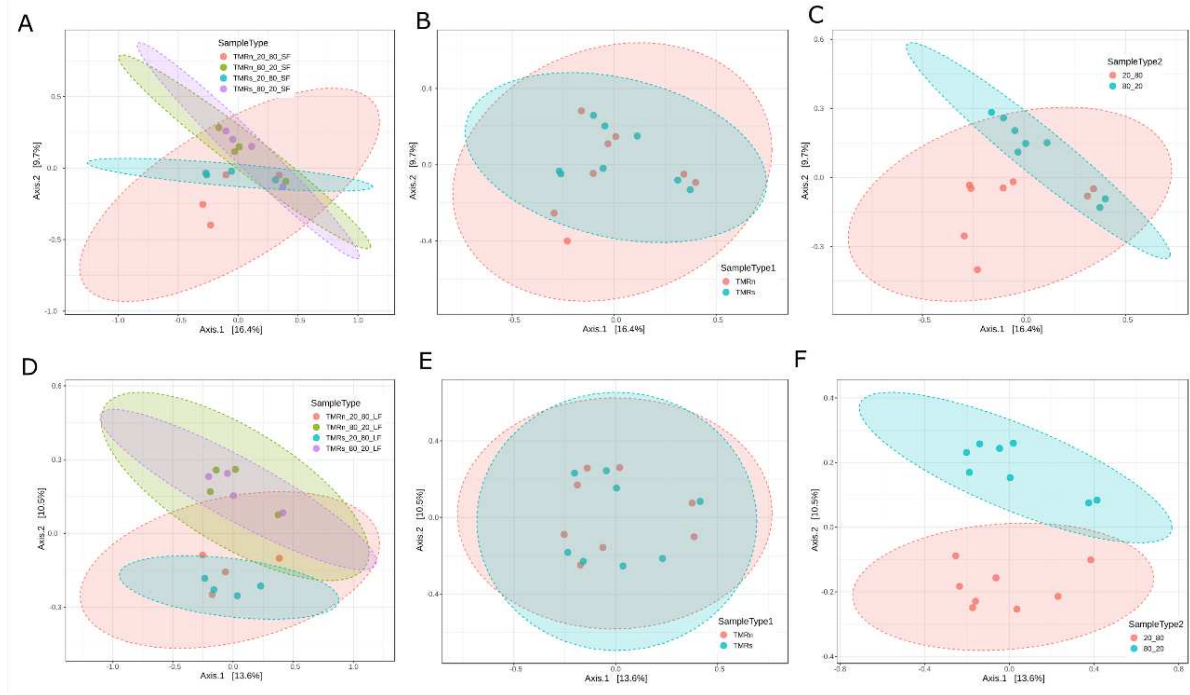


Figura 8. As análises de Beta diversidade foram realizadas usando as análises de componentes principais (PCoA). **A-C** mostram resultados da fase sólida e **D-F** para a fase líquida. **A** representa a Beta diversidade quando todos os tratamentos são comparados; **B**, representa a Beta diversidade quando são comparados os tipos de processamento da TMR (ensilado ou não); e **C**, representa a Beta diversidade quando são comparadas as diferentes relações de volumoso:concentrado. Observe que que as amostras não se sobrepuseram somente em **F**, formando dois grupos distintos.

O número de espécies e a distribuição dos táxons em todas as amostras foram avaliados por meio de análises de α -diversidade usando o índice de Chao1 para riqueza, o índice de Shannon para diversidade e o índice de Simpson que tem um peso maior para a riqueza do que a diversidade dos táxons. Na fase líquida foram observadas diferenças para os índices de Chao1 ($P < 0,020$) e Shannon ($P < 0,0498$) para as diferentes relações V:C. A relação V:C de 80:20 apresentou maior índice de Chao1 e Shannon quando comparadas com as silagens de 20:80 (Figura 9c). Por outro lado, não houve diferença ($P > 0,05$) para os índices de Chao1, Shannon e Simpson para as variáveis analisadas para a fase sólida (Figura 4 supl.) e líquida quando todos os tratamentos ($P > 0,05$; Figura 9a), ou tipo de processamento ($P > 0,05$; Figura 9b) foram comparados.

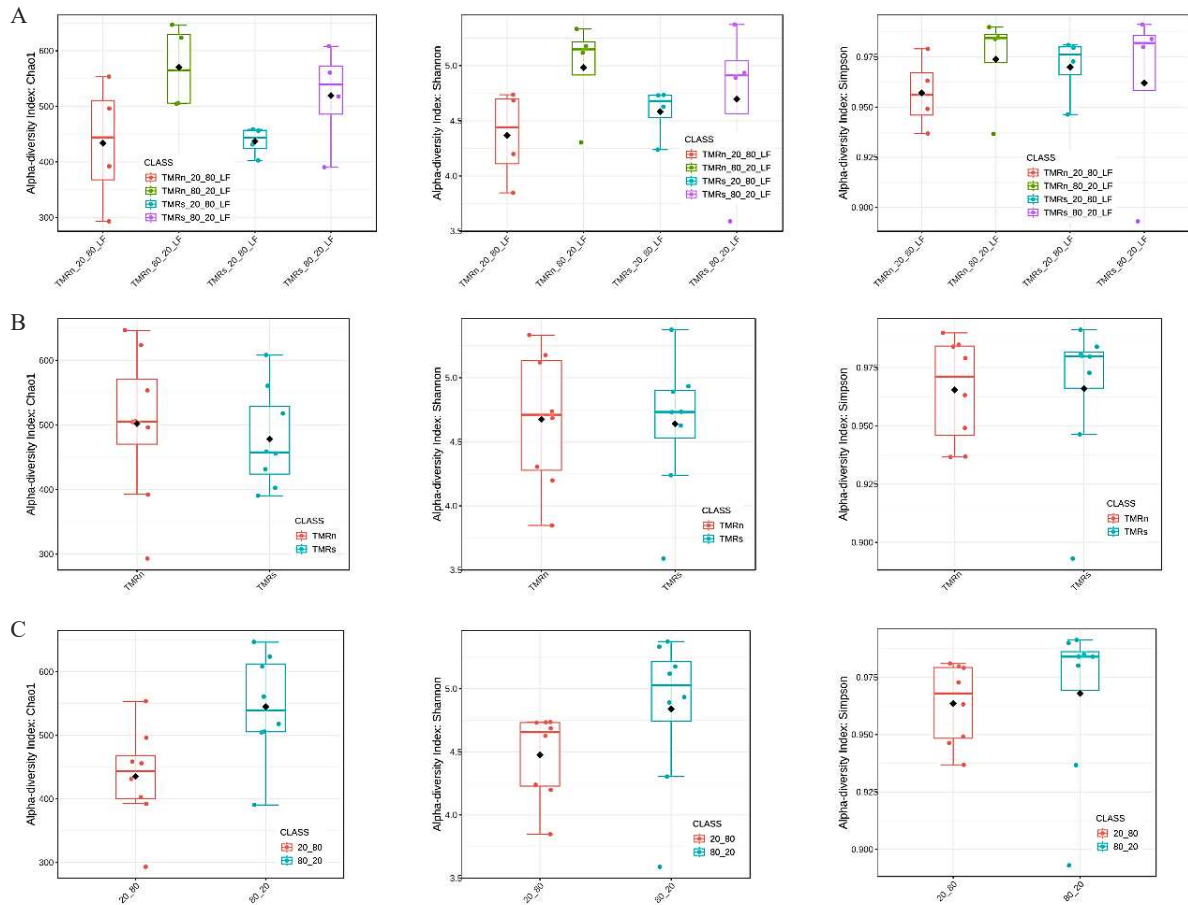


Figura 9. Alfa diversidade. Índices de Chao, Shannon e Simpson para a fase líquida. **A** representa a Alfa diversidade quando todos os tratamentos são comparados; **B**, representa a Alfa diversidade quando são comparados os tipos de processamento da TMR (ensilado ou não); e **C**, representa a Alfa diversidade quando são comparados as diferentes relações de volumoso:concentrado.

A análise de Lefse é usada a fim de investigar quais táxons bacterianos classificados a nível de gênero apresentam diferenças significativas em abundâncias entre os diferentes tipos de TMR analisadas. Desta forma, a análise de Lefse foi realizada para todas as diferentes comparações apresentadas nesse estudo. De acordo com os resultados anteriores, foi observado diferença estatística ($P < 0,05$) somente para o grupo de TMR da fase líquida com diferentes proporções de V:C, que apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) para a β -diversidade com base na PCoA. Dentre os gêneros identificados pela análise de Lefse, os que apresentaram LDA score acima de 2 foram *Lachnospiraceae_NK3A20_group* e *Atopobium* (Figura 10) para a relação V:C de 20:80. A relação 80:20 mostrou maiores quantidades dos gêneros *Candidatus_Soleaferrea*, *Family_XIII_UCG_001*, *Pseudobutyrvibrio*, *Lactobacillus*, *Shuttleworthia*, *Fibrobacter*, *Butyrvibrio*, *Acetobacter*, *Lachnospiraceae_ACC2044_group*,

Lachnospiraceae_XPB1014_group, *Candidatus_Saccharimonas*, *Saccharofermentans* e *Succiniclasticum* (Figura 10).

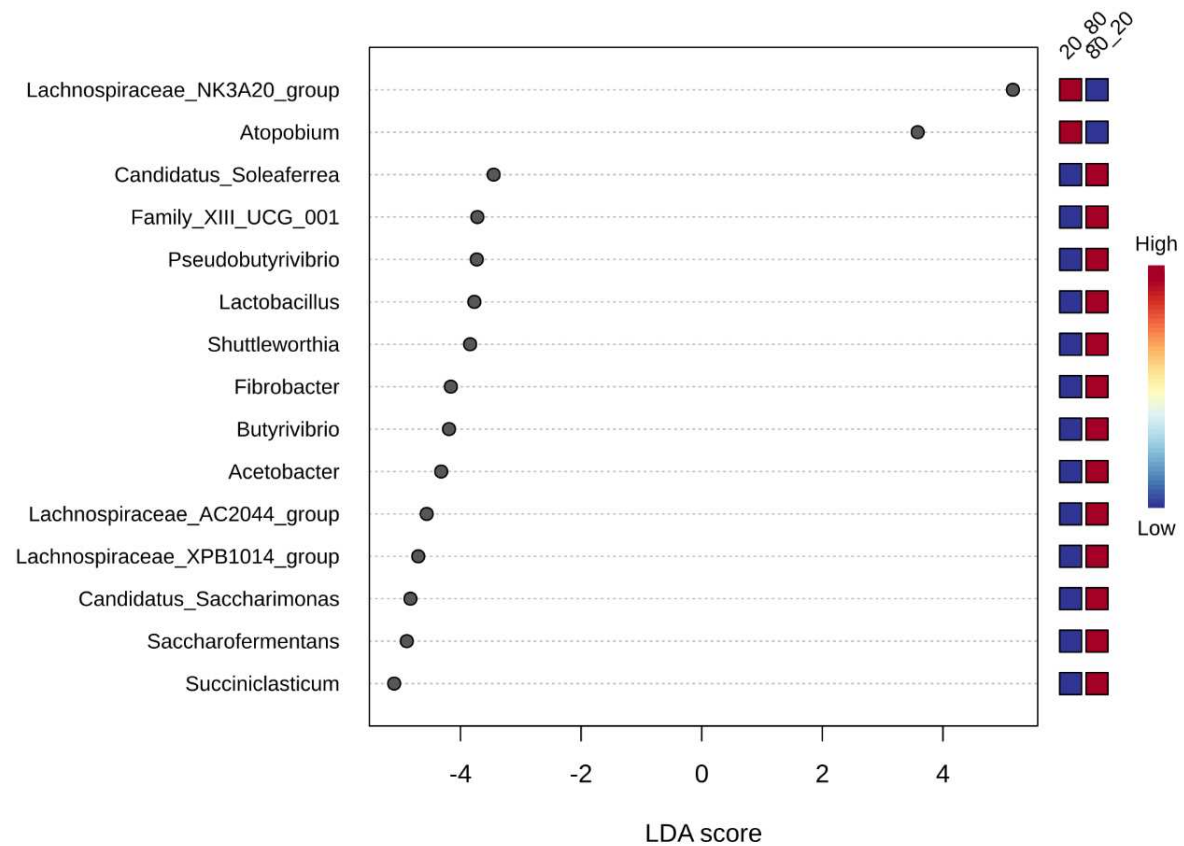


Figura 10. A análise de Lefse mostra os táxons que representam as diferenças significativas para as diferentes relações de volumoso:concentrado para a fase líquida, sendo a relação V:C 20:80 em vermelho e 80:20 em azul (LDA Score >2).

Dentre as ASVs identificadas na fase líquida 63 foram compartilhadas por todos os tratamentos (Figura 11a). Ao se avaliar o tipo de processamento, foram observadas 92 ASVs compartilhadas entre as TMR ensiladas ou não, além disso observou-se que 9 ASVs são exclusivas da TMRn e 11 ASVs da TMRs (Figura 11b). Ainda na fase líquida destaca-se a avaliação das ASVs observadas nas diferentes relações de V:C, em que 85 ASVs são compartilhadas entre as proporções 80:20 e 20:80, 21 são exclusivas das TMRs contendo 80:20 e 9 são exclusivas das TMR com proporção de 20:80 V:C (Figura 11c).

Na fase sólida foram identificadas 69 ASVs que são compartilhadas por todos os tratamentos (Figura 11a), 85 compartilhados entre as TMR ensiladas ou não (Figura 11b). Além disso, foram observadas 5 e 9 ASVs exclusivas para TMRn e TMRs, respectivamente, e 80

compartilhadas pelas TMR's com diferentes proporções de V:C, com 14 exclusivas para a 80:20 e 9 para a proporção de 20:80 (Figura 11c).

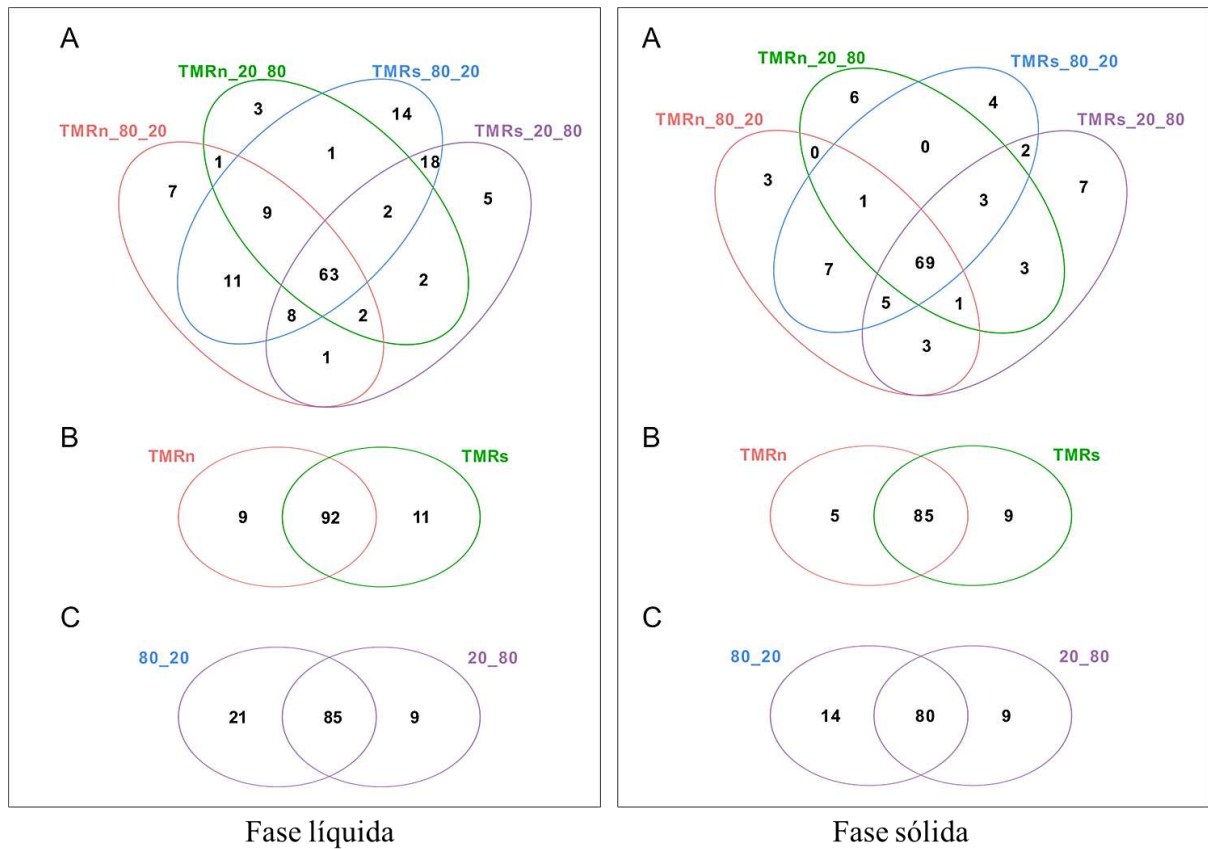


Figura 11. Diagrama de Venn representando o número de ASVs que são compartilhadas entre os tratamentos e aquelas que são exclusivas de cada grupo. Note que o diagrama da fase líquida está posicionado a esquerda, e o da fase sólida a direita. **A.** representa o número de ASVs que são compartilhadas entre todos os tratamentos para a fase líquida e sólida a direita; **B.** representa o número ASVs exclusivas e as que são compartilhadas em função do tipo de processamento (ensilada ou não) para a fase líquida e fase sólida; e **C.** representa o número de ASVs exclusivas e as que são compartilhadas em função da relação volumoso:concentrado (20:80 ou 80:20).

5. DISCUSSÃO

O aumento no consumo de PB, CNF e amido nas TMR 20:80 influenciaram o consumo de NDT (Euclides Filho *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 2007). O maior consumo de CCNF, amido e NDT das dietas com maior proporção de concentrado (TMR 20:80), provavelmente se deve à maior concentração de amido das mesmas, uma vez que o NDT é uma somatória da maioria dos componentes (PB, EE, FDNcp, CNF) que compõem a MS da dieta (Valadares Filho *et al.*, 2016). Além disso, quando a proporção de concentrado na dieta é aumentada, pode-se melhorar a aceitabilidade da dieta e, com isso, acelerar a taxa de fluxo da digesta que culmina no aumento da ingestão das diferentes frações de nutrientes pelos animais (Allen, 1996; Chen *et al.*, 2021).

Desta forma, o aumento no consumo de NDT é resultante desse maior aporte de concentrado nos tratamentos TMR 20:80, conforme reportado. Por outro lado, nos tratamentos TMR 80:20, o maior teor de carboidratos estruturais (celulose, hemicelulose e lignina) presentes na forragem explicam o maior consumo de FDNcp nessas dietas, fazendo com que ocorra restrição na taxa de fluxo da digesta o que leva a redução no consumo da maioria dos nutrientes, conforme observado em nosso estudo (Allen, 1996; Chen *et al.*, 2021; Pucetti *et al.*, 2024).

Dietas ricas em concentrado têm a capacidade de fornecer nutrientes adicionais que favorecem o crescimento dos microrganismos no rúmen e estimulam a fermentação ruminal (Chen *et al.*, 2021). Por isso, elevar os níveis de concentrado na dieta tende a melhorar a digestibilidade dos nutrientes. Desta forma, a maior digestibilidade aparente da MS, PB, EE, CNF, MO e amido nas dietas com maiores proporções de concentrado (TMR 20:80) pode estar relacionada com a maior concentração de carboidratos não estruturais nessas dietas, o que possibilita a rápida fermentação desses constituintes pela microbiota ruminal. Respostas semelhantes foram observadas por Pereira *et al.* (2007) e Pucetti *et al.* (2024) que relataram aumentos lineares para a digestibilidade aparente total dos nutrientes quando níveis crescentes de concentrado foram utilizados nas dietas.

Tendo em vista que o milho é o ingrediente energético de maior relevância em dietas de ruminantes, a busca de alternativas que promovam o incremento da utilização do milho dietético pelo aumento da digestibilidade do amido, poderia resultar em menores custos devido ao aumento da eficiência alimentar (Michelotti *et al.*, 2021).

Nesse contexto, nosso estudo mostrou que silagens de TMR 20:80 apresentaram aumento na digestibilidade do amido quando comparadas aos demais tratamentos, o que pode estar relacionado com a proteólise que ocorre durante a fermentação, devido à degradação da matriz proteica (zeína) que reveste os grânulos de amido (Hoffman *et al.*, 2011). Com isso, ocorre o aumento da disponibilidade e digestibilidade do amido no trato gastrointestinal, o que resulta na melhoria da eficiência alimentar e digestibilidade total da dieta (Silva *et al.*, 2020). Resultados semelhantes têm sido observados para silagens de grãos úmidos ou reidratados de milho ou sorgo e TMR ensilada (Hoffman *et al.*, 2011; Ferraretto *et al.*, 2014; Miyaji e Nonaka, 2018; Lazzari *et al.*, 2021). Além disso, a diferença entre os teores de amido nos tratamentos (29,48 vs 55,05 g/kg MS para TMR 80:20 e TMR 20:80, respectivamente) contribuíram para as diferenças nas digestibilidades apontadas em nosso estudo. Os valores de digestibilidade aparente total do amido observadas neste estudo foram semelhantes aos relatados por Shipandeni *et al.* (2023) que observaram digestibilidade variando de 869,3 a 922,10 g/kg MS em estudo com vacas de leite alimentadas com diferentes fontes de amido.

Quanto ao balanço de nitrogênio, a redução do Nfres no tratamento TMRs 20:80, bem como a redução do Nfezes nos tratamentos ensilados (TMRs 80:20 e TMRs 20:80) podem estar relacionadas com aumento da utilização do N no rúmen e no metabolismo animal como um todo embora o consumo de N microbiano, PB microbiana e gMCP/kg de NDT consumido tenham sido semelhantes entre as dietas. Resultados semelhantes foram reportados por Pereira *et al.*, (2007) e Kljak *et al.* (2017), os quais também não observaram diferenças significativas na produção de proteína microbiana quando níveis crescentes de concentrado foram utilizados. Isto sugere que os animais foram mais eficientes em utilizar o N disponível para deposição de músculo e melhora no desempenho (Kljak *et al.*, 2017).

Os valores de pH e as concentrações de N-NH₃ e de AGV são os principais indicadores da fermentação ruminal (Liu *et al.*, 2019). Dietas com maiores proporções de concentrado (20:80) diminuíram as concentrações de acetato e promoveram aumento nas produções de propionato e redução da proporção acetato/propionato. A maior concentração de propionato nas dietas com alto concentrado ensiladas (TMRs 20:80) pode estar relacionada a uma maior conversão do ácido láctico a propionato, por meio da via do acrilato (Counotte *et al.*, 1983; Stewart e Bryant, 1988), indicando que dietas com elevadas proporções de concentrado podem alterar o padrão de fermentação, favorecendo a produção de propionato em detrimento ao acetato. A redução na proporção acetato/propionato indica uma melhora na eficiência de utilização da energia da dieta (Hao *et al.*, 2021a), o que pode contribuir para o aumento no desempenho de animais alimentados com esse tipo de dieta, visto que propionato e butirato são reconhecidos por promoverem incrementos no ganho de peso de ruminantes (Liu *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2021; Hao *et al.*, 2021b).

A queda dos valores do pH ruminal dos animais em função do tempo, é proveniente da ingestão de açúcares simples e carboidratos de rápida digestão que compõem as dietas de alto concentrado (20:80), contribuindo para uma intensa produção de ácidos orgânicos e redução do pH ruminal (Harmon e Swanson, 2020), o que pode explicar o menor valor de pH observado na TMR 20:80, 6 horas após a alimentação. No entanto, os valores de pH ruminal observados neste estudo encontram-se dentro da faixa ideal para que crescimento microbiano sem que haja riscos de distúrbios metabólicos (Nagaraja e Titgemeyer, 2007).

As concentrações de N-NH₃ ruminais são provenientes de taxa de decomposição de nitrogênio e absorção e utilização de amônia pelos microrganismos ruminais (Li *et al.*, 2016). Em nosso estudo, as concentrações de N-NH₃ estão dentro do intervalo aceitável (5 a 30 mg N-NH₃ dL⁻¹) para que ocorra a síntese de proteína microbiana (Satter e Slyter, 1974). Além disso, as maiores concentrações de N-NH₃ observadas nos animais que receberam as dietas com maior

proporção de concentrado (20:80) podem estar relacionadas com a maior ingestão de PB. Resultados semelhantes foram reportados por Kljak *et al.* (2017) e Chen *et al.* (2021) com o aumento de concentrado na dieta .

A microbiota ruminal é responsável pela degradação dos produtos dietéticos e influenciam diretamente o metabolismo dos ruminantes (Liu *et al.*, 2021), desta forma a identificação dos microrganismos associados a degradação dos diferentes componentes, bem como os produtos por eles gerados, têm grande importância para a manipulação dos ingredientes da dieta e conseqüente desempenho animal (Chen *et al.*, 2021). As avaliações deste estudo tiveram o caráter exploratório com intuito de identificar os principais gêneros de bactérias ruminais que estão envolvidas na fermentação de diferentes silagens de TMR.

A formação de dois grupos distintos pela avaliação da β - diversidade por meio da PCoA para a relação V:C da fase líquida, pode estar relacionada com a proporção de V:C da dieta, que pode afetar a composição da microbiota ruminal (Belanche *et al.*, 2012; Pitta *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021). Adicionalmente, tais diferenças são reforçadas pela avaliação da α -diversidade que, de acordo com índices de Chao e Shannon, indicam que a relação V:C de 20:80 da fase líquida apresentou os menores valores, indicando que dietas contendo maior proporção de concentrado em sua composição apresentam menor diversidade de espécies. Estas observações estão de acordo com a literatura em que dietas contendo teores elevados de concentrado reduzem a riqueza, homogeneidade e diversidade das bactérias ruminais (Petri *et al.*, 2013; Plaizier *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2021).

A abundância relativa dos táxons bacterianos presentes nas fases líquida e sólida, com a predominância dos gêneros *Prevotella*, *Rikenellaceae_RC9_gut_group* e *Christensenellaceae_R7_group* em todos os tratamentos analisados, pode estar relacionada com a composição da dieta, e corroboram com aqueles descritos por Thoetkiattikul *et al.* (2013), Chen *et al.* (2021) e Liu *et al.* (2021).

O gênero *Prevotella* é geralmente encontrado em abundância elevada no ambiente ruminal de bovinos (Thoetkiattikul *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2021). Os representantes deste gênero possuem atuação hemicelulolítica e proteolítica, podendo utilizar proteínas, peptídeos, hemicelulose e pectina para seu crescimento, sendo versáteis e capazes de utilizar diversos tipos de substrato presentes no ambiente ruminal (Stevenson e Weimer, 2007; Thoetkiattikul *et al.*, 2013). O gênero *Rikenellaceae_RC9_gut_group* pode estar relacionado com o metabolismo de lipídeos e o processo de degradação ruminal da hemicelulose (Zhang *et al.*, 2019). Já o gênero *Christensenellaceae_R7_group* pode ser importante para a degradação da celulose e

hemicelulose no rúmen (Dai *et al.*, 2015). Neste contexto, a análise de Lefse foi usada para investigar quais táxons bacterianos apresentaram diferenças significativas em abundância para as diferentes relações de V:C.

O número de táxons responsáveis pela diferença entre os grupos identificados na relação 20:80 igual a 2, pode ser reflexo da menor diversidade microbiana em função da maior proporção de concentrado da dieta conforme reportado anteriormente. O gênero *Lachnospiraceae_NK3A20_group* tem a sua população ruminal aumentada quando a dieta possui teores elevados de concentrado (Ricci *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022), como observado no nosso estudo. Este gênero pode estar associado com a degradação de açúcares solúveis no rúmen (Kaminsky *et al.*, 2023). Deste modo, seu crescimento ótimo é comprometido em dietas contendo altas proporções de volumoso devido à dificuldade de iniciar a quebra dos compostos presentes no tecido vegetal, o principal produto de sua fermentação é o butirato (Kaminsky *et al.*, 2023). De acordo com os mesmos autores, quando bactérias deste gênero são cultivadas em ambientes contendo microrganismos metanogênicos, o H₂ produzido por eles pode não ser utilizado na rota metanogênica, o que pode resultar na redução da produção de CH₄.

Outro gênero identificado na relação 20:80 foi o *Atopobium* em que os principais produtos da fermentação da glicose são os ácidos láctico, fórmico e acético, não havendo produção de H₂ (Clavel *et al.*, 2014). A presença dos gêneros *Lachnospiraceae_NK3A20_group* e *Atopobium* pode estar associada com a redução da produção de metano no rúmen, o que pode acarretar no incremento da eficiência energética da dieta pela redução de perdas provocadas pela metanogênese, podendo contribuir para o aumento do desempenho animal.

Já na relação 80:20 da fase líquida a análise de Lefse revelou 13 gêneros que contribuem para a diferenciação entre as diferentes relações V:C, dentre estes, destacamos os gêneros *Fibrobacter*, *Shuttleworthia*, *Saccharofermentans* os membros da família *Lachnospiraceae*. O gênero *Fibrobacter* está associado com a produção de xilanases e endoglucanases envolvidas na degradação de polissacarídeos estruturais (Jiang *et al.*, 2017). Mais especificamente na fase líquida, representantes deste gênero atuam no metabolismo de nutrientes solúveis (Bowen *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2023).

Outro gênero abundante em dietas ricas em forragens observado no nosso estudo foi o *Shuttleworthia* que está correlacionado com os índices de fermentação ruminal e enzimas chave para digestão da fibra (Hao *et al.*, 2021b). Assim, como o *Saccharofermentans* que é pertencente

ao filo Bacteroidetes e participa da degradação de hemicelulose, pectina, amido, frutano, arabinogalactana e quitina (Hao *et al.*, 2021a).

Os membros da família Lachnospiraceae (Lachnospiraceae_ACC2044_group, Lachnospiraceae_XPB1014_group) estão relacionados com a degradação da fibra uma vez que são produtores de celulase (Li *et al.*, 2019). Dai *et al.* (2015) associaram a elevada abundância relativa de Lachnospiraceae (não classificado), Lachnospiraceae_NK4A136_group, e Lachnospiraceae_AC2044_group presentes em animais com o aumento da digestibilidade da fibra.

Quanto a produção de AGVs, os gêneros identificados na análise de Lefse que estão associados com a produção de propionato foram *Candidatus_Saccharimonas* (Hao *et al.*, 2021a), e *Succiniclasticum* (Van Gylswyk, 1995). *Pseudobutyrvibrio* e alguns membros da família Lachnospiraceae estão associados com a produção de butirato (Singhal *et al.*, 2021), enquanto que o acetato é o produto final da fermentação do gênero *Fibrobacter* contribuindo para o aumento da concentração deste AGV no rúmen (Jiang *et al.*, 2017).

Em sistemas de criação de bovinos de corte, o uso de silagens de TMR pode trazer inúmeros benefícios. Desta forma é possível inferir que ao aumentar a digestibilidade da dieta, há uma diminuição nas perdas de energia via fezes, o que se traduz em maior disponibilidade de energia para o animal, promovendo maior retenção de energia e eficiência alimentar. A nível ruminal, destaca-se, que as silagens de TMR não comprometeram a população bacteriana, e nem o processo fermentativo. Sendo assim, além de reduzir a necessidade de mão de obra diária para a mistura dos ingredientes, a TMR ensilada contribui para o aumento da digestibilidade da dieta sem comprometer o processo de fermentação ruminal, e se mostra como uma alternativa promissora, para a alimentação de ruminantes.

6. CONCLUSÕES

A maior proporção de concentrado na dieta proporciona impacto positivo no consumo e na digestibilidade da maioria dos nutrientes, sem comprometer a fermentação ruminal. Por outro lado, a ausência de efeito entre as TMR ensiladas ou não sobre o consumo e a digestibilidade da maioria dos nutrientes evidencia a qualidade do processo de ensilagem, tornando-se uma alternativa de conservação de alimentos, além de facilitar a operação de alimentação animal nas propriedades. Além disso, as dietas com TMR ensilada melhoraram a digestibilidade do amido, o que pode contribuir para aumento da eficiência alimentar dos animais. A abundância relativa dos táxons bacterianos a nível de gênero, na fase líquida e sólida, mostrou predominância de *Prevotella*, *Rikenellaceae_RC9_gut_group* e *Christensenellaceae_R7_group* para todos os tratamentos analisados.

7. REFERÊNCIAS

- ALLEN, M. S. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, [s. l.], vol. 74, n° 12, p. 3063, 1996. <https://doi.org/10.2527/1996.74123063x>.
- AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. 1° ed. Arlington, Virginia, USA: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, INC, 1990. <https://doi.org/10.7312/seir17116-004>.
- BARBOSA, A. M.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S.; DETMANN, E.; LEÃO, M. I. Endogenous fraction and urinary recovery of purine derivatives obtained by different methods in Nelore cattle1. **Journal of Animal Science**, [s. l.], vol. 89, n° 2, p. 510–519, 1 fev. 2011a. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2366>.
- BARBOSA, A. M.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S.; DETMANN, E.; LEÃO, M. I. Endogenous fraction and urinary recovery of purine derivatives obtained by different methods in nelore cattle. **Journal of Animal Science**, [s. l.], vol. 89, n° 2, p. 510–519, 2011b. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2366>.
- BELANCHE, A.; DOREAU, M.; EDWARDS, J. E.; MOORBY, J. M.; PINLOCHE, E.; NEWBOLD, C. J. Shifts in the Rumen Microbiota Due to the Type of Carbohydrate and Level of Protein Ingested by Dairy Cattle Are Associated with Changes in Rumen Fermentation. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], vol. 142, n° 9, p. 1684–1692, 1 set. 2012. DOI 10.3945/jn.112.159574. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article/142/9/1684/4630931>.
- BOWEN, J. M.; MCCABE, M. S.; LISTER, S. J.; CORMICAN, P.; DEWHURST, R. J. Evaluation of microbial communities associated with the liquid and solid phases of the rumen of cattle offered a diet of perennial ryegrass or white clover. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], vol. 9, 8 out. 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02389>.
- BUENO, A. V. I.; LAZZARI, G.; JOBIM, C. C.; DANIEL, J. L. P. Ensiling total mixed ration for ruminants: A review. **Agronomy**, [s. l.], vol. 10, n° 6, 2020. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060879>.
- CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; ROSEN, M. J.; HAN, A. W.; JOHNSON, A. J. A.; HOLMES, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, [s. l.], vol. 13, n° 7, p. 581–583, 23 jul. 2016. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- CHEN, H.; WANG, C.; HUASAI, S.; CHEN, A. Effects of dietary forage to concentrate ratio on nutrient digestibility, ruminal fermentation and rumen bacterial composition in Angus cows. **Scientific Reports**, [s. l.], vol. 11, n° 1, 1 dez. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96580-5>.
- CHEN, L.; GUO, G.; YUAN, X.; SHIMOJO, M.; YU, C.; SHAO, T. Effect of Applying Molasses and Propionic Acid on Fermentation Quality and Aerobic Stability of Total Mixed Ration Silage Prepared with Whole-plant Corn in Tibet. **Asian-Australasian Journal of**

Animal Sciences, [s. l.], vol. 27, nº 3, p. 349–356, 1 mar. 2014.
<https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13378>.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details. 1992. **International Feed Research Unit**. [...]. Aberdeen, UK: Rowett Research Institute, 1992. p. 21.

CLAVEL, T.; LEPAGE, P.; CHARRIER, C. The Family Coriobacteriaceae. **The Prokaryotes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 201–238.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-30138-4_343.

COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E.; PITTA, G. V.; ALVES, V. M. C.; HERNANI, L. C. **Cultivo do Milho: Glossário**. [S. l.]: Embrapa Milho e Sorgo, 2010.

COUNOTTE, G. H. M.; LANKHORST, A.; PRINS, R. A. Role of DL-Lactic Acid as an Intermediate in Rumen Metabolism of Dairy Cows¹. **Journal of Animal Science**, [s. l.], vol. 56, nº 5, p. 1222–1235, 1 maio 1983. <https://doi.org/10.2527/jas1983.5651222x>.

DAI, X.; TIAN, Y.; LI, J.; SU, X.; WANG, X.; ZHAO, S.; LIU, L.; LUO, Y.; LIU, D.; ZHENG, H.; WANG, J.; DONG, Z.; HU, S.; HUANG, L. Metatranscriptomic Analyses of Plant Cell Wall Polysaccharide Degradation by Microorganisms in the Cow Rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], vol. 81, nº 4, p. 1375–1386, 15 fev. 2015.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03682-14>.

DER BEDROSIAN, M. C.; NESTOR, K. E.; KUNG, L. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 95, nº 9, p. 5115–5126, set. 2012. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4833>.

DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], vol. 62, nº 4, p. 980–984, ago. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000400030>.

DEUSCH, S.; CAMARINHA-SILVA, A.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U.; RODEHUTSCORD, M.; SEIFERT, J. A Structural and Functional Elucidation of the Rumen Microbiome Influenced by Various Diets and Microenvironments. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], vol. 8, 24 ago. 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01605>.

EUCLIDES FILHO, K.; EUCLIDES, V. P. B.; FIGUEIREDO, G. R.; OLIVEIRA DE, M. D. Evaluation of Nellore animals and their crosses with Charolais, Fleckvieh and Chianina fed three diets; 1: daily weight gain and feed conversion. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s. l.], vol. 26, p. 66–72, 1997. .

FERRARETTO, L. F.; TAYSOM, K.; TAYSOM, D. M.; SHAVER, R. D.; HOFFMAN, P. C. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 97, nº 5, p. 3221–3227, maio 2014. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7680>.

HAO, W.; WANG, H.; XU, C. Dynamic changes of proteolysis and microorganism composition of total mixed ration silages with different moisture levels. **Advances in Energy Science and Equipment Engineering, Proceedings of the International Conference on Energy Equipment Science and Engineering**. [S. l.: s. n.], 2015. p. 269–273.

HAO, Y.; GONG, Y.; HUANG, S.; JI, S.; WANG, W.; WANG, Y.; YANG, H.; CAO, Z.; LI, S. Effects of age, diet CP, NDF, EE, and starch on the rumen bacteria community and function in dairy cattle. **Microorganisms**, [s. l.], vol. 9, n° 8, p. 1788, 23 ago. 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081788>.

HAO, Y.; GUO, C.; GONG, Y.; SUN, X.; WANG, W.; WANG, Y.; YANG, H.; CAO, Z.; LI, S. Rumen fermentation, digestive enzyme activity, and bacteria composition between pre-weaning and post-weaning dairy calves. **Animals**, [s. l.], vol. 11, n° 9, p. 2527, 28 ago. 2021. <https://doi.org/10.3390/ani11092527>.

HARMON, D. L.; SWANSON, K. C. Review: Nutritional regulation of intestinal starch and protein assimilation in ruminants. **Animal**, [s. l.], vol. 14, p. s17–s28, 2020. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003136>.

HOFFMAN, P. C.; ESSER, N. M.; SHAVER, R. D.; COBLENTZ, W. K.; SCOTT, M. P.; BODNAR, A. L.; SCHMIDT, R. J.; CHARLEY, R. C. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 94, n° 5, p. 2465–2474, maio 2011. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3562>.

HRISTOV, A. N.; BANNINK, A.; CROMPTON, L. A.; HUHTANEN, P.; KREUZER, M.; MCGEE, M.; NOZIERE, P.; REYNOLDS, C. K.; BAYAT, A. R.; YÁÑEZ-RUIZ, D. R.; DIJKSTRA, J.; KEBREAB, E.; SCHWARM, A.; SHINGFIELD, K. J.; YU, Z. Invited review: Nitrogen in ruminant nutrition: A review of measurement techniques. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 102, n° 7, p. 5811–5852, jul. 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15829>.

JIANG, F. G.; LIN, X. Y.; YAN, Z. G.; HU, Z. Y.; LIU, G. M.; SUN, Y. D.; LIU, X. W.; WANG, Z. H. Effect of dietary roughage level on chewing activity, ruminal pH, and saliva secretion in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 100, n° 4, p. 2660–2671, abr. 2017. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11559>.

JOBIM, C. C.; NUSSIO, L. G. Princípios básicos da fermentação na ensilagem. **Forragicultura: Ciência, Tecnologia e Gestão dos Recursos Forrageiros**. [S. l.: s. n.], 2013. p. 649–658.

JUNGES, D.; MORAIS, G.; SPOTO, M. H. F.; SANTOS, P. S.; ADESOGAN, A. T.; NUSSIO, L. G.; DANIEL, J. L. P. Short communication: Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 100, n° 11, p. 9048–9051, nov. 2017. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12943>.

KAMINSKY, R. A.; REID, P. M.; ALTERMANN, E.; KENTERS, N.; KELLY, W. J.; NOEL, S. J.; ATTWOOD, G. T.; JANSSEN, P. H. Rumen Lachnospiraceae isolate NK3A20 exhibits metabolic flexibility in response to substrate and coculture with a methanogen. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], vol. 89, n° 10, 31 out. 2023. <https://doi.org/10.1128/aem.00634-23>.

KIBEGWA, F. M.; BETT, R. C.; GACHUIRI, C. K.; MACHUKA, E.; STOMEIO, F.; MUJIBI, F. D. Diversity and functional analysis of rumen and fecal microbial communities associated with dietary changes in crossbreed dairy cattle. **PLOS ONE**, [s. l.], vol. 18, n° 1, p. e0274371, 13 jan. 2023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274371>.

- KLJAK, K.; PINO, F.; HEINRICHS, A. J. Effect of forage to concentrate ratio with sorghum silage as a source of forage on rumen fermentation, N balance, and purine derivative excretion in limit-fed dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 100, n° 1, p. 213–223, jan. 2017. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11383>.
- KUNG, L.; SHAVER, R. D.; GRANT, R. J.; SCHMIDT, R. J. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 101, n° 5, p. 4020–4033, 1 maio 2018. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>.
- LAZZARI, G.; POPPI, A. C. O.; MACHADO, J.; BUENO, A. V. I.; GOMES, A. L. M.; JOBIM, C. C.; DANIEL, J. L. P. Effects of protein source and lipid supplementation on conservation and feed value of total mixed ration silages for finishing beef cattle. **Journal of Animal Science**, [s. l.], vol. 99, n° 2, 1 fev. 2021. DOI 10.1093/jas/skab032. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article/doi/10.1093/jas/skab032/6126771>.
- LI, F.; HITCH, T. C. A.; CHEN, Y.; CREEVEY, C. J.; GUAN, L. L. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal the breed effect on the rumen microbiome and its associations with feed efficiency in beef cattle. **Microbiome**, [s. l.], vol. 7, n° 1, p. 6, 14 dez. 2019. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0618-5>.
- LI, S.; YOON, I.; SCOTT, M.; KHAFIPOUR, E.; PLAIZIER, J. C. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product and subacute ruminal acidosis on production, inflammation, and fermentation in the rumen and hindgut of dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], vol. 211, p. 50–60, jan. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.10.010>.
- LIU, H.; XU, T.; XU, S.; MA, L.; HAN, X.; WANG, X.; ZHANG, X.; HU, L.; ZHAO, N.; CHEN, Y.; PI, L.; ZHAO, X. Effect of dietary concentrate to forage ratio on growth performance, rumen fermentation and bacterial diversity of Tibetan sheep under barn feeding on the Qinghai-Tibetan plateau. **PeerJ**, [s. l.], vol. 7, p. e7462, 5 ago. 2019. <https://doi.org/10.7717/peerj.7462>.
- LIU, J.; XU, T.; ZHU, W.; MAO, S. High-grain feeding alters caecal bacterial microbiota composition and fermentation and results in caecal mucosal injury in goats. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], vol. 112, n° 3, p. 416–427, 14 ago. 2014. <https://doi.org/10.1017/S0007114514000993>.
- LIU, K.; ZHANG, Y.; YU, Z.; XU, Q.; ZHENG, N.; ZHAO, S.; HUANG, G.; WANG, J. Ruminal microbiota–host interaction and its effect on nutrient metabolism. **Animal Nutrition**, [s. l.], vol. 7, n° 1, p. 49–55, mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.12.001>.
- MA, Z. Y.; ZHOU, J. W.; YI, S. Y.; WANG, M.; TAN, Z. L. In vitro inoculation of fresh or frozen rumen fluid distinguishes contrasting microbial communities and fermentation induced by increasing forage to concentrate ratio. **Frontiers in nutrition**, [s. l.], vol. 8, p. 772645, 2021. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.772645>.
- MACHADO, M. G.; DETMANN, E.; MANTOVANI, H. C.; VALADARES FILHO, S. C.; BENTO, C. B. P.; MARCONDES, M. I.; ASSUNÇÃO, A. S. Evaluation of the length of adaptation period for changeover and crossover nutritional experiments with cattle fed

- tropical forage-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], vol. 222, p. 132–148, dez. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.10.009>.
- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS ONE**, [s. l.], vol. 8, n° 4, p. e61217, 22 abr. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, [s. l.], vol. 85, n° 6, p. 1217–1240, 2002. .
- MERTENS, David R.; GRANT, R. J. Digestibility and Intake. **Forages**. [S. l.]: Wiley, 2020. p. 609–631. <https://doi.org/10.1002/9781119436669.ch34>.
- MICHELOTTI, T. C. A.; SILVA, R. A.; CARNEIRO, J. H.; NAVARRO, R. B.; CARVALHO, I. Q.; PAULA, E. M.; FERRARETTO, L. F.; CAETANO, M.; LANNA, D. P. D.; ALMEIDA, R. de. Effect of ensiling time on apparent total tract starch digestibility in Southern Brazilian dairy herds. **Scientia Agricola**, [s. l.], vol. 78, n° 2, 2021. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2019-0096>.
- MIYAJI, M.; NONAKA, K. Effects of altering total mixed ration conservation method when feeding dry-rolled versus steam-flaked hulled rice on lactation and digestion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 101, n° 6, p. 5092–5101, 2018. DOI 10.3168/jds.2017-13802. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13802>.
- MORGAVI, D. P.; KELLY, W. J.; JANSSEN, P. H.; ATTWOOD, G. T. Rumen microbial (meta)genomics and its application to ruminant production. **Animal : an international journal of animal bioscience**, [s. l.], vol. 7 Suppl 1, p. 184–201, mar. 2013. <https://doi.org/10.1017/S1751731112000419>.
- NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], vol. 90, p. E17–E38, jun. 2007. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-478>.
- NRC. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. 8° ed. [S. l.]: National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2016. <https://doi.org/10.17226/1904>.
- OKUDA, H.; FUJII, S.; KAWASHIMA, Y. A direct colorimetric determination of blood ammonia. **Tokushima Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], vol. 12, p. 11–23, 1965.
- PEREIRA, D. H.; PEREIRA, O. G.; DA SILVA, B. C.; LEÃO, M. I.; VALADARES FILHO, S. de C.; CHIZZOTTI, F. H. M.; GARCIA, R. Intake and total and partial digestibility of nutrients, ruminal pH and ammonia concentration and microbial efficiency in beef cattle fed with diets containing sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) silage and concentrate in different ratios. **Livestock Science**, [s. l.], vol. 107, n° 1, p. 53–61, mar. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.09.002>.
- PETRI, R. M.; SCHWAIGER, T.; PENNER, G. B.; BEAUCHEMIN, K. A.; FORSTER, R. J.; MCKINNON, J. J.; MCALLISTER, T. A. Characterization of the Core Rumen Microbiome in Cattle during Transition from Forage to Concentrate as Well as during and after an Acidotic Challenge. **PLoS ONE**, [s. l.], vol. 8, n° 12, p. e83424, 31 dez. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083424>.

- PITTA, D. W.; INDUGU, N.; KUMAR, S.; VECCHIARELLI, B.; SINHA, R.; BAKER, L. D.; BHUKYA, B.; FERGUSON, J. D. Metagenomic assessment of the functional potential of the rumen microbiome in Holstein dairy cows. **Anaerobe**, [s. l.], vol. 38, p. 50–60, abr. 2016. DOI 10.1016/j.anaerobe.2015.12.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996415300913>.
- PLAIZIER, J. C.; LI, S.; DANSCHER, A. M.; DERAKSHANI, H.; ANDERSEN, P. H.; KHAFIPOUR, E. Changes in Microbiota in Rumen Digesta and Feces Due to a Grain-Based Subacute Ruminant Acidosis (SARA) Challenge. **Microbial Ecology**, [s. l.], vol. 74, n° 2, p. 485–495, 8 ago. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0940-z>.
- PUCETTI, P.; VALADARES FILHO, S. de C.; SILVA, J. T. da; OLIVEIRA, K. R. de; SOUZA, G. A. P. de; CIDRINI, F. A.; HOLLERBACH, L. G.; SILVA, B. de C.; RENNO, L. N.; SAMPAIO, C. B.; SWANSON, K. C. Effects of different concentrate levels in AGRI-002E sorghum silage-based diets on nutrient intake and digestibility, ruminal pH and ammonia concentration, ruminal degradability, and microbial efficiency in beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], vol. 315, p. 116026, set. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2024.116026>.
- QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], vol. 41, n° D1, p. D590–D596, 27 nov. 2012. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- RICCI, S.; PACÍFICO, C.; CASTILLO-LOPEZ, E.; RIVERA-CHACON, R.; SCHWARTZ-ZIMMERMANN, H. E.; REISINGER, N.; BERTHILLER, F.; ZEBELI, Q.; PETRI, R. M. Progressive microbial adaptation of the bovine rumen and hindgut in response to a step-wise increase in dietary starch and the influence of phytogetic supplementation. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], vol. 13, 22 jul. 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.920427>.
- SAS INSTITUTE INC. **SAS ® 9.4**. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc, 2010.
- SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], vol. 32, n° 2, p. 199–208, 24 set. 1974. <https://doi.org/10.1079/BJN19740073>.
- SEGATA, N.; IZARD, J.; WALDRON, L.; GEVERS, D.; MIROPOLSKY, L.; GARRETT, W. S.; HUTTENHOWER, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome Biology**, [s. l.], vol. 12, n° 6, p. R60, 24 jun. 2011. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>.
- SHIPANDENI, M. N. T.; PAULA, E. M.; ESPOSITO, G.; FACIOLA, A. P.; RAFFRENATO, E. Effects of starch sources varying in particle sizes on ruminal fermentation, nutrient flow, starch digestibility, and lactation performance of dairy cows. **Journal of Animal Science**, [s. l.], vol. 101, 3 jan. 2023. <https://doi.org/10.1093/jas/skad147>.
- SIEGFRIED, V. R.; RUCKEMANN, H.; STUMPF, G. Eine HPLC-methode zur bestimmung organischer säuren in silagen. **Landwirtschaft Forsch**, [s. l.], vol. 37, n° 1, p. 298–304, 1984. .
- SILVA, B. C.; GODOI, L. A.; VALADARES FILHO, S. C.; ZANETTI, D.; BENEDETI, P. D. B.; DETMANN, E. A suitable enzymatic method for starch quantification in different organic

matrices. **MethodsX**, [s. l.], vol. 6, p. 2322–2328, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.09.040>.

SILVA, B. C.; PACHECO, M. V. C.; GODOI, L. A.; ALHADAS, H. M.; PEREIRA, J. M. V.; RENNÓ, L. N.; DETMANN, E.; PAULINO, P. V. R.; SCHOONMAKER, J. P.; VALADARES FILHO, S. de C. Reconstituted and ensiled corn or sorghum grain: Impacts on dietary nitrogen fractions, intake, and digestion sites in young Nellore bulls. **PLOS ONE**, [s. l.], vol. 15, n° 8, p. e0237381, 7 ago. 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237381>.

SINGHAL, R.; DONDE, H.; GHARE, S.; STOCKE, K.; ZHANG, J.; VADHANAM, M.; REDDY, S.; GOBEJISHVILI, L.; CHILTON, P.; JOSHI-BARVE, S.; FENG, W.; MCCLAIN, C.; HOFFMAN, K.; PETROSINO, J.; VITAL, M.; BARVE, S. Decrease in acetyl-CoA pathway utilizing butyrate-producing bacteria is a key pathogenic feature of alcohol-induced functional gut microbial dysbiosis and development of liver disease in mice. **Gut Microbes**, [s. l.], vol. 13, n° 1, 1 jan. 2021. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1946367>.

STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], vol. 75, n° 1, p. 165–174, 1 maio 2007. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0802-y>.

STEWART, C. S.; BRYANT, M. P. The rumen bacteria. *In*: HOBSON, P. N. (org.). **The rumen microbial ecosystem**. [S. l.]: Elsevier Science Publishers Ltda, 1988. p. 21–73.

THOETKIATTIKUL, H.; MHUANTONG, W.; LAOTHANACHAREON, T.; TANGPHATSORNRUANG, S.; PATTARAJINDA, V.; EURWILAICHITR, L.; CHAMPREDA, V. Comparative analysis of microbial profiles in cow rumen fed with different dietary fiber by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing. **Current Microbiology**, [s. l.], vol. 67, n° 2, p. 130–137, 8 ago. 2013. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0336-3>.

VALADARES FILHO, S. C.; SILVA, L. F. C. e; GIONBELLI, M. P.; ROTTA, P. P.; MARCONDES, M. I.; CHIZZOTTI, M. L.; PRADOS, L. F. **Exigências Nutricionais de Zebuínos Puros e Cruzados - BR-CORTE**. Editora UF. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2016. vol. 3,. <https://doi.org/10.5935/978-85-8179-111-1.2016B001>.

VAN GYLSWYK, N. O. *Succiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a Ruminal Bacterium Converting Succinate to Propionate as the Sole Energy-Yielding Mechanism. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [s. l.], vol. 45, n° 2, p. 297–300, 1 abr. 1995. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-2-297>.

WANG, S.; CHAI, J.; ZHAO, G.; ZHANG, N.; CUI, K.; BI, Y.; MA, T.; TU, Y.; DIAO, Q. The Temporal Dynamics of Rumen Microbiota in Early Weaned Lambs. **Microorganisms**, [s. l.], vol. 10, n° 1, p. 144, 11 jan. 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010144>.

YUAN, X.; GUO, G.; WEN, A.; DESTA, S. T.; WANG, J.; WANG, Y.; SHAO, T. The effect of different additives on the fermentation quality, in vitro digestibility and aerobic stability of a total mixed ration silage. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], vol. 207, p. 41–50, set. 2015. DOI 10.1016/j.anifeedsci.2015.06.001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840115001856>.

ZHANG, X.; WANG, H.; GUO, X. Comparative analysis of rumen fermentation parameters and bacterial profiles during adaption to different fattening stages in beef cattle fed TMR with various forage silage. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], vol. 278, n° February, p. 115006, ago. 2021. DOI 10.1016/j.anifeedsci.2021.115006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115006>.

ZHANG; ZHAO; CHEN; ZHOU; MENG; WU. Effects of Adding Various Silage Additives to Whole Corn Crops at Ensiling on Performance, Rumen Fermentation, and Serum Physiological Characteristics of Growing-Finishing Cattle. **Animals**, [s. l.], vol. 9, n° 9, p. 695, 17 set. 2019. <https://doi.org/10.3390/ani9090695>.

ZHAO, W.; ABDELSATTAR, M. M.; WANG, X.; ZHANG, N.; CHAI, J. In vitro modulation of rumen fermentation by microbiota from the recombination of rumen fluid and solid phases. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], vol. 11, n° 1, 14 fev. 2023. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03387-22>.

8. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1 supl. Proporção dos ingredientes, composição química, perfil fermentativo e caracterização microbiológica das dietas experimentais antes da ensilagem.

Item	Proporção dos ingredientes (%MS)			
	TMRn 80:20	TMRn 20:80	TMRs 80:20	TMRs 20:80
Silagem de milho	80,00	20,00	80,00	20,00
Farelo de milho	13,63	70,54	13,63	70,54
Farelo soja	2,46	5,54	2,46	5,54
Ureia/S.A.	0,91	0,91	0,91	0,91
Núcleo Mineral	3,00	3,00	3,00	3,00
Composição química (g/kg MS)				
MS (g/kg MN)	253,4	542,1	249,8	568,7
Matéria Mineral	72,2	60,3	61,2	45,3
Proteína Bruta	109,9	118,7	98,1	119,2
Extrato Etéreo	27,5	34,3	31,5	32,1
FDNcp	438,1	179,5	462,3	128,8
Amido	293,5	549,2	280,3	555,4
CNF	352,2	601,3	340,3	668,3
NDT	703,8	837,2	693,6	866,1
CSA	112,3	93,9	152,2	146,6
N-NH ₃ (g/kg N total)	148,1	151,3	169,1	140,2
pH	6,1	6,0	6,2	6,1
Populações microbianas (log UFC/g forragem)				
BAL	6,49	6,67	6,59	6,98
Enterobactérias	5,21	5,05	5,33	5,07
Mofos	5,37	5,99	5,35	4,97
Leveduras	5,61	5,63	4,99	4,33

¹: g/kg MS, MS: matéria seca, MN: matéria natural, ureia/S.A.: ureia mais sulfato de amônio, FDNcp: fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína, CNF: carboidratos não fibrosos, NDT: nutrientes digestíveis totais, CSA: carboidratos solúveis em água, N: nitrogênio, BAL: bactérias do ácido lático, UFC: unidades formadoras de colônia. TMRn 80:20, ração em mistura total não ensilada 80:20; TMRn 20:80, ração em mistura total não ensilada 20:80; TMRs 80:20, silagem de ração em mistura total 80:20, TMRs 20:80, silagem de ração em mistura total 20:80

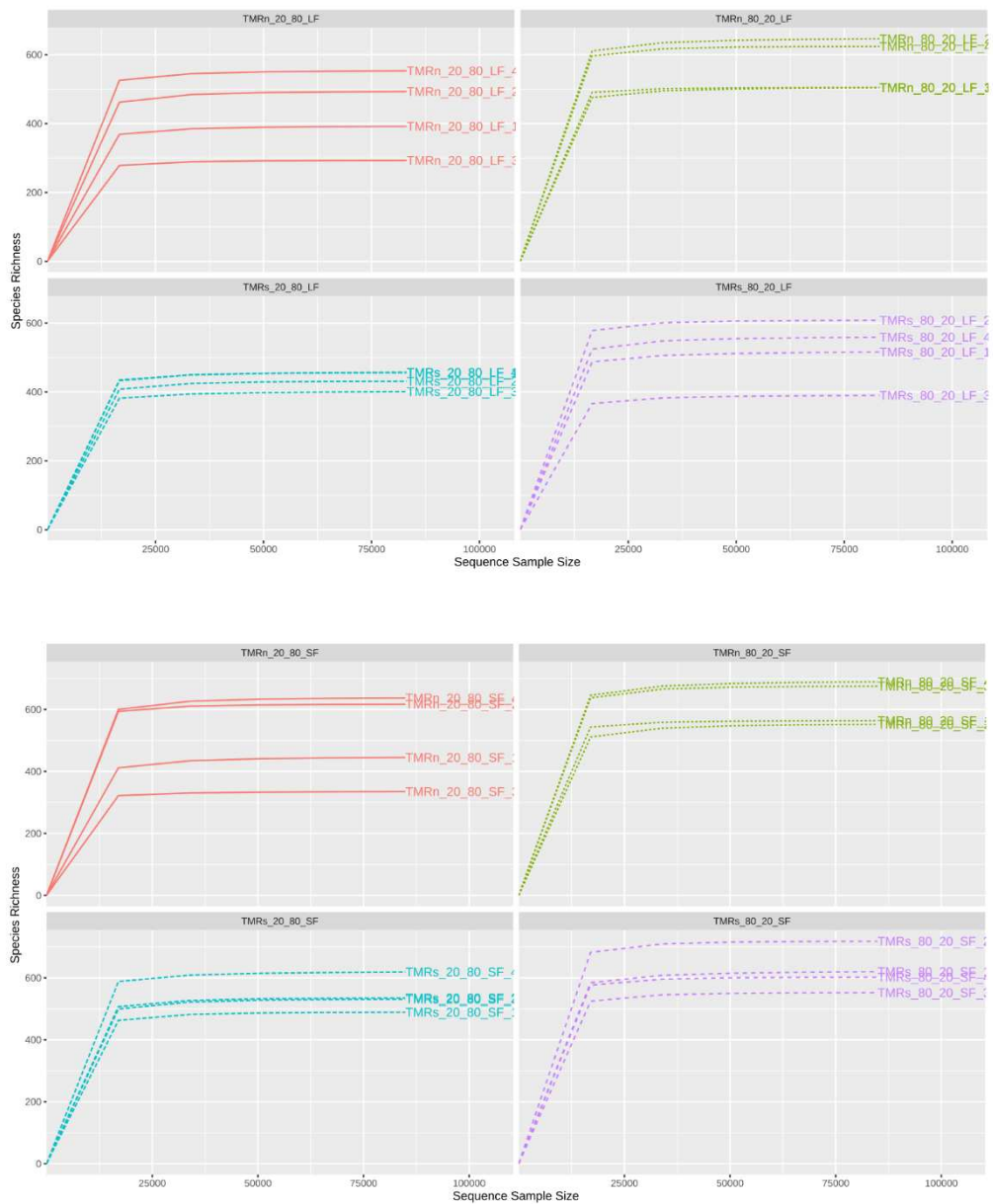


Figura 1 supl. Cobertura de Goods, para todas as amostras excederam 99% indicando precisão e a reprodutibilidade do sequenciamento.

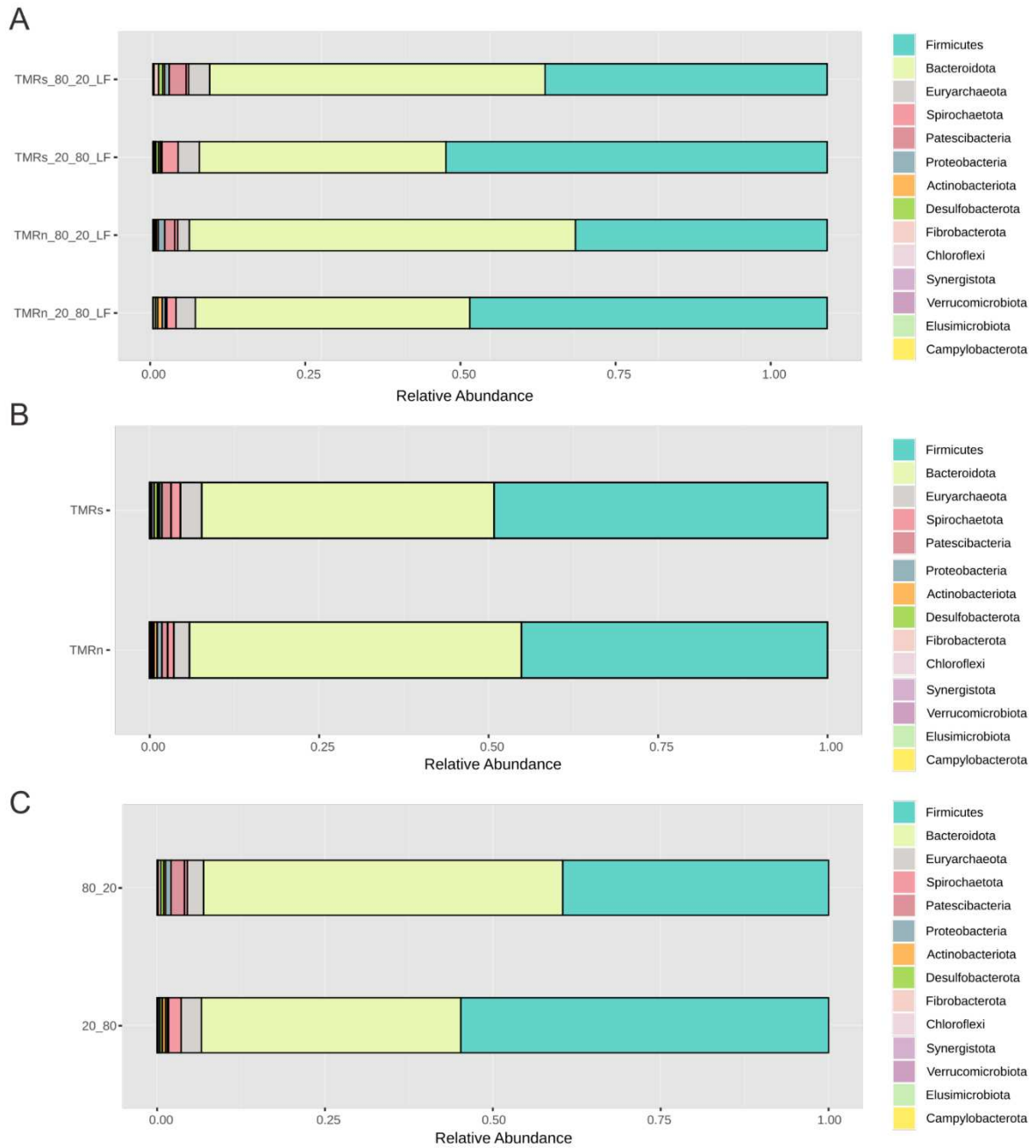


Figura 2 supl. Comunidade bacteriana da fase líquida de líquido ruminal a nível de filo. **A.** representa a abundância relativa dos filios quando todos os tratamentos são considerados; **B.** representa a abundância relativa dos filios considerando o tipo de processamento (não ensilada ou ensilada); e **C.** representa a abundância relativa dos filios considerando a relação volumoso:concentrado (20:80 ou 80:20).

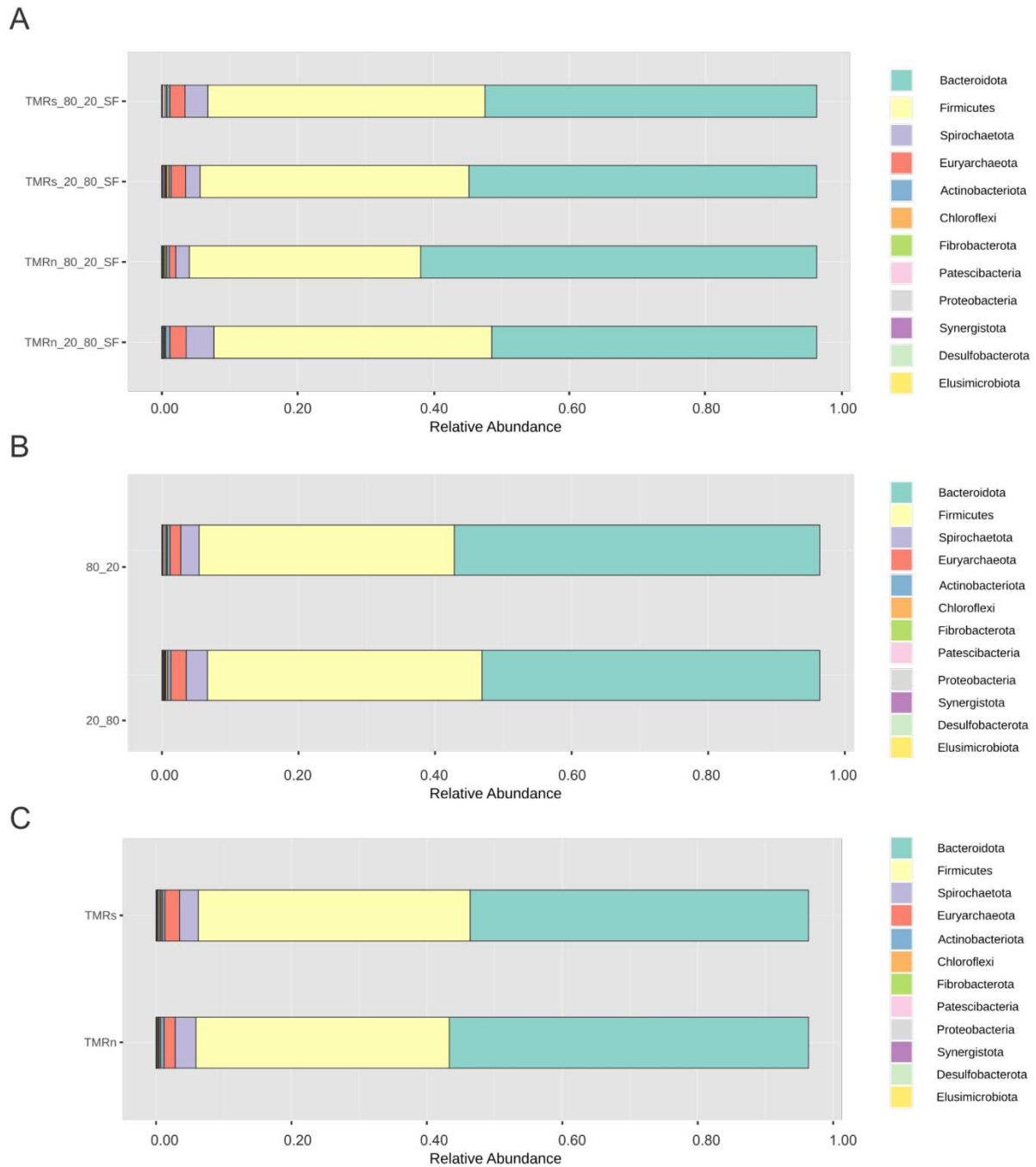


Figura 3 supl. Comunidade bacteriana da fase sólida de líquido ruminal a nível de filo. **A.** representa a abundância relativa dos filós quando todos os tratamentos são considerados; **B.** representa a abundância relativa dos filós considerando o tipo de processamento (não ensilada ou ensilada); e **C.** representa a abundância relativa dos filós considerando a relação volumoso:concentrado (20:80 ou 80:20).

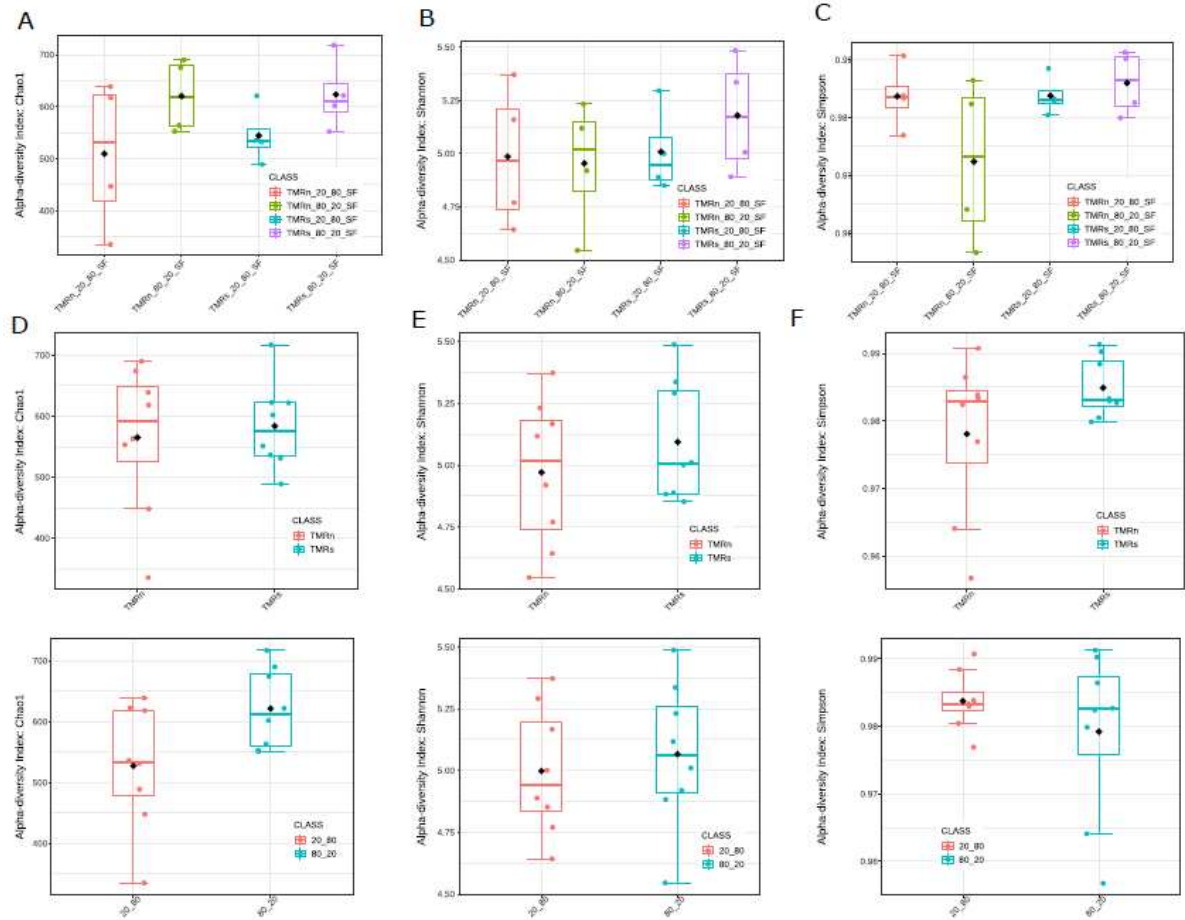


Figura 4 supl. Alfa diversidade. Índices de Chao, Shannon e Simpson para a fase sólida. **A** representa a Alfa diversidade quando todos os tratamentos são comparados; **B**. representa a Alfa diversidade quando são comparados os tipos de processamento da TMR (não ensilada ou ensilado); e **C**. representa a Alfa diversidade quando são comparados as diferentes relações volumoso:concentrado.

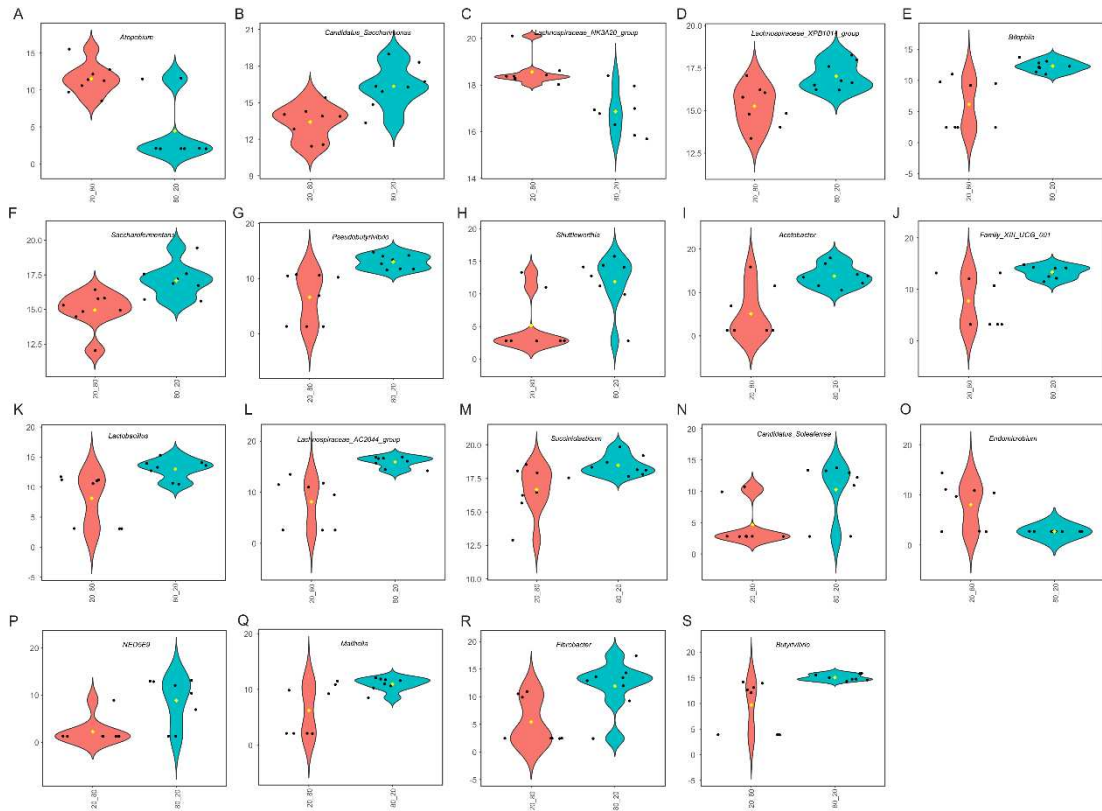


Figura 3 supl. Gráficos boxplot análise de Lefse

Tabela 2 supl. Discriminação das ASVs do Diagrama de Venn que são compartilhadas entre os tratamentos e aquelas que são exclusivas de cada grupo para a fase líquida.

		Fase líquida				
	Compartilhado entre todos		TMR 20:80	TMR 80:20	TMRs	TMRn
<i>Prevotella</i>	Family XIII AD3011 group	<i>[Eubacterium] ventriosum</i> group	UCG-001	<i>Shuttleworthia</i>	UCG-001	<i>Lachnospiraceae</i> UCG-009
NA	CAG-352	<i>Lachnospiraceae</i> FE2018 group	<i>Olsenella</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Catenisphaera</i>	<i>Endomicrobium</i>
<i>Rikenellaceae</i> RC9 gut group	FD2005	probable genus 10	<i>Enterorhabdus</i>	<i>Lachnospiraceae</i> NK4A136 group	NED5E9	<i>Anaerospobacter</i>
<i>Christensenellaceae</i> R-7 group	<i>Anaerovorax</i>	<i>Amnipila</i>	<i>Atopobium</i>	<i>Prevotellaceae</i> Ga6A1 group	<i>Elusimicrobium</i>	<i>Candidatus Soleaferrea</i>
NK4A214 group	<i>Lachnospiraceae</i> ND3007 group	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Endomicrobium</i>	possible genus Sk018	<i>Anaerofustis</i>	<i>[Eubacterium] siraeum</i> group
<i>Lachnospiraceae</i> NK3A20 group	UCG-002	Family XIII UCG-001	<i>Anaerospobacter</i>	<i>Lachnospiraceae</i> UCG-009	EMP-G18	<i>Lachnospiraceae</i> UCG-010
<i>Ruminococcus</i>	<i>Marvinbryantia</i>	<i>Methanospaera</i>	<i>Sphaerochaeta</i>	NED5E9	<i>Quinella</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i> UCG-008
<i>Succiniclasticum</i>	UCG-005	<i>Alloprevotella</i>	<i>Pseudoramibacter</i>	<i>Candidatus Soleaferrea</i>	<i>Ruminobacter</i>	<i>Sphaerochaeta</i>
<i>Prevotellaceae</i> UCG-003	<i>Papillibacter</i>	<i>Monoglobus</i>	<i>Ruminobacter</i>	<i>Bilophila</i>	<i>Suttonella</i>	<i>Pseudoramibacter</i>
<i>Treponema</i>	<i>[Eubacterium] ruminantium</i> group	<i>Coprococcus</i>		<i>[Eubacterium] siraeum</i> group		<i>Oscillospira</i>
UCG-004	<i>Anaerovibrio</i>	<i>Lachnospiraceae</i> UCG-002		<i>Elusimicrobium</i>		<i>Bacteroides</i>
<i>Saccharofermentans</i>	<i>Mogibacterium</i>	<i>Lachnospiraceae</i> UCG-008		<i>Anaerofustis</i>		
<i>Prevotellaceae</i> NK3B31 group	<i>[Eubacterium] hallii</i> group	<i>Lachnospiraceae</i> UCG-006		EMP-G18		
<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Veillonellaceae</i> UCG-001	<i>[Eubacterium] saphenum</i> group		<i>Limosilactobacillus</i>		
SP3-e08	<i>[Eubacterium] nodatum</i> group	<i>[Eubacterium] brachy</i> group		<i>Liquorilactobacillus</i>		
<i>Acetitomaculum</i>	DNF00809	<i>Corynebacterium</i>		<i>Tyzzera</i>		
<i>[Ruminococcus] gauvreauii</i> group	<i>Syntrophococcus</i>	<i>Sediminispirochaeta</i>		<i>Porphyromonas</i>		
<i>Lachnospiraceae</i> XPB1014 group	<i>Flexilinea</i>	<i>Fretibacterium</i>		<i>CPla-4</i> termite group		
U29-B03	<i>[Anaerorhabdus] furcosa</i> group	<i>Desulfovibrio</i>		<i>Suttonella</i>		
<i>Prevotellaceae</i> UCG-001	<i>Oribacterium</i>	<i>Enterorhabdus</i>		<i>Clostridium sensu stricto</i> 12		
<i>Candidatus Saccharimonas</i>	<i>Blautia</i>	<i>[Eubacterium] ventriosum</i> group		<i>Comamonas</i>		
<i>Moryella</i>	<i>Defluviitaleaceae</i> UCG-011	<i>Lachnospiraceae</i> FE2018 group				

Tabela 3 supl. Discriminação das ASVs do Diagrama de Venn que são compartilhadas entre os tratamentos e aquelas que são exclusivas de cada grupo para a fase sólida.

			Fase sólida			
Compartilhado entre todos			TMR 20:80	TMR 80:20	TMRs	TMRn
<i>Prevotella</i>	<i>Papillibacter</i>	<i>Lachnospiraceae</i> UCG-002	UCG-001	<i>Shuttleworthia</i>	<i>Mycoplasma</i>	<i>Olsenella</i>
NA	[<i>Eubacterium</i>] ruminantium group	<i>Lachnospiraceae</i> UCG-008	<i>Olsenella</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Lachnospiraceae</i> UCG-009	<i>Corynebacterium</i>
<i>Rikenellaceae</i> RC9 gut group	<i>Anaerovibrio</i>	<i>Lachnospiraceae</i> UCG-006	<i>Succinivibrionaceae</i> UCG-002	<i>Lachnospiraceae</i> NK4A136 group	<i>Endomicrobium</i>	<i>Howardella</i>
<i>Christensenellaceae</i> R-7 group	<i>Butyrivibrio</i>	<i>Atopobium</i>	<i>Sharpea</i>	<i>Lachnospiraceae</i> UCG-009	<i>Lachnoclostridium</i>	[<i>Eubacterium</i>] xylanophilum group
NK4A214 group	<i>Lachnospiraceae</i> AC2044 group	[<i>Eubacterium</i>] saphenum group	<i>Corynebacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Colidextribacter</i>	GCA-900066575
<i>Lachnospiraceae</i> NK3A20 group	<i>Mogibacterium</i>	<i>Pyramidobacter</i>	<i>Endomicrobium</i>	<i>Lachnoclostridium</i>	<i>Candidatus</i> Soleaferrea	
<i>Ruminococcus</i>	[<i>Eubacterium</i>] hallii group	[<i>Eubacterium</i>] brachy group	UCG-009	<i>Colidextribacter</i>	<i>Lachnospiraceae</i> UCG-010	
<i>Succiniclasticum</i>	<i>Veillonellaceae</i> UCG-001	<i>Raoultibacter</i>	<i>Lachnospiraceae</i> UCG-010	NED5E9	<i>Pseudoramibacter</i>	
<i>Prevotellaceae</i> UCG-003	[<i>Eubacterium</i>] nodatum group	<i>Erysipelotrichaceae</i> UCG-008	<i>Prevotellaceae</i> YAB2003 group	[<i>Eubacterium</i>] siraeum group	p-1088-a5 gut group	
<i>Treponema</i> UCG-004	<i>Amnipila</i>	DNF00809		<i>Anaerofustis</i>	p-1088-a5 gut group	
<i>Saccharofermentans</i>	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Syntrophococcus</i>		GCA-900066575		
<i>Prevotellaceae</i> NK3B31 group	<i>Prevotellaceae</i> Ga6A1 group	<i>Flexilinea</i>				
<i>Methanobrevibacter</i> SP3-e08	Family XIII UCG-001	[<i>Anaerorhabdus</i>] furcosa group		<i>Desulfobulbus</i>		
<i>Acetitomaculum</i> [Ruminococcus] gauvreauii group	<i>Methanospaera</i>	<i>Oribacterium</i>		<i>Eubacterium</i>		
<i>Lachnospiraceae</i> XPB1014 group	<i>Monoglobus</i>	<i>Blautia</i>				
Family XIII AD3011 group	<i>Coproccoccus</i>	<i>Fibrobacter</i>				
CAG-352	<i>Anaeroplasmia</i>	<i>Defluviitaleaceae</i> UCG-011				
FD2005	<i>Enterorhabdus</i>	[<i>Eubacterium</i>] ventriosum group				
<i>Anaerovorax</i>	U29-B03	<i>Lachnospiraceae</i> FE2018 group				
<i>Lachnospiraceae</i> ND3007 group	<i>Prevotellaceae</i> UCG-001	probable genus 10				
	<i>Candidatus</i>	<i>Prevotellaceae</i> UCG-004				
	<i>Saccharimonas</i>	UCG-005				
	<i>Moryella</i>	<i>Marvinbryantia</i>				
	UCG-002					

CONCLUSÃO GERAL

Baseados nos resultados obtidos nesta tese, concluímos:

1. A utilização de núcleo mineral com inclusão de monensina não afeta o processo fermentativo de silagens de TMR, contribuindo para a redução da população de fungos filamentosos e leveduras nas silagens. O inoculante a base de *L. buchneri* avaliado proporciona menor concentração de amônia e favoreceu a DIVFDN. Desta forma, a ensilagem da TMR, pode ser realizada com a inclusão de monensina na dieta, associada a presença de inoculante microbiano a base de *L. buchneri*.
2. A proporção de concentrado na dieta proporciona impacto positivo no consumo e na digestibilidade da maioria dos nutrientes, sem comprometer a fermentação ruminal. Por outro lado, a ausência de efeito entre as TMR ensiladas ou não sobre o consumo e a digestibilidade da maioria dos nutrientes evidencia a qualidade do processo de ensilagem, tornando-se uma alternativa de conservação de alimentos, além de facilitar a operação de alimentação animal nas propriedades. Além disso, as dietas com TMR ensilada melhoraram a digestibilidade do amido, o que pode contribuir para aumento da eficiência alimentar dos animais. A abundância relativa dos táxons bacterianos a nível de gênero, na fase líquida e sólida, mostrou predominância de *Prevotella*, *Rikenellaceae_RC9_gut_group* e *Christensenellaceae_R7_group* para todos os tratamentos analisados.