

**VINICIUS DA SILVA SANTOS**

**SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR E DE MILHO ENSILADAS NA FORMA DE  
RAÇÃO TOTAL TRATADAS COM ADITIVOS QUÍMICOS E BACTERIANOS**

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: Sebastião C. Valadares Filho

Karina Guimaraes Ribeiro

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

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

T

Santos, Vinícius da Silva, 1994-  
S237s Silagens de cana-de-açúcar e de milho ensilados na forma  
2023 de ração total tratadas com aditivos químicos e bacterianos /  
Vinícius da Silva Santos. – Viçosa, MG, 2023.  
1 tese eletrônica (134 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Odilon Gomes Pereira.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Zootecnia, 2023.  
Referências bibliográficas: f. 19-23.  
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.253>  
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Rações - Aditivos. 2. Cana-de-açúcar - Silagem.  
3. Milho - Silagem. 4. Digestibilidade. 5. Micro-organismos.  
I. Pereira, Odilon Gomes, 1960-. II. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 636.0855

**VINICIUS DA SILVA SANTOS**

**SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR E DE MILHO ENSILADAS NA FORMA DE  
RAÇÃO TOTAL TRATADAS COM ADITIVOS QUÍMICOS E INOCULANTE  
BACTERIANO**

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: 20 de dezembro de 2023

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 **VINICIUS DA SILVA SANTOS**  
Data: 22/03/2024 18:39:23-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

---

**Vinicius da Silva Santos**  
(Autor)

Documento assinado digitalmente  
 **ODILON GOMES PEREIRA**  
Data: 26/03/2024 08:20:08-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

---

**Odilon Gomes Pereira**  
(Orientador)

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Débora e Milton,*

*Por terem me dado à vida e por hoje serem*

*A minha vida. Por todo amor, carinho e dedicação...*

*Dedico*

*“Paciência e Perseverança tem o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem.”*

Jhon Quincy Adams

## **AGRADECIMENTOS**

A palavra gratidão sempre esteve presente na minha vida, principalmente porque não se chega em lugar algum sem ajuda, mesmo uma palavra de incentivo faz toda a diferença, por isso só tenho a agradecer:

A “Deus” pela vida, por cuidados dos meus passos, incentivo e força.

Aos meus pais Nilton e Débora pelo exemplo de força, coragem e pelo apoio e amor incondicional.

À minha irmã Anna Carolina pelo apoio, amor incondicional e amizade.

À minha família por sempre acreditarem em mim, não me deixarem desistir e assistência em todos os momentos, principalmente nos momentos de dificuldade.

Aos professores da Universidade Federal da Paraíba pelos conhecimentos ministrados e contribuições.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Zootecnia, e a todos os professores pelos conhecimentos ministrados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa e auxílio na execução do projeto.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao INCT-CA pelo financiamento parcial desta pesquisa.

Ao professor Odilon Gomes Pereira pela orientação, pela confiança e por todo o apoio para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca, pela disponibilidade do tempo, sugestões e pelas colaborações relacionadas ao trabalho.

Aos colegas e irmãos científicos do laboratório de Forragicultura e do Laboratório de Nutrição Animal, estagiárias Giovanna e Ana Laura pela amizade e auxílio na execução do trabalho, conselhos, apoio e acima de tudo pela amizade. Aos Funcionários do Departamento de Zootecnia, Mauro (em memória), Pinguim, Zé Flavio, Mario pela colaboração e auxílio sempre que necessário.

Aos meus amigos de graduação Alberto, Thaiano, Silas, Pedro pelo carinho apoio e amizade.

Aos animais utilizados nos meus dois experimentos aqueles por quem eu sempre tive o maior respeito, carinho e cuidado durante todo o tempo que trabalhamos juntos.

Queria agradecer à todos os funcionais do DZO/UFV pelo carinho, pelas de apoio e consideração durante todos esses anos.

À todos que torceram por mim durante essa trajetória, o meu mais sincero

**Muito Obrigado !!!**

## **BIOGRAFIA**

Vinicius da Silva Santos, filho de Debora Melquiades Silva Oliveira e Nilton José dos Santos, nasceu em 08 de junho de 1994, em Bom Jesus da Lapa - BA.

Em dezembro de 2011 concluiu o ensino médio na escola Centro Integrado de Ensino Continuo. Em março de 2012 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal da Paraíba - Areia, Participou do programa de iniciação científica do CNPq por três anos consecutivos de 2013 à 2016, onde na oportunidade participou de diversos trabalhos envolvendo nutrição de ruminantes e na área de conservação de silagens, concluindo o curso de graduação em janeiro de 2017, na oportunidade recebeu prêmio de láurea acadêmica de aluno destaque de Zootecnia. Em março de 2017 ingressou na pós-graduação no nível mestrado em Zootecnia, no curso de Pós-Graduação em Zootecnia, pela Universidade Federal de Viçosa-MG, obtendo Título no nível mestrado em Zootecnia em fevereiro do ano de 2019.

## RESUMO

SANTOS, Vinicius da Silva, D. SC., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2022. **Silagens de cana-de-açúcar e de milho ensiladas na forma de ração total tratadas com aditivos químicos e inoculante bacteriano.** Orientador: Odilon Gomes Pereira. Coorientadores: Sebastião de Campos Valadares Filho e Karina Guimarães Ribeiro

Esta tese foi dividida em quatro capítulos. **Capítulo 1** - Foi usado o delineamento quadrado latino (DQL) 4x4, com 4 dietas, 4 animais e 4 períodos experimentais, enquanto que para os bags foi avaliado no delineamento inteiramente casualizado (DIC) 4x4 com 4 tratamentos e 4 repetições. Objetivou-se avaliar os efeitos da ensilagem de cana-de-açúcar tratada com óxido de cálcio, ureia e inoculante microbiano sobre as populações microbianas, composição química, perfil fermentativo, perdas de matéria seca e estabilidade aeróbica após 90 dias de fermentação, bem como o consumo e a digestibilidade de nutrientes e os parâmetros ruminais em bovinos de corte. Os tratamentos foram: Tratamento 1- Silagem de cana-de-açúcar Controle (Sem aditivos), Tratamento 2 – Silagem de cana-de-açúcar inoculada com Lalsil cana (*Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition) Tratamento 3 – Silagem de cana-de-açúcar 10g/kg de óxido de cálcio com base na matéria natural Tratamento 4 – Silagem de cana-de-açúcar com 10g/kg de ureia com base na matéria natural. Os maiores valores de MS foram observados para as silagens tratadas com Cal. Houve efeito para DMS, DFDN, DEE, DCNF e NDT. Foi observado maior DMS e DFDN para Cal, em comparação as dietas controle e lalsil. As silagens tratadas com cal e ureia apresentaram maiores valores de DCNF e NDT que as dietas controle e lalsil. As silagens com inclusão de cal apresentaram valores da fração solúvel da MS e da MO superiores a silagem controle. A aplicação de 10g/kg de óxido de cálcio promoveu a melhor preservação da matéria seca e carboidratos solúveis, reduzindo o teor de FDNcp das silagens de cana-de-açúcar, promoveu melhorias na digestibilidade *in situ* da MS com aumento da fração solúvel, maior digestibilidade *in vivo* da MS, FDN, CNF e NDT sem alterações no consumo animal. Portanto recomenda-se a aplicação de 10g/kg MS de óxido de cálcio em silagens de cana. **Capítulo 2** Foi usado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), 4x5. O modelo incluiu os efeitos fixos de silagem, inoculante e da interação silagem × inoculante.

Objetivou-se avaliar os efeitos da ensilagem de milho na forma de ração mista total (TMR) inoculada ou não, sobre composição química, perfil fermentativo e estabilidade aeróbia após 90 dias de fermentação. Além disso, avaliar a diversidade microbiana das silagens de milho preparadas na forma de ração em mistura total (TMR) na presença ou não do inoculante. Foram avaliados os seguintes tratamentos: Tratamento 1 – Controle (Silagem de milho convencional sem adição de inoculante) ; Tratamento 2 – Silagem de milho inoculada com LalSil AS; Tratamento 3 – Silagem de milho TMR (Sem inoculante); Tratamento 4 – Silagem de milho TMR inoculada com Lalsil AS. Houve efeito de silagem para MS, MO, MM e lignina, houve efeito interativo inoculante x silagem (IxS) para PB, FDNcp, NIDA, NNP, CNF e FDA. Houve efeito significativo para EA, com efeito de silagem. As silagens TMRs inoculadas e não inoculadas com lalsil permaneceram estáveis durante todas as 168 horas de avaliação do experimento. A adição do inoculante microbiano aumentou a população de bactérias lácticas e reduziu a população de leveduras em silagens de milho após 90 dias de fermentação, entretanto, não alterou a estabilidade aeróbia. Não se faz necessário a aplicação de Lalsil AS em silagens TMRs de milho, tendo as silagens apresentado alta estabilidade aeróbia com menores perdas de MS e preservação de carboidratos solúveis, com solubilidade do amido. A aplicação do inoculante aumentou a abundância relativa do gênero *Lactobacillaceae* e as silagens TMRs tiveram aumento na abundância relativa principalmente na população de *Weissella* e *Lactiplantibacillus*. A silagem de ração total de milho sem adição do inoculante microbiano propicia melhorias no perfil fermentativo e estabilidade aeróbia. **Capítulo 3** – Utilizou-se o delineamento experimental em quadrado latino  $4 \times 4$ , arranjado em esquema fatorial  $2 \times 2$ . Objetivou-se avaliar os efeitos da ensilagem de milho na forma de ração mista total (TMR) inoculada ou não com *L. buchneri*, sobre parâmetros ingestivos, digestivos e ruminais de bovinos. Foram avaliados os seguintes tratamentos: Tratamento 1 - Controle -; Tratamento 2 – Silagem de milho inoculada com LalSil AS; Tratamento 3 – Silagem de milho TMR (Sem inoculante); Tratamento 4 – Silagem de milho TMR inoculada com Lalsil AS. Houve efeito de silagem sobre CFDN (kg/dia), tendo as silagens TMRs apresentado menor consumo em comparação com as silagens convencionais, independente da aplicação do inoculante. Os animais alimentados com as silagens TMRs apresentaram maior digestibilidade da MS, PB, CNF, amido e NDT, independente da inclusão do inoculante. Houve efeito interativo entre silagem e inoculante para DMO, com as silagens TMRs inoculadas apresentando maiores valores de

digestibilidade. Houve efeito de silagem para a fração 'a' da MS e MO, as silagens TMRs apresentaram maior fração solúvel não diferindo quanto a presença do inoculante. No ensaio com bovinos a silagem TMR de milho apresentou maior digestibilidade da MS e nutrientes, principalmente CNF incluindo o amido. silagem de ração total de milho sem adição do inoculante microbiano favoreceu a digestibilidade de MS e outros nutrientes, principalmente CNF e amido, constituindo-se em vantagem prática no fornecimento diário das dietas. **Capítulo 4** - Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) 6x4 com 6 tratamentos e 4 repetições. Objetivou-se avaliar os efeitos da ensilagem de cana-de-açúcar em diferentes relações volumoso/concentrado, sobre as populações microbianas, composição química, perfil fermentativo e estabilidade aeróbia após 90 dias fermentação. Foram avaliados: Tratamento 1 Controle - Silagem de Cana-de-açúcar convencional (Sem inoculante), Tratamento 2 20/80 – Silagem de Ração mista total de Cana-de-açúcar na relação volumoso/concentrado 20/80; Tratamento 3 40/60 – Silagem de Ração mista total de Cana-de-açúcar na relação volumoso/concentrado 40/60; Tratamento 4 60/40 – Silagem de Ração mista total de Cana-de-açúcar na relação volumoso/concentrado 60/40; Tratamento 5 80/20 – Silagem de Ração mista total de Cana-de-açúcar na relação volumoso/concentrado 80/20; Tratamento 6 Lalsil - Silagem de Cana-de-açúcar inoculada com Lalsil Cana (*Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition). Houve efeito para pH, N-NH<sub>3</sub>, BAL e LEV (p<0,05) após 90 dias de ensilagem. Foi observado efeito significativo (p<0,05), com as silagens 20/80 apresentando maior teor de MS seguidas por 40/60, 60/40, 80/20, Controle e Lalsil sendo que essas últimas não diferiram entre si. As silagens Controle e Lalsil (p<0,05) apresentaram maior valor de FDN. As silagens 60/40, apresentaram maior número de horas de estabilidade (p<0,05) que as silagens 80/20, Controle e Lalsil. Houve efeito significativo (p<0,05) As silagens 60/40 apresentaram menor temperatura máxima que Lalsil, as silagens. As silagens TMRs na proporção 40/60, 60/40 e 80/20, apresentaram maior estabilidade aeróbia. Portanto recomenda-se a ensilagem de cana-de-açúcar na forma de ração mista total de cana-de-açúcar com inclusão de até 60% de concentrado sem adição de inoculante para melhorias na estabilidade aeróbia.

Palavras-chave: Abundância relativa. Concentrado. Digestibilidade. Microrganismos. TMR. 16S rRNA.

## ABSTRACT

SANTOS, Vinicius da Silva, D. SC., Federal University of Viçosa, May 2022. **Sugarcane and corn silages ensiled as total mixed ration treated with chemical additives and bacterial inoculant.** Adviser: Odilon Gomes Pereira. Co-advisors: Sebastião de Campos Valadares Filho and Karina Guimarães Ribeiro

This thesis was divided into four chapters. Chapter 1 - The 4x4 Latin square design (DQL) was used, with 4 diets, 4 animals and 4 experimental periods, while for the bags it was evaluated in the 4x4 completely randomized design (DIC) with 4 treatments and 4 replications. The objective of this study was to evaluate the effects of sugarcane silage treated with calcium oxide, urea and microbial inoculant on microbial populations, chemical composition, fermentative profile, dry matter losses and aerobic stability after 90 days of fermentation, as well as nutrient intake and digestibility and rumen parameters in beef cattle. The treatments were: Treatment 1 - Sugarcane silage Control (No additives), Treatment 2 - Sugarcane silage inoculated with Lalsil sugarcane (*Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition) Treatment 3 - Sugarcane silage -sugar 10g/kg of calcium oxide based on natural material Treatment 4 – Sugarcane silage with 10g/kg of urea based on natural material. The highest DM values were observed for silages treated with Lime. There was an effect for DMS, DFDN, DEE, DCNF and NDT. Higher DMS and DFDN were observed for Cal, compared to the control and lalsil diets. Silages treated with lime and urea showed higher DCNF and TDN values than the control and lalsil diets. The silages with lime inclusion presented values of the soluble fraction of DM and OM higher than the control silage. The application of 10g/kg of calcium oxide promoted better preservation of dry matter and soluble carbohydrates, reducing the NDFcp content of sugarcane silages, promoting improvements in the in situ digestibility of DM with an increase in the soluble fraction, greater in vivo digestibility of DM, NDF, CNF and TDN without changes in animal consumption. Therefore, it is recommended to apply 10g/kg DM of calcium oxide to sugarcane silages. **Chapter 2** – A completely randomized design (DIC), 4x5, was used. The model included the fixed effects of silage, inoculant and the silage × inoculant interaction. The objective was to evaluate the effects of corn silage in the form of total mixed ration (TMR), inoculated or not, on

chemical composition, fermentative profile and aerobic stability after 90 days of fermentation. Furthermore, evaluate the microbial diversity of corn silages prepared as total mixed feed (TMR) in the presence or absence of the inoculant. The following treatments were evaluated: Treatment 1 – Control (Conventional corn silage without addition of inoculant); Treatment 2 – Corn silage inoculated with LalSil AS; Treatment 3 – TMR corn silage (without inoculant); Treatment 4 – TMR corn silage inoculated with Lalsil AS. There was a silage effect for MS, MO, MM and lignin, there was an interactive effect of inoculant x silage (IxS) for CP, NDFcp, NIDA, NNP, CNF and FDA. There was a significant effect for EA, with a silage effect. The TMR silages inoculated and not inoculated with lalsil remained stable throughout the 168 hours of evaluation of the experiment. The addition of the microbial inoculant increased the population of lactic acid bacteria and reduced the yeast population in corn silages after 90 days of fermentation, however, it did not change aerobic stability. It is not necessary to apply Lalsil AS to TMR corn silages, as the silages have shown high aerobic stability with lower DM losses and preservation of soluble carbohydrates, with starch solubility. The application of the inoculant increased the relative abundance of the genus *Lactobacillaceae* and the TMRs silages had an increase in relative abundance mainly in the *Weissella* and *Lactiplantibacillus* populations. Total corn ration silage without the addition of microbial inoculant provides improvements in the fermentative profile and aerobic stability. **Chapter 3** – A  $4 \times 4$  Latin square experimental design was used, arranged in a  $2 \times 2$  factorial scheme. The objective was to evaluate the effects of corn silage in the form of total mixed ration (TMR) inoculated or not with *L. buchneri*, on ingestive, digestive and ruminal parameters of cattle. The following treatments were evaluated: Treatment 1 - Control -; Treatment 2 – Corn silage inoculated with LalSil AS; Treatment 3 – TMR corn silage (without inoculant); Treatment 4 – TMR corn silage inoculated with Lalsil AS. There was an effect of silage on CFDN (kg/day), with TMRs silages showing lower consumption compared to conventional silages, regardless of the application of the inoculant. Animals fed with TMRs silages showed greater digestibility of DM, CP, CNF, starch and TDN, regardless of the inclusion of the inoculant. There was an interactive effect between silage and inoculant for BMD, with inoculated TMR silages showing higher digestibility values. There was a silage effect for the 'a' fraction of MS and MO, the TMR silages presented a higher soluble fraction, not differing in terms of the presence of the inoculant. In the test with cattle, TMR corn silage showed greater digestibility of DM and nutrients, mainly CNF including starch. total corn ration silage without

addition of microbial inoculant favored the digestibility of DM and other nutrients, mainly CNF and starch, constituting a practical advantage in the daily supply of diets. **Chapter 4** - A 6x4 completely randomized design (DIC) was used with 6 treatments and 4 replications. The objective was to evaluate the effects of sugarcane ensiling in different roughage/concentrate ratios, on microbial populations, chemical composition, fermentative profile and aerobic stability after 90 days of fermentation. The following were evaluated: Treatment 1 Control - Conventional sugarcane silage (without inoculant), Treatment 2 20/80 – Total mixed sugarcane ration silage in roughage/concentrate ratio 20/80; Treatment 3 40/60 – Total mixed feed silage made from sugar cane in roughage/concentrate ratio 40/60; Treatment 4 60/40 – Total mixed feed silage made from sugar cane in roughage/concentrate ratio 60/40; Treatment 5 80/20 – Total mixed feed silage made from sugar cane in roughage/concentrate ratio 80/20; Treatment 6 Lalsil - Sugarcane Silage inoculated with Lalsil Cane (*Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition). There was an effect on pH, N-NH<sub>3</sub>, BAL and LEV ( $p < 0.05$ ) after 90 days of ensiling. A significant effect was observed ( $p < 0.05$ ), with 20/80 silages presenting a higher DM content followed by 40/60, 60/40, 80/20, Control and Lalsil, with the latter not differing from each other. Control and Lalsil silages ( $p < 0.05$ ) had higher NDF values. The 60/40 silages presented a greater number of hours of stability ( $p < 0.05$ ) than the 80/20, Control and Lalsil silages. There was a significant effect ( $p < 0.05$ ) The 60/40 silages had a lower maximum temperature than Lalsil, the silages. TMR silages in the proportion 40/60, 60/40 and 80/20 showed greater aerobic stability. Therefore, it is recommended to ensile sugarcane in the form of a total mixed ration of sugarcane with inclusion of up to 60% of concentrate without the addition of inoculant to improve aerobic stability.

Keywords: Relative abundance. Focused. Digestibility. Microorganisms. TMR. 16S rRNA.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| INTRODUÇÃO GERAL.....                                                                                                                                                                 | 15  |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                                                     | 18  |
| CAPITULO I – SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADA COM ADITIVOS QUÍMICOS E MICROBIANO SOBRE PARÂMETROS INGESTIVOS, DIGESTIVOS E RUMINAIS EM BOVINOS DE CORTE .....                        |     |
| INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                                      | 21  |
| MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                                                              | 22  |
| RESULTADOS .....                                                                                                                                                                      | 31  |
| DISCUSSÃO .....                                                                                                                                                                       | 42  |
| CONCLUSÕES .....                                                                                                                                                                      | 45  |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                                                     | 46  |
| CAPITULO II – DIVERSIDADE MICROBIANA DE SILAGENS DE MILHO E DE RAÇÃO MISTA TOTAL (TMR) COM OU SEM INOCULANTE MICROBIANO .....                                                         |     |
| INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                                      | 54  |
| MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                                                              | 56  |
| RESULTADOS .....                                                                                                                                                                      | 62  |
| DISCUSSÃO .....                                                                                                                                                                       | 75  |
| CONCLUSÕES .....                                                                                                                                                                      | 80  |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                                                     | 81  |
| CAPITULO III – SILAGENS DE MILHO NA FORMA DE RAÇÃO MISTA TOTAL (TMR) COM OU SEM INOCULANTE MICROBIANO SOBRE O CONSUMO, DIGESTIBILIDADE E PARÂMETROS RUMINAIS DE BOVINOS DE CORTE..... |     |
| INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                                      | 89  |
| MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                                                              | 90  |
| RESULTADOS .....                                                                                                                                                                      | 97  |
| DISCUSSÃO .....                                                                                                                                                                       | 107 |
| CONCLUSÕES .....                                                                                                                                                                      | 110 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                                                     | 110 |

|                                                                                                                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| CAPITULO IV – PERFIL FERMENTATIVO E ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM DIFERENTES RELAÇÕES VOLUMOSO/CONCENTRADO NA FORMA DE RAÇÃO MISTA TOTAL (TMR) ..... | 114 |
| INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                             | 115 |
| MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                                                     | 116 |
| RESULTADOS .....                                                                                                                                                             | 121 |
| DISCUSSÃO .....                                                                                                                                                              | 126 |
| CONCLUSÕES .....                                                                                                                                                             | 129 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                                            | 130 |
| CONCLUSÕES GERAIS .....                                                                                                                                                      | 133 |

## INTRODUÇÃO GERAL

A pecuária brasileira é uma das principais atividades que compõem a economia do país, destacando-se por sua predominância na produção em pastagens tropicais. O Brasil abriga o segundo maior rebanho bovino do mundo, com aproximadamente 214,7 milhões de cabeças, possuindo o segundo maior rebanho mundial, com cerca de 214,7 milhões de cabeças (USDA, 2021), além de ser o maior exportador de carne bovina no mundo (ABIEC, 2021).

Apesar do sistema de produção brasileiro ser beneficiado pelo potencial de produção de forragem, enfrenta desafios significativos. Mudanças climáticas e a notável variabilidade dos biomas do país tornam a produção eficiente ao longo do ano uma tarefa complexa. Fatores como radiação, temperatura e disponibilidade hídrica influenciam significativamente a quantidade e a qualidade das plantas forrageiras em um sistema de cultivo (Nascimento Junior et al, 2013).

Uma das principais alternativas para suprimento da oferta de alimentos em condições de escassez de forragem é o uso de silagem, cuja técnica apresenta como principal vantagem a conservação do alimento para fornecimento e suprimento das exigências nutricionais dos animais. A silagem é o resultado da conservação de forragem verde por meio de um processo fermentativo anaeróbico, onde bactérias produtoras de ácido lático fermentam carboidratos solúveis em água, reduzindo o pH devido à produção de ácido lático (Phalow, 2003).

Dentre as culturas que se destacam para produção de silagem encontra-se o milho, devido as suas características de composição química que são consideradas ideais para ensilagem como teor de matéria seca (próximo a 300g/kg), concentração de carboidratos solúveis (>60g/kg) e o baixo poder tamponante da massa ensilada (McDonald et al, 1991).

Outra cultura de bastante interesse para produção de silagem é a cana-de-açúcar, amplamente utilizada no Brasil, a cana apresenta um elevado potencial produtivo. Com produtividade média entre 30-50 t MS/ha, é possível obter uma produção 2,5 a 3 vezes maior que o milho (Siqueira et al, 2008). Dentre os fatores necessários para produção de uma silagem de qualidade a cana de maneira similar ao milho apresenta um teor de carboidratos solúveis adequados para redução do pH, promovendo uma fermentação ácida e manutenção da fase principal de fermentação, entretanto, ambas as culturas apresentam excesso de carboidratos

solúveis residuais com valores reportados de 94g/kg e 385g/kg com base na matéria seca para o milho e para a cana-de-açúcar respectivamente (Silva et al, 2018).

As principais perdas de natureza fermentativa que ocorrem em silagens de milho e cana-de-açúcar ocorrem na fase de abertura ou descarga, nessa fase de exposição do material ao ar, o principal grupo microbiano responsável por utilizar os carboidratos solúveis residuais são as leveduras, tendo o etanol como o principal produto formado, sendo reportado frequentemente nos estudos envolvendo essas culturas. (Pedroso et al, 2008; Avila et al, 2014; Silva et al 2018; Agarussi et al, 2022;).

O uso de aditivos em silagens é uma tecnologia frequentemente utilizada no processo de produção de silagens. Os aditivos buscam minimizar as perdas decorrentes do processo fermentativo, o uso de aditivos químicos como óxido de cálcio e a ureia foram amplamente utilizados na pecuária com o objetivo de maximizar o aproveitamento da fração fibrosa das forragens, o efeito benéfico desses aditivos pode ser observado em silagens de cana-de-açúcar, responsável por minimizar as perdas por etanol, aumento na população de bactérias lácticas e no consumo de MS (Cavali et al, 2010; Jacovaci et al, 2017; Martins et al, 2021).

Para mitigar essas perdas, são utilizados aditivos, incluindo aditivos químicos que visam melhorar as características nutricionais da silagem. Além desses, os aditivos microbiológicos são amplamente empregados para reduzir a fermentação alcoólica na fase de abertura, aumentando a produção de ácido acético, um importante inibidor das leveduras. Rabelo et al (2019) destaca em sua meta análise que a inoculação de cana-de-açúcar com *L. buchneri* pode aumentar em 30,8% a concentração de ácido acético nas silagens.

Outra abordagem envolve o fornecimento de dietas completas com a técnica TMR (Total Mixed Ration), que permite a mistura de ingredientes com a silagem. Essa estratégia reduz a seleção de alimentos pelos animais, simplifica o manejo diário e otimiza a digestibilidade dos nutrientes (Owen & Howard, 1965).

Em países do continente asiático, Japão, China, e no continente africano essa técnica tem por vantagem principal a inclusão de subprodutos ao processo de ensilagem, dessa forma, com o aproveitamento de resíduos da indústria é possível o fornecimento de uma ração de baixo custo, além de reduzir a seleção, facilita o fornecimento diário, sendo uma ferramenta prática de manejo (Bueno et al., 2020).

Esta pratica tem retornado ao foco nos últimos anos, devido as suas vantagens já conhecidas no passado como a praticidade no fornecimento e agregação dos nutrientes à ração e outras mais recentes como disponibilidade do amido ao longo do tempo de fermentação e otimização da digestibilidade da matéria seca e nutrientes, tendo sido alvo de diversos estudos recentemente (Santos et al, 2017; Gusmão et al 2018; Restelatto et al, 2019; Lazzari et al, 2021).

O avanço das técnicas moleculares em silagens é uma ferramenta importante na caracterização da microbiota epifítica dos alimentos a serem ensilados, sendo possível conhecer novas espécies que podem vir a se tornar potenciais inoculantes no futuro. Embora se tenha uma boa ideia dos benefícios que a produção de silagens TMRs fornece quando incluída nos sistemas de produção, pouco se conhece sobre a diversidade microbiana de silagens de ração total, conhecimento que ainda é escasso e carece de mais estudos para melhor entendimento da dinâmica e interações entre as comunidades bacterianas envolvidas no processo fermentativo.

## REFERÊNCIAS

- ABIEC-Associação Brasileira da Indústria Exportadora de Carne. (2020). Beefreport: perfil da pecuária no Brasil.
- Agarussi, M. C. N., Pereira, O. G., da Silva, L. D., da Silva, V. P., de Paula, R. A., e Silva, F. F., & Ribeiro, K. G. (2022). Effect of Various Strains of *Lactobacillus buchneri* on the Fermentation Quality and Aerobic Stability of Corn Silage. **Agriculture**, 12(1), 95.
- Ávila C.L.S., Carvalho B.F., Pinto J.C., Duarte W.F. and Schwan R.F. (2014). Use of *Lactobacillus hilgardii* strains for enhancing quality of sugarcane silage. **Journal of Dairy Science**, 97, 940–951.
- Bueno, A.V.I; Lazzari, G., Jobim, C. C., & Daniel, J. L. P. et al. (2020). Ensiling total mixed ration for ruminants: A review. **Agronomy**, v. 10, n. 6, p. 879.
- Cavali, J., Pereira, O. G., Valadares Filho, S. D. C., et al. (2010). Bromatological and microbiological characteristics of sugarcane silages treated with calcium oxide. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39(7), 1398-1408.
- Ferrazza, R. D. A., & Castellani, E. (2022). Análise das transformações da pecuária brasileira: um enfoque na pecuária leiteira. **Ciência Animal Brasileira**, 22.
- Gusmão, J.O., Danés, M.A.C., Casagrande, D.R., Bernardes, T.F., (2018). Total mixed ration silage containing elephant grass for small-scale dairy farms. **Grass Forage Science**. 73, 717–726. <https://doi.org/10.1111/gfs.12357>.
- Jacovaci, F. A., Jobim, C. C., Schmidt, P. (2017). A data-analysis on the conservation and nutritive value of sugarcane silage treated with calcium oxide. **Animal Feed Science and Technology**, v. 225, p. 1-7.
- Lazzari, G., Poppi, A.C.O., Machado, J., Bueno, A.V.I., Gomes, A.L.M., Jobim, C.C., Daniel, J.L.P., (2021). Effects of protein source and lipid supplementation on conservation and feed value of total mixed ration silages for finishing beef cattle. *J. Anim. Sci.* 99, 1–13. <https://doi.org/10.1093/jas/skab032>.
- Martins, S. C., Carvalho, G. G., Pires, A. J. et al, (2021). Preservation of sugarcane silage with urea and calcium oxide: performance and metabolic efficiency of dairy cows. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, 34(4), 305-315.

- McDonald, Peter, A. R. Henderson, and S. Jo E. Heron. (1991). **The biochemistry of silage**. Chalcombe publications.
- Nascimento Junior, D.D; Vilela, H.H; Sousa B.M.L; et al. (2013). Fatores que afetam a qualidade de plantas forrageiras. In: **Forragicultura Ciência, Tecnologia e Gestão dos Recursos Forrageiros**. Jaboticabal-SP Brasil p.409.
- Owen, F. G.; Howard, W. T. (1965). Effect of ration moisture level on value of alfalfa plus cracked corn as a complete-feed silage for lactating cows. **Journal of dairy science**, v. 48, n. 10, p. 1310-1314.
- Pahlow, G.; Muck, R. E.; Driehuis, F. et al. (2003). Microbiology of ensiling. In: **Silage Science And Technology**. 42., Madison, USA. Proceedings... Madison: ASCSSA-SSSA, 2003. p.31-93.
- Pedroso, A. D. F., Nussio, L. G., Loures, D. R. S. (2008). Fermentation, losses, and aerobic stability of sugarcane silages treated with chemical or bacterial additives. **Scientia Agricola**, 65(6), 589-594.
- Restelatto, R., Novinski, C. O., Pereira, L. M., Silva, E. P., Volpi, D., Zopollatto, M., ... & Faciola, A. P. (2019). Chemical composition, fermentative losses, and microbial counts of total mixed ration silages inoculated with different *Lactobacillus* species. **Journal of Animal Science**, 97(4), 1634-1644.
- Santos, V.S. (2017). **Farelo de trigo em substituição ao capim aruana em silagens á base de palma forrageira na forma de ração completa**. Trabalho de conclusão de curso. Areia – PB.
- Silva, L. D., Pereira, O. G., Silva, T. C. (2018). Effects of *Lactobacillus buchneri* isolated from tropical maize silage on fermentation and aerobic stability of maize and sugarcane silages. **Grass and Forage Science**, 73(3), 660-670.
- Siqueira, G. R., Resende, F. D., Roman, J., Reis, R., & Bernardes, T. (2008). Uso estratégico de forragens conservadas em sistemas de produção de carne. **Produção e utilização de forragens conservadas**. Maringá: Masson, 41-88.
- USDA (2021). Livestock and poultry: world markets and trade. Report for January. Disponível em: Economics, Statistics and Market Information System. <https://usda.library.cornell.edu>

## CAPITULO I – SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADA COM ADITIVOS QUÍMICOS E MICROBIANO SOBRE PARÂMETROS INGESTIVOS, DIGESTIVOS E RUMINAIS EM BOVINOS DE CORTE

### Resumo

Objetivou-se avaliar os efeitos da ensilagem de cana-de-açúcar tratada com aditivos químicos e inoculante microbiano, sobre as populações microbianas, composição química, perfil fermentativo e estabilidade aeróbia após 90 dias de fermentação (experimento 1), bem como consumo, digestibilidade, degradabilidade ruminal *in situ* e parâmetros ruminais em bovinos de corte (experimento 2). Os tratamentos foram: Tratamento 1- Silagem de cana Sem aditivos (Controle), Tratamento 2 – Silagem de cana inoculada com Lalsil cana (*Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788) Tratamento 3 – Silagem de cana com 10g/kg de cal com base na matéria natural e Tratamento 4 – Silagem de cana com 10g/kg de ureia com base na matéria natural. No experimento 1, foi usado o delineamento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 4 repetições, enquanto que no experimento 2 foi usado um quadrado latino 4x4, com 4 dietas, 4 animais e 4 períodos experimentais. No primeiro experimento, o material foi ensilado em bags de 20 kgs de capacidade, abertos após 90 dias de fermentação, quando foram expostas ao ar por sete dias de para avaliação da estabilidade aeróbia. O maior valores de MS foi observado para a silagem tratada com Cal (287,9 g/kg). As silagens tratadas com cal apresentaram menores ( $P<0,05$ ) valores de FDNcp (549,4 vs 677,7 g/kg) e maiores valores de CNF (378,8 vs 255 g/kg) e CHOs (44,4 vs 20,3 g/kg) em comparação à silagem controle. O tratamento controle apresentou maior ( $P<0,05$ ) produção de ácido lático (66,6g/kgMS) comparado aos tratamentos Lalsil e Ureia, enquanto que a silagem tratada com Cal apresentou maior ( $P<0,05$ ) conteúdo de ácido acético (11,03g/kgMS) comparado aos tratamentos controle e Lalsil. Houve efeito de tratamentos ( $P<0,05$ ) sobre as digestibilidades aparentes da MS, FDN, EE, CNF e NDT. As silagens tratadas com cal apresentaram maiores valores de digestibilidade ( $P<0,05$ ). As silagens com inclusão de cal apresentaram valores da fração solúvel da MS superior ( $P<0,05$ ) a silagem controle. Recomenda-se a aplicação de 10g/kg MN de óxido de cálcio em silagens de cana-de-açúcar.

## INTRODUÇÃO

Em sistemas de produção de ruminantes, a ensilagem desempenha um papel fundamental ao garantir o fornecimento de alimento de qualidade ao longo do ano, especialmente durante períodos de escassez de alimentos. A cana-de-açúcar destaca-se devido à sua produtividade e potencial de ensilagem, caracterizado por teores de matéria seca (MS) próximos a 300g/kg e teores de carboidratos solúveis superiores a 230g/kg, além de uma população de bactérias láticas (>6,00 UFC/g de forragem) que garantem o rápido declínio do pH a valores inferiores a 4,0 (Pedroso et al, 2008; Ávila et al, 2010; Cardoso et al, 2018). No entanto, apesar dessas características desejáveis, a silagem de cana-de-açúcar pode apresentar perdas expressivas de MS (variando de 200 a 600g/kg), devido à formação de produtos indesejáveis, como etanol e ésteres, produzidos principalmente por leveduras, devido à alta população epifítica desses microorganismos na cana-de-açúcar (Júnior et al, 2020; Daniel et al, 2015).

Essas perdas podem ocorrer durante a etapa de fermentação ativa ou na fase de exposição ao ar, levando a uma redução na estabilidade aeróbica da silagem e resultando em perdas quantitativas e qualitativas de material, principalmente relacionadas ao aumento da fração fibrosa (Ávila, 2014; Daniel et al., 2015; Rabelo et al., 2019). Para minimizar essas perdas, melhorar a estabilidade aeróbica e otimizar a produção animal, várias abordagens têm sido estudadas, incluindo o uso de aditivos químicos como ureia e óxido de cálcio, o uso de inoculantes microbianos e a produção de silagens na forma de dieta total.

Conforme apontado por Jacovaci et al. (2017) em sua meta-análise, silagens de cana-de-açúcar tratadas com óxido de cálcio tendem a apresentar menor produção de etanol, melhoria na recuperação de matéria seca e estabilidade aeróbica. Cavali et al. (2010), avaliando níveis de óxido de cálcio em silagens de cana-de-açúcar, observaram aumento na população de bactérias láticas e na taxa de degradação ruminal da fração potencialmente degradável, recomendando adição de 10g/kg de óxido de cálcio com base na MS.

Outra opção viável é o uso de inoculantes microbianos, compostos principalmente por bactérias láticas heterofermentativas obrigatórias, com destaque para o *Lentilactobacillus buchneri*, capaz de converter o ácido láctico em ácido acético e 1,2 propanodiol (Oude Elferink et al., 2001). Rabelo et al. (2018), em estudo de meta-análise, avaliaram o efeito do *Lentilactobacillus buchneri* e do *Lactiplantibacillus plantarum* em silagens de cana-de-açúcar e

concluíram que o *L. buchneri* reduz as perdas de MS e produção de etanol, com efeitos benéficos na silagem, embora não tenham sido observados ganhos na digestibilidade e estabilidade aeróbia.

A ureia é outro aditivo químico estudado e amplamente utilizado em cana-de-açúcar, principalmente para corrigir o baixo teor de proteína (Cavali et al., 2010; Cardoso et al., 2018). Em silagens, espera-se que o nitrogênio na forma de amônia possa modificar o pH, inibindo grupos microbianos como as leveduras e melhorando as características químicas do material ensilado, especialmente aumentando a concentração de ácido acético (Kung Junior et al., 2000).

Embora existam alguns estudos demonstrando efeitos benéficos desses aditivos em silagens de cana-de-açúcar, poucos trabalhos avaliaram a utilização destes na alimentação de ruminantes, indicando a necessidade de estudos envolvendo animais. A nossa hipótese é que a cana-de-açúcar ensilada com a inclusão de aditivos químicos e inoculante microbiano, proporcione ganhos no perfil fermentativo reduzindo a fermentação alcoólica propiciando maior estabilidade aeróbia e maior eficiência alimentar.

Portanto, objetivou-se avaliar os efeitos da ensilagem de cana-de-açúcar tratada com óxido de cálcio, ureia e inoculante microbiano sobre as populações microbianas, composição química, perfil fermentativo, perdas de matéria seca e estabilidade aeróbica após 90 dias de fermentação, bem como o consumo e a digestibilidade de nutrientes e os parâmetros ruminais em bovinos de corte.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Colheita da cana-de-açúcar, ensilagem e delineamento experimental**

A cana-de-açúcar foi colhida no departamento de Zootecnia na unidade de ensino pesquisa e extensão UEPE gado de corte. A cana apresentou teor médio de 292,2 g MS/kg matéria natural (MN). Em seguida, o material foi processado em tamanhos de partículas de  $\pm 10$  mm em máquina forrageira estacionária (JF-60, JF-Máquinas®, Itapira-SP, Brasil) acoplada em tomada de potência do trator (Valtra / Valmet 785®, Mogi das CruzesSP, Brasil). O experimento foi realizado nas dependências do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) no município de Viçosa-MG situada a 200 e 45' de latitude sul, 420 e 51' de longitude oeste e 648 m de altitude, a ensilagem foi realizada nas dependências do setor de gado

de corte e as análises foram realizadas parte no Laboratório de Forragicultura e no Laboratório de Microbiologia da Silagem.

Foi usado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) 4x4 sendo 4 tratamentos, com 4 repetições por tratamento. Utilizou-se o inoculante comercial Lalsil Cana à base de *Lentilactobacillus buchneri* (LB; NCIMB 40788 Lallemand®, Aparecida de Goiânia-GO, Brasil) [ $3 \times 10^5$  ufc/g; LB]. Foram avaliados os seguintes tratamentos:

Tratamento 1 Controle - Silagem de cana-de-açúcar ,  
Tratamento 2 Lalsil – Silagem de cana-de-açúcar inoculada com Lalsil cana (*Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition)

Tratamento 3 Cal – Silagem de cana-de-açúcar com 10g/kg de óxido de cálcio com base na matéria natural

Tratamento 4 Ureia– Silagem de cana-de-açúcar com 10g/kg de ureia com base na matéria natural. Após o processamento foram formadas pilhas de 500 kg de material para aplicação dos aditivos ou aplicação do inoculante de acordo com as recomendações do fabricante. O inoculante foi diluído em 150 mL de água destilada e aplicado em pilhas de 500 kg MN com borrifadores manuais, sendo aplicado o mesmo volume de água destilada no tratamento controle.

A ensilagem foi realizada em bags de 20kgs de capacidade, sendo ajustados para uma densidade média de 650kg/dm<sup>3</sup>. Na Tabela 1 são mostradas a composição química, valores de pH e as populações de leveduras, enterobactérias, fungos filamentosos e bactérias do ácido lático (UFC/g de forragem) da cana-de-açúcar antes da ensilagem.

Tabela 1 – Composição química, pH e populações microbianas após aplicação dos tratamentos, antes da ensilagem.

| Itens                                 | Tratamentos |        |        |        |
|---------------------------------------|-------------|--------|--------|--------|
|                                       | Controle    | Lalsil | Cal    | Ureia  |
| MS g/kg <sup>1</sup>                  | 292,2       | 290,7  | 300,8  | 326,8  |
| MM g/kg <sup>2</sup>                  | 29,0        | 26,5   | 57,1   | 25,6   |
| PB g/kg <sup>3</sup>                  | 19,0        | 23,8   | 25,40  | 100,9  |
| EE g/kg <sup>4</sup>                  | 10,62       | 10,37  | 5,63   | 13,88  |
| FDNcp g/kg <sup>5</sup>               | 454,04      | 410,19 | 439,66 | 450,55 |
| FDA g/kg <sup>6</sup>                 | 456,59      | 413,21 | 445,26 | 457,35 |
| pH                                    | 5,65        | 5,62   | 11,36  | 5,90   |
| Leveduras UFC/g de forragem           | 5,35        | 5,41   | 4,61   | 5,26   |
| Enterobactérias UFC/g de forragem     | 5,39        | 5,49   | ND     | 4,94   |
| Fungos filamentosos UFC/g de forragem | 4,51        | 4,74   | 3,77   | 4,71   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |       |       |       |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Bactérias do ácido láctico UFC/g de forragem                                                                                                                                                                                                                                                                | 5,43  | 5,77  | 4,41  | 5,07  |
| Carboidratos solúveis em água g/kg                                                                                                                                                                                                                                                                          | 511,8 | 532,7 | 488,8 | 354,3 |
| <sup>1</sup> Matéria Seca <sup>2</sup> Matéria mineral <sup>3</sup> Proteína bruta <sup>4</sup> Extrato etéreo <sup>5</sup> Fibra insolúvel em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína <sup>6</sup> Fibra insolúvel em detergente ácido UFC – Unidades formadoras de colônias ND – Não detectado |       |       |       |       |

### **Perfil fermentativo e estabilidade aeróbia**

Amostras de 25 g da planta e das silagens após 60 dias de fermentação foram homogeneizadas em 225 mL de solução de Ringer's solution estéril (Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) em liquidificador industrial (1 min). O extrato aquoso foi dividido em duas alíquotas: Uma alíquota foi usada para medição do pH, com potenciômetro digital (W38 / Tecnal®, São Paulo-SP, Brasil). Após, 20 mL do extrato aquoso foi filtrado e acidificado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:1 (armazenados a -20 °C) para posteriores análises das concentrações de carboidratos solúveis em água por método colorimétrico (Nelson, 1944), amônia, pelo método fenol-hipoclorito (Okuda et al., 1965) etanol e ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, ácido propiônico) (Siegfried et al., 1984).

A segunda alíquota do extrato aquoso foi usada para quantificação das populações de enterobactérias (ENT), bactérias lácticas (BAL), Leveduras (LEV) e fungos filamentosos (FUN). Foram realizadas diluições seriadas 10<sup>1</sup> a 10<sup>9</sup>. Em seguida, foi realizado o plaqueamento em placas de Petri estéreis (método pour-plate) em meios de cultura. Foi utilizado o MRS ágar (De Man, Rogosa & Sharpe, Merck®, Darmstadt, Alemanha) para o cultivo de BAL (37 °C / 48 h), VRB ágar (Violet Red Bile Agar, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) para o cultivo de ENT (37 °C / 24 h) e DRBC ágar (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol Base Agar, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) para cultivo de LEV (25 °C / 72 h) e de FUN (25 °C / 120 h). Para contagem das populações microbianas considerou-se o intervalo de ufc entre 25 a 250 (American Public Health Association, 2015).

Após 90 dias de ensilagem os bags foram abertos e pesados, uma amostra de 2 kg de silagem foi alocada em baldes plásticos de 10L que foram cobertos por uma camada de tecido de nylon para avaliação da estabilidade aeróbia (EA). Os baldes foram armazenados em sala com temperatura ambiente constante (± 22 °C), e no centro da massa da silagem foi inserido um data-logger (Cryopark iMINI™, Cryopark Company Inc., VA, USA) para mensuração da temperatura, a cada 10 min durante sete dias. Dois data-loggers foram distribuídos na sala para mensuração da

temperatura ambiente. A EA 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 Junior et al., 2003).

## **Experimento 2. Consumo, digestibilidade e parâmetros da fermentação ruminal em bovinos de corte recebendo dietas contendo silagens de cana-de-açúcar tratada com aditivos químicos e microbiano.**

### **Dietas e animais**

Além da avaliação da silagem quanto as características fermentativas e ensaio de EA, os bags também foram alocados em manilhas de concreto com capacidade de 1 m<sup>3</sup> para o ensaio de consumo e digestibilidade com bovinos de corte. Após o preparo dos bags, cada manilha foi vedada com filme plástico de polietileno dupla face com 200 micras (Lonax, PaperPlast™, Belo Horizonte-MG, Brasil), envolta com arame de zinco 1,24 mm (BWG18, Gerdau®, Ouro Branco-MG, Brasil) e acrescido de 10 cm de areia para proteção do filme plástico.

Foram utilizados quatro novilhos da raça Nelore, não-castrados, fistulados no rúmen, peso corporal médio (PCm) de 370 ± 20 kg e idade média de 18 ± 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, com ingestão voluntária e livre acesso à água.

O delineamento utilizado foi o quadrado latino (DQL) 4x4, com 4 dietas, 4 animais e 4 períodos experimentais. As dietas foram previamente formuladas em uma relação volumoso: concentrado (30:70), para atender as exigências para ganho de 1,0 kg em bovinos de corte cruzados pesando em média 400kg seguindo as tabelas de exigências do BR-Corte 4.0 (Valadares filho, et al 2023). Para a elaboração das dietas realizou-se a mistura dos ingredientes, farelo de milho, farelo de soja, ureia/sulfato de amônio (9:1), núcleo mineral-vitamínico [(Tortuga®, Brasil) FOSBOVI 40™ com adição de sal comum (1/1), apresentando: Cálcio: 223,00 g/kg; Fósforo: 174,00 g/kg; Enxofre: 24,00 g/kg; Cobalto: 100,00 mg/kg; Cobre: 1.250,00mg/kg; Ferro: 1.795,00 mg/kg; Iodo: 90,00 mg/kg; Manganês: 2.000,00 mg/kg; Selênio: 15,00 mg/kg; Zinco: 5.270,00 g/kg; Flúor: 1.740,00 mg/kg com a cana-de-açúcar *in natura*. A proporção dos

ingredientes das dietas e a composição química são apresentada abaixo nas tabelas 2 e 3 respectivamente.

Tabela 2 – Proporção dos ingredientes nas dietas experimentais (g/kg)

| Itens <sup>1</sup>            | Dieta 1 | Dieta 2 | Dieta 3 | Dieta 4* |
|-------------------------------|---------|---------|---------|----------|
| Silagem de Cana-de-açúcar     | 300     | 300     | 300     | 300      |
| Farelo de milho               | 591,0   | 591,0   | 591,0   | 616,2    |
| Farelo de Soja                | 65,5    | 65,5    | 65,5    | 48,8     |
| Ureia/SA                      | 11,5    | 11,5    | 11,5    | 3,0      |
| Núcleo mineral/Sal            | 15,0    | 15,0    | 15,0    | 15,0     |
| Bicarbonato/Óxido de magnésio | 17,0    | 17,0    | 17,0    | 17,0     |

\*Dieta 4 – Cana de açúcar 10g/kg ureia MN

Tabela 3 – Composição química dos ingredientes das dietas experimentais (g/kg)

| Itens <sup>1</sup>                         | MS <sup>1</sup> | PB <sup>2</sup> | FDNcp <sup>3</sup> | FDA <sup>4</sup> | MM <sup>5</sup> | EE <sup>6</sup> |
|--------------------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| Silagem de Cana-de-açúcar                  | 333             | 34,7            | 450,5              | 265,7            | 37,6            | 10,1            |
| Silagem de Cana-de-açúcar 10g/kg MN ureia* | 333             | 125             | 443,15             | 268,3            | 25,6            | 13,8            |
| Farelo de milho                            | 879,7           | 90,2            | 257,2              | 30,9             | 13,34           | 45,1            |
| Farelo de Soja                             | 886,3           | 489             | 71,78              | 56,67            | 67,79           | 11,63           |
| Ureia/AS (9/1)                             | 100             | 2539,07         | -                  | -                | -               | -               |
| Núcleo mineral/Sal (1/1)                   | 100             | -               | -                  | -                | -               | -               |
| Bicarbonato/Óxido de magnésio (3/1)        | 100             | -               | -                  | -                | -               | -               |

\*Silagem de cana tratada com 10g/kg de ureia com base na matéria natural; MS<sup>1</sup> – Matéria seca; PB<sup>2</sup> – Proteína bruta; FDNcp<sup>3</sup> – Fibra insolúvel em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; FDA<sup>4</sup> – Fibra insolúvel em detergente ácido; MM<sup>5</sup> – Matéria mineral; EE<sup>6</sup> – Extrato etéreo.

A duração do ensaio de consumo e digestibilidade foi de 80 dias, dividido em quatro períodos experimentais de 20 dias cada, sendo 14 dias (1º ao 14º dia) para adaptação e 6 dias (15º ao 20º dia) para coletas (Machado et al., 2016). A estimativa do teor MS das dietas foi realizada semanalmente para ajustar o teor de MS ao longo do ensaio experimental. As dietas foram fornecidas duas vezes ao dia, às 7h00 e 17h00.

### **Mensuração do consumo, amostragem de ingredientes e sobras**

As dietas foram ajustadas diariamente, o consumo foi *ad libitum* e as sobras mantidas  $\pm 15\%$  do total ofertado. Os animais foram pesados ao início e ao final de cada período experimental para medir a variação de peso vivo em percentual (PV %). 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 a partir do 14º até 20º dia de cada período experimental, e acondicionadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises. As sobras foram amostradas  $\pm 10\%$  do total de cada dia de coleta, com a confecção de uma amostra composta por animal e por período. As amostras foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar ( $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por 72 h e moídas em moinho de facas com peneira de 2 e 1 mm para posteriores análises.

### **Coleta total de fezes e urina**

Foram realizadas coletas totais de fezes e urina do 15º ao 19º dia de cada período experimental. As fezes foram coletadas em baldes plásticos de 50 L de capacidade, providos de tampa e devidamente identificados, os quais foram pesados diariamente. A urina foi coletada com auxílio de sondas coletoras, que foram acopladas aos animais, conectadas a galões plásticos 20 L, que continham 200 mL de uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  20% (v/v) (Hristov et al., 2019).

Os animais permaneceram em constante observação por 5 dias (120 horas). Ao final de cada 24 h de coleta, os baldes contendo as fezes foram pesados, homogeneizados e uma amostra de aproximadamente 250 g foi acondicionada em bandeja de alumínio previamente pesada, posteriormente processada conforme descrito anteriormente. Em seguida, foi realizada uma amostra composta proporcional ao peso pré-seco total das fezes de cada dia de coleta, sendo estas

acondicionadas em potes plásticos para posteriores análises. Os volumes urinários foram mensurados diariamente com a utilização de proveta graduada. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20 °C para posteriores análises. A urina foi amostrada 1% sobre o total de volume urinário de cada dia de coleta, no final de cada período, amostras compostas de urina foram descongeladas, homogeneizadas e amostradas para análise de N urinário, alantoína e ácido úrico para aferição do balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana (Hristov et al., 2019).

### **Coleta de líquido ruminal e mensuração do pH**

A coleta de líquido ruminal foi realizada no 20º dia de cada período experimental. As amostras foram coletadas em cinco pontos distintos na interface líquido-sólido do rúmen e foram filtradas em três camadas de gaze estéril. Foram coletadas  $\pm$  250 mL de líquido ruminal em cada horário de coleta (0; 2; 4 e 6 horas após alimentação). A digesta foi retirada para separação das frações líquida e sólida e medição do pH da fração líquida com auxílio de um potenciômetro digital, imediatamente após a filtragem (Deusch et al., 2017). Aproximadamente 50 mL da fração líquida foi acidificada com 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:1 (v / v) e armazenada a -20 °C para posteriores análises de N-NH<sub>3</sub> ruminal e ácidos orgânicos.

### **Degradabilidade ruminal *in situ***

Amostras das silagens foram tomadas no início de todos os quatro períodos experimentais e processadas à 2mm em moinho de facas (R-TE-650/1, Tecnal®, Piracicaba-SP, Brasil), onde foram alocadas em duplicata em sacos de náilon obedecendo a relação de 20mg de matéria seca/cm<sup>2</sup> de superfície. A incubação foi realizada no 8º dia de cada período com auxílio de correntes, para avaliação nos períodos: 0; 3; 6; 9; 24; 48; 72 e 96h. após a retirada das amostras pós incubação, foi realizada lavagem com água corrente com auxílio de baldes plásticos de 10L até que a água residual se apresentasse translúcida, após a lavagem os sacos permaneceram na estufa por 48 horas. Posteriormente as amostras foram moídas a 1mm para análises dos teores de MS e MM para estimativa das curvas de degradação da MS e MO, seguindo o modelo proposto por Orskov & McDonald (1979)  $Y_t = a + b \times (1 - e^{-(ct)})$  Onde Y<sub>t</sub> = fração degradada da MS no

tempo “t”, g/kg; a = fração rapidamente solúvel, g/kg; b = fração potencialmente degradável no rumen, g/kg; c = taxa constante para degradação de b, por hora; t = tempo, horas

## **Análises químicas, experimentos 1 e 2**

As amostras da planta no dia da ensilagem, das silagens, de ingredientes, fezes e sobras foram submetidas à secagem parcial em estufa de circulação forçada de ar (55 °C / 72 h). 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 submetidas às análises de quantificação dos teores de matéria seca (MS, método 934,01), matéria orgânica (MO, método 972,43), matéria mineral (MM, método 942,05), proteína bruta (PB = N × 6,25, método 984,13), extrato etéreo (EE, método 920,39) e fibra em detergente ácido (FDA, método 973,18) (AOAC, 1990). Também foram determinados os teores de fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), utilizando-se  $\alpha$ -amilase termoestável sem o uso de sulfito de sódio (Mertens, 2002), nitrogênio insolúvel em detergente ácido [(NIDA) (Licitra et al., 1996)], lignina [(LIG) (Gomes et al., 2011)] e proteína solúvel em tampão borato-fosfato (Licitra et al., 1996).

Os teores de carboidratos não-fibrosos (CNF) foram estimados pela fórmula:  $100 - [(proteína\ bruta\ (PB) - PB\ da\ ureia + ureia) + FDNcp + extrato\ etéreo + cinzas]$  (Detmann e Valadares Filho, 2010). O cálculo do NDT foi realizado conforme proposto pelo Nutrient Requirements of Beef Cattle (NRC, 2001). Foi realizada análise de amido conforme Silva et al. (2019). Foram determinados os consumos de MS, MO, PB, FDNcp, EE, CNF, NDT e o consumo de amido, bem como suas respectivas digestibilidades, exceto para NDT (Mertens e Grant, 2020). A concentração de N-NH<sub>3</sub> do fluido ruminal foi avaliada pelo método fenolhipoclorito (Okuda et al., 1965). Os ácidos orgânicos do rúmen (lactato, acetato, propionato e butirato) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; SPD-10 AVP, Shimadzu®, Oregon, USA), com detector ultravioleta em 210 nm. A coluna utilizada foi C18 (fase reserva), e utilizado o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fase móvel, com fluxo de 1,5 mL min<sup>-1</sup>, pressão da coluna de 168 kgf e volume injetado de 20 µL (Siegfried et al., 1984).

A urina foi analisada quanto à concentração de nitrogênio (N) e derivados de purina (alantoína e ácido úrico) (Chen e Gomes, 1992). Derivados de purina (DP) e volume total de urina foram utilizados para estimar as purinas absorvidas e a síntese de proteína microbiana no rúmen. Os derivados de purinas foram obtidos pela multiplicação de cada um pelo volume total urinário (Barbosa et al., 2011). As purinas absorvidas (PA) foram calculadas pela fórmula:  $PA = [DP - (0,30 PC^{0,75})] / 0,80$ , Onde: PC = peso corporal;  $0,301 PC^{0,75}$  = excreção endógena de DP; 0,80 = recuperação de PA. A síntese de N microbiano (NMic) foi determinada pela fórmula:  $NMic = [(70 \times PA) / (0,93 \times 1000 \times 0,137)]$ ; Onde: 70 = concentração de N nas purinas; 0,93 = digestibilidade das purinas; 0,137 = taxa média de N-RNA pelo N-total para bactérias ruminais (Barbosa et al., 2011).

O balanço de N (BN) foi obtido por diferença entre N total ingerido e N total excretado nas fezes e urina (Hristov et al., 2019). O BN foi determinado pela fórmula:  $BN = NI - (N \text{ fezes} + N \text{ urina})$ ; Onde: NA = NI – N fezes; NI = N ofertado – N sobras; Onde: NR = nitrogênio retido; NI = nitrogênio ingerido; N fezes = nitrogênio nas fezes; N urina = nitrogênio na urina; N ofertado = nitrogênio ofertado; N sobras = nitrogênio sobras.

### **Análise estatística experimentos 1 e 2**

Todas as variáveis foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos dados e ao teste de Levene para verificação da homogeneidade de variância. Os dados referentes às populações microbianas foram transformados para a base logarítmica (Log10). Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e foram analisadas pelo procedimento PROC MIXED do SAS® versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, 2010).

Os dados obtidos no estudo com os animais foram analisados em delineamento quadrado latino 4x4 (DQL) com base no seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + A_k + P_l + e_{ijkl}$$

Onde:  $Y_{ijk}$  = variável resposta;  $\mu$  = constante geral;  $S_i$  = efeito da silagem i (efeito fixo)  $A_k$  = efeito do animal k (efeito aleatório);  $P_l$  = efeito do período experimental l (efeito aleatório);  $e_{ijkl}$  = erro aleatório residual.

Os resultados de pH e N-NH<sub>3</sub> ruminal foram avaliados como medida repetida no tempo enquanto que os demais resultados foram comparados usando teste Tukey a nível de 5% de probabilidade para erro tipo I.

Os dados referentes ao estudo das silagens nos bags foram avaliados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 4 tratamentos e 4 repetições. Com base no seguinte modelo:

$$Y_{ik} = \mu + \alpha_i + e_{ik}$$

Onde:  $Y_{ik}$  = variável dependente,  $\mu$  = média geral,  $\alpha_i$  = efeito fixo da i-ésima silagem e  $e_{ik}$  = erro aleatório residual

Todos os outros dados foram submetidos a análise de variância, aplicando-se o teste Tukey-Kramer pelo LSMEANS statement ( $\alpha = 0,05$ ) para erro tipo 1, usando-se o pacote estatístico do SAS.

## RESULTADOS

### Composição química

Houve efeito ( $P < 0,05$ ) de tratamento sobre os teores de MS, MO, CHOs, PB, FDNcp, NIDA/Ntotal, MM, EE e CNF (Tabela 4). Os teores de FDA e Lignina não foram afetados ( $P > 0,05$ ) pelos tratamentos. O maior valor de MS foi observado para a silagem tratada com Cal (287,9 g/kg). As silagens de cana tratadas com ureia apresentaram maiores ( $P < 0,05$ ) conteúdos de PB (144,7g/kg) e EE (34,2g/kg). As silagens tratadas com cal apresentaram menores ( $P < 0,05$ ) valores de FDNcp (549,4 vs 677,7 g/kg) e maiores valores de CNF (378,8 vs 255 g/kg) e CHOs (44,4 vs 20,3 g/kg) em comparação à silagem controle.

Tabela 4 - Composição química das silagens de cana-de-açúcar após 90 dias de fermentação (g/kg).

| Itens           | Tratamentos |         |        |        | p-valor | EPM    |
|-----------------|-------------|---------|--------|--------|---------|--------|
|                 | Controle    | Lalsil  | Cal    | Ureia  |         |        |
| MS <sup>1</sup> | 200,6C      | 238,8B  | 287,9A | 250,1B | <0,001  | 0,8855 |
| MO <sup>2</sup> | 959,4B      | 969,1AB | 942,9C | 973,5A | <0,001  | 0,3205 |

|                          |        |         |        |        |        |        |
|--------------------------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|
| CHOs <sup>3</sup>        | 20,3C  | 48,5A   | 44,4A  | 27,9B  | <0,001 | 0,2992 |
| PB <sup>4</sup>          | 33,3B  | 26,4B   | 24,11B | 144,7A | <0,001 | 1,3384 |
| FDNcp <sup>5</sup>       | 677,6A | 629,4AB | 549,4B | 596AB  | <0,001 | 1,5014 |
| FDA <sup>6</sup>         | 410,7  | 372,4   | 332,2  | 363,2  | 0,142  | 0,8559 |
| NIDA/Ntotal <sup>7</sup> | 132,5B | 158,1AB | 209,7A | 38,57C | <0,001 | 1,7999 |
| MM <sup>8</sup>          | 40,6B  | 30,8BC  | 57,1A  | 26,5C  | <0,001 | 0,3205 |
| EE <sup>9</sup>          | 11,1B  | 5,6B    | 8,3B   | 34,2A  | <0,001 | 0,3077 |
| CNF <sup>10</sup>        | 255BC  | 325,4AB | 378,8A | 216,2C | <0,001 | 1,8094 |
| Lignina                  | 91,0   | 78,1    | 88,8   | 92,2   | 0,7639 | 0,4842 |

<sup>1</sup>Matéria Seca <sup>2</sup>Matéria orgânica <sup>3</sup>Carboidratos solúveis <sup>4</sup>Proteína bruta <sup>5</sup>Fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína <sup>6</sup>Fibra em detergente ácido <sup>7</sup>Nitrogênio insolúvel em detergente ácido em relação ao nitrogênio total <sup>8</sup>matéria mineral <sup>9</sup>Extrato etéreo <sup>10</sup>Carboidratos não fibrosos; EPM – Erro padrão da média; Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de probabilidade (P≤0,05)

Houve efeito (P<0,05) de tratamento sobre o pH, registrando-se maior valor nas silagens tratadas com Cal (3,97) após 90 dias de fermentação. A silagem tratada com ureia apresentou maior (P<0,05) concentração de N-NH<sub>3</sub>/Ntotal (6,50) e menor (P<0,05) população de leveduras (2,52 UFC/g de silagem) (Tabela 5). A menor população de bactérias lácticas foi observada (p<0,05) nas silagens inoculadas com lalsil (5,59 UFC/g de silagem).

Tabela 5 – Valores de pH, N-NH<sub>3</sub>, populações microbianas, teores de ácidos orgânicos e etanol das silagens de cana após 90 dias de fermentação, em função dos tratamentos

| Itens                    | Tratamentos |        |        |        | P-valor | EPM    |
|--------------------------|-------------|--------|--------|--------|---------|--------|
|                          | Controle    | Lalsil | Cal    | Ureia  |         |        |
| pH                       | 3,50C       | 3,32D  | 3,97A  | 3,61B  | <0,0001 | 0,062  |
| N-NH <sub>3</sub> /total | 2,84B       | 1,83B  | 1,65B  | 6,50A  | <0,0001 | 0,5629 |
| BAL                      | 7,78A       | 5,59B  | 8,16A  | 7,74A  | <0,0001 | 0,2844 |
| FUN                      | 2,52        | ND     | ND     | ND     | -       | -      |
| LEV                      | 3,49A       | 3,57A  | 3,91A  | 2,52B  | 0,0023  | 0,1614 |
| Ácido Láctico(g/kg)      | 66,3A       | 52,68B | 52,68B | 35,13B | 0,0007  | 0,4196 |
| Ácido Acético<br>(g/kg)  | 7,29B       | 4,03B  | 11,03A | 7,85AB | 0,0068  | 0,0948 |

|                            |         |         |        |        |        |        |
|----------------------------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|
| Ácido Propiônico<br>(g/kg) | 5,31    | 5,26    | 5,63   | 6,03   | 0,7981 | 0,06   |
| Ácido Butírico<br>(g/kg)   | 14,2A   | 5,01B   | 3,67B  | 1,39B  | 0,0354 | 0,1705 |
| Etanol (g/kg)              | 153,18A | 63,72AB | 24,72B | 28,34B | 0,0162 | 17,89  |

<sup>1</sup>g de N-NH<sub>3</sub> por kg de nitrogênio total <sup>2</sup>Bactérias do ácido lático Unidades formadoras de colônia/g de forragem <sup>3</sup>Fungos filamentosos Unidades formadoras de colônia/g de forragem <sup>4</sup>Leveduras Unidades formadoras de colônias/g de forragem; EPM – Erro padrão da média; Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de probabilidade (P≤0,05)

O tratamento controle apresentou maior (P<0,05) produção de ácido lático (66,6g/kgMS) comparado aos tratamentos Lalsil e Ureia, enquanto que a silagem tratada com Cal apresentou maior (P<0,05) conteúdo de ácido acético (11,03g/kgMS) comparado aos tratamentos controle e Lalsil (Tabela 5). Foi registrado maior (P<0,05) conteúdo de ácido butírico (14,2g/kgMS) na silagem controle, enquanto que o ácido propiônico não foi afetado pelos tratamentos, registrando-se valor médio de 5,55. Quanto ao etanol, foi registrado maior (P<0,05) concentração no tratamento controle, em comparação aqueles com Cal e Uréia.

A estabilidade aeróbia das silagens após 7 dias de exposição não diferiu (P<0,05) entre os tratamentos, com valor médio de 57,31 ± (14,63) horas (Tabela 6). Comportamento semelhante foi verificado para o conteúdo de carboidratos solúveis residuais e a população de fungos. Além de maior valor (P<0,05) de pH na silagem tratada com ureia e maior população de leveduras na silagem inoculada comparadas àquelas contendo Cal e ureia (Tabela 6).

Não houve efeito (p>0,05) para os teores de Carboidratos solúveis (g/kg) com média de 4,46 ±1,21 e a população de fungos filamentosos (UFC/g de silagem) com média de 6,12 ±1,41 (Tabela 6). As silagens tratadas com ureia apresentaram maiores valores de pH (8,15), as silagens tratadas com Lalsil apresentaram maiores valores de Leveduras (7,35 UFC/g de silagem) que Cal e Ureia.

Tabela 6 – Estabilidade aeróbia, Carboidratos solúveis residual, pH e populações microbianas das silagens de cana-de-açúcar após 7 dias de exposição ao ar;

| Itens | Tratamentos |
|-------|-------------|
|-------|-------------|

|                                    | Controle | Lalsil  | Cal    | Ureia  | p-valor | EPM    |
|------------------------------------|----------|---------|--------|--------|---------|--------|
| EA(horas) <sup>1</sup>             | 51,25    | 63,25   | 52,13  | 62,63  | 0,5414  | 36,584 |
| MS(g/kg MN) <sup>2</sup>           | 23,84B   | 25,74AB | 28,03A | 24,3AB | 0,0430  | 0,1521 |
| CHOs(g/kg MS) <sup>3</sup>         | 36,8     | 43,4    | 42,7   | 55,2   | 0,1805  | 0,075  |
| pH                                 | 3,51D    | 4,33C   | 7,27B  | 8,15A  | <0,0001 | 0,5044 |
| FUN(UFC/g de silagem) <sup>4</sup> | 4,75     | 6,56    | 5,70   | 4,69   | 0,0670  | 0,075  |
| LEV(UFC/g de silagem) <sup>5</sup> | 5,38AB   | 7,35A   | 6,96B  | 4,79B  | 0,0090  | 0,088  |

<sup>1</sup>Estabilidade aeróbia (horas); <sup>2</sup>Matéria seca; <sup>3</sup>Carboidratos solúveis em água; <sup>4</sup>Fungos filamentosos, unidades formadoras de colônia/g de forragem; <sup>5</sup>Leveduras, unidades formadoras de colônia/g de forragem;

EPM – Erro padrão da média

Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de probabilidade (P≤0,05)

Na Tabela 7 é mostrada a composição química das dietas contendo silagens de cana-de-açúcar após 90 dias de fermentação, ofertadas para os animais experimentais.

Tabela 7 - Composição química das dietas contendo silagens de cana-de-açúcar após 90 dias de fermentação

| Itens                      | Tratamentos |        |       |        |
|----------------------------|-------------|--------|-------|--------|
|                            | Controle    | Lalsil | Cal   | Ureia  |
| MS <sup>1</sup> g/kg MN    | 560,8       | 574,8  | 608,0 | 591,9  |
| MO <sup>2</sup> g/kg MS    | 954,3       | 955,9  | 950,7 | 960,1  |
| CHOs <sup>3</sup> g/kg MS  | 28,5        | 42,5   | 35,1  | 31,1   |
| PB <sup>4</sup> g/kg MS    | 125,7       | 130,5  | 125,6 | 118,8  |
| FDNcp <sup>5</sup> g/kg MS | 252,2       | 221,7  | 235,4 | 238,9  |
| FDA <sup>6</sup> g/kg MS   | 108,3       | 98,8   | 102   | 106,36 |
| NIDA/Ntotal <sup>7</sup>   | 26,7        | 14,6   | 79,9  | 18,1   |
| MM <sup>8</sup> g/kg MS    | 45,7        | 44,1   | 49,3  | 39,9   |
| EE <sup>9</sup> g/kg MS    | 16,6        | 22,9   | 33,5  | 43,4   |
| CNF <sup>10</sup> g/kg MS  | 577,4       | 598,4  | 573,9 | 576,6  |
| Lignina g/kg MS            | 28,75       | 22,6   | 26,6  | 27,4   |

<sup>1</sup>Matéria Seca <sup>2</sup>Matéria orgânica <sup>3</sup>Carboidratos solúveis <sup>4</sup>Proteína bruta <sup>5</sup>Fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína <sup>6</sup>Fibra em detergente ácido <sup>7</sup>g de Nitrogênio insolúvel em detergente ácido por kg de nitrogênio total <sup>8</sup>matéria mineral <sup>9</sup>Extrato etéreo <sup>10</sup>Carboidratos não fibrosos.

Apenas o consumo de EE foi afetado ( $P < 0,05$ ) pelas dietas experimentais, registrando-se maior consumo na dieta contendo silagem de cana-de-açúcar tratada com ureia (Tabela 8).

Tabela 8 – Consumo de nutrientes nas diferentes dietas contendo silagens de cana-de-açúcar.

| Itens <sup>1</sup>      | Tratamentos |        |       |       | p-valor | EPM    |
|-------------------------|-------------|--------|-------|-------|---------|--------|
|                         | Controle    | Lalsil | Cal   | Ureia |         |        |
| CMSkg/dia <sup>1</sup>  | 8,93        | 9,20   | 8,55  | 9,62  | 0,5455  | 0,39   |
| CMS%PV <sup>2</sup>     | 2,00        | 2,01   | 1,82  | 2,11  | 0,4985  | 0,06   |
| CPBkg/dia <sup>3</sup>  | 1,11        | 1,22   | 1,06  | 1,11  | 0,4889  | 0,0498 |
| CFDNkg/dia <sup>4</sup> | 2,18        | 1,93   | 1,9   | 2,3   | 0,409   | 0,0989 |
| CFDN%PV <sup>5</sup>    | 0,49        | 0,42   | 0,40  | 0,50  | 0,3402  | 0,0201 |
| CMOk/dia <sup>6</sup>   | 8,52        | 8,78   | 7,98  | 9,23  | 0,4526  | 0,3936 |
| CEEk/dia <sup>7</sup>   | 0,54C       | 0,91BC | 1,35B | 2,08A | <0,001  | 0,1646 |
| CCNFkg/dia <sup>8</sup> | 5,27        | 5,61   | 4,93  | 5,56  | 0,4459  | 0,25   |
| CNDTk/dia <sup>9</sup>  | 6,07        | 6,425  | 6,21  | 7,0   | 0,38    | 0,3004 |

<sup>1</sup>Consumo de matéria seca kg/dia; <sup>2</sup>Consumo de matéria seca em relação ao %peso vivo animal <sup>3</sup>Consumo de proteína bruta kg/dia; <sup>4</sup>Consumo de fibra insolúvel em detergente neutro kg/dia; <sup>5</sup>Consumo de fibra insolúvel em detergente neutro em relação ao %peso vivo animal; <sup>6</sup>Consumo de matéria orgânica kg/dia; <sup>7</sup>Consumo de extrato etéreo kg/dia <sup>8</sup>Consumo de carboidratos não fibrosos kg/dia; <sup>9</sup>Consumo de nutrientes digestíveis totais kg/dia; EPM – Erro padrão da média; Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de probabilidade ( $P \leq 0,05$ )

Na Tabela 9 encontram-se os resultados referentes a digestibilidade *in vivo* dos das dietas contendo silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e inoculante microbiano. Houve efeito de tratamentos ( $P < 0,05$ ) sobre as digestibilidades aparentes da MS, FDN, EE, CNF e NDT, enquanto que as digestibilidade da PB e MO não foram afetadas ( $P > 0,05$ ) pelas dietas.

Tabela 9 - Digestibilidade *in vivo* dos animais alimentados com as dietas contendo silagem de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e inoculante microbiano

| Itens | Tratamentos |        |     |       | p-valor | EPM |
|-------|-------------|--------|-----|-------|---------|-----|
|       | Controle    | Lalsil | Cal | Ureia |         |     |

|                   |        |         |        |         |        |        |
|-------------------|--------|---------|--------|---------|--------|--------|
| DMS <sup>1</sup>  | 68,98B | 70,02B  | 74,85A | 71,17B  | 0,0058 | 0,81   |
| DPB <sup>2</sup>  | 66,3   | 69,79   | 71,62  | 65,51   | 0,0925 | 1,1943 |
| DFDN <sup>3</sup> | 40,90B | 39,53B  | 53,79A | 46,81AB | 0,0244 | 1,9251 |
| DMO <sup>4</sup>  | 69,53B | 70,45B  | 75,61A | 71,76B  | 0,0061 | 0,8377 |
| DEE <sup>5</sup>  | 39,65C | 64,64B  | 85,38A | 86,11A  | 0,0002 | 5,17   |
| DCNF <sup>6</sup> | 82,55  | 81,43   | 84,60  | 82,23   | 0,4140 | 0,7292 |
| NDT <sup>7</sup>  | 67,78C | 69,96BC | 76,57A | 75,58AB | 0,002  | 1,125  |

<sup>1</sup>%Digestibilidade da matéria seca <sup>2</sup>Digestibilidade da proteína bruta

<sup>3</sup>%Digestibilidade da fibra insolúvel em detergente neutro <sup>4</sup>%Digestibilidade da matéria orgânica <sup>5</sup>%Digestibilidade do extrato etéreo <sup>6</sup>%Digestibilidade dos carboidratos não fibrosos <sup>7</sup>Nutrientes digestíveis totais;

EPM – Erro padrão da média

Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de probabilidade (P≤0,05)

As excreções de alantoína, de ácido úrico, de derivados de purina e purinas absorvidas (mmol/dia), Nmic (g/dia) e eficiencia microbiana não foram afetadas (P>0,05) pelas dietas experimentais (Tabela 10).

Tabela 10 – Derivados de purina e proteína microbiana de animais alimentados com as dietas experimentais contendo silagens com cana de açúcar.

| Itens                              | Tratamentos |        |        |        | p-valor | EPM    |
|------------------------------------|-------------|--------|--------|--------|---------|--------|
|                                    | Controle    | Lalsil | Cal    | Ureia  |         |        |
| Excreção de Alantoína (mmol/dia)   | 130,23      | 115,5  | 200,14 | 130,82 | 0,6481  | 24,37  |
| Excreção de Ácido úrico (mmol/dia) | 1,61        | 2,40   | 47,41  | 27,71  | 0,4541  | 0,1669 |
| Excreção de Derivados de Purina    | 131,84      | 117,97 | 217,14 | 117,59 | 0,5033  | 24,366 |

|                                        |        |        |        |        |        |        |
|----------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| (mmol/dia)                             |        |        |        |        |        |        |
| Purinas absorvidas<br>(mmol/dia)       | 128,11 | 110,27 | 214,75 | 119,29 | 0,6518 | 30,722 |
| Nmic (g/dia) <sup>1</sup>              | 70,39  | 60,59  | 118,03 | 70,96  | 0,6536 | 16,879 |
| Eficiencia microbiana<br>(gNmic/kgNDT) | 87,4   | 69,6   | 213,9  | 78,4   | 0,5267 | 38,653 |

Nmic<sup>1</sup> – Nitrogenio microbiano

EPM – Erro padrão da média

Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de probabilidade (P≤0,05)

Na Tabela 11 são mostrados os valores do balanço de nitrogênio dos animais, nitrogênio nas fezes e nitrogênio na urina, os quais não foram afetados (P>0.05) pelos tratamentos.

Tabela 11 – Balanço de nitrogênio dos animais alimentados com as com as dietas experimentais contendo silagens com cana-de-açúcar

| Itens                          | Tratamentos |        |                 |       | p-valor | EPM   |
|--------------------------------|-------------|--------|-----------------|-------|---------|-------|
|                                | Controle    | Lalsil | Óxido de calcio | Ureia |         |       |
| Balanço Nitrogenado gN/d       | 108,82      | 110,53 | 91,73           | 99,97 | 0,8582  | 7,337 |
| Nitrogênio das fezes<br>g/kgMS | 22,13       | 2,149  | 23,16           | 22,19 | 0,8147  | 0,700 |
| Nitrogênio da Urina gN/d       | 61,35       | 63,68  | 56,09           | 56,65 | 0,6192  | 3,791 |

EPM – Erro padrão da média; Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de probabilidade (P≤0,05)

Houve efeito significativo de pH (p<0,05) para tratamento e hora, O menor valor de pH ruminal (Figura 1) no tempo 0 e 20 horas foi observado para os animais alimentados com dietas incluindo silagens tratadas com óxido de calcio, o pico dos valores de pH ocorreram 24 horas após alimentação dos animais e ocorreu no período 0 para os valores de N-NH<sub>3</sub> (mg/dl de liquido ruminal). Os animais consumindo as dietas contendo silagem de cana tratadas com óxido de

calcio obtiveram menores valores de pH no tempo 20 e no tempo 0 em comparação às demais. Não houve efeito ( $p>0,05$ ) de tratamento para  $N-NH_3$  que apresentou média  $15,05 \pm 6,99$  havendo apenas efeito de hora ( $p<0,05$ ), a silagem controle apresentou o pico de  $N-NH_3$  20 horas após a primeira alimentação pela manhã.

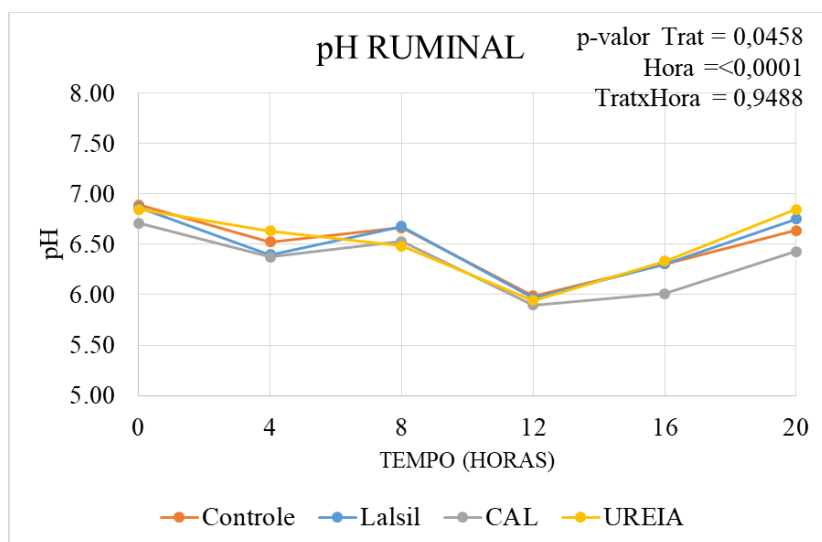


Figura 1 – Comportamento dos valores de pH ruminal mg/dl de líquido ruminal de bovinos alimentados com dietas contendo silagem de cana tratadas com aditivos químicos e inoculante microbiano. P-valor – probabilidade de efeito para tratamento (Trat) Hora (períodos de coleta) interação tratamento x hora (trat x hora).

Tabela 12 - Concentrações de pH e nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) mg/dl por horário de coleta

| N-NH <sub>3</sub> |            |        |        |        | P-valor |        |             |
|-------------------|------------|--------|--------|--------|---------|--------|-------------|
| Hora              | Tratamento |        |        |        | Trat    | Hora   | Trat x Hora |
|                   | Controle   | Lalsil | Cal    | Ureia  | 0,3050  | 0,0010 | 0,8379      |
| 0                 | 21,821     | 23,329 | 23,479 | 22,414 |         |        |             |
| 4                 | 13,566     | 12,694 | 9,935  | 9,935  |         |        |             |
| 8                 | 11,686     | 12,315 | 13,173 | 13,173 |         |        |             |
| 12                | 13,944     | 7,741  | 9,077  | 14,016 |         |        |             |
| 16                | 14,752     | 10,957 | 14,016 | 15,731 |         |        |             |
| 20                | 23,022     | 14,995 | 16,210 | 14,745 |         |        |             |
| Média             | 16,46      | 13,67  | 14,31  | 15,00  |         |        |             |

|       |                      |        |        |        |
|-------|----------------------|--------|--------|--------|
| EPM   | 0,7895               | 0,8830 | 0,8679 | 0,6893 |
| pH    | 0,0458 0,0001 0,9488 |        |        |        |
| 0     | 6,89                 | 6,86   | 6,71   | 6,85   |
| 4     | 6,53                 | 6,40   | 6,38   | 6,63   |
| 8     | 6,67                 | 6,68   | 6,53   | 6,49   |
| 12    | 5,99                 | 5,97   | 5,90   | 5,94   |
| 16    | 6,31                 | 6,31   | 6,01   | 6,34   |
| 20    | 6,64                 | 6,75   | 6,43   | 6,85   |
| Média | 6,50b                | 6,49c  | 6,33d  | 6,51a  |
| EPM   | 0,0526               | 0,0557 | 0,0517 | 0,0574 |

EPM – Erro padrão da média; P-valor – probabilidade de efeito para tratamento (Trat); Hora (períodos de coleta); Interação tratamento x hora (Trat x Hora). Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste F de Fischer ( $P < 0,05$ ).

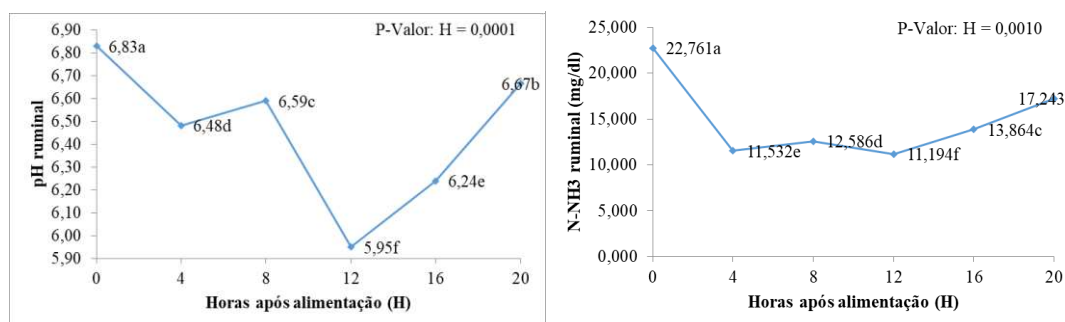


Figura 2 - pH e N-NH<sub>3</sub> ruminal ao longo do tempo (0, 4, 8, 12, 16 e 20h) após alimentação de bovinos de corte alimentados com silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e inoculante microbiano; P-valor: Probabilidade de efeito de tempo (H); Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste F de Fischer ( $P < 0,05$ ).

Na tabela 13 encontram-se os valores referentes aos ácidos graxos voláteis (mg/dl de líquido ruminal) dos animais antes da alimentação e 8 horas após a alimentação. Não houve efeito ( $p > 0,05$ ) de tratamento sobre a produção de AGVs mmol/L.

Tabela 13 – Ácidos graxos voláteis presentes no líquido ruminal de rúmen de bovinos de corte alimentados com as dietas experimentais.

| Antes da Alimentação | Tratamento |
|----------------------|------------|
|----------------------|------------|

|                             | Controle | Lalsil | Cal   | Ureia | p-valor | EPM    |
|-----------------------------|----------|--------|-------|-------|---------|--------|
| Total de AGVs mmol/L        | 18,98    | 27,69  | 22,75 | 24,21 | 0,3161  | 1,7177 |
| AGVs<br>individuais/100mmol |          |        |       |       |         |        |
| Acetato                     | 66,58    | 61,37  | 65,41 | 64,45 | 0,3308  | 1,0296 |
| Propionato                  | 19,63    | 23,09  | 22,31 | 23,05 | 0,2558  | 0,6700 |
| Butirato                    | 13,78    | 15,54  | 12,50 | 12,28 | 0,1362  | 0,6896 |
| Relação A:P                 | 3,44     | 2,72   | 2,94  | 2,82  | 0,2310  | 0,1291 |
| 8 horas após alimentação    |          |        |       |       |         |        |
| Total e AGVs mmol/L         | 29,95    | 25,26  | 24,40 | 27,72 | 0,5583  | 1,4909 |
| AGVs<br>individuais/100mmol |          |        |       |       |         |        |
| Acetato                     | 64,68    | 64,49  | 63,75 | 63,51 | 0,9718  | 0,8959 |
| Propionato                  | 22,74    | 22,68  | 24,05 | 22,63 | 0,8592  | 0,5875 |
| Butirato                    | 12,58    | 12,82  | 12,20 | 13,86 | 0,8988  | 0,6249 |
| Relação A:P                 | 2,90     | 2,86   | 2,68  | 2,84  | 0,9175  | 0,1044 |

EPM – Erro padrão da média; Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de probabilidade ( $P \leq 0,05$ )

O maior percentual de degradabilidade da MS e MO foi observado para as silagens tratadas com Óxido de cálcio, apresentando valores superiores a 40% de degradação no tempo 0 (Figura 1). Não houve efeito ( $p > 0,05$ ) para os parâmetros b e kd das frações da MS que apresentaram média  $32,21 \pm 12,08$  e  $0,031 \pm 0,017$  bem como para os parâmetros b e kd referentes à MO das silagens que apresentaram média  $35,96 \pm 17,19$  e  $0,040 \pm 0,038$  (Tabela 14).

As silagens com inclusão de Óxido de cálcio apresentaram valores da fração solúvel da MS e da MO superiores ( $p < 0,05$ ) a silagem controle ( $p < 0,05$ ) (44,19 vs 27,12) e (42,23 vs 23,10) respectivamente.

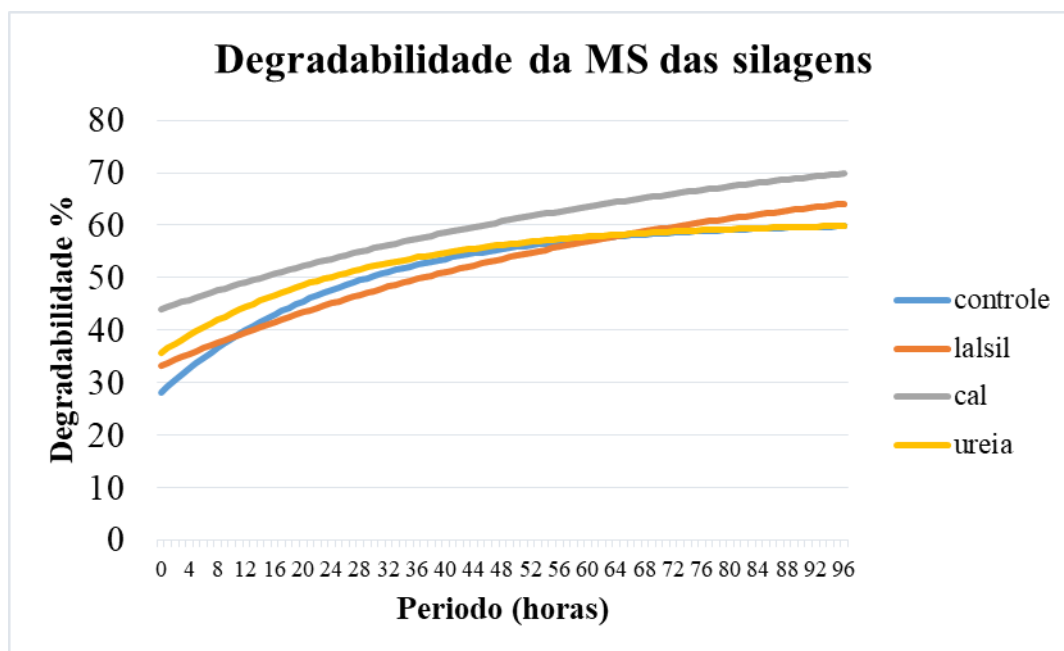


Figura 2 – Curvas de degradação das silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e inoculante microbiano lalsil cana (*Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition) nos diferentes períodos (horas).

Tabela 14 – Taxa de degradação *in situ* dos animais alimentados com dietas contendo silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e inoculante microbiano.

| Parâmetros      | Tratamentos |         |        |         | p-valor | EPM   |
|-----------------|-------------|---------|--------|---------|---------|-------|
|                 | Controle    | Lalsil  | Cal    | Ureia   |         |       |
| MS <sup>1</sup> |             |         |        |         |         |       |
| Fração a        | 27,12B      | 33,23AB | 44,19A | 35,48AB | 0,0274  | 2,191 |
| Fração b        | 38,01       | 40,77   | 23,35  | 26,64   | 0,1767  | 3,021 |
| kd              | 0,034       | 0,020   | 0,028  | 0,036   | 0,7007  | 0,004 |
| MO <sup>2</sup> |             |         |        |         |         |       |
| Fração a        | 23,10B      | 31,66AB | 42,23A | 34,19AB | 0,0119  | 2,30  |
| Fração b        | 39,72       | 35,44   | 41,47  | 27,12   | 0,6941  | 4,29  |
| kd              | 0,080       | 0,024   | 0,017  | 0,036   | 0,0839  | 0,009 |

<sup>1</sup>Matéria seca <sup>2</sup>Matéria orgânica

a – Fração solúvel em água b – fração potencialmente degradável kd – taxa fracional de degradação;

EPM – Erro padrão da média

Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de probabilidade ( $P \leq 0,05$ )

## DISCUSSÃO

O teor de MS da cana-de-açúcar antes da ensilagem, assemelha-se aos 300gMS/kg matéria natural (MN) preconizados por McDonald et al. (1991) para garantir uma boa fermentação do material ensilado. Silagens de cana-de-açúcar, apesar de, em geral, apresentarem teores adequados de MS e carboidratos solúveis em água, tendem a sofrer perdas durante o processo de ensilagem devido ao excesso de carboidratos solúveis no meio. A redução no teor de MS após a ensilagem pode estar relacionada à fermentação por microrganismos indesejáveis, como as leveduras, que resultam na produção de etanol. Esse fato é comum em diversos estudos sobre silagens (Pedroso et al, 2008; Ávila et al, 2014; Daniel et al, 2015; Silva et al 2018; Junior et al, et al, 2020; Agarussi et al, 2022).

A redução no teor de MS ocorreu em menor proporção para a silagem tratada com Óxido de cálcio, que também apresentou maior teor de carboidratos solúveis residuais e menor teor de FDNcp em comparação com a silagem controle, corroborando com outros estudos que aplicaram óxido de cálcio (Amaral et al., 2009; Cavali et al., 2010; Martins et al., 2015). O óxido de cálcio, quando em contato com a água, libera hidratos de cálcio (CaO) e produz hidróxido de cálcio, que possui um alto potencial alcalino (Jacovaci et al., 2017), contribuindo, assim, para a preservação de carboidratos solúveis por meio da inibição das leveduras. Esse efeito é evidenciado pelo maior valor de pH nas silagens tratadas com Óxido de cálcio, que também apresentaram maiores teores de CNF e carboidratos solúveis residuais.

Por outro lado, as perdas de MS na silagem controle estão associadas ao consumo excessivo de carboidratos solúveis, o que leva à redução do pH e ao aumento do teor de FDNcp, indicando uma alta proliferação de leveduras e a consequente produção de etanol (Pahlow et al., 2003). O menor pH foi registrado na silagem não tratada, resposta semelhante também foi observado por Roth et al. (2018) em estudos com silagem de cana-de-açúcar.

O maior teor de PB para silagem tratada com ureia era esperado, uma vez que a ureia possui em sua composição, cerca de 262 à 292% de PB, resultando em um maior teor de N-NH<sub>3</sub>

nessas silagens. No entanto, os teores de  $\text{N-NH}_3$  de todas as silagens encontram-se abaixo dos 10g de  $\text{N-NH}_3$ / kg N total preconizados por Mahanna, (2003) para silagens de boa qualidade.

Após 90 dias de fermentação a população de BAL aumentou e a população de leveduras reduziu em comparação à população epifítica do material antes da ensilagem, isso indica que a quantidade de açúcar disponível foi suficiente para garantir o crescimento de bactérias lácticas e declínio do pH. A população de leveduras após 90 dias de fermentação foi menor para as silagens tratadas com ureia, pois a urease presente na parede celular das forragens ensiladas atua liberando amônia, que apresenta potencial inibitório para leveduras, promovendo redução na produção de etanol (Pedroso et al, 2011).

O teor mais elevado de ácido acético na silagem tratada com óxido de cálcio e o teor de  $\text{N-NH}_3$  no tratamento com ureia podem ter minimizado as perdas decorrentes das fermentações secundárias causadas por microrganismos indesejáveis, como a produção de etanol (Lopes e Evangelista, 2010).

Ademais, a maior produção de ácido acético na silagem tratada com óxido de cálcio, em comparação com a silagem controle, pode ter contribuído para o controle das leveduras, uma vez que o ácido acético tem potencial antifúngico (Moon, 1983). Além disso a menor população de fungos filamentosos pode estar relacionada ao pH abaixo de 4,0, bem abaixo da faixa de crescimento desses grupos microbianos (Woolford, 1984).

A menor produção de etanol nas silagens tratadas com  $\text{CaO}$  e ureia comparadas à controle, podem estar associadas a menor população de leveduras, especialmente na silagem com ureia. Jacovaci et al, (2017) destacaram em sua revisão uma produção média de etanol de 42,4g/kgMS para silagens tratadas com óxido de cálcio, os dados aqui apresentados encontram-se bem abaixo (24,72g/kg), indicando eficiência na aplicação do  $\text{CaO}$  e redução das perdas de nutrientes como carboidratos solúveis por fermentações secundárias, de microrganismos indesejáveis. Isso indica que a maior quantidade de ácido acético no tratamento óxido de cálcio contribuiu para redução de leveduras e menor produção de etanol, em contrapartida o excesso de ácido láctico presente no tratamento controle pode ter sido consumido por leveduras para produção de etanol.

Embora tenha sido observada a presença de ácido butírico, os resultados foram inferiores a 10,0 g/kg de MS, com exceção do tratamento controle (14,2 g/kg de MS), isso se deve à população reduzida de enterobactérias, uma das principais produtoras desse ácido a partir da proteólise (McDonald et al., 1991), Além disso, a cana-de-açúcar tradicionalmente apresenta um

baixo teor de proteína em sua composição, apresentando substrato reduzido para o crescimento desse grupo.

Há perda da estabilidade aeróbia de todas as silagens após sete dias de exposição ao ar, com aquecimento da massa ensilada após 50-60 horas, indica que provavelmente apesar da diferença observada na produção de ácido acético, os tratamentos não apresentaram eficiência em conter fermentações indesejáveis após exposição das silagens ao ar. Pedroso et al. (2017) observaram média de 60 horas para estabilidade aeróbia de silagens de cana tratadas com 10g/kg MN de CaO. Valor semelhante a este foi observado por Silva et al.(2018) em silagens de cana-de-açúcar inoculadas com cepas de *L. Buchneri*. Zhang et al. (2019) estudando a sucessão de bactérias e fungos em silagens de cana-de-açúcar após a exposição ao ar, observaram forte correlação do gênero *Pichia* com *Lactobacillus* e *Pediococcus*, cujo gênero de leveduras está fortemente relacionados à perda da estabilidade, devido sua tolerância à acidez e atuação nas etapas iniciais de exposição ao ar.

O aumento da população de fungos filamentosos e leveduras está relacionado com a perda da estabilidade aeróbia. Com a exposição da silagem ao ar, ocorre o crescimento de microrganismos que estavam na forma esporulada no interior do silo, resultando no consumo de nutrientes, uma vez que as leveduras podem consumir nutrientes, produzindo CO<sub>2</sub> e gerando calor, acarretando perdas de matéria seca (Pahlow et al., 2003).

O maior consumo de EE na silagem tratada com ureia provavelmente se deve ao maior conteúdo desse nutriente nessa silagem, visto que o consumo de MS foi semelhante entre as dietas. A maior digestibilidade da matéria seca das dietas contendo silagens tratadas com óxido de cálcio provavelmente se deve a maior solubilidade no rúmen devido à hidrólise ácida de carboidratos complexos após o processo de conservação na forma de silagem, o que pode favorecer o ataque por bactérias fibrolíticas no ambiente ruminal (Jackson, 1977). Isso explicaria a maior digestibilidade da FDN e NDT para as dietas incluindo silagens tratadas com CaO. O aumento da digestibilidade da FDN em silagens de cana-de-açúcar submetidas a tratamentos alcalinos tem sido reportado por diferentes autores, como Daniel et al. (2013), Chizzoti et al. (2015) e Martins et al. (2015).

Os valores observados para DMS e DFDN estão próximos aqueles relatados por Jacovaci et al, (2017) em sua meta-análise avaliando adição de óxido de cálcio em silagens de cana, que verificaram valores de 70,2 e 57,5%, respectivamente.

A maior digestibilidade de CNF para as dietas incluindo os tratamentos Óxido de cálcio e Ureia, com valores superiores a 85% pode ser explicada pela relação N-NH<sub>3</sub>/Carboidrato presente no ambiente ruminal e pela interação do pH com as bactérias presentes no rúmen. Esses dados sugerem uma melhor utilização da amônia presente no ambiente ruminal (Costa et al, 2015). A quantidade de amônia ruminal é uma ferramenta importante para otimizar o aproveitamento das fontes de carboidratos disponíveis e ocorre idealmente entre 8 e 15 mg/dL de amônia ruminal disponível (Detmann et al. 2009)

Embora tenha sido observado efeito entre tratamento e hora, a concentração média de amônia ruminal de 14,86 mg/dL no nosso estudo, é superior aos 5 mg/dL de amônia ruminal estabelecidos por Satter e Slyter (1974) e aos 10 mg/dL de nitrogênio amoniacal ruminal (Van Soest, 1994), para que ocorra adequado crescimento microbiano. Enquanto que para o pH ruminal foi observado apenas um efeito de tempo, onde o pico para os valores de pH foi observado 24 horas após a primeira alimentação Chizzoti et al, (2015) não observaram efeito dos níveis de adição de óxido de cálcio sobre valores de pH ruminal, concentração de amônia, eficiência microbiana, e verificaram efeito linear positivo sobre a digestibilidade da MS, MO, FDN e PB.

A diferença de 17 pontos percentuais observada na fração solúvel da MS e da MO em comparação com a silagem controle, evidencia a hidrólise de carboidratos complexos comentada anteriormente. causada pela aplicação de CaO à cana-de-açúcar nas silagens, aumentando o aproveitamento dessa silagem no ambiente ruminal. Esses resultados estão de acordo com os observados por Cavali et al, (2010) que observaram valores de 53,50% na fração solúvel para silagens tratadas com 10g/kg MN de CaO.

## CONCLUSÕES

Destaca-se a redução do conteúdo de etanol naquelas silagens tratadas com óxido de cálcio ou ureia, principal problema na ensilagem dessa cultura, sem contudo favorecer a estabilidade aeróbia dessas silagens. No experimento com animais, as dietas avaliadas não promoveram alterações no consumo de nutrientes, bem como no pH e amônia ruminal e concentração de AGV no rumen. A aplicação de 10g/kg de óxido de cálcio promoveu melhor preservação de matéria seca e carboidratos solúveis, aumentou a produção de ácido acético e perdas na forma de etanol,

reduzindo o teor de FDNcp das silagens de cana-de-açúcar. Promoveu também melhorias na digestibilidade *in situ* da MS com aumento da fração solúvel da MS e da MO, uma maior digestibilidade *in vivo* da MS, FDN, CNF e NDT sem alterações no consumo animal. Portanto recomenda-se a aplicação de 10g/kg MN de óxido de cálcio em silagens de cana.

### **Agradecimentos**

Os autores externam seus agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ciência Animal (INCT-CA) por todo o apoio e suporte financeiro.

### **Conflito de interesse**

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

### **REFERÊNCIAS**

- Agarussi, M. C. N., Pereira, O. G., da Silva, L. D., da Silva, V. P., de Paula, R. A., e Silva, F. F., & Ribeiro, K. G. (2022). Effect of Various Strains of *Lactobacillus buchneri* on the Fermentation Quality and Aerobic Stability of Corn Silage. **Agriculture**, 12(1), 95.
- Amaral, R. C. D., Pires, A. V., Susin, I., Nussio, L. G., Mendes, C. Q., & Gastaldello Junior, A. L. (2009). Cana-de-açúcar ensilada com ou sem aditivos químicos: fermentação e composição química. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 38, 1413-1421.
- AOAC. (1990). Official methods of analysis of the AOAC, 15th ed. Methods 932.06, 925.09, 985.29, 923.03.
- Arriola, K. G. Oliveira, A.S.; Jiang, Y. et al.; (2021). Meta-analysis of effects of inoculation with *Lactobacillus buchneri*, with or without other bacteria, on silage fermentation, aerobic stability, and performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**,
- Ávila C.L.S., Carvalho B.F., Pinto J.C., Duarte W.F. and Schwan R.F. (2014). Use of *Lactobacillus hilgardii* strains for enhancing quality of sugarcane silage. **Journal of Dairy Science**, 97, 940–951.

- Ávila, C. L. D. S., Valeriano, A. R., Pinto, J. C., et al. (2010). Chemical and microbiological characteristics of sugar cane silages treated with microbial inoculants. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39(1), 25-32.
- Barbosa, A. M., R. F. D. Valadares, S. C. Valadares Filho, D. S. Pina, E. Detmann, and M. I. Leão. (2011). Endogenous fraction and urinary recovery of purine derivatives obtained by different methods in nellore cattle. **Journal of Animal Science**. 89:510–519. doi:10.2527/jas.2009-2366.
- Bueno, A.V.I; Lazzari, G., Jobim, C. C., & Daniel, J. L. P. et al. (2020). Ensiling total mixed ration for ruminants: A review. **Agronomy**, v. 10, n. 6, p. 879,
- Cândido, E. P.; Santos, E. M.; Ramos, J. P. F.; (2015). Economic response of feedlot sheep fed silages with different cultivars of sorghum. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.1, p.79-85.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., et al. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**. 6 (8), 1621–1624,
- Cardoso, L. L., Ribeiro, K. G., Marcondes, M. I., Pereira, O. G., & Weiß, K. (2018). Chemical composition and production of ethanol and other volatile organic compounds in sugarcane silage treated with chemical and microbial additives. **Animal Production Science**, 59(4), 721-728.
- Cardoso, L.L.; Ribeiro, K.G.; Marcondes, M.I.; et al. (2018). Chemical composition and production of ethanol and other volatile organic compounds in sugarcane silage treated with chemical and microbial additives. **Animal Production Science**.
- Carvalho-Estrada, P. D. A.; de Andrade, P. A. M.; Paziani, S. D. F.; et al. (2020). Rehydration of dry corn preserves the desirable bacterial community during ensiling. **FEMS Microbiology Letters**, v367 n 17.
- Castro Neto, A.G; Molina, L.R; Gonçalves, L.C; et al. (2008). Parâmetros de fermentação de silagens de cana-de-açúcar submetidas a diferentes tratamentos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.5, p.1150-1156, <https://doi.org/10.1590/s0102-09352008000500017>

- Cavali, J., Pereira, O. G., Valadares Filho, S. D. C., et al. (2010). Bromatological and microbiological characteristics of sugarcane silages treated with calcium oxide. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 1398-1408.
- Chelius, M.K., Triplett, E.W. (2001). The diversity of Archaea and Bacteria in: association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial ecology** 41 (3), 252–263.
- Chizzotti, F. H. M.; Pereira, O. G.; Filho, S. C. V.; et al. (2014). Does sugar cane ensiled with calcium oxide affect intake, digestibility, performance, and microbial efficiency in beef cattle? *Animal Feed Science and Technology*, 203, 23–32. (2015) doi:10.1016/j.anifeedsci.
- Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. **Série Histórica das Safras**. (2021). Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras> Acesso em: 20 Jul. (2021).
- Costa, N. D. L., Monteiro, A. L. G., Silva, A. L. P., et al. (2015). Considerações sobre a degradação da fibra em forragens tropicais associada com suplementos energéticos ou nitrogenados. **Archivos de Zootecnia**, v. 64, n. 247, p. 31-41,
- Martins, S. C. D. S. G., Carvalho, G. G. P., Pires, A. J. V., et al; (2015). Parâmetros qualitativos de silagens de cana-de-açúcar tratadas com ureia e óxido de cálcio. **Semina Ciências Agrárias**, 1135-1144.
- Daniel, J.L.P., Santos, M.C., Zopollatto, M., Huhtanen, P., Nussio, L.G. (2013). A data analysis of lime addition on the nutritive value of sugarcane in Brazil. **Animal Feed Science Technology** 184, 17-23.
- Daniel, J. L. P.; Checchi, M.; Zwieler, J.; et al. (2015). The effects of *Lactobacillus kefir* and *L. brevis* on the fermentation and aerobic stability of sugarcane silage. **Animal Feed Science and Technology**, 205, 69-74.
- Detmann, E., Paulino, M. F., Mantovani, H. C., Valadares Filho, S. D. C., et al. (2009). Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis–Menten kinetics. **Livestock Science**, 126(1-3), 136-146.
- Detmann, E., Souza, M.A., Valadares Filho, S.C. et al. (2012). **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco: Universidade Federal de Viçosa, 214 p.

- Fernandes, J; Silva, E.B; Carvalho-estrada, C.A; et al. (2021). Influence of hybrid, moisture, and length of storage on the fermentation profile and starch digestibility of corn grain silages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 271, p. 114707.
- Ferraretto, L. F.; Silva Filho, W. I., Fernandes, T. et al. (2018). Effect of ensiling time on fermentation profile and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated corn with or without varied concentrations of wet brewers grains. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 5, p. 4643-4649.
- Guo, L.; Yao, D.; Li, D.; et al. (2020). Effects of lactic acid bacteria isolated from rumen fluid and feces of dairy cows on fermentation quality, microbial community, and in vitro digestibility of alfalfa silage. **Frontiers in microbiology**, 10, 2998.
- Hall, M.B., (2003) Challenges with nonfiber carbohydrate methods1,2. **Journal of Animal Science** 81, 3226–3232. <https://doi.org/10.2527/2003.81123226x>.
- Hristov, A. N., A. Bannink, L. A. Crompton, et al. (2019). Invited review: Nitrogen in ruminant nutrition: A review of measurement techniques. **Journal of. Dairy Science**. 102:5811–5852. doi:10.3168/jds.2018-15829.
- Jackson, M.G., (1977). Review article: the alkali treatment of straws. **Animal Feed Science and Technology** 2, 105–130.
- Jacovaci, F. A., Jobim, C. C., Schmidt, P. (2017). A data-analysis on the conservation and nutritive value of sugarcane silage treated with calcium oxide. **Animal Feed Science and Technology**, v. 225, p. 1-7,
- Júnior, R. C., Capucho, E., Garcia, T. M., Del Valle, T. A., Campana, M., Zilio, E. M., ... & Morais, J. P. (2020). Lemongrass essential oil in sugarcane silage: Fermentative profile, losses, chemical composition, and aerobic stability. **Animal Feed Science and Technology**, 260, 114371.
- Júnior, R. C., Capucho, E., Garcia, T. M., et al (2020). Lemongrass essential oil in sugarcane silage: Fermentative profile, losses, chemical composition, and aerobic stability. **Animal Feed Science and Technology**, v. 260, p. 114371,
- Klopfenstein, T., (1978). Chemical treatment of crop residues. **Journal of Animal Science** 46, 841–848.
- Kung, L. Jr., J. R. Robinson, N. K. Ranjit, J. H. Chen, C. M. Golt, and J. D. Pesek. (2000). Microbial populations, fermentation endproducts, and aerobic stability of corn silage

- treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. **Journal Dairy Science**. 83:1479–1486.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M.(Eds.), **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, John Wiley, New York, pp. 115–176.
- Lopes, J.; Evangelista, A. R. Características bromatológicas, fermentativas e população de leveduras de silagem de cana-de-açúcar acrescidas de ureia e aditivos absorventes de umidade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 39, n. 5, p. 984-991, 2010.
- Mahanna, Bill; Chase, Larry E. (2003). Practical applications and solutions to silage problems. **Silage science and technology**, v. 42, p. 855-895.
- Martins, S. C. D. S. G., Carvalho, G. G. P., Pires, A. J. V., Silva, R. R., Leite, L. C., Pereira, F. M., ... & da Cruz, C. H. (2015). Qualitative parameters of sugarcane silages treated with urea and calcium oxide. *Semina: Ciências Agrárias*, 36(2), 1135-1144.
- McDonald, Peter, A. R. Henderson, and S. Jo E. Heron. (1991). **The biochemistry of silage**. Chalcombe publications.
- Miyaji, M; Matsuyama, H; Nonaka, K. (2017). Effect of ensiling process of total mixed ration on fermentation profile, nutrient loss and in situ ruminal degradation characteristics of diet. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 1, p. 134-139.
- Moon, Nancy J. (1983). Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 453-460.
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.** 153:375–380.
- Okuda, H., Fujii, S., Kawashima, Y., (1965). A direct colorimetric determination of blood ammonia. *Tokushima Tokushima Journal of Experimental Medicine*. 12, 11–23.
- Orskov, D.R.; McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p.499-503.
- Oude Elferink, S.J.W.H., Krooneman, J., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F., Faber, F. and Driehuis, F. (2001). Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology** 67, 125–132.

- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude-Elferink, S.J.W.H., Spoelstra, S.F. (2003). Microbiology of ensiling. In: Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H. (Eds.), **Silage Science and Technology**. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, pp. 31–93.
- Pedroso, A. F., Esteves, S. N., Junior, W. B., & Souza, G. B. (2017). Chemical composition, fermentation profile and apparent digestibility of sugarcane silage treated with chemical additives. **Boletim de Indústria Animal**, 74(3), 182-194.
- Pedroso, A.F; Nussio, L.G; Loures, D.R.S; et al. (2007). Efeito do tratamento com aditivos químicos e inoculantes bacterianos nas perdas e na qualidade de silagens de cana-deaçúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.3, p.558-564, <https://doi.org/10.1590/s1516-35982007000300006>
- Pedroso, A. F., Nussio, L. G., Loures, D. R. S., et al. (2008). Fermentation, losses, and aerobic stability of sugarcane silages treated with chemical or bacterial additives. **Scientia Agricola**, 65(6), 589-594.
- Rabelo, C. H. S., Härter, C. J., Ávila, C. L. D. S., & Reis, R. A. (2019). Meta-analysis of the effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, chemical composition and aerobic stability of sugarcane silage. **Grassland science**, v. 65, n. 1, p. 3-12.
- Roth, A. P. T., Siqueira, G. R., Rabelo, C. H., et al (2018). Effect of days postburning and calcium oxide on the fermentation, aerobic stability and nutritional characteristics of sugarcane silage for finishing Nellore steers. **Grass and Forage Science**, 73(3), 671-684.
- Satter, L.D.; Slyter, L.L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial production in vitro. **British Journal of Nutrition**. v. 32, n. 2, p.199-208.
- Siegriffield, V.R., H. Ruckemann and G. Stumpf. (1984).Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. **Landwirtsch Forsch.** 37:298-304.
- Silva, L. D., Pereira, O. G., Silva, T. C. (2018). Effects of *Lactobacillus buchneri* isolated from tropical maize silage on fermentation and aerobic stability of maize and sugarcane silages. **Grass and Forage Science**, 73(3), 660-670.
- Valadares Filho SC, Marcondes MI, Chizzotti ML, et al. (2023). Exigências nutricionais de zebuínos puros e cruzados **BR-CORTE**. Viçosa: DZO-UFV, p.113-133.Eds.

- Van soest, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. (1994). 2. ed. Ithaca: Comstock Publishing Association, 476 p.
- Wang, H. Hao, W., Ning, T. et al. (2018). Characterization of culturable yeast species associating with whole crop corn and total mixed ration silage. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 31, n. 2, p. 198.
- Zhang, L., Zhou, X., Gu, Q., et al, (2019). Analysis of the correlation between bacteria and fungi in sugarcane tops silage prior to and after aerobic exposure. **Bioresource Technology**, 291, 121835. doi:10.1016/j.biortech.2019.12183
- Zhang, X., Wang, H., & Guo, X. (2021). 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**, 115006.

## CAPITULO II – DIVERSIDADE MICROBIANA DE SILAGENS DE MILHO E DE RAÇÃO MISTA TOTAL (TMR) COM OU SEM INOCULANTE MICROBIANO

### Resumo

Objetivou-se avaliar os efeitos da ensilagem de milho na forma de ração mista total (TMR) inoculada ou não, sobre composição química, perfil fermentativo, perdas de matéria seca e estabilidade aeróbia após 90 dias fermentação. Também avaliou-se a diversidade microbiana das silagens de milho preparadas na forma de ração mista total (TMR) na presença ou não do inoculante, sobre parâmetros ingestivos, digestivos e ruminais de bovinos de corte. Foram avaliados os seguintes tratamentos: Tratamento 1 Controle – Silagem de milho convencional sem adição de inoculante; Tratamento 2 – Silagem de milho inoculada com LalSil AS; Tratamento 3 – Silagem de milho TMR (Sem inoculante); Tratamento 4 – Silagem de milho TMR inoculada com Lalsil AS. Os dados referentes às silagens nos baldes foram avaliados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), 4x5. O modelo incluiu os efeitos fixos de silagem, inoculante e da interação silagem × inoculante. Foi registrado maior conteúdo de MS nas silagens de TMR, comparadas às silagens exclusiva de milho (469,5 x 287,6 g/kg). Houve efeito de silagem ( $P<0,05$ ) sobre o conteúdo de ácido lático, registrando-se maior valor na silagem TMR comparada à silagem exclusiva de milho, (70/kgMS) vs (111g/kg), as silagens inoculadas apresentaram maior produção de ácido acético em relação as silagens não inoculadas, (15,61) vs (16,23g/kgMS). Houve efeito ( $P<0,05$ ) de silagem sobre EA registrando se maior valor na silagem TMR comparada à silagem de milho (168 vs 68,21 horas). Observou-se maior abundância dos grupos *Lactobacillus* e *Lentilactobacillus* nas silagens exclusivas de milho e de *Weissela* nas silagens de TMR. Ao se comparar as silagens TMR com a silagem controle (CONT) verificou-se aumento na família *Lactobacillaceae*, principalmente na população de *Weissela*. Ao se comparar TMR vs TMR + LB verifica-se aumento na família *Lactobacillaceae*, principalmente a população de *Lentilactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. Não se faz necessário a aplicação de inoculante em silagens TMRs de milho, tendo as silagens apresentado alta estabilidade aeróbia com menores perdas de MS e preservação de carboidratos solúveis, com solubilidade do amido. A aplicação do inoculante aumentou a abundância relativa do gênero *Lactobacillaceae* e as silagens TMRs tiveram aumento na abundância relativa principalmente na

população de *Weissella* e *Lactiplantibacillus*. Mediante os aspectos abordados indica-se fazer a ensilagem de ração total de milho sem adição do inoculante microbiano para melhorias no perfil fermentativo e na estabilidade aeróbia.

## **PALAVRAS-CHAVE**

Bactéria do ácido lático. Concentrado. Inoculante. Microrganismos. TMR. 16S rDNA.

## **INTRODUÇÃO**

Desde que o conceito de TMR (Total Mixed Ration) foi introduzido, estudos têm sido realizados na busca de otimizar a produção animal. Isso é feito de forma a reduzir os custos com mão de obra, fornecimento de uma ração balanceada e impedindo que os animais selecionem ingredientes da ração (Owen & Howard, 1965).

Segundo dados da CONAB (2021), tem ocorrido uma elevação na produção de grãos de milho e de soja ao longo dos últimos dez anos. Isso resulta em uma expectativa de maior inclusão de grãos nos sistemas de confinamento de bovinos, no entanto, a logística de armazenamento é um dos principais gargalos nesses sistemas. Dessa forma, a produção de silagens na forma de TMR se apresenta como uma alternativa interessante. Os grãos que farão parte das dietas podem ser armazenados diretamente no silo no momento de ensilagem, facilitando o armazenamento e, além disso, a logística de fornecimento diário.

O interesse em silagens TMR tem sido renovado em alguns países como China, África do Sul, Itália e Brasil (Bueno et al, 2020). Algumas vantagens têm sido reportadas como a simplificação no manejo nutricional, bem como aumento da digestibilidade dos nutrientes, principalmente, o amido (no caso de grãos ricos em prolaminas) (Miyaji et al., 2017), redução da seleção dos ingredientes da dieta e aumento do tempo de estabilidade aeróbia merecem destaque para futuros estudos (Nishino et al., 2004; Wang & Nishino 2007; Nishino & Hattori 2007; Chen et al., 2015).

De modo geral, silagens de milho apresentam excelente qualidade quando preparadas corretamente, entretanto quando o material é exposto ao ar o ácido lático produzido no processo fermentativo e os carboidratos solúveis residuais presentes no material, tendem a acarretar em perdas na fase aeróbia.

Dessa forma, o uso de inoculantes microbianos como o *Lentilactobacillus buchneri*, tem sido alvo de diversas pesquisas como destacado por Arriola et al., (2020) em sua meta-análise, objetivando o aumento das bactérias lácticas, a produção de ácido acético e conversão do ácido láctico a 1,2 propanodiol, sendo uma importante forma para minimizar as perdas no processo fermentativo, principalmente as perdas causadas por mofo e leveduras após a abertura do silo.

A degradação das proteínas que recobrem o amido em silagens de milho incrementam a taxa de degradação da matéria seca e do amido no ambiente ruminal (Fernandes et al., 2021). Tal fato pode ocorrer de maneira similar em silagens TMR. Isso acontece porque a umidade presente na planta em uma interação com o concentrado pode possibilitar que os mesmos processos de degradação de prolaminas ocorram. Isso acaba por modificar o consumo e digestibilidade de nutrientes quando fornecida para os ruminantes. (Ferrareto et al., 2018).

Além desses efeitos, a adição do nitrogênio não proteico, que advém do fornecimento de ureia no silo em silagens TMR pode promover uma hidrólise alcalina de carboidratos complexos. Isso ocorre principalmente na fibra das forragens, possibilitando um aumento fracional da sua digestibilidade, pois segundo Bueno et al (2020), a degradabilidade da FDN em silagens TMR depende principalmente dos ingredientes contidos na dieta.

Embora na atualidade trabalhos dessa natureza sejam escassos, algumas modificações na microbiota da silagem e ruminal podem ser esperadas em função da modificação do substrato fornecido. Wang et al. (2018) observaram maior tempo de estabilidade aeróbia para silagens TMR com modificações das espécies de leveduras em silagens de milho de planta inteira e silagens de milho TMR entre os períodos de abertura. Melhorias na estabilidade aeróbia também foram observadas por Nishino et al., (2004) que observaram redução no crescimento de leveduras e maior estabilidade aeróbia para as silagens tratadas com *Lentilactobacillus buchneri* em comparação com a silagem controle.

No entanto, em nosso país, estudos envolvendo a avaliação da microbiota em silagens de TMR, bem como avaliações envolvendo animais alimentados com as mesmas são incipientes. Desta forma, baseado no exposto, a condução do presente estudo tem como base avaliar a diversidade microbiana de silagens de milho TMR na presença ou não de *Lentilactobacillus buchneri*, bem como o consumo e digestibilidade dos nutrientes das dietas, observando as diferenças entre as silagens e o processo de mistura da silagem de milho com o concentrado no momento da alimentação. A nossa hipótese é que o milho ensilado na forma de TMR proporciona

ganhos em estabilidade aeróbia e maior eficiência alimentar em relação a silagem de milho convencional. No Brasil, são incipientes os estudos envolvendo a avaliação de milho ensilado na forma de TMR, bem como seu uso na alimentação animal.

Objetivou-se avaliar os efeitos da ensilagem de milho na forma de ração mista total (TMR) inoculada ou não, sobre composição química, perfil fermentativo e estabilidade aeróbia após 90 dias de fermentação. Além disso, avaliar a diversidade microbiana das silagens de milho preparadas na forma de ração em mistura total (TMR) na presença ou não do inoculante.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Colheita do milho, preparo da TMR, ensilagem e delineamento experimental**

O milho foi plantado em área do DZO, no setor de Agrostologia. A colheita do material foi realizada quando o grão atingiu 2/3 da linha do leite (29,85 gMS/kgMN). Em seguida, o material foi processado em tamanhos de partículas de  $\pm 20$  mm em máquina forrageira estacionária (JF-60, JF-Máquinas®, Itapira-SP, Brasil) acoplada em tomada de potência do trator (Valtra / Valmet 785®, Mogi das CruzesSP, Brasil). O experimento foi realizado nas dependências do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) no município de Viçosa-MG situada a 200 e 45' de latitude sul, 420 e 51' de longitude oeste e 648 m de altitude, a ensilagem foi realizada nas dependências do setor de gado de corte e as análises foram realizadas parte no Laboratório de Forragicultura e no Laboratório de Microbiologia da Silagem.

Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado (DIC) 4x5 com 4 tratamentos e 5 repetições organizado em esquema fatorial 2x2, sendo dois tipos de silagem [silagem de milho (SM) e silagem de ração em mistura total (TMR)], estas sendo avaliadas também avaliando sem a adição de inoculante microbiano (CONT) ou com adição de inoculante microbiano (LB), com cinco repetições por tratamento. Após o processamento foram formadas pilhas de 10kg (ensaio em baldes) de material para mistura dos ingredientes da ração e/ou, aplicação do inoculante LaSil AS (*Lactobacillus buchneri* CNCM I-4323; Lallemand Animal Nutrition) de acordo com as recomendações do fabricante. O inoculante foi diluído em 50 mL de água destilada e aplicado em pilhas individuais de 10 kg MN com borrifadores manuais, sendo aplicado o mesmo volume de água destilada no tratamento controle. Foram avaliados os seguintes tratamentos:

Tratamento 1 - Silagem de milho Controle (Sem inoculante),

Tratamento 2 – Silagem de milho inoculada com LalSil AS

Tratamento 3 – Silagem de milho TMR (Sem inoculante)

Tratamento 4 – Silagem de milho TMR inoculada com Lalsil AS

O material foi ensilado em baldes plásticos (Jaguar Embalagens®, Jaguariúna-SP, Brasil) de 10 L (25 cm diâmetro × 25 cm altura) previamente pesados (peso vazio) e compactado manualmente, adotando-se uma densidade  $\pm 650 \text{ kg MN m}^3$ . Os baldes foram vedados com fita adesiva 45 mm (3M-5802, Scotch®, Sumaré-SP, Brasil), pesados (peso cheio inicial) e armazenados a temperatura ambiente até o momento da abertura. Na Tabela 1 são mostrados a composição química e a população de microrganismos nos diferentes tratamentos, antes da ensilagem.

Tabela 1 – Composição química e população microbiana do milho após a mistura dos ingredientes e aplicação do inoculante antes de ensilagem.

| Itens                                             | Tratamentos    |                 |        |               |
|---------------------------------------------------|----------------|-----------------|--------|---------------|
|                                                   | Milho controle | Milho inoculado | TMR    | TMR inoculado |
| MS g/kg <sup>1</sup>                              | 298,5          | 296,4           | 478,5  | 466,1         |
| PB g/kg <sup>2</sup>                              | 59,31          | 60,94           | 129,13 | 124,80        |
| EE g/kg <sup>3</sup>                              | 23,22          | 22,75           | 24,14  | 11,40         |
| MM g/kg <sup>4</sup>                              | 41,5           | 36,5            | 44,9   | 45,2          |
| FDNcp g/kg <sup>5</sup>                           | 482,1          | 450,45          | 244,7  | 267,3         |
| FDA g/kg <sup>6</sup>                             | 256,3          | 232,0           | 100,4  | 105,5         |
| CNF g/kg <sup>7</sup>                             | 409,2          | 444,8           | 572,5  | 566,8         |
| Amido g/kg                                        | 349,7          | 383,7           | 397,0  | 390,8         |
| Lignina g/kg                                      | 55,4           | 45,5            | 39,7   | 27,3          |
| pH                                                | 5,79           | 5,81            | 7,92   | 7,93          |
| Leveduras UFC/g de<br>forragem                    | 6,97           | 6,88            | 6,81   | 6,89          |
| Enterobactérias<br>UFC/g de forragem              | 6,49           | 6,10            | 6,39   | 6,13          |
| Fungos filamentosos<br>UFC/g de forragem          | 5,83           | 5,99            | 5,91   | 5,89          |
| Bactérias do ácido<br>lático UFC/g de<br>forragem | 6,04           | 6,31            | 6,19   | 6,15          |
| CHOs g/kg <sup>8</sup>                            | 64,6           | 73,6            | 46,9   | 45,8          |

<sup>1</sup>Matéria seca; <sup>2</sup>Proteína bruta; <sup>3</sup>Extrato etéreo; <sup>4</sup>Matéria mineral; <sup>5</sup>Fibra insolúvel em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; <sup>6</sup>Fibra insolúvel em detergente ácido; <sup>7</sup>Carboidratos não fibrosos <sup>8</sup>Carboidratos solúveis em água; TMR– Ração mista total de silagem de milho; UFC – Unidades formadoras de colônias/ grama de forragem.

A proporção e a composição química dos ingredientes das silagens TMR antes da ensilagem são apresentadas abaixo nas tabelas 2 e 3 respectivamente.

Tabela 2 - Proporção dos ingredientes das dietas experimentais (g/kgMS<sup>1</sup>)

| Itens                               | Proporção |
|-------------------------------------|-----------|
| Silagem de milho                    | 400       |
| Farelo de milho                     | 506,4     |
| Farelo de soja                      | 51,6      |
| Ureia/sulfato de amônio (9/1)       | 10,0      |
| Núcleo mineral                      | 15,0      |
| Bicarbonato/Oxido de magnésio (3/1) | 17,0      |

<sup>1</sup> – g/kg com base na matéria seca

Tabela 3 – Composição da MS (g/kg MN<sup>1</sup>) e demais constituintes (g/kg MS) dos ingredientes das dietas experimentais.

| Itens                                | MS <sup>2</sup> | PB <sup>3</sup> | FDNcp <sup>4</sup> | FDA <sup>5</sup> | MM <sup>6</sup> | EE <sup>7</sup> | Amido |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------|
| Silagem de milho                     | 297,4           | 60,1            | 466,6              | 249,8            | 41,5            | 23,2            | 62,41 |
| Farelo de milho                      | 884,5           | 80              | 137,7              | 30,9             | 13,3            | 45,1            | 151,8 |
| Farelo de soja                       | 892,4           | 448,8           | 263,9              | 56,6             | 67,6            | 11,63           | -     |
| Ureia/sulfato de amônio (9/1)        | 100             | 2547,0          | -                  | -                | -               | -               | -     |
| Núcleo mineral                       | 100             | -               | -                  | -                | -               | -               | -     |
| Bicarbonato/ Oxido de magnésio (3/1) | 100             | -               | -                  | -                | -               | -               | -     |

<sup>1</sup>matéria natural, <sup>2</sup>matéria seca, <sup>3</sup>proteína bruta, <sup>4</sup>FDN corrigida para cinzas e proteína, <sup>5</sup>Fibra em detergente ácido, <sup>6</sup>matéria mineral, <sup>7</sup>extrato etéreo

### Populações microbianas, Perfil fermentativo e estabilidade aeróbia

Amostras de 25 g da planta e das silagens após 90 dias de fermentação foram homogeneizadas em 225 mL de solução de Ringer's solution estéril (Oxoid™, Hampshire,

Inglaterra) em liquidificador industrial (1 min). O extrato aquoso foi dividido em duas alíquotas: Uma alíquota foi usada para medição do pH, com potenciômetro digital (W38 / Tecnal®, São Paulo-SP, Brasil). Após, 20 mL do extrato aquoso foi filtrado e acidificado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:1 (armazenados a -20 °C) para posteriores análises das concentrações de carboidratos solúveis em água por método colorimétrico (Nelson, 1944), amônia, pelo método fenol-hipoclorito (Okuda et al., 1965) e ácidos orgânicos (ácido lático, ácido acético, ácido butírico, ácido propiônico, e etanol) (Siegfried et al., 1984).

A segunda alíquota do extrato aquoso foi usada para quantificação das populações de enterobactérias (ENT), bactérias lácticas (BAL), Leveduras (LEV) e fungos filamentosos (FUN). Foram realizadas diluições seriadas 10<sup>1</sup> a 10<sup>9</sup>. Em seguida, foi realizado o plaqueamento em placas de Petri estéreis (método pour-plate) em meios de cultura. Foi utilizado o MRS ágar (De Man, Rogosa & Sharpe, Merck®, Darmstadt, Alemanha) para o cultivo de BAL (37 °C / 48 h), VRB ágar (Violet Red Bile Agar, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) para o cultivo de ENT (37 °C / 24 h) e DRBC ágar (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol Base Agar, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) para cultivo de LEV (25 °C / 72 h) e de FUN (25 °C / 120 h). Para contagem das populações microbianas considerou-se o intervalo de ufc entre 25 a 250 (American Public Health Association, 2015).

Após 90 dias de ensilagem os baldes foram abertos e pesados, uma amostra de 2 kg de silagem foi alocada em baldes plásticos de 10L que foram cobertos por uma camada de tecido de nylon para avaliação da EA. Os baldes foram armazenados em sala com temperatura ambiente constante ( $\pm$  22 °C), e no centro da massa da silagem foi inserido um data-logger (Cryopark iMINI™, Cryopark Company Inc., VA, USA) para mensuração da temperatura, a cada 10 min durante sete dias. Dois data-loggers foram distribuídos na sala para mensuração da temperatura ambiente. A EA 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 Junior et al., 2003).

### **Extração, purificação e sequenciamento do DNA**

A extração do DNA seguiu um método manual, protocolo proprietário desenvolvido internamente pela NGS Soluções Genômicas® (Piracicaba-SP, Brasil).

As amostras sequenciadas foram preparadas utilizando-se o MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA), com a amplificação de primers da região V4 16S do gene rRNA 16S, 515F

(5'- GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso et al., 2012). Pelo sequenciamento paired-end, com kits V3 de 600 ciclos.

As reads do sequenciamento das amostras destacadas na Tabela 1 foram submetidas ao Cutadapt (Martin, 2011) para a remoção de primers (515F (5'- GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')) e em seguida empregadas nas análises de bioinformática. Por fornecer vantagem significativa para uma identificação mais precisa de microrganismos, nesse trabalho foi utilizada uma abordagem baseada *Amplicon Sequence Variant* (ASV) ao invés de *Operating Taxonomic Units* (OTUs), usando a pipeline do DADA2 (Callahan et al, 2016).

Dentre as análises de bioinformática aplicadas no estudo de metagenômica alvo as seguintes análises foram desenvolvidas: i. abundância de táxons; ii. Estudo de diversidade microbiana (alfa e beta diversidade); e iii. Abundância diferencial de táxons.

### **Análises químicas**

As amostras da planta no dia da ensilagem, das silagens, de ingredientes, dietas, fezes e sobras foram submetidas à secagem parcial em estufa de circulação forçada de ar (55 °C / 72 h). 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 submetidas às análises de quantificação dos teores de matéria seca (MS, método 934,01), matéria orgânica (MO, método 972,43), matéria mineral (MM, método 942,05), proteína bruta (PB = N × 6,25, método 984,13), extrato etéreo (EE, método 920,39) e fibra em detergente ácido (FDA, método 973,18) (AOAC, 1990). Também foram determinados os teores de fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), utilizando-se  $\alpha$ -amilase termoestável sem o uso de sulfito de sódio (Mertens, 2002), nitrogênio insolúvel em detergente ácido [(NIDA) (Licitra et al., 1996)], lignina [(LIG) (Gomes et al., 2011)] e proteína solúvel em tampão borato-fosfato (Licitra et al., 1996).

A concentração de N-NH<sub>3</sub> das silagens foi avaliada pelo método fenolhipoclorito (Okuda et al., 1965). Os ácidos orgânicos das silagens (lactato, acetato, propionato e butirato) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; SPD-10 AVP, Shimadzu®, Oregon, USA), com detector ultravioleta em 210 nm. A coluna utilizada foi C18 (fase reserva), e

utilizado o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  como fase móvel, com fluxo de  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ , pressão da coluna de 168 kgf e volume injetado de  $20 \mu\text{l}$  (Siegfried et al., 1984).

### **Análises estatísticas**

Todas as variáveis foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos dados e ao teste de Levene para verificação da homogeneidade de variância. Os dados referentes às populações microbianas foram transformados para a base logarítmica (Log10). Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e foram analisadas pelo procedimento PROC MIXED do SAS® versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, 2010).

Os dados referentes às silagens nos baldes foram avaliados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 4 tratamentos e 5 repetições. O modelo incluiu os efeitos fixos de silagem, inoculante e da interação silagem  $\times$  inoculante, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

Onde:  $Y_{ijk}$  = variável dependente,  $\mu$  = média geral,  $\alpha_i$  = efeito fixo da  $i$ -ésima silagem,  $\beta_j$  = efeito fixo do  $j$ -ésimo inoculante,  $(\alpha\beta)_{ij}$  = interação entre silagem e inoculante, e  $e_{ijk}$  = erro aleatório residual.

Por fornecer vantagem significativa para uma identificação mais precisa de microrganismos, nesse trabalho foi utilizada uma abordagem baseada Amplicon Sequence Variant (ASV) ao invés de Operating Taxonomic Units (OTUs), usando a pipeline do DADA2 (Callahan et al., 2016). Em seguida, as análises de abundância de taxa, de alfa (Chao1 e Shannon), beta diversidade e Hierarchical Clustering & Heatmap Visualization foram realizada a nível de gênero com o módulo Marker-gene Data Profiling (MDP) do MicrobiomeAnalyst (Chong et al., 2020; Dhariwal et al., 2017). Para isso, foram empregadas as configurações padrão com transformação dos dados para escala de Relative Log Expression (RLE). Para as comparações da alfa diversidade que apresentaram significância estatística no teste ANOVA, o teste Tukey foi empregado para fazer as comparações pareadas usando a função `glht {multcomp}`

em ambiente R (Bretz et al., 2010; Searle, 1971; Hothorn et al., 2008; Hsu, 1996). Uma última análise, para identificar gêneros que aumentam ou diminuem sua abundância em função de tratamentos na ensilagem, um estudo de abundância diferencial dos taxons também foi realizado. Para isso, o MicrobiomeAnalyst foi empregado, no ambiente R, para a obtenção do objeto com formato adequado para o pacote phyloseq, seguido das análises de acordo com a pipeline disponível, com isso, ASVs que tiveram  $\log_2(FC) > 1,5$  ou  $< -1,5$  e  $p\text{-value} < 0,01$  foram consideradas com abundância diferencial entre as condições comparada e destacadas no Volcano plot.

Todos os outros dados foram submetidos a análise de variância, aplicando-se o teste F de Fisher, utilizando-se o PROC MIXED do SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, 2010). A matriz de covariância foi escolhida através do critério de Akaike corrigido (AICC). Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos utilizando-se diferenças de ( $P \leq 0,05$ ) e tendências entre ( $p > 0,05$ ) a ( $p < 0,10$ ), como níveis críticos de probabilidades para o erro tipo I.

## RESULTADOS

Observou-se efeito ( $P < 0,05$ ) da interação SxI sobre os conteúdos de PB, FDNcp NIDA, NNP, CNF e FDA, bem como efeito de silagem ( $P < 0,05$ ) sobre MS, MO, MM e lignina (Tabela 4). Foi registrado maior conteúdo de MS nas silagens de TMR, comparadas às silagens exclusiva de milho (469,5 x 287,6 g/kg). Comportamento semelhante foi observado para MO e MM, enquanto que a lignina foi superior na silagem de milho ( $P < 0,05$ ) comparada a TMR (60,42 vs 30,66).

Os conteúdos amido e EE não foram afetados ( $P > 0,05$ ) pelos fatores em estudo, nem pela interação destes, registrando-se valores médios de 330,85 e 28,35 g/kg, respectivamente.

Tabela 4 - Composição química das silagens de milho (SM) e silagens de ração em mistura total à base de milho (TMR), com ou sem aplicação de inoculante microbiano.

| Inoc | Silagem |     |       |     |   | p-valor |     |
|------|---------|-----|-------|-----|---|---------|-----|
|      | SM      | TMR | Média | EPM | I | S       | IxS |

| MS (g/kg) <sup>1</sup>   |         |              |       |            |        |             |        |
|--------------------------|---------|--------------|-------|------------|--------|-------------|--------|
| Cont                     | 289,9   | 466,3        | 378,1 | 1,869      | 0,7857 | <0,000<br>1 | 0,1421 |
| LB                       | 285,4   | 472,8        | 379,1 |            |        |             |        |
| Média                    | 287,6   | 468,5        |       |            |        |             |        |
| PB (g/kg) <sup>2</sup>   |         |              |       |            |        |             |        |
| Cont                     | 60,20Bb | 118,8Aa      | 89,5  | 0,556<br>4 | 0,0197 | <0,000<br>1 | 0,0234 |
| LB                       | 60,00Bb | 106,6Ba      | 83,3  |            |        |             |        |
| Média                    | 60,10   | 112,7        |       |            |        |             |        |
| NIDA%Ntotal <sub>3</sub> |         |              |       |            |        |             |        |
| Cont                     | 1,88Ab  | 0,3023B<br>b | 1,09  | 0,214<br>0 | 0,1095 | <0,000<br>1 | 0,0025 |
| LB                       | 2,62Aa  | 0,3090B<br>b | 1,46  |            |        |             |        |
| Média                    | 2,25    | 0,3056       |       |            |        |             |        |
| NNP%Ntotal <sup>4</sup>  |         |              |       |            |        |             |        |
| Cont                     | 52,37Bb | 59,01Aa      | 55,69 | 0,862<br>2 | 0,7723 | 0,4229      | 0,0040 |
| LB                       | 58,17Aa | 54,14Bb      | 56,15 |            |        |             |        |
| Média                    | 55,27   | 56,57        |       |            |        |             |        |
| MO (g/kg) <sup>5</sup>   |         |              |       |            |        |             |        |
| Cont                     | 43,2    | 52,84        | 48,07 | 0,092      | 0,2721 | <0,000<br>1 | 0,1093 |
| LB                       | 43,7    | 50,2         | 46,95 |            |        |             |        |
| Média                    | 43,45   | 51,52        |       |            |        |             |        |

|           |                           |              |            |            |        |             |            |
|-----------|---------------------------|--------------|------------|------------|--------|-------------|------------|
|           | FDNcp (g/kg) <sup>6</sup> |              |            |            |        |             |            |
| Cont      | 435,80Bb                  | 228,18A<br>a | 331,9<br>9 | 2,606      | 0,1392 | <0,000<br>1 | 0,0115     |
| LB        | 493,44Ba                  | 211,24A<br>a | 352,3<br>4 |            |        |             |            |
| Médi<br>a | 464,62                    | 219,71       |            |            |        |             |            |
|           | FDA (g/kg) <sup>7</sup>   |              |            |            |        |             |            |
| Cont      | 254,26Bb                  | 122,66A<br>a | 188,4<br>6 | 1,610      | 0,1085 | <0,000<br>1 | 0,002<br>5 |
| LB        | 286,20Ba                  | 111,32A<br>a | 198,7<br>6 |            |        |             |            |
| Médi<br>a | 270,23                    | 116,99       |            |            |        |             |            |
|           | EE (g/kg) <sup>8</sup>    |              |            |            |        |             |            |
| Cont      | 32,06                     | 30,06        | 31,06      | 0,186<br>2 | 0,1797 | 0,2694      | 0,1160     |
| LB        | 20,22                     | 31,06        | 25,64      |            |        |             |            |
| Médi<br>a | 26,14                     | 30,56        |            |            |        |             |            |
|           | MM (g/kg) <sup>9</sup>    |              |            |            |        |             |            |
| Cont      | 43,26                     | 52,84        | 48,05      | 0,092<br>6 | 0,2721 | <0,000<br>1 | 0,1093     |
| LB        | 43,78                     | 50,20        | 46,99      |            |        |             |            |
| Médi<br>a | 43,52                     | 51,52        |            |            |        |             |            |
|           | Lignina (g/kg)            |              |            |            |        |             |            |
| Cont      | 60,42                     | 30,66        | 45,54      | 0,451<br>3 | 0,4403 | <0,000<br>1 | 0,3595     |
| LB        | 71,14                     | 29,72        | 50,43      |            |        |             |            |
| Médi      | 65,78                     | 30,19        |            |            |        |             |            |

|              |         |              |            |            |        |             |        |
|--------------|---------|--------------|------------|------------|--------|-------------|--------|
| a            |         |              |            |            |        |             |        |
| CNF (g/kg)   |         |              |            |            |        |             |        |
| Cont         | 443,9Bb | 585,28A<br>a | 514,5<br>9 | 0,962<br>3 | 0,5649 | <0,000<br>1 | 0,0094 |
| LB           | 397,8Bb | 616,04A<br>a | 506,9<br>2 |            |        |             |        |
| Médi<br>a    | 420,85  | 600,66       |            |            |        |             |        |
| Amido (g/kg) |         |              |            |            |        |             |        |
| Cont         | 345,94  | 338,76       | 342,3<br>5 | 0,753<br>3 | 0,1954 | 0,7259      | 0,4475 |
| LB           | 309,7   | 329,02       | 319,3<br>6 |            |        |             |        |
| Médi<br>a    | 327,82  | 333,89       |            |            |        |             |        |

Inoculante: Cont – controle sem aditivo; LB - *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition; Silagem: Silagem de milho; Ração mista total de silagem de milho; <sup>1</sup>Matéria seca; <sup>2</sup>Proteína bruta; <sup>3</sup>Nitrogenio insolúvel em detergente ácido em relação ao % do nitrogênio total; <sup>4</sup>Nitrogênio não proteico em relação ao % do nitrogênio total <sup>5</sup>Matéria orgânica <sup>6</sup>Fibra insolúvel em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína <sup>7</sup>Fibra insolúvel em detergente ácido <sup>8</sup>Extrato etéreo; <sup>9</sup>Matéria mineral; <sup>10</sup>Carboidratos não fibrosos EPM – Erro padrão da média; P-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I × S); Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste F de Fischer (P < 0,05).

Houve efeito de silagem (P<0,05) sobre o conteúdo de ácido láctico, registrando-se maior valor na silagem TMR comparada à silagem exclusiva de milho, (70/kgMS) vs (111g/kg), enquanto que o ácido acético foi afetado apenas por inoculante, as silagens inoculadas apresentaram maior produção em relação as silagens não inoculadas, (15,61) vs (16,23g/kgMS) (Tabela 5). Não houve efeito de inoculante e silagem (P>0,05) sobre os conteúdos de ácido propiônico, que apresentou média 0,3012 ±0,059 g/MS. O N-NH<sub>3</sub>/Ntotal apresentou média 5,67±2,02, bem como de pH que teve média 3,95±0,30. Porém, houve efeito (p<0,05) de

inoculante e silagem sobre a população de BAL e de silagem sobre o conteúdo de carboidratos solúveis em água.

Tabela 5 – Perfil fermentativo, pH, carboidratos solúveis, N-NH<sub>3</sub> e populações microbianas das silagens após 90 dias de fermentação.

| Inoculante                             | Silagem |       | Média | EPM    | p-valor |         |        |
|----------------------------------------|---------|-------|-------|--------|---------|---------|--------|
|                                        | SM      | TMR   |       |        | I       | S       | IxS    |
| pH                                     |         |       |       |        |         |         |        |
| Cont                                   | 3,61    | 4,25  | 3,93  | 0,077  | 0,2220  | 0,0583  | 0,4244 |
| LB                                     | 3,70    | 4,25  | 3,97  |        |         |         |        |
| Média                                  | 3,65    | 4,25  |       |        |         |         |        |
| CHOs (g/kg) <sup>1</sup>               |         |       |       |        |         |         |        |
| Cont                                   | 7,8     | 23,6  | 15,7  | 0,232  | 0,3096  | <0,0001 | 0,3484 |
| LB                                     | 5,0     | 23,5  | 14,25 |        |         |         |        |
| Média                                  | 6,4     | 23,5  |       |        |         |         |        |
| N-NH <sub>3</sub> /Ntotal <sup>2</sup> |         |       |       |        |         |         |        |
| Cont                                   | 5,62    | 6,50  | 5,41  | 0,505  | 0,5970  | 0,4274  | 0,7106 |
| LB                                     | 5,21    | 5,36  | 5,28  |        |         |         |        |
| Média                                  | 5,41    | 5,93  |       |        |         |         |        |
| BAL UFC/g de silagem <sup>3</sup>      |         |       |       |        |         |         |        |
| Cont                                   | 7,26    | 5,48  | 6,37  | 0,305  | 0,0027  | 0,0002  | 0,5285 |
| LB                                     | 8,23    | 6,87  | 7,55  |        |         |         |        |
| Média                                  | 7,74    | 6,17  |       |        |         |         |        |
| FUN UFC/g de silagem <sup>4</sup>      |         |       |       |        |         |         |        |
| Cont                                   | 3,48    | ND    | -     | 0,143  | -       | -       | -      |
| LB                                     | 3,01    | 2,62  | 2,81  |        |         |         |        |
| Média                                  | 3,24    | -     |       |        |         |         |        |
| LEV UFC/g de silagem <sup>5</sup>      |         |       |       |        |         |         |        |
| Cont                                   | 3,42    | ND    | -     | 0,123  | <0,0001 | -       | -      |
| LB                                     | 2,73    | ND    | -     |        |         |         |        |
| Média                                  | 3,07    | -     |       |        |         |         |        |
| Ácido Lático (g/kgMS)                  |         |       |       |        |         |         |        |
| Cont                                   | 76,1    | 91,1  | 83,6  | 0,8113 | 0,6531  | 0,0046  | 0,1537 |
| LB                                     | 63,9    | 130,9 | 97,4  |        |         |         |        |
| Média                                  | 70,0    | 111,0 |       |        |         |         |        |
| Ácido Acético (g/kgMS)                 |         |       |       |        |         |         |        |
| Cont                                   | 13,64   | 12,89 | 13,26 | 0,1121 | 0,0270  | 0,9379  | 0,7504 |
| LB                                     | 17,57   | 19,57 | 18,57 |        |         |         |        |
| Média                                  | 15,60   | 16,23 |       |        |         |         |        |
| Ácido Propiônico (g/kgMS)              |         |       |       |        |         |         |        |
| Cont                                   | 0,50    | 1,62  | 1,06  | 0,0149 | 0,1370  | 0,2059  | 0,4485 |

|       |      |      |      |
|-------|------|------|------|
| LB    | 0,80 | 3,07 | 1,93 |
| Média | 0,65 | 2,34 |      |

Inoculante: Cont – controle sem aditivo; LB - *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition; Silagem: Silagem de milho; Ração mista total de silagem de milho <sup>1</sup>Carboidratos solúveis em água <sup>2</sup>Nitrogênio amoniacal em relação ao % de nitrogênio total <sup>3</sup>Bactérias do ácido láctico unidades formadoras de colônias/ grama de silagem <sup>4</sup>Fungos filamentosos unidades formadoras de colônias/ grama de silagem <sup>5</sup>Leveduras unidades formadoras de colônias/ grama de silagem; EPM – Erro padrão da média; P-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I × S); Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste F de Fischer (P < 0,05).

Houve efeito (P<0,05) de silagem sobre EA registrando se maior valor na silagem TMR comparada à silagem de milho planta (168 vs 68,21 horas) (Tabela 6). Não houve diferença (p>0,05) para o tempo até atingir a temperatura máxima, com média de 80,90±33,95 horas e a temperatura máxima atingida pelas silagens de 27,95±8,60 °C. Houve efeito de silagem e inoculante (P<0,05) para o teor de MS. Também, observou-se efeito (P<0,05) de silagem sobre o pH, carboidratos solúveis residuais e populações de fungos e leveduras.

Tabela 6 – Teores de matéria seca (MS), valores de pH, carboidratos solúveis, populações microbianas e estabilidade aeróbia das silagens após 7 dias de exposição ao ar.

| Inoculante | Silagem |       | p-valor |       |       |        |      |
|------------|---------|-------|---------|-------|-------|--------|------|
|            | SM      | TMR   | Média   | EPM   | I     | S      | IxS  |
| MS (%MS)   |         |       |         |       |       |        |      |
| Cont       | 29,48   | 48,96 | 39,22   | 2,430 | 0,012 |        | 0,70 |
| LB         | 28,30   | 50,52 | 39,41   | 6     | 6     | <0,001 | 70   |
| Média      | 28,89   | 49,74 |         |       |       |        |      |
| pH         |         |       |         |       |       |        |      |
| Cont       | 6,70    | 4,31  | 5,50    |       | 0,360 | <0,000 | 0,39 |
| LB         | 6,16    | 4,29  | 5,22    | 0,253 | 1     | 1      | 79   |
| Média      | 6,43    | 4,3   |         |       |       |        |      |

| CHOs <sup>1</sup> (g/kg)                       |       |       |        |       |       |        |      |
|------------------------------------------------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|------|
| Cont                                           | 5,4   | 28,0  | 16,7   | 0,252 | 0,894 | <0,000 | 0,67 |
| LB                                             | 6,2   | 26,3  | 16,25  |       | 4     | 1      | 65   |
| Média                                          | 5,8   | 27,15 |        |       |       |        |      |
| LEV <sup>2</sup>                               |       |       |        |       |       |        |      |
| Cont                                           | 6,82  | 4,54  | 5,68   | 0,335 | 0,651 | <0,000 | 0,12 |
| LB                                             | 7,19  | 4,07  | 5,63   |       | 7     | 1      | 70   |
| Média                                          | 7,00  | 4,30  |        |       |       |        |      |
| FUN <sup>3</sup>                               |       |       |        |       |       |        |      |
| Cont                                           | 7,75  | 4,27  | 6,01   | 0,315 | 0,882 | <0,000 | 0,24 |
| LB                                             | 7,16  | 4,60  | 5,88   |       | 1     | 1      | 87   |
| Média                                          | 7,45  | 4,43  |        |       |       |        |      |
| EA <sup>4</sup> (horas)                        |       |       |        |       |       |        |      |
| Cont                                           | 61,28 | 168   | 114,64 | 13,29 | 0,310 | <0,000 | 0,31 |
| LB                                             | 75,14 | 168   | 121,57 | 9     | 5     | 1      | 05   |
| Média                                          | 68,21 | 168   |        |       |       |        |      |
| Tempo até temperatura max <sup>5</sup> (horas) |       |       |        |       |       |        |      |
| Cont                                           | 75,59 | 91,33 | 83,46  | 8,489 | 0,733 |        | 0,08 |
| LB                                             | 97,84 | 58,86 | 78,35  |       | 3     | 0,4416 | 17   |
| Média                                          | 86,71 | 75,09 |        |       |       |        |      |
| Temperatura máxima <sup>6</sup> (°C)           |       |       |        |       |       |        |      |
| Cont                                           | 33,72 | 20,94 | 27,33  | 2,15  | 0,733 |        | 0,08 |
| LB                                             | 36,44 | 20,7  | 28,57  |       | 3     | 0,4416 | 17   |
| Média                                          | 35,08 | 20,8  |        |       |       |        |      |

Inoculante: Cont – controle sem aditivo; LB - *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition; Silagem: Silagem de milho; Ração mista total de silagem de milho  
<sup>1</sup>Carboidratos solúveis em água <sup>2</sup>Leveduras unidades formadoras de colônias/ grama de silagem  
<sup>3</sup>Fungos filamentosos unidades formadoras de colônias/ grama de silagem; <sup>4</sup>Numero de horas de estabilidade aeróbia da silagem; <sup>5</sup>Tempo em horas até a silagem atingir a temperatura máxima; <sup>6</sup>Temperatura máxima da silagem EPM – Erro padrão da média; P-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I × S); Médias seguidas por letras distintas distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste F de Fischer (P < 0,05).

A Figura 1 mostra a abundância relativa da comunidade microbiana nas silagens exclusivas de milho e TMR, com e sem inoculante microbiano. Observa-se maior abundância dos grupos *Weissella* e *Leuconostoc*, *Klebsiella*, *Lactococcus*, nas silagens de milho controle e tratada com inoculante, respectivamente, enquanto que nas TMRs destacam-se os *Carnobacterium*, *Klebsiella*, *Lactococcus* e *Lactiplantibacillus* (Figura 1a). Após 90 dias de fermentação, observou-se maior abundância dos grupos *Lactobacillus* e *Lentilactobacillus* nas silagens exclusivas de milho e de *Weissella* nas silagens de TMR (Figura 1a). Destaca-se, o desaparecimento do grupo *Carnobacterium* nas silagens de TMR. A Figura 1b mostra o heatmap com o agrupamento hierárquico dos principais grupos dentre as réplicas, observando-se o quanto são contrastantes as réplicas e as diferentes amostras.

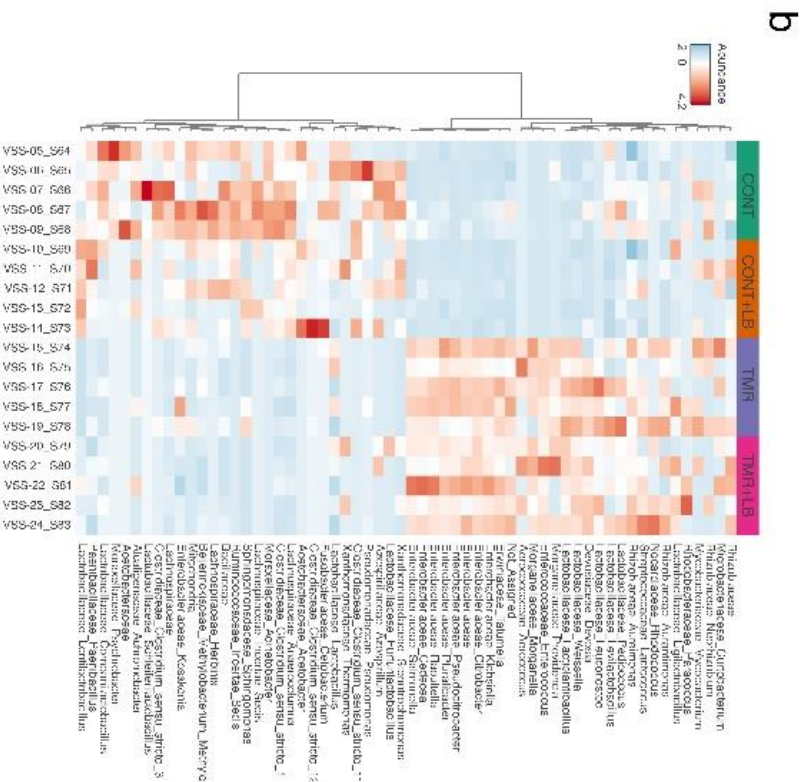
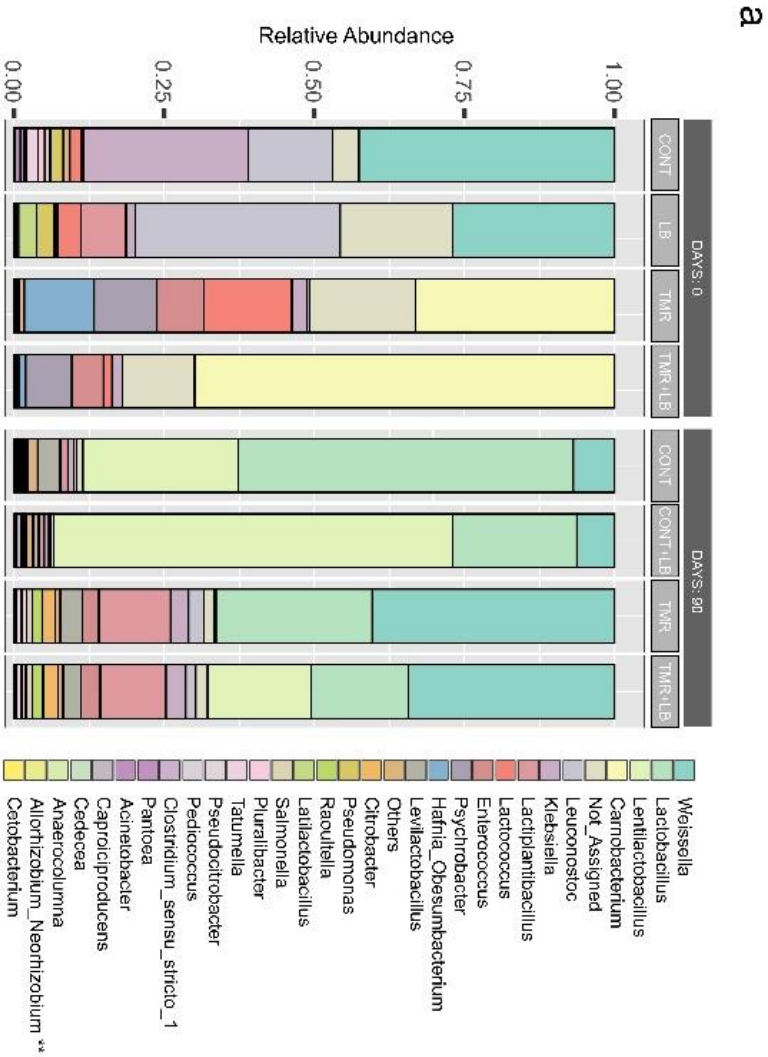


Figura 1 - Abundância relativa da comunidade microbiana (top 30) em nível de gênero revelada por amplificação do gene 16S rDNA de alto rendimento antes (Dia 0, planta) e após ensilagem (a) e Heatmap com agrupamento hierárquico (b) dos principais gêneros identificados com 90 dias de ensilagem em condições controle (CNT) The total mixed ration (TMR) e com tratamentos com inóculo de *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323; Lallemand Animal Nutrition (CNT+LB e TMR+LB).

Os resultados para a análise de alfa diversidade são mostrados na Figura 2. A Figuras 2-a e 2-b correspondem a análise de alfa diversidade para os índices Chao1 e Shannon, respectivamente, para os diferentes grupos após 90 dias de fermentação (CONT, CONT+LB, TMR e TMR+LB). Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para o índice de alfa diversidade Chao1, cujo índice variou de 31 a 41 (Figura 4 a). Contudo, registrou-se diferença ( $P<0,05$ ) para o índice de Chao1 quanto a aplicação do inoculante, registrando-se maior índice de alfa diversidade Chao1 nas silagens inoculadas (Figura 2 d).

As silagens TMR apresentaram maior ( $P<0,05$ ) índice de alfa diversidade de comunidade bacteriana Shannon (Figura 2-c), no entanto, não houve efeito ( $P>0,05$ ) de interação da presença do inoculante (Figura 4e)

A análise de  $\beta$ -diversidade, com base nas coordenadas principais (PCoA), mostra diferença ( $p<0,05$ ) entre as silagens ( $P<0,05$ ), bem como a presença de interação para a inclusão do inoculante (Figura 4f).

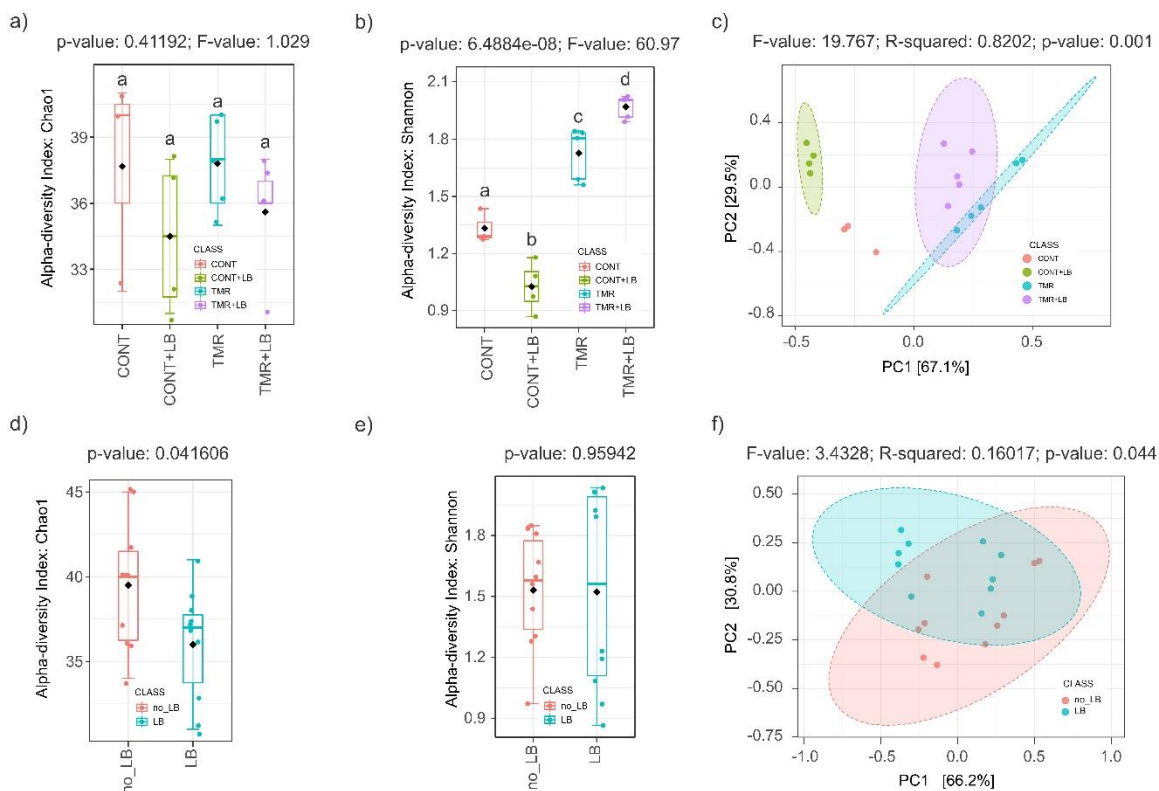


Figura 2 - Alfa diversidade com base no índice Chao1 (a e d), Shannon (b e e) e beta diversidade (c e f). Acima de cada gráfico é possível observar os p-valores associadas às comparações baseadas na ANOVA com Tukey (a e b), teste-t (d e e) e PERMANOVA (c e f); Silagens com 90 dias de ensilagem em condições controle (CNT) The total mixed ration (TMR) e com tratamentos com inóculo de *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323; Lallemand Animal Nutrition (CNT+LB e TMR+LB).

Após 90 dias de fermentação, a abundância diferencial de táxons foi influenciada ( $P < 0,05$ ) pelos tratamentos, registrando-se aumento na abundância diferencial da família *Lactobacillaceae*, principalmente *Lentilactobacillus* e desaparecimento de *Aurantimonas*, *Lactiplantibacillus*, *Weissella* e *Levilactobacillus* (Figura 3a) ao se comparar CONT e CONT + LB. Ao se comparar as silagens TMR com a CONT verificou-se aumento na família *Lactobacillaceae*, principalmente na população de *Weissella*, alguns membros das famílias *Enterococcaceae* e *Streptococcaceae* (enterococcus e Lactococcus) e *Morganellaceae* (*Morganella* e *Cedecea*) (Figura 3b). Comportamento similar verificou-se ao se comparar CONT com TMR + LB (Figura 3c).

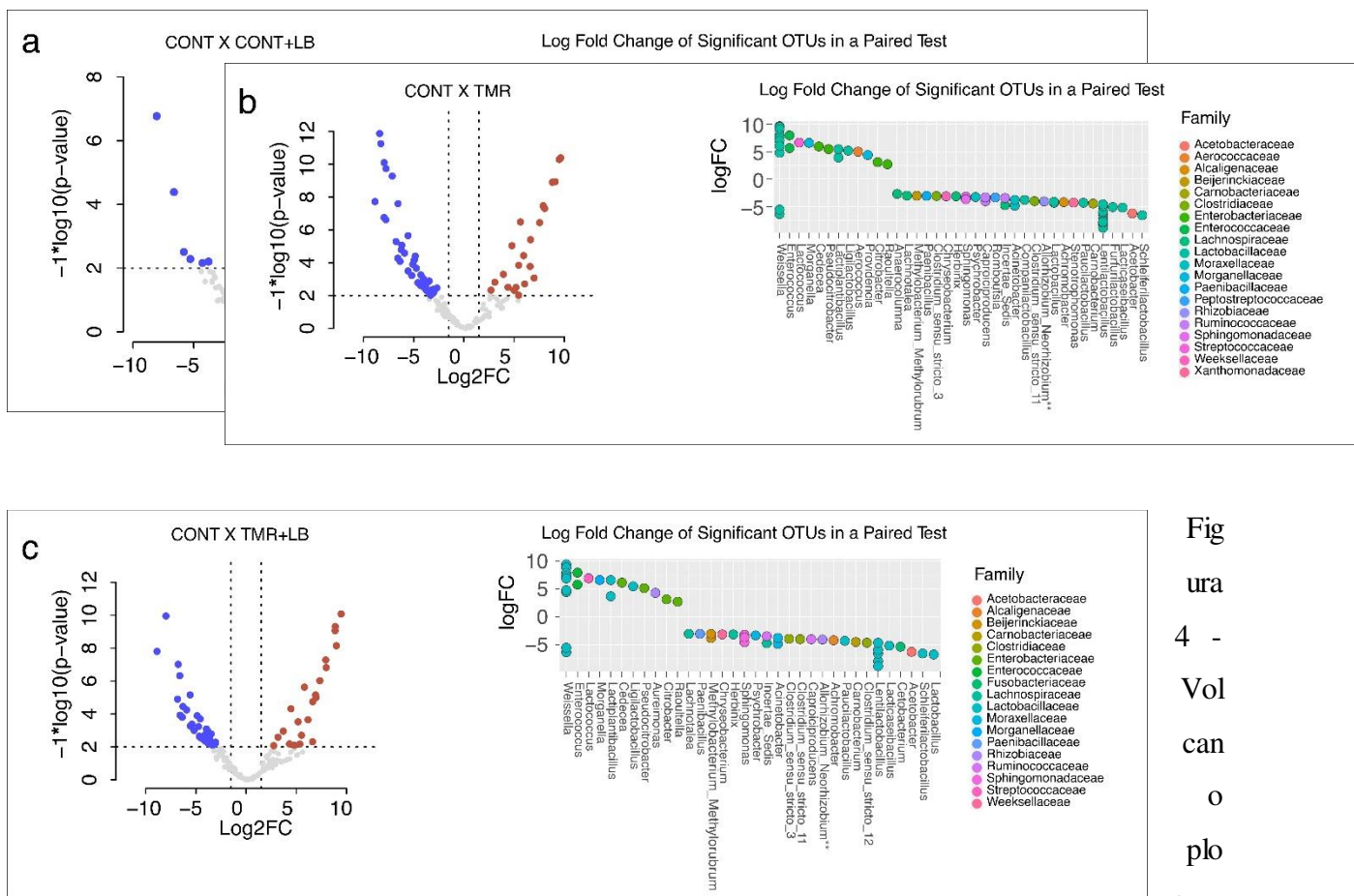


Fig  
ura  
4 -  
Vol  
can  
o  
plo  
t e

gráfico de bolha para estudo de abundância diferencial de gêneros em silagens de milho e silagens de milho TMR (total mixed ration) com 90 dias de ensilagem, em condição tratada e não tratado com *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323; Lallemand Animal Nutrition, (LB e no\_LB), respectivamente. Nos volcano plots, os pontos vermelhos representam gêneros que aumentam a abundância, significativamente ( $p\text{-valor} < 0,01$  e  $\text{Log2FC} > 1,5$ ), em função da presença do inóculo; e os pontos azuis representam os gêneros que reduziram a abundância significativamente ( $p\text{-valor} < 0,01$  e  $\text{Log2FC} < -1,5$ ). O gráfico de bolhas destaca quais são os gêneros que tiveram alteração (aumentam ou diminuem) em sua abundância na comparação do microbioma na presença do inóculo.

Ao se comparar TMR vs TMR + LB (Figura 5f), verifica-se aumento na família *Lactobacillaceae*, principalmente a população de *Lentilactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* e também da família *Yersiniaceae*, com aumento na abundância da população de *Serrata*.

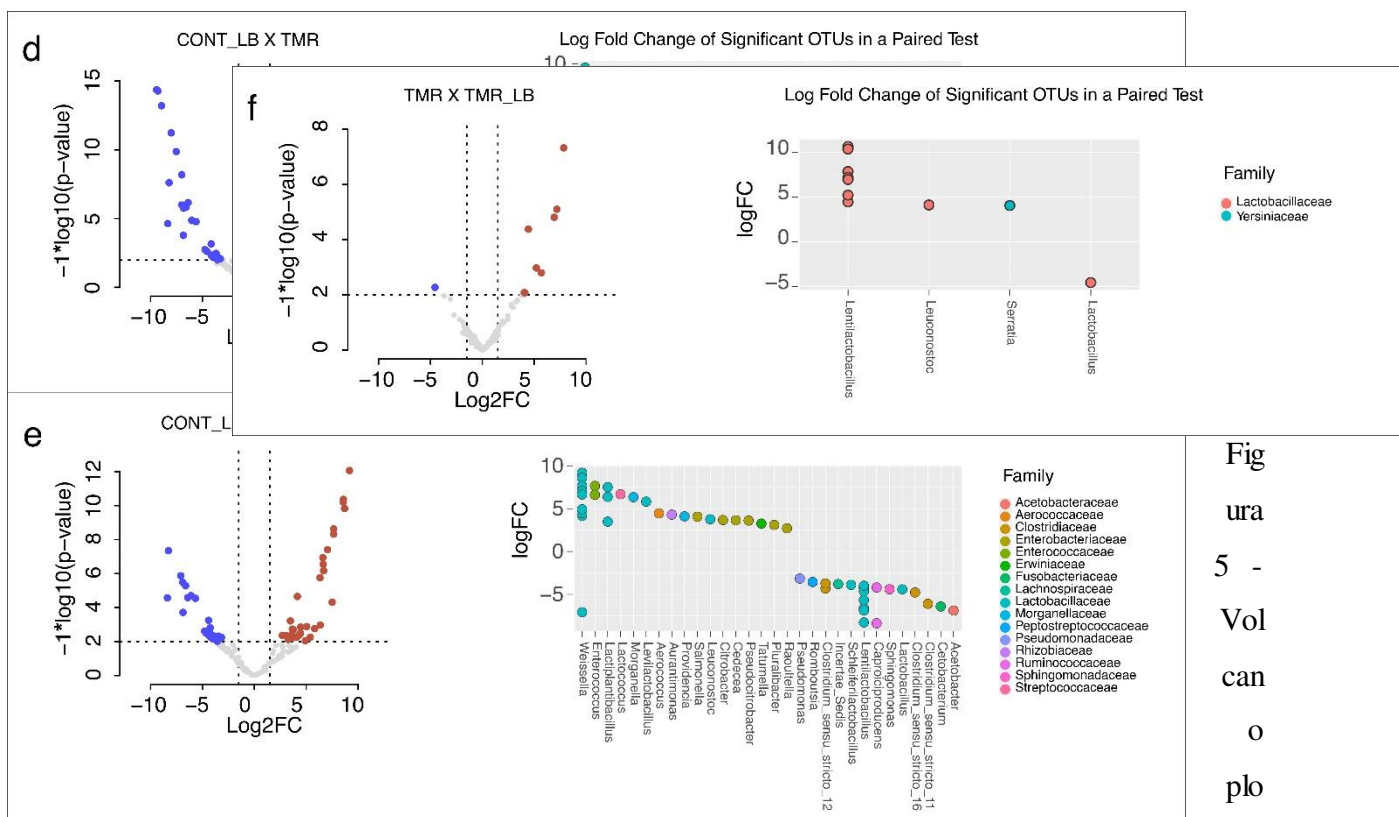


Fig  
ura  
5 -  
Vol  
can  
o  
plo  
t e

gráfico de bolha para estudo de abundância diferencial de gêneros em silagens de milho e silagens de milho TMR (total mixed ration) com 90 dias de ensilagem, em condição tratada e não tratado com *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323; Lallemand Animal Nutrition, (LB e no\_LB), respectivamente. Nos volcano plots, os pontos vermelhos representam gêneros que aumentam a abundância, significativamente ( $p\text{-valor} < 0,01$  e  $\log_2FC > 1,5$ ), em função da presença do inóculo; e os pontos azuis representam os gêneros que reduziram a abundância significativamente ( $p\text{-valor} < 0,01$  e  $\log_2FC < -1,5$ ). O gráfico de bolhas destaca quais são os gêneros que tiveram alteração (aumentam ou diminuem) em sua abundância na comparação do microbioma na presença do inóculo.

Ao se avaliar o efeito da presença do inoculante nas silagens (Figura 6), observa-se um aumento na abundância diferencial da família *Lactobacillaceae*, com destaque para *Lentilactobacillus*, *Ruminococcaceae* (*Caproiciproducentes*), e também dos gêneros *Leuconostoc* e *Paenibacillus*, com redução na abundância diferencial dos gêneros *Psychrobacter*, *Rumellibacillus*, *Enterococcus* e *Carnobacterium*.

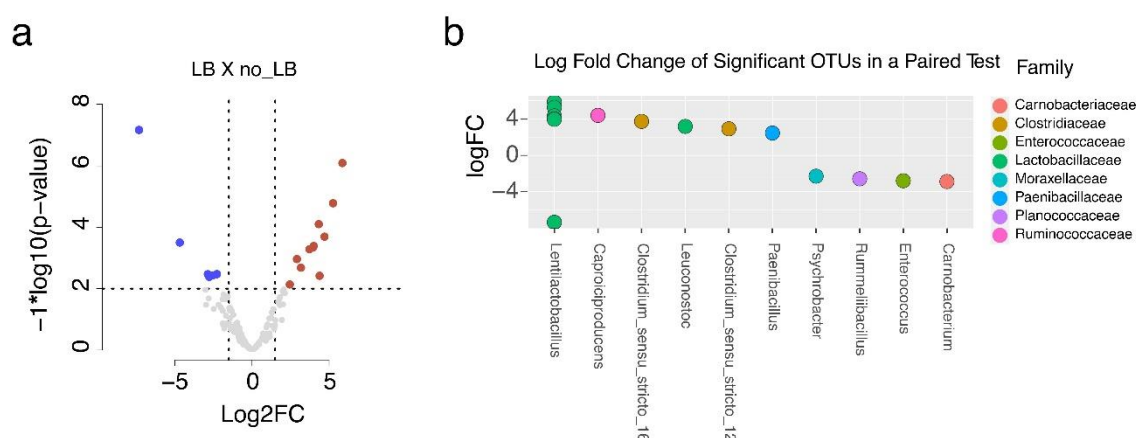


Figura 6 - Volcano plot (a) e gráfico de bolha (b) para estudo de abundância diferencial de gêneros em silagens de milho e silagens de milho TMR (total mixed ration) com 90 dias de ensilagem, em condição tratada e não tratada com *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323; Lallemand Animal Nutrition, (LB e no\_LB), respectivamente. Nos volcano plots (a), os pontos vermelhos representam gêneros que aumentam a abundância, significativamente ( $p\text{-value} < 0.01$  e  $\text{Log}_2\text{FC} > 1.5$ ), em função da presença do inóculo; e os pontos azuis representam os gêneros que reduziram a abundância significativamente ( $p\text{-valor} < 0.01$  e  $\text{Log}_2\text{FC} < -1.5$ ). O gráfico de bolhas (b) destaca quais são os gêneros que tiveram alteração (aumentam ou diminuem) em sua abundância na comparação do microbioma na presença do inóculo.

## DISCUSSÃO

### ENSAIO EM BALDES

As variações na composição química entre silagem de milho e TMR se deve a inclusão dos demais ingredientes na silagem TMR. É reconhecido que a planta de milho apresenta características como teor de MS, quantidade de carboidratos solúveis em água e população de BAL, que proporcionam adequada fermentação do material ensilado (Kung Jr. et al., 2018), a exemplo do observado no nosso trabalho. Destaca-se, também, que a ensilagem do milho planta na forma de TMR afetou de maneira positiva o perfil fermentativo das silagens, conforme

reportado em outros estudos (Chen et al, 2016; Miyaji et al, 2017). A ausência de efeito de tratamento sobre o pH e na concentração de amônia das silagens avaliadas, cujos valores médios foram 39,5 e 56,7 g de N-NH<sub>3</sub>/ kg de Ntotal, são indicadores de boa fermentação, conforme Kung Junior et al. (2018). Embora tenha sido registrado maior valor de ácido láctico nas silagens de TMR comparadas à de milho planta exclusiva (111 x 70 g/kgMS), ambas silagens podem ser consideradas de boa qualidade conforme os autores acima.

Apesar de não ter sido observado efeito de tratamento sobre o pH das silagens, o maior teor de carboidratos solúveis residuais nas silagens TMRs, pode estar associado às menores populações de fungos filamentosos e leveduras nessas silagens, cuja contagem desses grupos microbianos após 90 dias de fermentação foi abaixo do nível de detecção. Portanto, pode-se inferir, que as populações antes da ensilagem de 5,90 e 6,85log UFC/g de forragem para fungos e leveduras, respectivamente, podem ter sido suprimidas pela presença das bactérias lácticas que dominaram o meio e reduziram o pH rapidamente produzido ácido láctico e outros componentes inibidores no metabolismo desses microrganismos, como ácido acético e ácido propiônico (Heinl e Grabherr, 2017).

A população de leveduras e fungos também foi menor nas silagens inoculadas com Lalsil, indicando que a aplicação do inoculante contribuiu para a redução desses grupos indesejáveis. Costa et al, (2021) estudando novas cepas de bactérias lácteas sobre a conservação de silagem de milho colhido em estágio tardio de maturidade, observaram que cepas selvagens de *L. buchneri* e *L. farraginis* (isolados de silagens de milho) and *L. hilgardii* (isolado de silagens de cana) proporcionaram maior estabilidade aeróbia, menores perdas de matéria seca e boa acidificação.

Os valores médios de 54,1 e 59,3 g de N-NH<sub>3</sub>/ kgNtotal para silagens convencionais e TMRs de milho, respectivamente, apesar do maior teor de proteínas das silagens TMRs, indicam que a proteólise foi mínima em ambas as silagens. Teores de nitrogênio amoniacal abaixo de 10% são indicativos de que as silagens são de boa qualidade, conforme preconizado por Mahanna (2003).

O efeito de inoculante sobre o conteúdo de ácido acético já era esperado, uma vez que a inoculação com *L. buchneri* geralmente incrementa a produção desses ácidos em silagens tratadas com inoculantes contendo essa cepa (Avila et al, 2009; Rabelo et al, 2018; Agarussi et al, 2022), contribuindo assim para controlar fermentações secundárias. Enquanto que o efeito de silagem observado para o ácido láctico possivelmente está relacionado à inclusão de outros componentes à

silagem, favorecendo a compactação, fornecimento de carboidratos solúveis, favorecendo assim a fermentação das bactérias lácteas, em detrimento de outros grupos indesejáveis.

As silagens de milho planta controle e inoculada com lalsil apresentaram perda da estabilidade aeróbia após 61,28 e 75,14 horas, respectivamente, não diferindo entre si, o que pode ser atribuído à presença de leveduras acidófilas que em maior quantidade nessas silagens acarretaram em perdas de MS, lactato e uma redução média de 0,6g/kg de CHOs em relação ao material antes da ensilagem produzindo etanol e CO<sub>2</sub>, consequentemente elevando os valores de pH e causando o aquecimento da silagem (Mcdonald et al, 1991). Tal fato é comumente observado em estudos envolvendo silagem de milho (Avila et al 2014; Arriola et al, 2021; Agarussi et al, 2022).

A estabilidade aeróbia das silagens SM não foi afetada pela inoculação com *L. buchneri* como verificado em outros estudos (Da Silva et al, (2020) e Costa et al, (2021). Ferrero et al (2020) reportaram que dentre os fatores que possibilitam o insucesso da aplicação do inoculante em silagens se encontra a taxa de aplicação, considerando que taxas menores que  $1 \times 10^5$  UFC/ g tem sido ineficiente em prover melhorias na estabilidade aeróbia de silagens de milho. Em contrapartida, as silagens TMRs de milho permaneceram estáveis durante toda o período de avaliação (168 horas), apresentando uma população relativamente baixa de leveduras e fungos filamentosos. Embora esses grupos tenham sido detectados após a exposição ao ar, não houve redução de CHOs após os 7 dias de exposição ao ar. A elevada estabilidade aeróbia de silagens TMRs parece não estar relacionada a população de leveduras já que a resistência à deterioração foi observada mesmo quando valores de leveduras atingiram  $1 \times 10^6$  UFC/g (Nishino et al, 2004). Destaca-se, também, que a população de leveduras em silagens TMRs varia em função do substrato e temperatura (Wali et al., 2022), bem como pela duração do período de conservação (Wang et al., 2018).

Wali et al, (2022) observaram alterações na população de leveduras em silagens TMRs em função do substrato e temperatura e observaram a presença de diferentes espécies de leveduras em temperaturas de 10 e 25°C. Houve uma menor abundância de *Pichia* e *Issatchenkia* (assimiladoras de lactato) e concluíram que as diferenças na produção de ácido acético ou etanol podem ser explicadas pelas alterações na população de leveduras. Portanto, a alta estabilidade aeróbia é uma das principais vantagens de silagens TMRs, e tem sido frequentemente relatada em diversos estudos (Nishino et al, 2003; Nishino et al, 2004; Restelatto et al, 2019; Wali, et al 2020;

Lazzari et al, 2021). (Nishino et al, 2003; Nishino et al, 2004; Restelatto et al, 2019; Wali et al, 2020; Lazzari et al, 2021).

### **Diversidade Microbiana**

A variação na abundância relativa das comunidades microbianas entre o material pré-ensilado e após 90 dias de fermentação era esperada, tendo em vista a sucessão de eventos durante o processo fermentativo. Além disso a microbiota epifítica variável entre plantas forrageiras é dinâmica e pode também variar em função do substrato e da temperatura do meio (Wali et al., 2022).

A presença de *Weissella*, *Klebsiella* e *Leuconostoc* no material pré-ensilagem é comumente observada em planta do milho, sendo reportado por vários autores, como Keshri et al. (2018), Drouin et al, (2020) e Wali et al. (2022). A maior abundância observada para a população de *Lentilactobacillus* se deve a inclusão do inoculante contendo uma cepa de *Lentilactobacillus buchneri*, proporcionando assim maior abundância nas silagens de milho inoculadas em relação as silagens não inoculadas, além disso foi observada menor abundância relativa de população de *Lactobacillus* em relação a silagem de milho convencional inoculada (55,8 vs 20,6%), indicando que a inoculação promoveu uma seleção de bactérias lácticas do grupo *Lentilactobacillus* que foram dominantes na silagem inoculada. Um dos principais motivos para essa dominância é o metabolismo heterofermentativo facultativo apresentado, a rota metabólica anaeróbica que degrada ácido láctico à ácido acético e 1,2 propanodiol (Oude-Elferink et al, 2001).

Na TMR antes da ensilagem, foi observada uma abundância relativa de 33,2 e 69,9% de *Carnobacterium*, a descrição geral desse grupo acompanha a dos *Lactobacillus*, gram-positivos, catalase-negativos, formato bastonete, não formadores de esporos, não reduzem o nitrato e tem um principal produto formado através da fermentação de glicose pela via glicolítica que é o lactato (Hammes e Hertel, 2006).

A abundância relativa de grupos como *Weissella* em silagens TMRs foi também observada por Wang e Nishino (2008) em silagens de resíduo de soja com inclusão de grãos de cervejaria e por Santos et al. (2020) em silagens TMRs contendo palma forrageira, gliricidia, farelo de soja e milho.

Embora cepas de *Weissella* já tenham sido isoladas e utilizadas em silagens, não é comum o reporte da relação desse grupo com melhorias no processo fermentativo (Cai et al, 1998) ou na

estabilidade aeróbia de silagens (Adesogan et al., 2003; Danner et al., 2003). Em nosso estudo, a alta abundância relativa de *Weissella* associada a alta estabilidade aeróbia das silagens de milho TMRs podem estar relacionadas com a possibilidade da existência de uma ou mais cepas com potencial inibidor para microrganismos indesejáveis.

Outro grupo que apresentou elevada abundância relativa em silagens de milho TMRs no nosso estudo foi *Lactiplantibacillus*, cujo grupo é utilizado no processo de ensilagem como inoculantes, principalmente cepas de *Lactiplantibacillus plantarum*, apresentando foco principal na proteólise das silagens de milho, solubilizando a matriz proteica dos grãos de milho e auxiliando na disponibilização do amido (Duvinjak et al, 2022). O aumento desse grupo pode estar relacionado a sua rota alternativa envolvendo amilase e 1,4 e 1,6 glicosidase, sendo possível usar amido ou celulose além dos carboidratos solúveis (Velikova et al, 2016).

Duvinjak et al. (2022) avaliaram a redução da y-Zeína em silagens de milho e verificaram que silagens tratadas com inoculante contendo *Lactiplantibacillus plantarum* tiveram uma taxa de degradação de matéria seca maior (59%) e uma taxa de degradação de amido maior (160%) comparado às amostras de milho fresco (não ensilado). Os autores observaram ainda que a ensilagem de grão úmido de milho com adição de *L. plantarum* não apresentaram proteínas y-Zeína detectáveis, enquanto que foi possível observar essa fração nas silagens não inoculadas.

Ning et al. (2017) estudando o efeito de enzimas microbianas sob a degradação de amido e hemicelulose em silagens TMR contendo alfafa, observaram quatro espécies de *Bacillus* com atividade amilolítica em pH superior a 4,5 e constataram que a atividade tende a ser maior nas etapas iniciais de fermentação, e observaram que as espécies amilolíticas foram diferentes entre as TMRs de alfafa e TMR de leymus, isso pode indicar que a presença de diferentes ingredientes na ração pode alterar as espécies relacionadas com o processo de hidrólise dos grânulos de amido.

Agarussi et al. (2022) estudando inoculação de silagens de milho e sorgo reidratado inoculado com *Lactiplantibacillus plantarum* e *Propionibacterium acidipropionici*, em diferentes tempos de fermentação, observaram uma predominância na abundância relativa de *Lactobacillus* e *Weissella*, após 90 dias de fermentação. As silagens inoculadas apresentaram 80% de abundância do gênero *Lactobacillus* em silagens de milho e 85% em silagens de sorgo.

A diferença observada para o índice de Chao1 quanto a aplicação do inoculante, onde as silagens sem a presença do inoculante apresentaram um maior índice de alfa diversidade Chao1

comparadas as silagens sem inoculante, eram esperadas, uma vez que com a aplicação do inoculante ocorre dominância das bactérias lácticas na silagem, com supressão de outros grupos microbianos.

A análise dos dados referentes a abundância diferencial de táxons mostra que o inoculante aumentou os grupos da família *Lactobacillaceae*, os quais são desejáveis em silagens, pois produzem ácido láctico, com consequente redução de pH, evitando perdas, além da inibição de outros grupos indesejáveis. De maneira similar, ao se comparar TMR + LB com TMR, é possível notar o aumento da população de *Lentilactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* todos da família *Lactobacillaceae*. Esses resultados estão de acordo com o aumento da população de BAL e os resultados de abundância relativa que foram observados nesse estudo para as silagens inoculadas.

A presença de *Leuconostoc* em silagens é desejável, principalmente nas etapas iniciais de fermentação, pois embora sejam menos acidófilos que outros microrganismos, atuando em uma faixa de pH consideravelmente mais alta que o *L. buchneri* por exemplo, que é consideravelmente mais acidófilo, ele participa do início da fermentação enquanto outros grupos atuam em outras etapas terminais, otimizando o processo de conservação através da interação de grupos benéficos (Adesogan et al, 2003).

## CONCLUSÕES

A adição do inoculante microbiano utilizado aumentou a população de bactérias lácticas e reduziu a população de leveduras em silagens de milho após 90 dias de fermentação, sem proporcionar melhorias na estabilidade aeróbia após exposição ao ar. Embora tenha elevado a produção de ácido acético não se faz necessário a aplicação de inoculante em silagens TMRs de milho, tendo as silagens apresentado alta estabilidade aeróbia com menores perdas de MS e preservação de carboidratos solúveis. A aplicação do inoculante aumentou a abundância relativa do gênero *Lactobacillaceae* e as silagens TMRs apresentaram maior abundância relativa principalmente nas populações de *Weissella* e *Lactiplantibacillus*. Mediante os aspectos abordados indica-se a silagem de ração total de milho sem adição do inoculante microbiano para otimizar perfil fermentativo e na estabilidade aeróbia.

## Agradecimentos

Os autores externam seus agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ciência Animal (INCT-CA) por todo o apoio e suporte financeiro.

#### **Conflito de interesse**

Os autores declaram que não há conflito de interesse

#### **REFERÊNCIAS**

- Adesogan, A. T., M. B. Salawu, A. B. Ross, D. R. Davies, and A. E. Brooks. (2003). Effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* inoculants, or a chemical additive on the fermentation, aerobic stability, and nutritive. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 5, p. 1789-1796.
- Agarussi, M. C. N., Pereira, O. G., da Silva, L. D., da Silva, V. P., de Paula, R. A., e Silva, F. F., & Ribeiro, K. G. (2022). Effect of Various Strains of *Lactobacillus buchneri* on the Fermentation Quality and Aerobic Stability of Corn Silage. **Agriculture**, 12(1), 95.
- AOAC. (1990). Official methods of analysis of the AOAC, 15th ed. Methods 932.06, 925.09, 985.29, 923.03.
- Arriola, K. G. Oliveira, A.S.; Jiang, Y. et al.; Meta-analysis of effects of inoculation with *Lactobacillus buchneri*, with or without other bacteria, on silage fermentation, aerobic stability, and performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2021.
- Arriola, K. G., Vyas, D., Kim, D., et al, (2021). Effect of *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus buchneri*, or their combination on the fermentation and nutritive value of sorghum silage and corn silage. **Journal of Dairy Science**, 104(9), 9664-9675.

- Ávila, C. L. S., Pinto, J. C., Figueiredo, H. C. P., & Schwan, R. F. (2009). Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass and Forage Science**, 64(4), 384-394.
- Bueno, A.V.I; Lazzari, G., Jobim, C. C., & Daniel, J. L. P. et al. (2020). Ensiling total mixed ration for ruminants: A review. **Agronomy**, v. 10, n. 6, p. 879.
- Bretz, F., Hothorn, T., & Westfall, P. (2011). **Multiple Comparisons Using R** (Chapman & Hall/CRC (ed.); 1st ed.). Taylor & Francis Group. [http://www.ievbras.ru/ecostat/Kiril/R/Biblio\\_N/R\\_Eng/Bretz2011.pdf](http://www.ievbras.ru/ecostat/Kiril/R/Biblio_N/R_Eng/Bretz2011.pdf)
- Cai, Y., Benno, Y., Ogawa, M., et al. (1998). Influence of *Lactobacillus* spp. from an inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc* spp. from forage crops on silage fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 2982-2987.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., et al. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature methods**, v. 13, n. 7, p. 581-583, 2016.
- Cândido, E. P.; Santos, E. M.; Ramos, J. P. F, et al. (2015). Economic response of feedlot sheep fed silages with different cultivars of sorghum. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.1, p.79-85.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., et al. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**. 6 (8), 1621–1624.
- Chelius, M.K., Triplett, E.W. (2001). The diversity of Archaea and Bacteria in: **association with the roots of Zea mays L. Microbial ecology**. 41 (3), 252–263.
- Chen, L.; Guo, G.; Yuan, X at al., (2015). Effects of applying molasses, lactic acid bacteria and propionic acid on fermentation quality, aerobic stability and in vitro gas production of total mixed ration silage prepared with oat-common vetch intercrop on the Tibetan Plateau. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,. 96, 1678–1685.
- Chong, J., Liu, P., Zhou, G., & Xia, J. (2020). Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. **Nature Protocols**, 15(3), 799–821. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0264-1>
- Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. **Série Histórica das Safras**. (2021). Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras>  
Acesso em: 20 Jul. 2021.

- Costa, D. M., Carvalho, B. F., Bernardes, T. F., et al. (2021). New epiphytic strains of lactic acid bacteria improve the conservation of corn silage harvested at late maturity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 274, p. 114852.
- Da Silva, E. B., Smith, M. L., Savage, R. M., et al. (2021). Effects of *Lactobacillus hilgardii* 4785 and *Lactobacillus buchneri* 40788 on the bacterial community, fermentation and aerobic stability of high-moisture corn silage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 5, p. 1481-1493.
- Danner, H., M. Holzer, E. Mayrhuber, and R. Braun. (2003). Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and environmental microbiology**. 69:562–567.
- Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I. L., Agellon, L. B., & Xia, J. (2017). MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. **Nucleic Acids Research**, 45(1), 180–188. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx295>
- Detmann, E., Souza, M.A., Valadares Filho, S.C. et al. (2012). **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco: Universidade Federal de Viçosa, 214 p.
- Duvnjak, M., Butorac, A., Kljak, K., et al, (2022). The Evaluation of  $\gamma$ -Zein Reduction Using Mass Spectrometry—The Influence of Proteolysis Type in Relation to Starch Degradability in Silages. **Fermentation**, v. 8, n. 10, p. 551.
- Fernandes, J; Silva, E.B; Carvalho-estrada, C.A; et al. (2021). Influence of hybrid, moisture, and length of storage on the fermentation profile and starch digestibility of corn grain silages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 271, p. 114707.
- Ferraretto, L. F.; Silva Filho, W. I., Fernandes, T. et al. (2018). Effect of ensiling time on fermentation profile and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated corn with or without varied concentrations of wet brewers grains. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 5, p. 4643-4649.
- Ferrero, F., Tabacco, E., Piano, S., et al. (2021). Temperature during conservation in laboratory silos affects fermentation profile and aerobic stability of corn silage treated with *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus hilgardii*, and their combination. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 2, p. 1696-1713.
- Gallo, A., Bernardes, T. F., Copani, G., Fortunati, P., Gianluca Giuberti, G., Bruschi, S., Bryan, K.A., Nielsen, N.G., Witt, K.L., Masoero, F., (2018). Effect of inoculation with

- Lactobacillus buchneri LB1819 and Lactococcus lactis O224 on fermentation and mycotoxin production in maize silage compacted at different densities. *Anim. Feed Sci. Technol.* 246, 36-45.
- Hall, M.B., (2003). Challenges with nonfiber carbohydrate methods<sup>1,2</sup>. **Journal of Animal Science**. 81, 3226–3232. <https://doi.org/10.2527/2003.81123226x>
- Hammes, WALTER P.; HERTEL, CHRISTIAN. (2006). The genera lactobacillus and carnobacterium. **Prokaryotes**, v. 4, p. 320-403.
- Heinl, Stefan; Grabherr, Reingard. (2017). Systems biology of robustness and flexibility: Lactobacillus buchneri—A show case. **Journal of Biotechnology**, v. 257, p. 61-69.
- Hothorn, T; Bretz, F and Westfall, P (2008), Simultaneous Inference in General Parametric Models. **Biometrical Journal**, 50(3), 346–363; See vignette("generalsiminf", package = "multcomp").
- Jason C. Hsu (1996), **Multiple Comparisons**. Chapman & Hall, London.
- Keshri, J., Chen, Y., Pinto, R., et al. (2018). Microbiome dynamics during ensiling of corn with and without Lactobacillus plantarum inoculant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 4025-4037.
- Kung Junior, L., Shaver, R.D., Grant, R.J., Schmidt, R.J., (2018). Silage review: interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**. 101, 4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M.(Eds.), **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, John Wiley, New York, pp. 115–176.
- Lei, C. H. E. N., Yuan, X. J., LI, J. F., et al. (2017). Effect of lactic acid bacteria and propionic acid on conservation characteristics, aerobic stability and in vitro gas production kinetics and digestibility of whole-crop corn based total mixed ration silage. **Journal of Integrative Agriculture**, 16(7), 1592-1600.
- Mahanna, Bill; Chase, Larry E. (2003). Practical applications and solutions to silage problems. **Silage science and technology**, v. 42, p. 855-895.
- McDonald, Peter, A. R. Henderson, and S. Jo E. Heron. (1991). **The biochemistry of silage**. Chalcombe publications.
- Martin, Marcel. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet. journal**, v. 17, n. 1, p. 10-12.

- Miyaji, M; Matsuyama, H; Nonaka, K. (2017). Effect of ensiling process of total mixed ration on fermentation profile, nutrient loss and in situ ruminal degradation characteristics of diet. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 1, p. 134-139,
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.** 153:375–380.
- Ning, T., Wang, H., Zheng, M., et al, (2016). Effects of microbial enzymes on starch and hemicellulose degradation in total mixed ration silages. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 30(2), 171–180. doi:10.5713/ajas.16.0046
- Nishino, N., Wada, H., Yoshida, M., & Shiota, H. (2004). Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 8, p. 2563-2570.
- Nishino, N., Wada, H., Yoshida, M., & Shiota, H. (2004). Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. **Journal of dairy science**, 87(8), 2563-2570.
- Nishino, N.; Hattori, H. (2007). Resistance to aerobic deterioration of total mixed ration silage inoculated with and without homofermentative or heterofermentative lactic acid bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture.**, 87, 2420–2426.
- Nishino, Naoki; Harada, Hiroaki; Sakaguchi, Ei. (2003). Evaluation of fermentation and aerobic stability of wet brewers' grains ensiled alone or in combination with various feeds as a total mixed ration. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 6, p. 557-563.
- Okuda, H., Fujii, S., Kawashima, Y., (1965). A direct colorimetric determination of blood ammonia. **Tokushima Journal of Experimental Medicine.** 12, 11–23.
- Oude elferink, Stefanie JWH et al. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental microbiology**, v. 67, n. 1, p. 125-132, 2001.
- Pereira, G. A., Santos, E. M., Araújo, G. G. L., et al. (2019). Isolation and identification of lactic acid bacteria in fresh plants and in silage from *Opuntia* and their effects on the

- fermentation and aerobic stability of silage. **The Journal of Agricultural Science**, v. 157, n. 9-10, p. 684-692,
- Rabelo, C.H.S., Basso, F.C., McAllister, T.A., Lage, J.F., Gonçalves, G.S., Lara, E.C., Oliveira, A.A., Berchielle, T.T., Reis, R.A., (2016). Influence of *Lactobacillus buchneri* as silage additive and forage:concentrate ratio on the growth performance, fatty acid profile in longissimus muscle, and meat quality of beef cattle. **Can. Journal of Animal Science**. 96, 550-562.
- Rabelo, C. H. S., Härter, C. J., Ávila, C. L. D. S., & Reis, R. A. (2019). Meta-analysis of the effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, chemical composition and aerobic stability of sugarcane silage. **Grassland science**, v. 65, n. 1, p. 3-12.
- Restelatto, R., Novinski, C. O., Pereira, L. M., et al. (2019). Chemical composition, fermentative losses, and microbial counts of total mixed ration silages inoculated with different *Lactobacillus* species. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 4, p. 1634-1644,
- Santos, F. N. S., Santos, E. M., Oliveira, J. S., et al. (2020). Fermentation profile, microbial populations, taxonomic diversity and aerobic stability of total mixed ration silages based on Cactus and *Gliricidia*. **The Journal of Agricultural Science**, v. 158, n. 5, p. 396-405.
- Searle S.R (1971), Linear Models. John Wiley & Sons, New York.
- Siegrifield, V.R., H. Ruckemann e G. Stumpf. (1984). Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. **Landwirtsch Forsch**. 37:298-304.
- Silva, B. de C., L. A. Godoi, S. de C. Valadares Filho, D. Zanetti, P. D. B. Benedeti, and E. Detmann. (2019). A suitable enzymatic method for starch quantification in different organic matrices. **MethodsX**. 6:2322–2328. doi:10.1016/j.mex.2019.09.040.
- Silva, L. D., Pereira, O. G., Silva, T. C., et al. (2018). Effects of *Lactobacillus buchneri* isolated from tropical maize silage on fermentation and aerobic stability of maize and sugarcane silages. **Grass and Forage Science**, v. 73, n. 3, p. 660-670. value of crimped wheat grains. *J. Dairy Sci*. 86:1789–1796.
- Valadares Filho, S. C., Lopes, S. A., Chizzotti, M. L. et al. (2023). BR-CORTE 4.0. Formulação de dietas, predição de desempenho e análise econômica de zebuínos puros e cruzados. Disponível em [www.brcorte.com.br](http://www.brcorte.com.br).

- Van soest, P. J. (1994). **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Comstock Publishing Association, 476 p.
- Velikova, P., Stoyanov, A., Blagoeva, G., et al, (2016). Starch utilization routes in lactic acid bacteria: New insight by gene expression assay. **Starch-Stärke** 68, 953–960.
- Wali, A., Hou, J., Tsuruta, T., & Nishino, N. (2022). Bacterial and fungal microbiota of total mixed ration silage stored at various temperatures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 2, p. 579-590.
- Wang, F.; Nishino, N. (2007) Resistance to aerobic deterioration of total mixed ration silage: Effect of ration formulation, air infiltration and storage period on fermentation characteristics and aerobic stability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 88, 133–140.
- Wang, F.; NISHINO, Naoki. (2008). Ensiling of soybean curd residue and wet brewers grains with or without other feeds as a total mixed ration. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 6, p. 2380-2387.
- Wang, H. Hao, W., Ning, T. et al. (2018). Characterization of culturable yeast species associating with whole crop corn and total mixed ration silage. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 31, n. 2, p. 198.

### **CAPITULO III – SILAGENS DE MILHO NA FORMA DE RAÇÃO MISTA TOTAL (TMR) COM OU SEM INOCULANTE MICROBIANO SOBRE O CONSUMO, DIGESTIBILIDADE E PARÂMETROS RUMINAIS DE BOVINOS DE CORTE**

#### **Resumo**

Objetivou-se avaliar os efeitos da ensilagem de milho na forma de ração mista total (TMR) inoculada ou não, sobre parâmetros ingestivos, digestivos e ruminais de bovinos. Foram avaliados os seguintes tratamentos: Tratamento 1 - Controle (silagem de milho convencional sem adição de inoculante); Tratamento 2 – Silagem de milho inoculada com LaSil AS; Tratamento 3 – Silagem de milho TMR (Sem inoculante); Tratamento 4 – Silagem de milho TMR inoculada com Lalsil AS. Os dados foram analisados de acordo com o delineamento experimental em quadrado latino  $4 \times 4$ , arranjado em esquema fatorial  $2 \times 2$ . Houve efeito de silagem sobre CFDN kg/dia tendo as silagens TMRs apresentado menor consumo ( $2,26 \times 1,94$  kg/dia) em comparação com as silagens convencionais, sem diferença para a aplicação do inoculante. Os animais alimentados com as silagens TMRs apresentaram maior digestibilidade da MS, PB, CNF, amido e NDT sem diferença para inclusão do inoculante. Houve efeito interativo entre silagem e inoculante para DMO, com as silagens TMRs inoculadas apresentando maiores valores de digestibilidade. Houve efeito de silagem para a fração ‘a’ da MS e MO, as silagens TMRs apresentaram maior fração solúvel não diferindo quanto a presença do inoculante. A silagem TMR de milho apresentou maior digestibilidade de MS e nutrientes, principalmente CNF. Mediante os aspectos abordados indica-se a ensilagem de milho na forma de TMR sem adição do inoculante microbiano.

#### **PALAVRAS-CHAVE**

Bactéria do ácido láctico. Concentrado. Dieta. Microrganismos. Ração mista total.

## INTRODUÇÃO

A otimização dos sistemas de produção que envolvem animais tem sido alvo de muitas pesquisas na atualidade, isso tem ocorrido através da precisão e eficiência dos sistemas, onde as dietas vem sendo cada vez mais otimizadas para atender às exigências nutricionais dos animais, reduzindo custos com desperdício, bem como redução de trabalho e mão de obra.

Nesse cenário destaca-se o interesse pela utilização de silagens na forma de TMR nos sistemas de produção envolvendo ruminantes, devido às vantagens de sua utilização como redução de trabalho no fornecimento diário, mistura homogênea dos ingredientes com o concentrado, redução da seleção dos alimentos, possibilidade de inclusão de subprodutos à silagem, elaboração de uma dieta para atender determinada categoria animal, conservação de grãos diretamente no silo, o que favorece a compra estratégica de grãos em períodos de custo mais acessível, utilização de diferentes ingredientes possibilitando corrigir deficiências nutricionais do volumoso ou melhorar características fermentativas das silagens (Owen e Howard, 1965; Bueno et al., 2020).

Além dessas vantagens operacionais e nutricionais citadas acima, tem sido observado aumento na estabilidade aeróbia da silagem, com menores alterações na qualidade durante o fornecimento ao longo do tempo (Nishino et al 2003; Weinberg et al 2011; Xie et al 2022). Além disso, estudos envolvendo silagens de milho tem reportado aumento na digestibilidade do amido ao longo do período de fermentação, em função da proteólise ocorrer na matriz que recobre os grânulos de amido presentes no grão, envolvendo fatores que dependem do teor de umidade e do tempo de fermentação (Ferrareto et al; 2018; Bueno et al, 2020). Dessa forma resposta similar pode ser observada em silagens de TMR à base de milho uma vez que a umidade presente na silagem está diretamente relacionada ao volumoso utilizado em adição aos ingredientes do concentrado, podendo ser observado indícios como: um aumento na fração solúvel em silagens envolvendo grãos (Silva et al 2020) ou um aumento da fração de proteína solúvel (Hao et al, 2015).

Embora a conservação de forragem na forma de silagem seja uma técnica interessante para suprir as demandas nos períodos de escassez, produzir silagens envolve riscos quando o processo de ensilagem ocorre de maneira inadequada. A adoção de tecnologias como o uso de inoculante microbiano ,principalmente o *L. buchneri*, merece destaque pois este pode contribuir para

minimizar perdas decorrentes do processo fermentativo, como perdas de MS e mitigação da produção de etanol (Nishino et al., 2007).

A presença do inoculante microbiano pode ser uma alternativa interessante para minimizar perdas e expandir a população de bactérias lácticas, sendo uma forma de manipular a microbiota da silagem, logo nas primeiras fases após a etapa da vedação. Hao et al, (2020) estudaram as características de microrganismos proteolíticos e seus efeitos na proteólise em silagens TMR de soja, observaram que ocorre uma sucessão das bactérias aeróbias proteolíticas por bactérias lácticas proteolíticas em silagens TMR e as serinas e metaloproteinases microbianas dessas cepas desempenham papéis importantes na proteólise dessas silagens. A nossa hipótese é que silagens elaboradas na forma de ração mista total, podem apresentar diferenças quanto a composição química, afetando os parâmetros ingestivos, digestivos e ruminais em bovinos.

Portanto, objetivou-se avaliar os efeitos da ensilagem de milho na forma de ração mista total (TMR) inoculada ou não com *L. buchneri*, sobre parâmetros ingestivos, digestivos e ruminais de bovinos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Colheita do milho, preparo da TMR, ensilagem e delineamento experimental**

O milho foi plantado em área do DZO, nas dependências do setor de Agrostologia da Universidade Federal e Viçosa. A colheita do material foi realizada quando o grão atingiu 2/3 da linha do leite. Em seguida, o material foi processado em tamanhos de partículas de  $\pm 20$  mm em máquina forrageira estacionária (JF-60, JF-Máquinas®, Itapira-SP, Brasil) acoplada em tomada de potência do trator (Valtra / Valmet 785®, Mogi das Cruzes-SP, Brasil). O experimento foi realizado nas dependências do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) no município de Viçosa-MG situada a 200 e 45' de latitude sul, 420 e 51' de longitude oeste e 648 m de altitude, a ensilagem foi realizada nas dependências da Unidade de ensino pesquisa e extensão (UEPE) gado de corte e as análises foram realizadas parte no Laboratório de Forragicultura e no Laboratório de Microbiologia da Silagem.

Foi usado o delineamento em quadrado latino  $4 \times 4$ , com quatro animais, quatro dietas e quatro períodos experimentais, em esquema fatorial  $2 \times 2$  sendo dois tipos de silagem [silagem de

milho (SM) e silagem de ração em mistura total (TMR)], com ou sem (CTRL) inoculante microbiano (LB).

Tratamento 1 - Silagem de milho Controle (Sem inoculante),

Tratamento 2 – Silagem de milho inoculada com LaSil AS

Tratamento 3 – Silagem de milho TMR (Sem inoculante)

Tratamento 4 – Silagem de milho TMR inoculada com Lalsil AS

A silagem de TMR foi composta por milho, farelo de milho, farelo de soja, ureia e núcleo vitamínico-mineral. Para a confecção da TMR realizou-se a mistura dos ingredientes, farelo de milho, farelo de soja, ureia/sulfato de amônio (9:1), núcleo mineral-vitamínico [(Agrocere®, Brasil) Confinatto-N210™, contendo: 200 g kg<sup>-1</sup> Ca; 24 g kg<sup>-1</sup> P; 59,3 g kg<sup>-1</sup> Na; 23 g kg<sup>-1</sup> S; 5 g kg<sup>-1</sup> Mg; 8,2 mg kg<sup>-1</sup> Co; 560 mg kg<sup>-1</sup> Cu; 240 mg kg<sup>-1</sup> F; 28 mg kg<sup>-1</sup> I; 1.120 mg kg<sup>-1</sup> Mn; 5,6 mg kg<sup>-1</sup> Se; 1.680 mg kg<sup>-1</sup> Zn; 5,6 mg kg<sup>-1</sup> Se; 59.140 UI kg<sup>-1</sup> Vit. A; 10.000 ufc kg<sup>-1</sup> *Saccharomyces cerevisiae*; 1.000 mg kg<sup>-1</sup> Monensina sódica] com o milho *in natura*.

Para o ensaio com os bovinos, a ensilagem foi realizada em manilhas de concreto de 500kg de capacidade, preconizando-se uma densidade média de 600kg/dm<sup>3</sup>. As dietas foram previamente formuladas adotando-se relação volumoso: concentrado (40:60), na base da matéria seca, para atender as exigências para ganho de 1,3kg de bovinos de corte cruzados pesando em média 400kg, segundo o BR-Corte 4.0 (Valadares Filho et al., 2023). A proporção química dos ingredientes e a composição química são apresentadas abaixo nas tabelas 1 e 2 respectivamente.

Tabela 1 - Proporção dos ingredientes das dietas experimentais (g/kgMS<sup>1</sup>)

| Itens                               | Proporção |
|-------------------------------------|-----------|
| Silagem de milho                    | 400       |
| Farelo de milho                     | 506,4     |
| Farelo de soja                      | 51,6      |
| Ureia/sulfato de amônio (9/1)       | 10,0      |
| Núcleo mineral                      | 15,0      |
| Bicarbonato/Oxido de magnésio (3/1) | 17,0      |

<sup>1</sup> – g/kg com base na matéria seca

Tabela 2 – Composição da MS (g/kg MN<sup>1</sup>) e demais constituintes (g/kg MS) dos ingredientes das dietas experimentais.

| Itens                                | MS <sup>2</sup> | PB <sup>3</sup> | FDNcp <sup>4</sup> | FDA <sup>5</sup> | MM <sup>6</sup> | EE <sup>7</sup> | Amido |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------|
| Silagem de milho                     | 297,4           | 60,1            | 466,6              | 249,8            | 41,5            | 23,2            | 624,1 |
| Farelo de milho                      | 884,5           | 80              | 137,7              | 30,9             | 13,3            | 45,1            | 151,8 |
| Farelo de soja                       | 892,4           | 448,8           | 263,9              | 56,6             | 67,6            | 11,63           | -     |
| Ureia/sulfato de amônio (9/1)        | 100             | 2547,0          | -                  | -                | -               | -               | -     |
| Núcleo mineral                       | 100             | -               | -                  | -                | -               | -               | -     |
| Bicarbonato/ Óxido de magnésio (3/1) | 100             | -               | -                  | -                | -               | -               | -     |

<sup>1</sup>matéria natural, <sup>2</sup>matéria seca, <sup>3</sup>proteína bruta, <sup>4</sup>FDN corrigida para cinzas e proteína, <sup>5</sup>Fibra em detergente ácido, <sup>6</sup>matéria mineral, <sup>7</sup>extrato etéreo

Foram ensilados 2t de cada tratamento em manilhas de concreto com capacidade de 1 m<sup>3</sup> para o ensaio de consumo e digestibilidade com bovinos de corte. Após a compactação, cada manilha foi vedada com filme plástico de polietileno dupla face com 200 micras (Lonax, PaperPlast™, Belo Horizonte-MG, Brasil), envolta com arame de zinco 1,24 mm (BWG18, Gerdau®, Ouro Branco-MG, Brasil) e acrescido de 10 cm de areia para proteção do filme plástico. Foram utilizados quatro novilhos da raça Nelore, não-castrados, fistulados no rúmen, peso corporal médio (PCm) de 350 ± 25 kg e idade média de 18 ± 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, com ingestão voluntária e livre acesso a água.

O período experimental teve a duração de 80 dias, sendo 4 períodos de 20 dias, (14 dias para adaptação dos animais às dietas, 5 dias de coleta total de urina e fezes e 1 dia destinado para coleta e medição do pH no líquido ruminal).

A duração do ensaio de consumo e digestibilidade foi de 80 dias, dividido em quatro períodos experimentais de 20 dias cada, sendo 14 dias (1º ao 14º dia) para adaptação e 6 dias (15º ao 20º dia) para coletas (Machado et al., 2016). A estimativa do teor MS das dietas foi realizada semanalmente para ajustar o teor de MS ao longo do ensaio experimental. As dietas foram fornecidas duas vezes ao dia, às 8h00 e 17h00.

### **Mensuração do consumo, amostragem de ingredientes e sobras**

As dietas foram ajustadas diariamente, o consumo foi *ad libitum* e as sobras mantidas  $\pm 15\%$  do total ofertado. Os animais foram pesados ao início e ao final de cada período experimental para medir a variação de peso vivo em percentual (PV %). 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 a partir do 14º até 20º dia de cada período experimental, e acondicionadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises. As sobras foram amostradas  $\pm 10\%$  do total de cada dia de coleta, com a confecção de uma amostra composta por animal e por período. As amostras foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar ( $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por 72 h e moídas em moinho de facas com peneira de 2 e 1 mm para posteriores análises.

### **Coleta total de fezes e urina**

Foram realizadas coletas totais de fezes e urina do 15º ao 19º dia de cada período experimental. As fezes foram coletadas em baldes plásticos de 50 L de capacidade, providos de tampa e devidamente identificados, os quais foram pesados diariamente. A urina foi coletada com auxílio de sondas coletoras, que foram acopladas aos animais, conectadas a galões plásticos 20 L, que continham 200 mL de uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4 20\%$  (v/v) (Hristov et al., 2019).

Os animais permaneceram em constante observação por 5 dias (120 horas). Ao final de cada 24 h de coleta, os baldes contendo as fezes foram pesados, homogeneizados e uma amostra de aproximadamente 250 g foi acondicionada em bandeja de alumínio previamente pesada, posteriormente processada conforme descrito anteriormente. Em seguida, foi realizada uma amostra composta proporcional ao peso seco total das fezes de cada dia de coleta, sendo estas acondicionadas em potes plásticos para posteriores análises. Os volumes urinários foram mensurados diariamente com a utilização de proveta graduada. Em seguida, as amostras foram armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises. A urina foi amostrada 1% sobre o total de volume urinário de cada dia de coleta, no final de cada período, amostras compostas de urina foram descongeladas, homogeneizadas e amostradas para análise de N urinário, alantoína e ácido úrico para aferição do balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana (Hristov et al., 2019).

## **Coleta de líquido ruminal e mensuração do pH**

A coleta de líquido ruminal foi realizada no 20º dia de cada período experimental. As amostras foram coletadas em cinco pontos distintos na interface líquido-sólido do rúmen e foram filtradas em três camadas de gaze estéril. Foram coletadas  $\pm$  250 mL de líquido ruminal em cada horário de coleta (0; 2; 4 e 6 horas após alimentação). A digesta foi retirada para separação das frações líquida e sólida e medição do pH da fração líquida com auxílio de um potenciômetro digital, imediatamente após a filtragem (Deusch et al., 2017). Aproximadamente 50 mL da fração líquida foi acidificada com 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:1 (v / v) e armazenada a -20 °C para posteriores análises de N-NH<sub>3</sub> ruminal e ácidos orgânicos.

## **Degradabilidade ruminal *in situ***

Amostras das silagens foram tomadas no início de todos os quatro períodos experimentais e processadas à 2mm em moinho de facas (R-TE-650/1, Tecnal®, Piracicaba-SP, Brasil), onde foram alocadas em duplicata em sacos de náilon obedecendo a relação de 20mg de matéria seca/cm<sup>2</sup> de superfície. A incubação foi realizada no 8º dia de cada período com auxílio de correntes, para avaliação nos períodos: 0; 3; 6; 9; 24; 48; 72 e 96h. Após a retirada das amostras pós incubação, foi realizada lavagem com água corrente com auxílio de baldes plásticos de 10L até que a água residual se apresentasse translúcida, após a lavagem os sacos permaneceram na estufa por 48 horas. as amostras foram moídas a 1mm para análises dos teores de MS e MM para estimativa das curvas de degradação da MS e MO, seguindo o modelo proposto por Orskov & McDonald (1979)  $Y_t = a + b \times (1 - e^{-ct})$  Onde  $Y_t$  = fração degradada da MS no tempo “t”, g/kg; a = fração rapidamente solúvel, g/kg; b = fração potencialmente degradável no rumen, g/kg; c = taxa constante para degradação de b, por hora; t = tempo, horas

## **Análises químicas**

As amostras da planta no dia da ensilagem, das silagens, de ingredientes, dietas, fezes e sobras foram submetidas à secagem parcial em estufa de circulação forçada de ar (55 °C / 72 h). 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 submetidas às análises de quantificação dos teores de matéria seca (MS, método 934,01), matéria orgânica (MO, método 972,43), matéria mineral (MM, método 942,05), proteína bruta ( $PB = N \times 6,25$ , método 984,13), extrato etéreo (EE, método 920,39) e fibra em detergente ácido (FDA, método 973,18) (AOAC, 1990). Também foram determinados os teores de fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), utilizando-se  $\alpha$ -amilase termoestável sem o uso de sulfito de sódio (Mertens, 2002), nitrogênio insolúvel em detergente ácido [(NIDA) (Licitra et al., 1996)], lignina [(LIG) (Gomes et al., 2011)] e proteína solúvel em tampão borato-fosfato (Licitra et al., 1996).

Os teores de carboidratos não-fibrosos (CNF) foram estimados pela fórmula:  $100 - [(proteína\ bruta\ (PB) - PB\ da\ ureia + ureia) + FDNcp + extrato\ etéreo + cinzas]$  (Detmann e Valadares Filho, 2010). O cálculo do NDT foi realizado conforme proposto pelo Nutrient Requirements of Beef Cattle (NRC, 2001). Foi realizada análise de amido conforme Silva et al. (2019). Foram determinados os consumos de MS, MO, PB, FDNcp, EE, CNF, NDT e o consumo de amido, bem como suas respectivas digestibilidades, exceto para NDT (Mertens e Grant, 2020). A concentração de  $N-NH_3$  do fluido ruminal foi avaliada pelo método fenolhipoclorito (Okuda et al., 1965). Os ácidos orgânicos do rúmen (lactato, acetato, propionato e butirato) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; SPD-10 AVP, Shimadzu®, Oregon, USA), com detector ultravioleta em 210 nm. A coluna utilizada foi C18 (fase reserva), e utilizado o  $H_2SO_4$  como fase móvel, com fluxo de  $1,5\ mL\ min^{-1}$ , pressão da coluna de 168 kgf e volume injetado de  $20\ \mu L$  (Siegfried et al., 1984).

A urina foi analisada quanto à concentração de nitrogênio (N) e derivados de purina (alantoína e ácido úrico) (Chen e Gomes, 1992). Derivados de purina (DP) e volume total de urina foram utilizados para estimar as purinas absorvidas e a síntese de proteína microbiana no rúmen. Os derivados de purinas foram obtidos pela multiplicação de cada um pelo volume total urinário (Barbosa et al., 2011). As purinas absorvidas (PA) foram calculadas pela fórmula:  $PA = [DP - (0,301\ PC^{0,75})] / 0,80$ , Onde: PC = peso corporal;  $0,301\ PC^{0,75}$  = excreção endógena de DP; 0,80 = recuperação de PA. A síntese de N microbiano (NMic) foi determinada pela fórmula:  $NMic = [(70 \times PA) / (0,93 \times 1000 \times 0,137)]$ ; Onde: 70 = concentração de N nas purinas; 0,93 = digestibilidade das purinas; 0,137 = taxa média de N-RNA pelo N-total para bactérias ruminais (Barbosa et al., 2011).

O balanço de N (BN) foi obtido por diferença entre N total ingerido e N total excretado nas fezes e urina (Hristov et al., 2019). O BN foi determinado pela fórmula:  $BN = NI - (N \text{ fezes} + N \text{ urina})$ ; Onde:  $NA = NI - N \text{ fezes}$ ;  $NI = N \text{ ofertado} - N \text{ sobras}$ ; Onde:  $NR = \text{nitrogênio retido}$ ;  $NI = \text{nitrogênio ingerido}$ ;  $N \text{ fezes} = \text{nitrogênio nas fezes}$ ;  $N \text{ urina} = \text{nitrogênio na urina}$ ;  $N \text{ ofertado} = \text{nitrogênio ofertado}$ ;  $N \text{ sobras} = \text{nitrogênio sobras}$ .

## Análises estatísticas

Todas as variáveis foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos dados e ao teste de Levene para verificação da homogeneidade de variância. Os dados referentes às populações microbianas foram transformados para a base logarítmica (Log10). Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e foram analisadas pelo procedimento PROC MIXED do SAS® versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, 2010). Os dados obtidos de consumo, digestibilidade, pH ruminal, N-NH<sub>3</sub> ruminal, ácidos orgânicos, foram analisados em delineamento quadrado latino (DQL)

Os dados foram analisados de acordo com o delineamento experimental em quadrado latino  $4 \times 4$ , arranjado em esquema fatorial  $2 \times 2$ , com quatro tratamentos e quatro períodos experimentais, conforme o seguinte modelo:  $Y_{ijk} = \mu + S_i + I_j + (S \times I)_{ij} + A_k + P_l + e_{ijkl}$

Em que:  $Y_{ijk}$  = variável resposta;  $\mu$  = constante geral;  $S_i$  = efeito da silagem  $i$  (efeito fixo);  $I_j$  = efeito de inoculante  $j$  (efeito fixo);  $S \times I_{ij}$  = efeito de interação entre a silagem e o inoculante  $ij$  (efeito fixo);  $A_k$  = efeito do animal  $k$  (efeito aleatório);  $P_l$  = efeito do período experimental  $l$  (efeito aleatório);  $e_{ijkl}$  = erro aleatório residual.

Os dados referentes às medições do rúmen (0, 2, 4 e 6 h após alimentação) como o pH ruminal, ácidos orgânicos e N-NH<sub>3</sub> ruminal foram analisados como medidas repetidas no tempo, com efeito fixo para tempo de amostragem e interação entre dieta  $\times$  tempo.

Os dados de degradabilidade ruminal *in situ* foram analisados segundo o modelo proposto por Orskov & McDonald (1979)  $Deg(t) = a + b(1 - e^{-ct})$ .

Todos os outros dados foram submetidos a análise de variância, aplicando-se o teste F de Fisher, utilizando-se o PROC MIXED do SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, 2010). A matriz de covariância foi escolhida através do critério de Akaike corrigido (AICC). Todos os

procedimentos estatísticos foram conduzidos utilizando-se diferenças de  $P \leq 0,05$  e tendências entre  $p > 0,05$  a  $p < 0,10$ , como níveis críticos de probabilidades para o erro tipo I.

## RESULTADOS

Na Tabela 3 é mostrada a composição química, a população microbiana (UFC/g de forragem) e o pH do material antes da ensilagem.

Tabela 3 – Composicao das silagens de milho e das TMR antes de ensilagem.

| Itens                                       | Tratamentos    |                 |        |               |
|---------------------------------------------|----------------|-----------------|--------|---------------|
|                                             | Milho controle | Milho inoculado | TMR    | TMR inoculado |
| MS g/kg <sup>1</sup>                        | 298,5          | 296,4           | 478,5  | 466,1         |
| PB g/kg <sup>2</sup>                        | 59,31          | 60,94           | 129,13 | 124,80        |
| EE g/kg <sup>3</sup>                        | 23,22          | 22,75           | 24,14  | 11,40         |
| MM g/kg <sup>4</sup>                        | 41,5           | 36,5            | 44,9   | 45,2          |
| FDNcp g/kg <sup>5</sup>                     | 482,1          | 450,45          | 244,7  | 267,3         |
| FDA g/kg <sup>6</sup>                       | 256,3          | 232,0           | 100,4  | 105,5         |
| CNF g/kg <sup>7</sup>                       | 409,2          | 444,8           | 572,5  | 566,8         |
| Amido g/kg                                  | 349,7          | 383,7           | 397,0  | 390,8         |
| Lignina g/kg                                | 55,4           | 45,5            | 39,7   | 27,3          |
| pH                                          | 5,79           | 5,81            | 7,92   | 7,93          |
| Leveduras UFC/g de forragem                 | 6,97           | 6,88            | 6,81   | 6,89          |
| Enterobactérias UFC/g de forragem           | 6,49           | 6,10            | 6,39   | 6,13          |
| Fungos filamentosos UFC/g de forragem       | 5,83           | 5,99            | 5,91   | 5,89          |
| Bactérias do ácido lático UFC/g de forragem | 6,04           | 6,31            | 6,19   | 6,15          |
| CHOs g/kg <sup>8</sup>                      | 64,6           | 73,6            | 46,9   | 45,8          |

<sup>1</sup>Matéria seca; <sup>2</sup>Proteína bruta; <sup>3</sup>Extrato etéreo; <sup>4</sup>Matéria mineral; <sup>5</sup>Fibra insolúvel em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; <sup>6</sup>Fibra insolúvel em detergente

ácido;<sup>7</sup>Carboidratos não fibrosos <sup>8</sup>Carboidratos solúveis em água; TMR– Ração mista total de silagem de milho; UFC – Unidades formadoras de colônias/ grama de forragem.

Na Tabela 4 são mostrados os consumos de nutrientes dos animais alimentados com dietas experimentais contendo silagens de milho (SM) e silagens de ração em mistura total à base de milho (TMR), com ou sem aplicação de inoculante microbiano. Não houve efeito ( $P>0,05$ ) de silagem ou de inoculante sobre os consumos de MS, MO, EE, CNF e amido que apresentaram média respectivamente  $7,34\pm0,93$ ;  $6,93\pm0,87$ ;  $0,35\pm0,14$ ;  $3,84\pm0,71$ ;  $2,87\pm0,43$  kg/dia. Contudo, houve efeito ( $P<0,05$ ) de silagem sobre o consumo de CFDN, registrando-se menor valor para as silagens de TMR ( $2,26 \times 1,94$  kg/dia).

Tabela 4 – Consumo de matéria seca e nutrientes dos animais alimentados com as dietas experimentais contendo silagens de milho (SM) e silagens de ração em mistura total à base de milho (TMR), com ou sem aplicação de inoculante microbiano.

| Inoculante | Silage <sup>1</sup>    |      | Média | EPM    | p-valor |        |        |
|------------|------------------------|------|-------|--------|---------|--------|--------|
|            | SM                     | TMR  |       |        | I       | S      | IxS    |
|            | CMS kg/d <sup>1</sup>  |      |       |        |         |        |        |
| Cont       | 7,57                   | 7,49 | 7,53  | 0,2344 | 0,4704  | 0,7674 | 0,6496 |
| LB         | 6,94                   | 7,34 | 7,14  |        |         |        |        |
| Média      | 7,25                   | 7,41 |       |        |         |        |        |
|            | CMO kg/d <sup>2</sup>  |      |       |        | I       | S      | IxS    |
| Cont       | 7,20                   | 7,04 | 7,12  | 0,218  | 0,4589  | 0,8481 | 0,6165 |
| LB         | 6,58                   | 6,92 | 6,75  |        |         |        |        |
| Média      | 6,89                   | 6,98 |       |        |         |        |        |
|            | CFDN kg/d <sup>3</sup> |      |       |        | I       | S      | IxS    |
| Cont       | 2,29                   | 2,02 | 2,15  | 0,082  | 0,3987  | 0,0338 | 0,7287 |
| LB         | 2,23                   | 1,87 | 2,03  |        |         |        |        |
| Média      | 2,26                   | 1,94 |       |        |         |        |        |
|            | CEEkg/d <sup>4</sup>   |      |       |        | I       | S      | IxS    |
| Cont       | 0,35                   | 0,38 | 0,36  | 0,036  | 0,9116  | 0,7209 | 0,9929 |
| LB         | 0,34                   | 0,37 | 0,35  |        |         |        |        |
| Média      | 0,34                   | 0,37 |       |        |         |        |        |
|            | CCNFkg/d <sup>5</sup>  |      |       |        | I       | S      | IxS    |

|                         |      |      |      |        |        |        |        |
|-------------------------|------|------|------|--------|--------|--------|--------|
| Cont                    | 3,93 | 3,97 | 3,95 | 0,1798 | 0,5163 | 0,4507 | 0,5139 |
| LB                      | 3,48 | 3,97 | 3,72 |        |        |        |        |
| Média                   | 3,70 | 3,97 |      |        |        |        |        |
| Camidokg/d <sup>6</sup> |      |      |      |        | I      | S      | IxS    |
| Cont                    | 2,59 | 3,15 | 2,87 | 0,1090 | 0,9699 | 0,1148 | 0,4465 |
| LB                      | 2,76 | 2,97 | 2,86 |        |        |        |        |
| Média                   | 2,67 | 3,06 |      |        |        |        |        |
| CNDTk/d <sup>7</sup>    |      |      |      |        | I      | S      | IxS    |
| Cont                    | 5,69 | 6,14 | 5,91 | 0,2493 | 0,2865 | 0,1126 | 0,4113 |
| LB                      | 4,74 | 6,01 | 5,37 |        |        |        |        |
| Média                   | 5,16 | 6,07 |      |        |        |        |        |

Inoculante: Cont – controle sem aditivo; LB - *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition; Silagem: Silagem de milho; Ração mista total de silagem de milho; <sup>1</sup>Consumo de matéria seca <sup>2</sup>Consumo de matéria orgânica <sup>3</sup>Consumo de fibra insolúvel em detergente neutro <sup>4</sup>Consumo de extrato etéreo <sup>5</sup>Consumo de carboidratos não fibrosos <sup>6</sup>Consumo de amido <sup>7</sup>Consumo de nutrientes digestíveis totais; EPM – Erro padrão da média; P-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I × S); Médias seguidas por letras distintas distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste F de Fischer (P < 0,05);

Houve efeito da interação (P<0,05) silagem e inoculante sobre a DMO (Tabela 5). Os animais alimentados com as silagens TMRs apresentaram maiores (P<0,05) digestibilidades da MS, PB, CNF, amido e NDT (Tabela 5). A digestibilidade da FDN não foi afetada (P>0.05) por nenhum dos fatores em estudo, registrando-se valor médio de 56,51%.

Tabela 5 – Digestibilidade das dietas fornecidas aos animais experimentais.

| Inoculante       | Silagem |         | p-valor |       |        |        |        |
|------------------|---------|---------|---------|-------|--------|--------|--------|
|                  | SM      | TMR     | Média   | EPM   | I      | S      | IxS    |
| DMS <sup>1</sup> |         |         |         |       |        |        |        |
| Cont             | 71,06   | 77,03   | 74,04   | 1,689 | 0,1538 | 0,0011 | 0,0545 |
| LB               | 64,08   | 78,34   | 71,21   |       |        |        |        |
| Média            | 67,57   | 77,68   |         |       |        |        |        |
| DMO <sup>2</sup> |         |         |         |       | I      | S      | IxS    |
| Cont             | 72,60Ba | 78,33Ab | 75,46   | 1,634 | 0,1239 | 0,0010 | 0,0464 |
| LB               | 65,48Bb | 79,51Aa | 72,49   |       |        |        |        |

|       |                     |       |       |        |        |        |        |  |
|-------|---------------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--|
| Média | 69,04               | 78,92 |       |        |        |        |        |  |
|       | DPB <sup>3</sup>    |       |       |        | I      | S      | IxS    |  |
| Cont  | 63,01               | 68,70 | 65,85 | 2,448  | 0,1877 | 0,0130 | 0,1156 |  |
| LB    | 51,54               | 69,91 | 60,72 |        |        |        |        |  |
| Média | 57,27               | 69,30 |       |        |        |        |        |  |
|       | DFDN <sup>4</sup>   |       |       |        | I      | S      | IxS    |  |
| Cont  | 60,52               | 57,51 | 59,01 | 1,729  | 0,0865 | 0,5378 | 0,1083 |  |
| LB    | 50,92               | 57,12 | 54,02 |        |        |        |        |  |
| Média | 55,72               | 57,31 |       |        |        |        |        |  |
|       | DEE <sup>5</sup>    |       |       |        | I      | S      | IxS    |  |
| Cont  | 90,21               | 95,75 | 92,98 | 0,8610 | 0,7437 | 0,0644 | 0,1782 |  |
| LB    | 92,95               | 94,02 | 93,48 |        |        |        |        |  |
| Média | 91,58               | 94,88 |       |        |        |        |        |  |
|       | DCNF <sup>6</sup>   |       |       |        | I      | S      | IxS    |  |
| Cont  | 79,18               | 89,42 | 84,3  | 2,135  | 0,2550 | 0,0004 | 0,1251 |  |
| LB    | 73,16               | 90,46 | 81,81 |        |        |        |        |  |
| Média | 76,17               | 89,94 |       |        |        |        |        |  |
|       | Damido <sup>7</sup> |       |       |        | I      | S      | IxS    |  |
| Cont  | 84,81               | 90,93 | 87,87 | 1,005  | 0,7992 | 0,0028 | 0,8780 |  |
| LB    | 84,25               | 90,79 | 87,52 |        |        |        |        |  |
| Média | 84,53               | 90,84 |       |        |        |        |        |  |
|       | NDT <sup>8</sup>    |       |       |        | I      | S      | IxS    |  |
| Cont  | 74,93               | 81,64 | 78,28 | 1,706  | 0,1570 | 0,0015 | 0,0964 |  |
| LB    | 68,16               | 82,31 | 75,23 |        |        |        |        |  |
| Média | 71,54               | 81,97 |       |        |        |        |        |  |

Ino  
cul  
ant  
e:  
Co  
nt –  
con  
trol  
e  
se

m aditivo; LB - *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition; Silagem: Silagem de milho; Ração mista total de silagem de milho;  
<sup>1</sup>Digestibilidade da matéria seca <sup>2</sup>Digestibilidade da matéria orgânica <sup>3</sup>Digestibilidade da proteína bruta <sup>4</sup>Digestibilidade da fibra insolúvel em detergente neutro  
<sup>5</sup>Digestibilidade do extrato etéreo <sup>6</sup>Digestibilidade dos carboidratos não fibrosos  
<sup>7</sup>Digestibilidade do amido <sup>8</sup>Nutrientes digestíveis totais; EPM – Erro padrão da média; P-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I × S); Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste F de Fischer (P < 0,05);

Houve efeito (p<0,05) de silagem sobre a síntese de proteína microbiana (g/d), registrando-se maior valor nas silagens TMRs (24,83 x 52,93 g/dia). Contudo, a eficiência microbiana e a relação nitrogênio microbiano/nitrogênio consumido, não foram afetadas (P>0.05) pelos fatores em estudo (Tabela 6).

Tabela 6 – Eficiência e síntese de proteína Microbiana dos animais alimentados com as dietas experimentais.

| Inoculante | Dietas                              |        | Média | EPM   | I      | S      | IxS    |
|------------|-------------------------------------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|
|            | SM                                  | TMR    |       |       |        |        |        |
|            | Nmic (g/d) <sup>1</sup>             |        |       |       |        |        |        |
| Cont       | 26,52                               | 43,59  | 35,05 | 6,72  | 0,3594 | 0,0108 | 0,2028 |
| LB         | 23,15                               | 62,27  | 42,71 |       |        |        |        |
| Média      | 24,83                               | 52,93  |       |       |        |        |        |
|            | EtMic (g N-Mic/kg NDT) <sup>2</sup> |        |       |       | I      | S      | IxS    |
| Cont       | 45,53                               | 65,77  | 55,65 | 14,21 | 0,2812 | 0,0735 | 0,2906 |
| LB         | 46,04                               | 112,84 | 79,44 |       |        |        |        |
| Média      | 45,78                               | 89,30  |       |       |        |        |        |
|            | Nmic/Nconsumido (g/g) <sup>3</sup>  |        |       |       | I      | S      | IxS    |
| Cont       | 0,22                                | 0,33   | 0,27  | 0,064 | 0,2770 | 0,0773 | 0,3872 |
| LB         | 0,25                                | 0,52   | 0,38  |       |        |        |        |
| Média      | 0,23                                | 0,42   |       |       |        |        |        |

Inoculante: Cont – controle sem aditivo; LB - *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition; Silagem: Silagem de milho; Ração mista total de silagem de milho; <sup>1</sup>Síntese de nitrogênio microbiano g/dia <sup>2</sup>Eficiência microbiana (relação entre gramas de Nitrogênio microbiano/kg de nutrientes digestíveis totais) <sup>3</sup>Relação entre Nitrogênio microbiano e o Nitrogênio consumido; EPM – Erro padrão da média; P-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I × S); Médias seguidas por letras distintas distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste F de Fischer (P < 0,05).

Houve efeito da interação inoculante x silagem sobre a excreção de Nitrogênio na urina, enquanto que o balanço de nitrogênio e o nitrogênio das fezes não foram afetados pelos fatores inoculante ou silagem, nem pela interação destes (Tabela 7).

Tabela 7 – Balanço Nitrogenado dos animais alimentados com as dietas experimentais.

| Inoculante | Silagem                  |         | Média | EPM  | I      | S      | IxS    |
|------------|--------------------------|---------|-------|------|--------|--------|--------|
|            | SM                       | TMR     |       |      |        |        |        |
|            | Balanço Nitrogenado gN/d |         |       |      |        |        |        |
| Cont       | 30,39                    | 41,78   | 36,08 | 4,49 | 0,3483 | 0,1666 | 0,7867 |
| LB         | 18,92                    | 35,31   | 27,11 |      |        |        |        |
| Média      | 24,65                    | 38,54   |       |      |        |        |        |
|            | N urina gN/d             |         |       |      |        |        |        |
| Cont       | 44,39Ba                  | 46,37Ba | 45,38 | 2,78 | 0,9088 | 0,0143 | 0,0300 |
| LB         | 34,34Ba                  | 55,61Aa | 44,97 |      |        |        |        |
| Média      | 39,36                    | 50,99   |       |      |        |        |        |
|            | N fezes g/kgMS           |         |       |      |        |        |        |
| Cont       | 43,27                    | 38,64   | 40,95 | 2,03 | 0,3897 | 0,1478 | 0,6785 |
| LB         | 48,42                    | 40,50   | 44,46 |      |        |        |        |
| Média      | 45,84                    | 39,57   |       |      |        |        |        |

Inoculante: Cont – controle sem aditivo; LB - *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition; Silagem: Silagem de milho; Ração mista total de silagem de milho; P-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I × S); Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste F de Fischer ( $P < 0,05$ ).

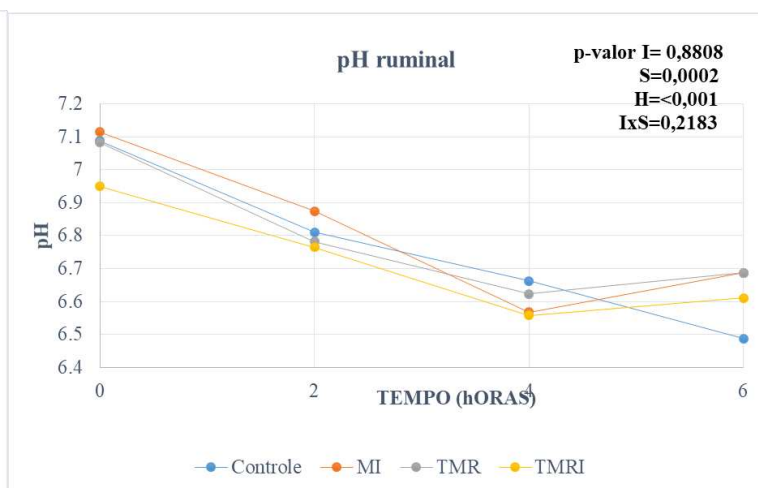
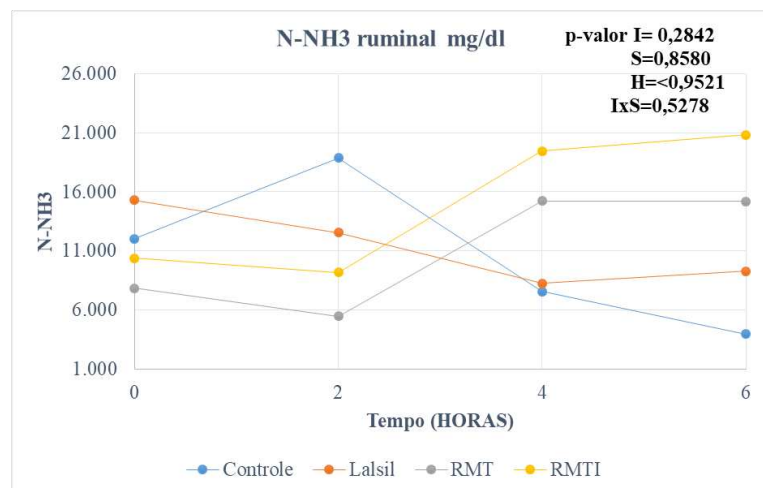


Figura 1 – Comportamento dos valores de N-NH<sub>3</sub> mg/dl de líquido ruminal e pH ruminal nos diferentes períodos (horas) de coleta; Controle – silagem de milho controle sem aditivo; Lalsil – silagem de milho inoculada com *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition; TMR - Ração mista total de silagem de milho; TMRI – Ração mista total de silagem de milho inoculada com *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition; P-valor- Probabilidade de efeitos para inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I × S);

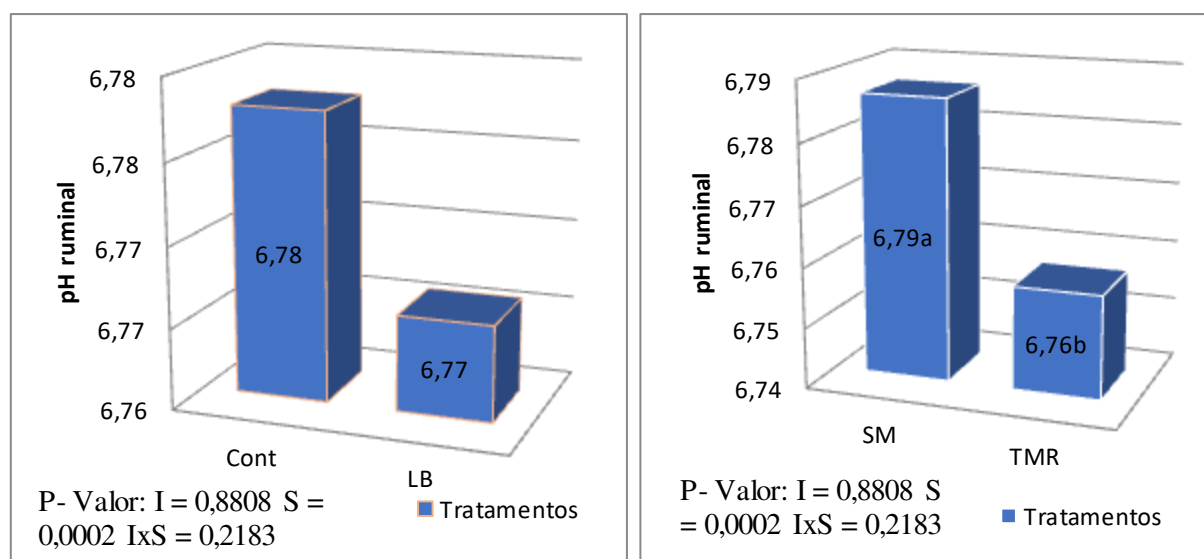


Figura 2 - Valores de pH ruminal

(A) em função do efeito de inoculante (I), pH ruminal (B) em função do efeito de silagem (S) de bovinos de corte alimentados com silagens de milho (SM) e silagens de ração em mistura total (TMR), com ou sem aplicação de inoculante microbiano; P-valor, Probabilidade de efeitos para I, S e interação I com S (I × S); Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste F de Fischer (P < 0,05).

Não houve efeito (P>0,05) de silagem, inoculante e tempo sobre o conteúdo de N-NH<sub>3</sub> ruminal que apresentou média 11,96 ±6,68 mg/dl, registrando-se se picos de amônia entre 4-6h após a alimentação, naqueles animais alimentados com silagens de TMRs.

Houve efeito (P<0,05) de silagem e de hora sobre o pH ruminal, (Figura 2) sendo registrado maiores valores de pH para as silagens TMRs na presença ou não do inoculante.

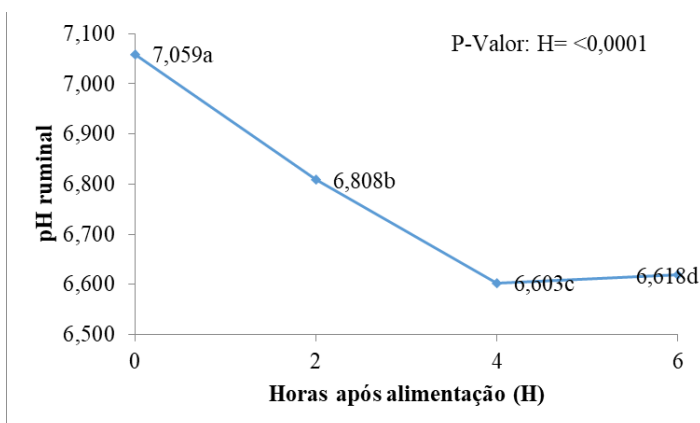


Figura 3 - pH ruminal ao longo do tempo (0, 2, 4 e 6h) após alimentação em bovinos de corte alimentados com silagens de milho e silagens de ração mista total (TMR), com ou sem inoculante microbiano; P-valor, Probabilidade de efeito de tempo (H); Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste F de Fischer ( $P < 0,05$ ).

Houve efeito ( $p < 0,05$ ) da interação silagem x inoculante sobre o total de AGVs, bem como de ácido propiônico no rúmen dos animais, no tempo zero (antes da alimentação), enquanto que o acetato e o butirato não foram afetados pelos fatores silagem e inoculantes, nem pela interação destes (Tabela 9). Contudo, após 6h de alimentação, não foi registrado efeito ( $p > 0,05$ ) de silagem, inoculante, nem de sua interação sobre o total de ácidos produzidos e os teores de acetato propionato, butirato e a relação A:P (Tabela 8).

Tabela 8 – Ácidos graxos voláteis presentes no líquido ruminal de bovinos de corte alimentados com as dietas experimentais.

| Inoculante           | Silagem |     |     |   |   |     |
|----------------------|---------|-----|-----|---|---|-----|
|                      | SM      | TMR | EPM | I | S | IxS |
| Antes da Alimentação |         |     |     |   |   |     |

| Total AGVs mmol/L        |         |         |        |        |        |        |
|--------------------------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|
| Cont                     | 21,90Ba | 33,27Aa | 1,8575 | 0,6291 | 0,2603 | 0,0316 |
| LB                       | 28,33Ba | 23,97Ba |        |        |        |        |
| Acetato                  |         |         |        |        |        |        |
| Cont                     | 65,33   | 66,98   | 1,0471 | 0,3776 | 0,3585 | 0,8658 |
| LB                       | 66,90   | 69,27   |        |        |        |        |
| Propionato               |         |         |        | I      | S      | IxS    |
| Cont                     | 21,41Ba | 21,93Ba | 0,8148 | 0,9873 | 0,0516 | 0,0291 |
| LB                       | 24,82Aa | 18,48Ba |        |        |        |        |
| Butirato                 |         |         |        | I      | S      | IxS    |
| Cont                     | 13,25   | 11,08   | 0,9417 | 0,2619 | 0,5829 | 0,0939 |
| LB                       | 8,27    | 12,24   |        |        |        |        |
| Relação A:P              |         |         |        | I      | S      | IxS    |
| Cont                     | 3,10    | 3,10    | 0,1522 | 0,5477 | 0,0664 | 0,0651 |
| LB                       | 2,72    | 3,78    |        |        |        |        |
| 6 Horas após alimentação |         |         |        |        |        |        |
| Total AGVs mmol/L        |         |         |        | I      | S      | IxS    |
| Cont                     | 29,03   | 28,55   | 1,1301 | 0,0720 | 0,7644 | 0,9293 |
| LB                       | 34,10   | 33,18   |        |        |        |        |
| Acetato                  |         |         |        | I      | S      | IxS    |
| Cont                     | 62,55   | 64,46   | 0,8436 | 0,5954 | 0,4904 | 0,8024 |
| LB                       | 64,13   | 65,04   |        |        |        |        |
| Propionato               |         |         |        | I      | S      | IxS    |
| Cont                     | 27,03   | 23,35   | 0,8717 | 0,5158 | 0,1273 | 0,5586 |
| LB                       | 25,04   | 23,16   |        |        |        |        |

|      | Butirato |       |        | I      | S      | IxS    |
|------|----------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Cont | 10,41    | 12,18 | 0,5888 | 0,9310 | 0,2729 | 0,8086 |
| LB   | 10,82    | 11,79 |        |        |        |        |

---

|      | Relação A:P |      |        | I      | S      | IxS    |
|------|-------------|------|--------|--------|--------|--------|
| Cont | 2,32        | 2,80 | 0,1302 | 0,5028 | 0,3015 | 0,4841 |
| LB   | 2,69        | 2,82 |        |        |        |        |

Inoculante: Cont – controle sem aditivo; LB - *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition; Silagem: Silagem de milho; Ração mista total de silagem de milho; P-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I × S); Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste F de Fischer (P < 0,05).

Foi observado efeito (p<0,05) da interação silagem x inoculante sobre as frações potencialmente degradáveis da MS e da MO, registrando-se maiores valores na silagem de milho convencional, comparada a TMR, sem a presença do inoculante, enquanto que a fração solúvel, de ambas as variáveis, foi afetada (p<0,05) apenas por silagem (Tabela 9). Não houve efeito (p>0,05) de silagem, inoculante, nem da interação destes, sobre as taxas de degradação da MS e MO das dietas.

Tabela 9 – Características de degradação ruminal *in situ* de dietas contendo silagens de milho e silagens na forma de ração total de milho.

| MS <sup>I</sup> |          |         |       |        |        |        |
|-----------------|----------|---------|-------|--------|--------|--------|
| Inoculante      | Silagem  |         | EPM   | I      | S      | IxS    |
|                 | SM       | TMR     |       |        |        |        |
|                 | Fração a |         |       |        |        |        |
| Cont            | 31,61    | 44,48   | 2,09  | 0,2910 | 0,0143 | 0,3951 |
| LB              | 30,85    | 37,66   |       |        |        |        |
|                 | Fração b |         |       |        |        |        |
| Cont            | 58,74Aa  | 32,42Bb | 2,89  | 0,2144 | 0,0003 | 0,0072 |
| LB              | 44,14Ba  | 38,6Bb  |       |        |        |        |
|                 | kd       |         |       |        |        |        |
| Cont            | 0,075    | 0,0547  | 0,005 | 0,4355 | 0,2303 | 0,5429 |
| LB              | 0,0598   | 0,0527  |       |        |        |        |

| MO <sup>2</sup> |         |         |        |        |        |        |
|-----------------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|
| Inoculante      | Silagem |         | EPM    | I      | S      | IxS    |
|                 | SM      | TMR     |        |        |        |        |
|                 | a       |         |        |        |        |        |
| Cont            | 30,46   | 42,69   | 2,11   | 0,4078 | 0,0134 | 0,5809 |
| LB              | 29,43   | 37,66   |        |        |        |        |
|                 | b       |         |        |        |        |        |
| Cont            | 59,55Aa | 34,32Ba | 2,903  | 0,1973 | 0,0004 | 0,0222 |
| LB              | 46,00Ba | 38,6Ba  |        |        |        |        |
|                 | kd      |         |        |        |        |        |
| Cont            | 0,0884  | 0,0545  | 0,0066 | 0,2206 | 0,1262 | 0,2764 |
| LB              | 0,0588  | 0,0527  |        |        |        |        |

<sup>1</sup>Matéria seca <sup>2</sup>Matéria orgânica; Inoculante: Cont – controle sem aditivo; LB - *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition; Silagem: Silagem de milho; Ração mista total de silagem de milho; a – Fração solúvel em água, b – fração potencialmente degradável kd – taxa fracional de degradação; EPM – Erro padrão da média; P-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I × S); Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste F de Fischer (P < 0,05).

## DISCUSSÃO

### ENSAIO COM ANIMAIS

O efeito de silagem sobre o consumo de FDNkg/dia já era esperado, pois as dietas contendo SM apresentarem em média 50g/kg MS a mais de FDNcp que aquelas contendo silagem de milho TMR. Isso ocorre em silagens TMRs devido à hidrólise de carboidratos complexos, principalmente a hemicelulose (Wang et al 2015).

Lazzari et al. (2021), ao estudar o efeito das diferentes fontes de proteína em silagens na forma de ração total na alimentação de bovinos em terminação, também não observaram efeito sobre o consumo de matéria seca, cujo valor médio foi de 7,91kg/dia.

As maiores digestibilidades de MS, MO, PB, CNF e Amido foi observadas para as silagens de TMR. Isso acarretou em um maior valor de NDT destas, comparada à SM. Isso pode estar relacionado a fatores ligados a maior degradação das prolaminas que recobrem o amido do grão de milho (Zeína) com o tempo de fermentação (Saylor et al, 2020a).

Saylor et al. (2020b) observaram 64% de degradação ruminal *in situ* de amido após 28 dias de ensilagem do grão úmido de milho, valor este 24,7% maior que no tempo 0. Em silagens TMRs, a hidratação do milho ocorre com a presença da umidade da própria planta adicionada ao alimento concentrado de modo que o teor de MS fica próximo ao do grão úmido de milho.

Um outro ponto interessante a ser destacado é a otimização da sincronia energia/proteína, favorável para a síntese microbiana, pois a maior digestibilidade da PB concomitante a digestibilidade de CNF, pode ter favorecido a síntese microbiana, uma vez que os microrganismos ruminais necessitam de esqueletos de carbono da fonte de carboidratos dietética juntamente com o N-NH<sub>3</sub> para síntese da proteína microbiana e AGVs (Castro et al., 2021).

Lazzari et al. (2021) observaram melhoria do GMD em silagens TMRs contendo grão de soja e associaram esse efeito ao maior consumo de matéria seca desse tratamento, evidenciando que a interação da fonte de proteína e a sua disponibilidade pode alterar significativamente o aproveitamento dos nutrientes no rúmen.

Os valores de N-NH<sub>3</sub>/N total no rúmen para as diferentes dietas, encontram-se acima dos 5mg/dl indicados por Satter & Slyter (1974) para manutenção normal das atividades ruminais e dos 10mg/dl recomendados por Van Soest (1994) para fermentação da fibra, sem comprometimento da degradação da FDN. Contudo, o pico de produção de N-NH<sub>3</sub> para as silagens TMRs ocorreu entre 4 e 6 horas após alimentação, com valores próximos a 20mg/dl, enquanto que para as silagens SMs esse valor ficou abaixo de 10mg/dl.

De maneira similar houve efeito de silagem e hora para os valores de pH, a redução dos valores de pH após a alimentação está relacionada com o consumo de concentrado das dietas. O pH ruminal maior nas silagens TMRs no mesmo período que se registrou o pico de N-NH<sub>3</sub>, parece ser um indicativo de diferença entre o padrão de fermentação das silagens TMRs e SM, em que a elevada quantidade de amônia associada à elevadas quantidades de carboidratos fermentescíveis no rúmen (principalmente amido) estimulou a formação da proteína microbiana (Russel et al, 1992), conforme observado no nosso estudo.

O maior conteúdo de N na urina observado para a TMR inoculada, possivelmente se deve a um mecanismo regulatório dos animais para excreção da amônia na forma de ureia na urina, pois de acordo com Harmeys e Martens (1980) a quantidade de ureia sintetizada pelo fígado está relacionada com a quantidade de amônia produzida no rúmen e a relação proteína/energia dietética. No entanto, isto não afetou o balanço de nitrogênio dos animais, o que pode ser

explicado pelo consumo de proteína bruta similar para todas as dietas experimentais. Nair et al. (2020) estudando fornecimento de TMRs contendo silagem de milho inoculadas com *L. hilgardii* e *L. buchneri* também não observaram efeito das dietas sobre o balanço de nitrogênio.

Os maiores valores do total de AGVs (mmol/L) produzidos no rúmen para as silagens TMR não inoculadas provavelmente estejam relacionados ao consumo de carboidratos solúveis rapidamente fermentescíveis no rúmen. Resposta similar foi observada por Cao et al. (2010) estudando o efeito de silagens TMR fresca ou ensilada para ovinos. Além disso, observaram uma menor emissão de metano indicando, eficiência ruminal. Essa maior produção de AGVs produzidos no rúmen em animais alimentados com silagens TMRs, comparadas à silagem convencional, podem estar relacionadas ao fato de a fermentação do amido no rúmen e a elevada quantidade de ácido lático das silagens TMRs, pode favorecer a produção de ácidos pelos microrganismos ruminais (Miyaji et al. 2018).

O efeito de silagem sobre a fração solúvel da MS e da MO para as dietas contendo silagens TMRs, se deve ao fato da unidade presente na planta de milho, em adição aos ingredientes da dieta, promover uma hidrólise, proporcionando assim maior disponibilidade de açúcares, principalmente amido, que após a fermentação no silo, esses açúcares podem ser rapidamente metabolizados no ambiente ruminal ou reaproveitados no intestino delgado. O fluxo contínuo de nutrientes para o ambiente ruminal favorece a sincronia do processo fermentativo no rúmen, o que torna o ambiente ruminal mais estável e proporciona melhorias na formação da proteína microbiana (Clemmons et al., 2021). Miyaji et al (2017) observaram valores em torno de 50,4% para a fração solúvel da MS de silagens TMRs de milho após 90 dias de fermentação, no estudo os autores também observaram um aumento na fração solúvel do amido de 53,7% para 71,9% após 90 dias de fermentação.

Silva et al. (2020) avaliando dietas baseadas em grãos de milho e sorgo secos ou reconstituídos, utilizando a técnica *in situ* para estimativa dos parâmetros de degradação, observaram maiores valores para a fração a (55,6 vs 29,0) e menores valores para a fração b (27,9 vs 57,3) para as dietas contendo grão de milho reconstituído, o que evidencia o efeito da umidade sobre a solubilidade dos grãos de milho no ambiente ruminal, aumentando a fração solúvel do amido nessas dietas (57,2 vs 23,3).

Os maiores valores da fração potencialmente degradável da MS (58,74%) e MO (59,55%) das dietas contendo SM sem inoculante, pode estar relacionado a maior presença de FDN nas silagens SM.

## **CONCLUSÕES**

A ensilagem de milho planta exclusiva ou na forma de TMR não altera o consumo de nutrientes em bovinos. Porém favorece a digestibilidade de MS e outros nutrientes, principalmente CNF e amido, constituindo-se em vantagem prática no fornecimento diário das dietas.

## **Agradecimentos**

Os autores externam seus agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ciência Animal (INCT-CA) por todo o apoio e suporte financeiro.

## **Conflito de interesse**

Os autores declaram que não há conflito de interesse

## **REFERÊNCIAS**

- Barbosa, A. M., R. F. D. Valadares, S. C. Valadares Filho, D. S. Pina, E. Detmann, and M. I. Leão. (2011). Endogenous fraction and urinary recovery of purine derivatives obtained by different methods in nellore cattle. **Journal of animal science**, v. 89, n. 2, p. 510-519, 2011. doi:10.2527/jas.2009-2366.
- Bueno, A.V.I; Lazzari, G., Jobim, C. C., et al, (2020). Ensiling total mixed ration for ruminants: A review. **Agronomy**, v. 10, n. 6, p. 879.

- 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. (2020) Storage length interacts with maturity to affect nutrient availability in unprocessed flint corn silage. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 49.
- Cao, Y., Takahashi, T., Horiguchi, K., Yoshida, N., & Cai, Y. (2010). Methane emissions from sheep fed fermented or non-fermented total mixed ration containing whole-crop rice and rice bran. **Animal Feed Science and Technology**, 157(1-2), 72–78. doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.02
- Castro, M. M. D., Cardoso, M. A., Detmann, E, et al. (2021). In vitro ruminal fermentation and enteric methane production of tropical forage added nitrogen or nitrogen plus starch. **Animal Feed Science and Technology**, v. 275, p. 114878.
- Chen, Xubin B.; Gomes, M. J. (1992). Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details.
- Clemmons, B. A., M. T. Henniger, and P. R. Myer. (2021). Data of bacterial community dynamics resulting from total rumen content exchange in beef cattle. **BMC Res. Notes**. 14:21–23. doi:10.1186/s13104-021-05726-1.
- Detmann, E., Souza, M.A., Valadares Filho, S.C. et al. (2012). **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco: Universidade Federal de Viçosa. 214 p.
- Hristov, A. N., A. Bannink, L. A. Crompton, P. et al, (2019). Invited review: Nitrogen in ruminant nutrition: A review of measurement techniques. **Journal of Dairy Science**. 102:5811–5852. doi:10.3168/jds.2018-15829.
- AOAC. (1990). Official methods of analysis of the AOAC, 15th ed. Methods 932.06, 925.09, 985.29, 923.03.
- Ferraretto, L. F.; Silva Filho, W. I., Fernandes, T. et al. (2018). Effect of ensiling time on fermentation profile and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated corn with or without varied concentrations of wet brewers grains. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 5, p. 4643-4649.
- Hall, M.B., (2003) Challenges with nonfiber carbohydrate methods1,2. **Journal of Animal Science** 81, 3226–3232. <https://doi.org/10.2527/2003.81123226x>.
- Hao, W.; Wang, H.; Xu, C. (2015). Dynamic changes of proteolysis and microorganism composition of total mixed ration silages with different moisture levels. In Advances in Energy Science and Equipment Engineering, **Proceedings of the International**

- Conference on Energy Equipment Science and Engineering**, Guangzhou, China, 30–31 May 2015; Zhou, S., Patty, A., Chen, S., Eds.; CRC Press: Balkema, Netherlands, pp. 269–273.
- Hao, W., Tian, P., Zheng, M., et al. (2020). Characteristics of proteolytic microorganisms and their effects on proteolysis in total mixed ration silages of soybean curd residue. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 33, n. 1, p. 100.
- Harmeyer, J.; Martens, H. (1980). Aspects of urea metabolism with reference to the goat. **Journal of Dairy Science**, v.63, p.1707-1728.
- Lazzari, G., Poppi, A. C., Machado, J., et al. (2021). 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**, v. 99, n. 2, p. skab032,
- Miyaji, M., Nonaka, K. (2018). Effects of altering total mixed ration conservation method when feeding dry-rolled versus steam-flaked hulled rice on lactation and digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101: 5092-5101.
- Miyaji, M.; Matsuyama, H; Nonaka, K. (2017). Effect of ensiling process of total mixed ration on fermentation profile, nutrient loss and in situ ruminal degradation characteristics of diet. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 1, p. 134-139.
- Nair, J., Huaxin, N., Andrada, E, et al. (2020). Effects of inoculation of corn silage with *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus buchneri* on silage quality, aerobic stability, nutrient digestibility, and growth performance of growing beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 98, n. 10, p. skaa267.
- Nishino, N.; Harada, H.; Sakaguchi, E. (2003). Evaluation of fermentation and aerobic stability of wet brewers' grains ensiled alone or in combination with various feeds as a total mixed ration. **J. Sci. Food Agric.**, 83, 557–563.
- Orskov, D.R.; Mcdonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p.499-503.
- Owen, F. G.; Howard, W. T. (1965). Effect of ration moisture level on value of alfalfa plus cracked corn as a complete-feed silage for lactating cows. **Journal of dairy science**, v. 48, n. 10, p. 1310-1314.

- Russell, J. B., O'connor, J. D., Fox, D. G., et al. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets, I Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, 70:3562.
- Satter, L.D.; Slyter, L.L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial production in vitro. **British Journal of Nutrition**. v. 32, n. 2, p.199-208.
- Saylor, B. A., Casale, F., Sultana, H., & Ferraretto, L. F. (2020). Effect of microbial inoculation and particle size on fermentation profile, aerobic stability, and ruminal in situ starch degradation of high-moisture corn ensiled for a short period. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 1, p. 379-395.
- Saylor, B. A., Fernandes, T., Sultana, H., Gallo, A., & Ferraretto, L. F. (2020). Influence of microbial inoculation and length of storage on fermentation profile, N fractions, and ruminal in situ starch disappearance of whole-plant corn silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 267, p. 114557.
- Silva, B. de C., L. A. Godoi, S. de C. Valadares Filho, D. Zanetti, P. D. B. Benedeti, E. Detmann. (2019). A suitable enzymatic method for starch quantification in different organic matrices. **MethodsX**. 6:2322–2328. doi:10.1016/j.mex.2019.09.040.
- Silva, B. C., Pacheco, M. V. C., Godoi, L. A., et al. (2020). In situ and in vitro techniques for estimating degradation parameters and digestibility of diets based on maize or sorghum. **The Journal of Agricultural Science**, v. 158, n. 1-2, p. 150-158.
- Valadares Filho, S. C., Lopes, S. A., Chizzotti, M. L. et al, (2023). BR-CORTE 4.0. Formulação de dietas, predição de desempenho e análise econômica de zebuínos puros e cruzados. Disponível em [www.brcorte.com.br](http://www.brcorte.com.br).
- Van soest, P. J. (1994). **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Comstock Publishing Association, 476 p.
- Xie, Y., Wang, L., Li, W., et al, (2022). Fermentation quality, in vitro digestibility, and aerobic stability of total mixed ration silage in response to varying proportion alfalfa silage. **Animals**, 12(8), 1039.
- Wang, H.; Ning, T.; Hao,W.; Zheng, M.; Xu, C. (2015) Dynamics associated with prolonged ensiling and aerobic deterioration of total mixed ration silage containing whole crop corn. Asian-Australas. **Journal of Animal Science**, 29, 62–72..
- Weinberg, Z.; Chen, Y.; Miron, D.; Raviv, Y.; Nahim, E.; Bloch, A.; Yosef, E.; Nikbahat, M.; Miron, J. (2011). Preservation of total mixed rations for dairy cows in bales wrapped with

polyethylene stretch film—A commercial scale experiment. **Animal Feed Science and Technology**. 164, 125–129.

#### **CAPITULO IV – PERFIL FERMENTATIVO E ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM DIFERENTES RELAÇÕES VOLUMOSO/CONCENTRADO NA FORMA DE RAÇÃO MISTA TOTAL (TMR)**

##### **Resumo**

Objetivou-se avaliar os efeitos da ensilagem de cana-de-açúcar em diferentes relações volumoso/concentrado, sobre as populações microbianas, composição química, perfil fermentativo e estabilidade aeróbia após 90 dias de fermentação. Avaliou-se os seguintes tratamentos: Controle - Silagem de Cana-de-açúcar (Sem inoculante), 20/80 – Silagem de Ração mista total de Cana-de-açúcar na relação volumoso/concentrado 20/80; 40/60 – Silagem de Ração mista total de Cana-de-açúcar na relação volumoso/concentrado 40/60; 60/40 – Silagem de Ração mista total de Cana-de-açúcar na relação volumoso/concentrado 60/40; 80/20 – Silagem de Ração mista total de Cana-de-açúcar na relação volumoso/concentrado 80/20; Lalsil - Silagem de Cana-de-açúcar inoculada com Lalsil Cana (*Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) 6x4 com 6 tratamentos e 4 repetições. Avaliações foram realizadas no período de abertura após 90 dias e após sete dias de exposição do material ao ar na avaliação da estabilidade aeróbia. A população de BAL foi maior para as silagens TMRs comparadas as silagens Controle e Lalsil, exceto para a relação 20/80 (3,71 UFC/g). Houve efeito para pH, N-

NH<sub>3</sub>, BAL e LEV ( $p < 0,05$ ) após 90 dias de ensilagem. Foi observado efeito significativo ( $p < 0,05$ ), com as silagens 20/80 apresentando maior teor de MS seguidas por 40/60, 60/40, 80/20, Controle e Lalsil sendo que essas últimas não diferiram entre si. As silagens Controle e Lalsil ( $p < 0,05$ ) apresentaram maior valor de FDN. As silagens 60/40, apresentaram maior número de horas de estabilidade ( $p < 0,05$ ) que as silagens 80/20, Controle e Lalsil. Houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) As silagens 60/40 apresentaram menor temperatura máxima que Lalsil, as silagens. As silagens TMRs na proporção 40/60, 60/40 e 80/20, apresentaram maior estabilidade aeróbia. Houve efeito significativo para temperatura máxima e tempo até atingir a temperatura máxima, as silagens 60/40 apresentaram menor temperatura máxima que Lalsil (29,2 vs 38,0 °C), as silagens 40/60 (153,4 horas) e 60/40 (157,5 horas) apresentaram maior tempo até atingir a temperatura máxima que as silagens Controle e Lalsil. Recomenda-se a ensilagem de cana-de-açúcar na forma de ração mista total de cana-de-açúcar com inclusão de até 60% de concentrado sem adição de inoculante para melhorias na estabilidade aeróbia.

Palavras-chave: Bactéria do ácido láctico. Inoculante. Atividade de água. Inoculante.

## INTRODUÇÃO

Atualmente, os sistemas de produção animal têm buscado a otimização e eficiência de um dos pilares para intensificação do sistema: a alimentação. Essa intensificação começa principalmente prezando pela praticidade no fornecimento de alimento, de forma a reduzir os custos com fornecimento e facilitar a logística. Nesse contexto, as silagens na forma de ração total caracterizam-se por apresentar, dentre suas vantagens, o fornecimento de um alimento sem a necessidade de pré-mistura no ato de fornecimento. Além disso, é uma técnica interessante para corrigir carências nutricionais que o volumoso possa conter, elevando o valor agregado da silagem.

Schingoethe, (2017), em sua revisão destaca que entre as vantagens da TMR se encontra a redução do trabalho, a possibilidade de formulação de uma dieta para atender diferentes grupos e categorias para fornecer de modo automatizado. Pode-se mascarar a presença de alguns ingredientes de baixo consumo ou corrigir a deficiência de nutrientes. E principalmente para manter uma taxa obrigatória de forragem para vacas em lactação.

Estudos com silagens na forma de rações já não são novidade em muitos países, tendo sido reportados efeitos positivos na estabilidade aeróbia de silagens TMR quando comparados a silagens produzidas da maneira tradicional (Nishino et al., 2004; Wang & Nishino 2007; Nishino & Hattori 2007; Chen et al., 2015). No entanto, embora essas silagens apresentem resultados satisfatórios, sua causa ainda é desconhecida, com as principais atribuições sendo a presença de umidade e a interação entre os ingredientes da ração.

Variações no teor de umidade de silagens TMR podem impactar de diferentes formas na qualidade da silagem. Santos et al, (2020) observaram melhorias na estabilidade aeróbia em função das diferentes relações de palma forrageira e gliricidia, observando variações nas comunidades microbianas presentes na silagem em função das diferentes relações. A umidade e interação da forragem com os ingredientes podem alterar as comunidades presentes no ambiente fermentado.

Na atualidade, não existem trabalhos visando à comparação de diferentes relações de volumoso/concentrado considerando os mesmos ingredientes variando apenas a fonte de forragem. Estudos dessa natureza são necessários para melhor compreensão das causas da maior estabilidade aeróbia em silagens na forma de ração em mistura total. A nossa hipótese é de que silagens elaboradas na forma de ração em mistura total podem diferir quanto às características fermentativas, especialmente quanto a estabilidade aeróbia. Objetivou-se avaliar os efeitos da ensilagem de cana-de-açúcar em diferentes relações volumoso/concentrado, sobre as populações microbianas, composição química, perfil fermentativo e estabilidade aeróbia após 90 dias fermentação.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Ensilagem e tratamentos**

O experimento foi realizado nas dependências do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no município de Viçosa-MG, situada a 200 e 45' de latitude sul, 420 e 51' de longitude oeste e 648 m de altitude. A ensilagem foi realizada nas dependências do laboratório de animais e as análises foram realizadas parte no laboratório de forragicultura e no laboratório de microbiologia da silagem.

A cana-de-açúcar foi colhido no departamento de Zootecnia na unidade de ensino pesquisa e extensão UEPE gado de corte, o material foi picado à um tamanho médio de partícula de 2cm

usando uma máquina desintegradora de forragem acoplada a força motor do trator (Valtra / Valmet 785®, Mogi das CruzesSP, Brasil) devidamente regulada, Após a picagem foram formadas pilhas de 10kgs de material para mistura dos ingredientes da ração e, ou, aplicação do inoculante Lalsil Cana (*Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition) de acordo com as recomendações do fabricante. As dietas foram previamente formuladas para atender relações de volumoso e concentrado e para atender as exigências para ganho de 1,0kgs em bovinos de corte cruzados pesando em média 400kgs seguindo as tabelas de exigências do BR-Corte 4.0 (Valadares filho, et al 2023).

Foram avaliados os seguintes tratamentos:

Tratamento 1 Controle - Silagem de Cana-de-açúcar Controle (Sem inoculante),  
Tratamento 2 20/80 – Silagem de Ração mista total de Cana-de-açúcar na relação volumoso/concentrado 20/80

Tratamento 3 40/60 – Silagem de Ração mista total de Cana-de-açúcar na relação volumoso/concentrado 40/60

Tratamento 4 60/40 – Silagem de Ração mista total de Cana-de-açúcar na relação volumoso/concentrado 60/40

Tratamento 5 80/20 – Silagem de Ração mista total de Cana-de-açúcar na relação volumoso/concentrado 80/20

Tratamento 6 Lalsil - Silagem de Cana-de-açúcar inoculada com Lalsil Cana (*Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788; Lallemand Animal Nutrition)

Na tabela 1 e 2 encontram-se a proporção e a composição química dos ingredientes das dietas experimentais, respectivamente:

Tabela 1 – Proporção (g/kg MS<sup>1</sup>) dos ingredientes das dietas experimentais.

| Itens                           | Dietas (relação V:C <sup>2</sup> ) |       |       |       |
|---------------------------------|------------------------------------|-------|-------|-------|
|                                 | 20/80                              | 40/60 | 60/40 | 80/20 |
| Silagem de cana                 | 200                                | 400   | 600   | 800   |
| Farelo de milho                 | 681,4                              | 442,1 | 204,1 | 22,4  |
| Farelo de soja                  | 76,6                               | 116,0 | 153,9 | 125,6 |
| Ureia/sulfato de amônio (9/1)   | 10,0                               | 9,9   | 10,0  | 20,0  |
| Núcleo mineral/sal branco (1:1) | 15,0                               | 15,0  | 15,0  | 15,0  |

|                                     |      |      |      |      |
|-------------------------------------|------|------|------|------|
| Bicarbonato/Oxido de magnésio (3:1) | 17,0 | 17,0 | 17,0 | 17,0 |
|-------------------------------------|------|------|------|------|

<sup>1</sup>g/kg com base na matéria seca  
<sup>2</sup>Relação volumoso:concentrado

Tabela 2 – Composição química dos ingredientes das dietas experimentais.

| Itens                               | MS <sup>2</sup> | PB <sup>3</sup> | FDN <sup>4</sup> | MM <sup>5</sup> | EE <sup>6</sup> |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| Silagem de cana                     | 308,8           | 13,1            | 450,,5           | 37,6            | 23,2            |
| Farelo de milho                     | 884,9           | 84,1            | 137,7            | 13,3            | 45,1            |
| Farelo de soja                      | 889,7           | 452,3           | 263,9            | 67,6            | 11,63           |
| Ureia/sulfato de amônio (9/1)       | 100             | 2539,7          | -                | -               | -               |
| Nucleo mineral/sal branco (1/1)     | 100             | -               | -                | -               | -               |
| Bicarbonato/Oxido de magnésio (3/1) | 100             | -               | -                | -               | -               |

<sup>1</sup>Matéria natural; <sup>2</sup>Matéria seca (g/kg MN<sup>1</sup>); <sup>3</sup>Proteína bruta (g/kg MS); <sup>4</sup>Fibra insolúvel em detergente neutro (g/kg MS); <sup>5</sup>Matéria mineral (g/kg MS); <sup>6</sup>Extrato etéreo (g/kg MS).

Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado (DIC) 6x5 com 6 tratamentos e 5 repetições. Após o processamento foram formadas pilhas de 10kg (ensaio em baldes) de material para mistura dos ingredientes da ração e/ou, aplicação do inoculante LalSil AS (*Lactobacillus buchneri* CNCM I-4323; Lallemand Animal Nutrition) de acordo com as recomendações do fabricante. O inoculante foi diluído em 50 mL de água destilada e aplicado em pilhas individuais de 10 kg MN com borrifadores manuais, sendo aplicado o mesmo volume de água destilada no tratamento controle.

O material foi ensilado em baldes plásticos (Jaguar Embalagens®, Jaguariúna-SP, Brasil) de 10 L (25 cm diâmetro × 25 cm altura) previamente pesados (peso vazio) e compactado manualmente, adotando-se uma densidade  $\pm 650 \text{ kg MN m}^3$ . Os baldes foram vedados com fita adesiva 45 mm (3M-5802, Scotch®, Sumaré-SP, Brasil), pesados (peso cheio inicial) e armazenados a temperatura ambiente até o momento da abertura. Na Tabela 1 são mostrados a composição química e a população de microrganismos nos diferentes tratamentos, antes da ensilagem.

Tabela 3 – pH, populações microbianas (UFC/g) e Composição química dos tratamentos experimentais antes do processo de ensilagem.

| Itens                     | Tratamentos |       |        |        |        |        |
|---------------------------|-------------|-------|--------|--------|--------|--------|
|                           | Controle    | 20/80 | 40/60  | 60/40  | 80/20  | Lalsil |
| pH                        | 5,84        | 8,3   | 8,65   | 9,23   | 8,49   | 5,85   |
| BAL <sup>1</sup> UFC/g    | 4,82        | 6,05  | 5,20   | 4,60   | 5,00   | 4,88   |
| LEV <sup>2</sup> UFC/g    | 5,19        | 5,50  | 5,21   | 5,42   | 5,69   | 5,20   |
| ENT <sup>3</sup> UFC/g    | 3,39        | 4,08  | 4,05   | 3,51   | 4,43   | 4,44   |
| FUN <sup>4</sup> UFC/g    | 3,70        | 4,87  | 3,83   | 3,66   | 4,74   | 3,86   |
| MS <sup>5</sup> g/kg MN   | 332,1       | 645,0 | 519,9  | 497,4  | 380,4  | 323,7  |
| FDN <sup>6</sup> g/kg MS  | 419,16      | 206,6 | 241,18 | 338,06 | 332,55 | 399,8  |
| PB <sup>7</sup> g/kg MS   | 12,9        | 177,2 | 163,7  | 182,1  | 124,3  | 12,4   |
| CHOs <sup>8</sup> g/kg MS | 733,7       | 152,4 | 256,7  | 370,6  | 596,3  | 710,6  |

<sup>1</sup>Bactérias do ácido lático Unidades formadoras de colônia /g de forragem;

<sup>2</sup>Leveduras Unidades formadoras de colônia /g de forragem; <sup>3</sup>Enterobactérias Unidades formadoras de colônia /g de forragem; <sup>4</sup>Fungos filamentosos Unidades formadoras de colônia /g de forragem; <sup>5</sup>Matéria seca; <sup>6</sup>Fibra insolúvel em detergente neutro; <sup>7</sup>Proteína bruta; <sup>8</sup>Carboidratos solúveis.

### Populações microbianas, Perfil fermentativo e estabilidade aeróbia

Amostras de 25 g da planta e das silagens após 90 dias de fermentação foram homogeneizadas em 225 mL de solução de Ringer's solution estéril (Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) em liquidificador industrial (1 min). O extrato aquoso foi dividido em duas alíquotas: Uma alíquota foi usada para medição do pH, com potenciômetro digital (W38 / Tecnal®, São Paulo-SP, Brasil). Após, 20 mL do extrato aquoso foi filtrado e acidificado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:1 (armazenados a -20 °C) para posteriores análises das concentrações de carboidratos solúveis em água por método colorimétrico (Nelson, 1944), amônia, pelo método fenol-hipoclorito (Okuda et al., 1965) e ácidos orgânicos (ácido lático, ácido acético, ácido butírico, ácido propiônico, e etanol) (Siegfried et al., 1984).

A segunda alíquota do extrato aquoso foi usada para quantificação das populações de enterobactérias (ENT), bactérias lácticas (BAL), Leveduras (LEV) e fungos filamentosos (FUN). Foram realizadas diluições seriadas  $10^1$  a  $10^9$ . Em seguida, foi realizado o plaqueamento em placas de Petri estéreis (método pour-plate) em meios de cultura. Foi utilizado o MRS ágar (De Man, Rogosa & Sharpe, Merck®, Darmstadt, Alemanha) para o cultivo de BAL (37 °C / 48 h), VRB ágar (Violet Red Bile Agar, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) para o cultivo de ENT (37 °C / 24 h) e DRBC ágar (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol Base Agar, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) para cultivo de LEV (25 °C / 72 h) e de FUN (25 °C / 120 h). Para contagem das populações microbianas considerou-se o intervalo de ufc entre 25 a 250 (American Public Health Association, 2015).

Após 90 dias de ensilagem os bags foram abertos e pesados, uma amostra de 2 kg de silagem foi alocada em baldes plásticos de 10L que foram cobertos por uma camada de tecido de nylon para avaliação da EA. Os baldes foram armazenados em sala com temperatura ambiente constante ( $\pm 22$  °C), e no centro da massa da silagem foi inserido um data-logger (Cryopark iMINI™, Cryopark Company Inc., VA, USA) para mensuração da temperatura, a cada 10 min durante sete dias. Dois data-loggers foram distribuídos na sala para mensuração da temperatura ambiente. A EA 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 Junior et al., 2003).

## **Análises químicas**

As amostras da planta no dia da ensilagem, das silagens e de ingredientes foram submetidas à secagem parcial em estufa de circulação forçada de ar (55 °C / 72 h). 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 submetidas às análises de quantificação dos teores de matéria seca (MS, método 934,01), matéria orgânica (MO, método 972,43), matéria mineral (MM, método 942,05), proteína bruta (PB =  $N \times 6,25$ , método 984,13), extrato etéreo (EE, método 920,39) e fibra em detergente ácido (FDA, método 973,18) (AOAC, 1990). Também foram determinados os teores de fibra em detergente

neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), utilizando-se  $\alpha$ -amilase termoestável sem o uso de sulfito de sódio (Mertens, 2002), nitrogênio insolúvel em detergente ácido [(NIDA) (Licitra et al., 1996)], lignina [(LIG) (Gomes et al., 2011)] e proteína solúvel em tampão borato-fosfato (Licitra et al., 1996).

A concentração de N-NH<sub>3</sub> das silagens foi avaliada pelo método fenolhipoclorito (Okuda et al., 1965). Os ácidos orgânicos das silagens (lactato, acetato, propionato e butirato) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; SPD-10 AVP, Shimadzu®, Oregon, USA), com detector ultravioleta em 210 nm. A coluna utilizada foi C18 (fase reserva), e utilizado o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fase móvel, com fluxo de 1,5 mL min<sup>-1</sup>, pressão da coluna de 168 kgf e volume injetado de 20 µL (Siegfried et al., 1984).

#### **Análise estatística**

Os dados referentes às silagens nos baldes serão avaliados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 6 tratamentos e 4 repetições. Com base no seguinte modelo:

$$Y_{ik} = \mu + \alpha_i + e_{ik}$$

Onde:  $Y_{ik}$  = variável dependente,  $\mu$  = média geral,  $\alpha_i$  = efeito fixo da  $i$ -ésima silagem e  $e_{ik}$  = erro aleatório residual

Todos os outros dados serão submetidos a análise de variância, aplicando-se o teste Tukey-Kramer pelo LSMEANS statement ( $\alpha = 0,05$ ) para erro tipo 1, usando-se o pacote estatístico do SAS.

## **RESULTADOS**

Houve efeito para pH, N-NH<sub>3</sub> BAL e LEV UFC/g ( $p < 0,05$ ) após 90 dias de ensilagem (Tabela 4), os maiores valores de pH foram observados para as silagens de cana-de-açúcar TMRs na relação 20/80 (8,43), seguidos por 40/60 (4,38) e 80/20 (3,79), os menores valores de pH foram observados para as silagens Controle (3,25) e Lalsil (3,03). A população de BAL foi maior para as silagens TMRs comparadas as silagens Controle e Lalsil, exceto para a relação 20/80 (3,71 UFC/g). Foi observada maior população de LEV nas silagens 20/80 em comparação com 80/20 e Lalsil (4,77 vs 3,31 e 2,90 UFC/g). Foi observada a presença de ENT apenas nas

silagens 20/80 (3,82 UFC/g), enquanto que para as outras silagens a contagem ficou abaixo do nível de detecção. Não houve efeito ( $p>0,05$ ) para FUN com valores médios ao redor de 4,97 UFC/g.

Com relação a composição química (Tabela 4), foi observado efeito significativo ( $p<0,05$ ), com as silagens 20/80 apresentando maior teor de MS (607,95 g/kg), seguidas por 40/60 (465,35 g/kg), 60/40 (366,70 g/kg), 80/20 (302,92g/kg), Controle (229,72 g/kg) e Lalsil (215,32 g/kg), sendo que essas ultimas não diferiram entre si. As silagens controle apresentaram menor valor ( $p<0,05$ ) para MM (24,57 g/kg) em comparação com as silagens TMRs. Houve efeito para FDN ( $p<0,05$ ), as silagens Controle (677,07 g/kg) e Lalsil (655,70 g/kg) que apresentaram maior valor de FDN, seguidas por 80/20, 60/40 e 40/60 e 20/80, estas últimas não diferindo entre si. Houve efeito significativo ( $p<0,05$ ) para CHOs, onde as silagens TMRs na relação 20/80 apresentaram maior valores (97,33 g/kg) em relação às demais. Menores valores de PB ( $p<0,05$ ) foram observados para as silagens Controle 22,13 g/kg e Lalsil (24,69 g/kg) em comparação as silagens TMRs. As silagens Controle e Lalsil apresentaram maior valor ( $p<0,05$ ) de N-NH<sub>3</sub>/Ntotal que as silagens 40/60 e 60/40.

Tabela 4— pH, populações microbianas, composição química e N-NH<sub>3</sub> de silagens de cana-de-açúcar na forma de ração total em diferentes relações volumosas e concentrado após 90 dias de fermentação.

| Itens                     | Tratamentos |        |            |         |        |            | EPM   | p-valor |
|---------------------------|-------------|--------|------------|---------|--------|------------|-------|---------|
|                           | Controle    | 20/80  | 40/60      | 60/40   | 80/20  | Lalsil     |       |         |
| pH                        | 3,25D       | 8,43A  | 4,38B      | 4,00BC  | 3,79C  | 3,03D      | 0,473 | <0,0001 |
| BAL <sup>1</sup><br>UFC/g | 4,47B       | 3,71B  | 7,56A      | 7,08A   | 7,37A  | 4,50B      | 0,429 | <0,0001 |
| LEV <sup>2</sup><br>UFC/g | 4,02ABC     | 4,77A  | 4,59A<br>B | 3,92ABC | 3,31BC | 2,90C      | 0,188 | 0,0047  |
| ENT <sup>3</sup><br>UFC/g | <2,00       | 3,82   | <2,00      | <2,00   | <2,00  | <2,00      | -     | -       |
| FUN <sup>4</sup><br>UFC/g | 5,92        | 6,22   | 5,43       | 4,05    | 4,56   | 3,67       | 0,388 | 0,0650  |
| MS <sup>5</sup><br>g/kg   | 229,7E      | 607,9A | 465,3<br>B | 366,7C  | 302,9D | 215,3<br>E | 3,479 | <0,0001 |

|                                                 |         |             |             |         |             |            |       |         |
|-------------------------------------------------|---------|-------------|-------------|---------|-------------|------------|-------|---------|
| MM <sup>6</sup><br>g/kg                         | 24,5C   | 45,8AB      | 52,7A       | 54,5A   | 62,3A       | 26,5B<br>C | 0,406 | <0,0001 |
| FDN <sup>7</sup><br>g/kg                        | 677,07A | 172,6D      | 248,7<br>D  | 364,9C  | 470,2B      | 655,7<br>A | 4,780 | <0,0001 |
| PB <sup>8</sup> g/kg                            | 22,13B  | 137,89<br>A | 146,2<br>4A | 150,43A | 118,61<br>A | 24,69<br>B | 1,410 | <0,0001 |
| CHOs <sup>9</sup><br>g/kg                       | 38,30B  | 97,33A      | 22,75<br>B  | 26,65B  | 51,28B      | 45,43<br>B | 0,766 | 0,0001  |
| N-<br>NH <sub>3</sub> /Nto<br>tal <sup>10</sup> | 2,24A   | 1,41AB      | 1,04B       | 0,99B   | 1,47AB      | 2,19A      | 0,159 | 0,0016  |

<sup>1</sup>Bactérias do ácido lático Unidades formadoras de colônia/g de silagem; <sup>2</sup>Leveduras Unidades formadoras de colônia /g de silagem; <sup>3</sup>Enterobactérias Unidades formadoras de colônia /g de silagem; <sup>4</sup>Fungos filamentosos Unidades formadoras de colônia /g de silagem; <sup>5</sup>Matéria seca; <sup>6</sup>Matéria mineral; <sup>7</sup>Fibra insolúvel em detergente neutro; <sup>8</sup>Proteína bruta; <sup>9</sup>Carboidratos solúveis; <sup>10</sup>Nitrogênio amoniacal em relação ao % do nitrogênio total. EPM – Erro padrão da média; Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade (p<0,05)

Houve efeito significativo (p<0,05) para os ácidos lático, acético e propiônico (p<0,05). O tratamento 80/20 apresentou maior produção de AL (235,06g/kgMS) seguido por 40/60 (171,39g/kgMS) que foi superior a Lalsil, Controle, 20/80. O tratamento Lalsil apresentou maior produção de ácido acético (20,19g/kgMS) comparado à controle, 60/40, 40/60 e 20/80. A maior produção de ácido propiônico foi observado para o tratamento 80/20 que apresentou uma produção de 7,37g/kgMS, sendo superiores aos demais tratamentos, não havendo diferença entre eles.

Tabela 5 – AGVs (g/kgMS) de silagens de Cana-de-açúcar na forma de ração total em diferentes relações volumosos e concentrado.

| Itens           | Tratamentos |         |         |         |         |        |        | P-valor |
|-----------------|-------------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|---------|
|                 | Controle    | 20/80   | 40/60   | 60/40   | 80/20   | Lalsil | EPM    |         |
| AL <sup>1</sup> | 37,7C       | 29,4C   | 171,3B  | 201,3AB | 235,0A  | 76,3C  | 2,148  | <0,0001 |
| AA <sup>2</sup> | 10,76BC     | 3,87C   | 3,45C   | 7,30BC  | 14,28AB | 20,19A | 0,1762 | 0,0001  |
| AP <sup>3</sup> | 1,32B       | 0,0003B | 0,0488B | 1,92B   | 7,37A   | 1,27B  | 0,0669 | <0,0001 |

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>1</sup>Ácido láctico g/kgMS; <sup>2</sup>Ácido acético g/kgMS; <sup>3</sup>Ácido propiônico g/kgMS.

Após 7 dias de exposição ao ar foi observado maior valor ( $p<0,05$ ) de pH (Tabela 6) para as silagens 20/80 (7,49) comparado as demais silagens, além disso as silagens 40/60 apresentaram maior valor ( $p<0,05$ ) que Lalsil e Controle. (5,31 vs 3,10 e 3,04).

Não foi observado a presença de Fungos filamentosos em nenhuma das silagens. Houve diferença para a população de LEV ( $p<0,05$ ) onde foi observado que as silagens 40/60 apresentaram maior valor (8,07 UFC/g) que as demais silagens, exceto as silagens 60/40. Houve efeito significativo ( $p<0,05$ ) para MS e CHOs, as silagens 20/80 apresentaram maiores valores de MS, seguidas por 40/60, 60/40, 80/20, Controle e Lalsil que não diferiram entre si. O teor de CHOs foi maior para as silagens 20/80 (90,9 g/kg) e 40/60 (85,13 g/kg) em comparação com as demais silagens e não diferiram entre si.

Tabela 6 - pH, Leveduras, MS e Carboidratos solúveis de silagens de cana-de-açúcar na forma de ração total em diferentes relações volumosos e concentrado após 7 dias de exposição ao ar.

| Itens                     | Tratamentos |       |       |             |            |        |       | p-valor |
|---------------------------|-------------|-------|-------|-------------|------------|--------|-------|---------|
|                           | Controle    | 20/80 | 40/60 | 60/40       | 80/20      | Lalsil | EPM   |         |
| pH                        | 3,10CD      | 7,49A | 5,31B | 4,18BC<br>D | 4,31B<br>C | 3,04D  | 0,407 | <0,0001 |
| LEV <sup>1</sup><br>UFC/g | 4,72DC      | 4,12D | 8,07A | 7,31AB      | 6,25B<br>C | 4,21D  | 0,397 | <0,0001 |
| FUN <sup>2</sup><br>UFC/g | ND          | ND    | ND    | ND          | ND         | ND     | -     | -       |

|                          |         |        |         |         |             |             |       |         |
|--------------------------|---------|--------|---------|---------|-------------|-------------|-------|---------|
| MS <sup>3</sup><br>g/kg  | 223,40E | 580,9A | 451,33B | 348,13C | 290,30<br>D | 208,45<br>E | 3,325 | <0,0001 |
| CHO <sup>4</sup><br>g/kg | 24,1B   | 90,9A  | 85,1A   | 31,8B   | 25,2B       | 25,8B       | 0,864 | <0,0001 |

<sup>1</sup>Leveduras Unidades formadoras de colônia /g de silagem; <sup>2</sup>Fungos filamentosos Unidades formadoras de colônia/g de silagem; <sup>3</sup>Matéria seca; <sup>4</sup>Carboidratos solúveis. EPM – Erro padrão da média; Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade (p<0,05).

Foi observado efeito significativo (p<0,05) para estabilidade aeróbia, as silagens 60/40, apresentaram maior número de horas de estabilidade (147,6 horas) que as silagens 80/20, Controle e Lalsil (Figura 1).

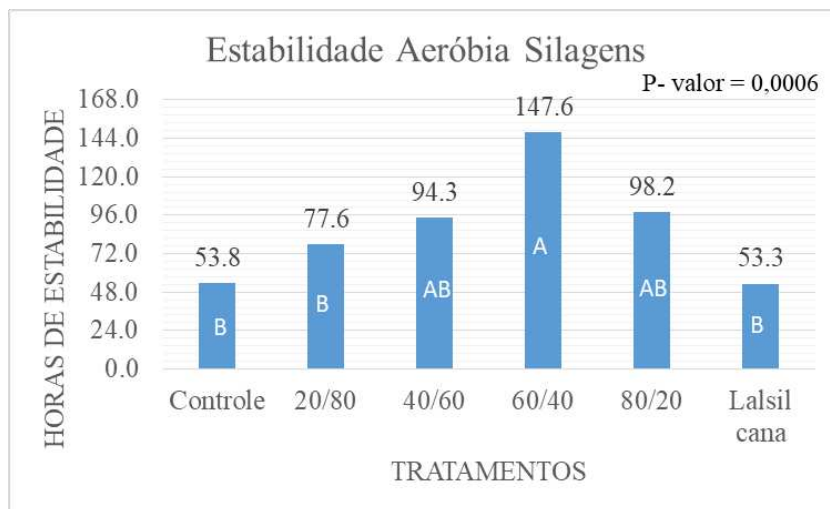


Figura 1 – Estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar na forma de ração total em diferentes relações volumosos e concentrado. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade (p<0,05)

Houve efeito significativo (p<0,05) para temperatura máxima e tempo até atingir a temperatura máxima, as silagens 60/40 apresentaram menor temperatura máxima que Lalsil (29,2 vs 38,0 °C), as silagens 40/60 (153,4 horas) e 60/40 (157,5 horas) apresentaram maior tempo até atingir a temperatura máxima que as silagens Controle e Lalsil.

Tabela 7 – Estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar na forma de ração total em diferentes relações volumosas e concentrado.

| Itens                                | Tratamentos |          |        |        |             |            | EPM        | p-valor |
|--------------------------------------|-------------|----------|--------|--------|-------------|------------|------------|---------|
|                                      | Controle    | 20/80    | 40/60  | 60/40  | 80/20       | Lalsi<br>1 |            |         |
| Tempo de Estabilidade e Aeróbia      | 53,8B       | 77,6B    | 94,3AB | 147,6A | 98,2AB      | 53,3<br>B  | 10,01<br>5 | 0,0006  |
| Temperatura Máxima                   | 37,4AB      | 30,5AB   | 35,9AB | 29,2B  | 34,2AB      | 38,0<br>A  | 1,152      | 0,0140  |
| Tempo até atingir Temperatura Máxima | 78,4BC      | 119,6ABC | 153,4A | 157,5A | 131,3A<br>B | 74,5<br>C  | 10,10<br>5 | 0,0003  |

EPM – Erro padrão da média; Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

As variações nos teores de MS, MM, PB, FDN e CHOs das silagens após 90 dias de fermentação podem ser consideradas normais, uma vez que a inclusão de concentrado e seus ingredientes influenciam a composição química das silagens, o que explica o maior teor de MS naquelas silagens TMR com maior inclusão de concentrado, bem como de MM, devido à inclusão do núcleo mineral nessas silagens. Em contrapartida, os teores de FDN foram menores.

A presença de ENT apenas na silagem TMR na relação 20/80, provavelmente se deve ao alto pH (8,43) dessa silagem, o que pode ter favorecido a presença de grupos indesejáveis nessas silagens, principalmente enterobactérias, pois segundo Woolford (1984) pH superiores a 5,5, favorece o crescimento de grupos microbianos como Clostrídios e Enterobactérias. Em contrapartida Kung Junior et al, (2015) sugere o desaparecimento de enterobactérias em pH abaixo de 4,5, devido à predominância de bactérias lácticas que competem com esse grupo logo

após a vedação do silo, a utilização dos açúcares disponíveis no meio e acidificação da massa ensilada através da produção do ácido lático, favorecem a redução do pH.

Os menores valores de pH observado para as silagens Controle e Lalsil, podem ser explicados pela maior quantidade de carboidratos solúveis, em média, 722,15 g/kg, com base da MS, que foram utilizados durante o período de fermentação, principalmente por bactérias. Por outro lado, as demais silagens TMRs apresentaram valores próximos a 4,0, indicativo de boa fermentação, como preconizado por McDonald et al. (1991).

As menores populações de BAL das silagens controle, Lalsil e 20/80, podem estar relacionadas com a intensidade e extensão de fermentação, pois é comum observar redução da atividade da água com a inclusão do concentrado e consequente aumento da MS nas silagens TMRs (Gusmão et al., 2018), podendo afetar a fermentação. Bueno et al. (2020), em sua revisão destaca que o aumento dos níveis de umidade em silagens TMRs através da maior inclusão de volumoso em relação ao concentrado, contribui para um maior acúmulo de produtos finais de fermentação, maior intensidade de fermentação e proteólise. Isso pode justificar a maior quantidade de BAL nessas silagens.

A menor população de LEV nas silagens inoculadas com Lalsil, provavelmente se deve a presença de *Lentilactobacillus buchneri* que além do ácido lático, produz ácido acético, responsável pela inibição principalmente de leveduras, conforme reportado em outros estudos com silagem de cana-de-açúcar (Ávila et al., 2009; Silva et al., 2018; Rabelo et al., 2019)

Embora tenha sido observado maiores valores de  $N-NH_3/\%N_{total}$  para as silagens de cana-de-açúcar controle e Lalsil comparadas às 40/60 e 60/40, todas as silagens apresentaram valores de  $N-NH_3$ , abaixo dos 10%, indicando baixa proteólise conforme preconizado por Mahanna (2003). Por outro lado, o maior teor de CHOs residuais observados para a silagem 20/80, pode ser atribuído à uma menor utilização destes para produção de ácido lático, já que o pH observado também foi maior para essas silagens.

A maior produção de ácido acético na silagem inoculada com Lalsil, comparada à controle, pode explicar a menor contagem de leveduras dessa silagem, comparada à silagem 20/80. No entanto, no momento da abertura, após exposição ao ar os carboidratos solúveis residuais e o ácido lático produzido, são usados como substratos de rotas metabólicas de microrganismos indesejáveis, incluindo mofo e leveduras, comprometendo a estabilidade aeróbia da silagem (Weib et al., 2022).

Tian et al. (2023) estudando o efeito de três diferentes umidades em silagens TMRs armazenadas em diferentes temperaturas, observaram relação positiva entre o efeito de umidade para o ácido acético entre as TMRs avaliadas (4,7 vs 5,9 vs 7,3g/kg), onde a concentração de ácido acético aumentou, sendo influenciado pela umidade presente na silagem, em todas as faixas de temperatura.

Os carboidratos solúveis remanescentes do processo de fermentação podem promover perdas em silagens de cana-de-açúcar, pois esses carboidratos podem ser utilizados na fase aeróbia, principalmente por leveduras, proporcionando perdas principalmente por etanol (Avila et al., 2014). Entretanto, a presença de leveduras com contagens superiores a  $10^6$  UFC/g, podem apresentar silagens com alta estabilidade aeróbia (Nishino et al., 2004), embora contagens acima de  $10^5$  UFC/g de leveduras tornem as silagens sujeitas a deterioração aeróbia (Mcdonald et al., 1991). Esse fato é válido para silagens de milho, entretanto não servem para silagens TMRs.

A maior estabilidade aeróbia da silagem 60/40, comparada às silagens controle, 20/80 e LalSil parece não está relacionada à contagem de LEV no momento da abertura dos silos, cuja população desse grupo foi inferior a  $10^5$  UFC/g de leveduras, em todas as silagens avaliadas, tampouco após a exposição aeróbia. Outro aspecto, é que a silagem tratada com inoculante, apesar de ter apresentado maior produção de ácido acético comparada ao controle, não refletiu em maior estabilidade aeróbia da silagem. Portanto, é possível que outros fatores possam contribuir para favorecer a maior estabilidade aeróbia nas silagens de TMR.

Destaca-se, que houve baixa variação no teor de MS das silagens TMRs entre o momento da abertura e após os 7 dias de exposição ao ar, indicando que as perdas de MS foram mínimas. Tian et al. (2020) estudando o efeito do carbonato de cálcio em silagens de alfafa com dois teores de MS (375 e 234g/kg), verificaram que silagens com menores teores de umidade apresentam menor estabilidade mesmo sob o efeito do carbonato de cálcio.

A redução do teor de MS das silagens contendo apenas a cana-de-açúcar, inoculada ou não com *L. buchneri*, está relacionada com a produção de etanol, ácidos e outros produtos voláteis de fermentação (Daniel et al., 2013). Rabelo et al., (2019) em estudo de meta-análise realizada com cana-de-açúcar, também não observaram efeito da inoculação com *L. buchneri* sobre a estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar. Os autores justificaram que a preservação dos carboidratos solúveis durante o período de conservação pode ser uma das explicações para a perda da estabilidade após a exposição ao ar.

Weinberg et al. (2011), ao estudar silagens TMRs com teores de MS próximos à 50% e 60% comparando com as TMRs *in natura*, observaram que a ligeira diferença na umidade e atividade da água inalterou a estabilidade aeróbia das silagens. As silagens TMRs apresentaram melhor estabilidade aeróbia em comparação com a TMR *in natura*.

O pH foi maior para as silagens 20/80 após 7 dias de exposição. Entretanto, de maneira similar, apesar da maior quantidade de CHOs residuais observado para esse tratamento não houve aumento da população de LEV após os 7 dias de exposição ao ar. Isso possivelmente se deve à redução da atividade da água dessa silagem (Zanine et al., 2022). Por conter alta proporção de ingredientes concentrados e menor teor de umidade, isso pode ter influenciado na fermentação e produção de ácido lático, interferindo no crescimento também de leveduras mesmo após exposição do material ao ar (Seppälä, 2020).

## **CONCLUSÕES**

O inoculante microbiano reduziu a população de leveduras após 90 dias de ensilagem. Entretanto não propiciou melhorias na estabilidade aeróbia da silagem de cana-de-açúcar. No entanto, a cana-de-açúcar quando ensilada na forma de TMR, especialmente aquela com relação volumoso:concentrado de 60/40, na base da MS, proporciona estabilidade aeróbia mais alta, que as silagens exclusivas de cana-de-açúcar.

## **Agradecimentos**

Os autores externam seus agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ciência Animal (INCT-CA) por todo o apoio e suporte financeiro.

## **Conflito de interesse**

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

- Ávila, C. L. S., Pinto, J. C., Figueiredo, H. C. P, et al. (2009). Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass and Forage Science**, v. 64, n. 4, p. 384-394.
- AOAC. (1990). Official methods of analysis of the AOAC, 15th ed. Methods 932.06, 925.09, 985.29, 923.03.
- Bueno, A. V. I., Lazzari, G., Jobim, C. C., & Daniel, J. L. P. Ensiling total mixed ration for ruminants: A review. **Agronomy**, v. 10, n. 6, p. 879, 2020.
- Cavali, J., Pereira, O. G., Valadares Filho, S. D. C., et al, (2010). Bromatological and microbiological characteristics of sugarcane silages treated with calcium oxide. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39, 1398-1408.
- Chen, L.; Guo, G.; Yuan, X at al., (2015). Effects of applying molasses, lactic acid bacteria and propionic acid on fermentation quality, aerobic stability and in vitro gas production of total mixed ration silage prepared with oat-common vetch intercrop on the Tibetan Plateau. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 96, 1678–1685.
- Chelius, M.K., Triplett, E.W. (2001). The diversity of Archaea and Bacteria in: association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology** 41 (3), 252–263.
- Daniel, J. L. P., K. Weiss, L. Custodio, A. et al, (2013). Occurrence of volatile organic compounds in sugarcane silages. **Animal Feed Science and Technology**. 185:101–105.
- Detmann, E., Souza, M.A., Valadares Filho, S.C. et al. 2012. **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco: Universidade Federal de Viçosa, 214 p.
- Fernandes, J; Silva, E.B; Carvalho-estrada, C.A; et al. (2021). Influence of hybrid, moisture, and length of storage on the fermentation profile and starch digestibility of corn grain silages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 271, p. 114707,
- Ferraretto, L. F.; Silva Filho, W. I., Fernandes, T. et al. (2018). Effect of ensiling time on fermentation profile and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated corn with or without varied concentrations of wet brewers grains. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 5, p. 4643-4649.

- Gusmão, J. O., Danes, M. A. C., Casagrande, D. R., & Bernardes, T. F. (2018). Total mixed ration silage containing elephant grass for small-scale dairy farms. **Grass and Forage Science**, v. 73, n. 3, p. 717-726.
- Kung Junior, L., Lim, J. M., Hudson, D. J., Smith, J. M., & Joerger, R. D. (2015). Chemical composition and nutritive value of corn silage harvested in the northeastern United States after Tropical Storm Irene. **Journal of Dairy Science**, 98(3), 2055–2062. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8621>
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M.(Eds.), **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, John Wiley, New York, pp. 115–176.
- McDonald, P., A. R. Henderson, and S. J. E. Heron. (1991). **The Biochemistry of Silage**. Chalcombe Publications, Welton, Lincoln, UK.
- Miyaji, M; Matsuyama, H; Nonaka, K. (2017). Effect of ensiling process of total mixed ration on fermentation profile, nutrient loss and in situ ruminal degradation characteristics of diet. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 1, p. 134-139.
- Moon, Nancy J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 453-460, 1983.
- Muck, Richard E. (2010). Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 183-191.
- Nelson, N. A (1944). Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.** 153:375–380.
- Nishino, N., Wada, H., Yoshida, M., & Shiota, H. (2004). Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. **Journal of dairy science**, 87(8), 2563-2570.
- Nishino, N.; Hattori, H. (2007). Resistance to aerobic deterioration of total mixed ration silage inoculated with and without homofermentative or heterofermentative lactic acid bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture.**, 87, 2420–2426.
- Okuda, H., Fujii, S., Kawashima, Y., (1965). A direct colorimetric determination of blood ammonia. *Tokushima J. Exp. Med.* 12, 11–23.

- Pedroso, A. D. F., Nussio, L. G., Paziani, S. D. F., Loures, D. R. S., Igarasi, M. S., Coelho, R. M., ... & Gomes, L. H. (2005). Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. **Scientia Agricola**, 62, 427-432.
- Rabelo, C. H. S., Härter, C. J., Ávila, C. L. D. S., & Reis, R. A. (2019). Meta-analysis of the effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, chemical composition and aerobic stability of sugarcane silage. **Grassland Science**, 65(1), 3-12.
- Santos, F. N. S., Santos, E. M., Oliveira, J. S., et al. 2020. Fermentation profile, microbial populations, taxonomic diversity and aerobic stability of total mixed ration silages based on Cactus and Gliricidia. **The Journal of Agricultural Science**, v. 158, n. 5, p. 396-405,
- Schingoethe, David J. (2017). A 100-Year Review: Total mixed ration feeding of dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 12, p. 10143-10150,
- Seppälä, A. (2020). Controlling aerobic stability of silage based total mixed rations: **Doctoral Dissertation**.
- Siegriffield, V.R., H. Ruckemann and G. Stumpf. (1984). Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. **Landwirtsch Forsch.** 37:298-304.
- Silva, L. D., Pereira, O. G., Silva, T. C., et al. (2018). Effects of *Lactobacillus buchneri* isolated from tropical maize silage on fermentation and aerobic stability of maize and sugarcane silages. **Grass and Forage Science**, v. 73, n. 3, p. 660-670.
- Tian, P., Vyas, D., Niu, D., Zuo, S., Jiang, D., & Xu, C. (2020). Effects of calcium carbonate on the fermentation quality and aerobic stability of total mixed ration silage. **Animal Feed Science** 29, 167-174.
- Tian, P., Hu, H., Zhang, X., Chen, M., & Wang, X. (2023). Effects of Temperature and Moisture Levels on Vitamin A in Total Mixed Ration Silage. **Fermentation**, 9(7), 614.
- Zanine, A., Portela, Y., Ferreira, D., et al. (2022). Babassu Byproducts in Total Mixed Ration Silage Based on Sugarcane for Small Ruminants Diets. **Agronomy**, v. 12, n. 7, p. 1641.
- Wang, H. Hao, W., Ning, T. et al. (2018). Characterization of culturable yeast species associating with whole crop corn and total mixed ration silage. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 31, n. 2, p. 198.
- Wang, F.; Nishino, N. (2007) Resistance to aerobic deterioration of total mixed ration silage: Effect of ration formulation, air infiltration and storage period on fermentation

- characteristics and aerobic stability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 88, 133–140.
- Weiß, Kirsten; Kroschewski, Bärbel; Auerbach, Horst Uwe. (2022). The influence of delayed sealing and repeated air ingress during the storage of maize silage on fermentation patterns, yeast development and aerobic stability. **Fermentation**, v. 8, n. 2, p. 48.
- Weinberg, Z. G., Chen, Y., Miron, D., et al, (2011). Preservation of total mixed rations for dairy cows in bales wrapped with polyethylene stretch film – A commercial scale experiment. **Animal Feed Science and Technology**, 164(1-2), 125–129. doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.11
- Woolford, M. K. (1984). **The silage fermentation**. Marcel Dekker, Inc..

## CONCLUSÕES GERAIS

A aplicação de 10g/kg de óxido de cálcio promoveu uma melhor preservação de matéria seca e carboidratos solúveis, reduzindo o teor de FDNcp das silagens de cana-de-açúcar, além de propiciar melhorias na digestibilidade in situ da MS com aumento da fração solúvel da MS e da MO, uma maior digestibilidade in vivo da MS, FDN, CNF e NDT sem alterações no consumo animal. Recomenda-se a aplicação de 10g/kg de óxido de cálcio em silagens de cana-de-açúcar.

A adição do inoculante microbiano utilizado aumentou a população de bactérias lácticas e reduz a população de leveduras em silagens de milho após 90 dias de fermentação, sem proporcionar melhorias na estabilidade aeróbia após exposição ao ar. Não se faz necessário a aplicação de inoculante em silagens TMRs de milho, tendo as silagens apresentado alta estabilidade aeróbia com menores perdas de MS e preservação de carboidratos solúveis, com

solubilidade do amido. No ensaio com bovinos a silagem TMR de milho apresentou maior digestibilidade de MS e nutrientes, principalmente CNF incluindo o amido. A aplicação do inoculante aumentou a abundância relativa do gênero *Lactobacillaceae* e as silagens TMRs tiveram aumento na abundância relativa principalmente na população de *Weissella* e *Lactiplantibacillus*. Mediante os aspectos abordados, indica-se a silagem de ração total de milho sem adição do inoculante microbiano, além de propiciar melhorias a silagem, também facilita a logística operacional de fornecimento diário da ração para os animais, tendo em vista a ausência da necessidade da mistura dos ingredientes após o fornecimento.

O inoculante microbiano utilizado, apesar de reduzir a população de leveduras após 90 dias de ensilagem, não propiciou melhorias na estabilidade aeróbia da silagem de cana, as silagens TMRs na proporção 40/60, 60/40 e 80/20, apresentaram uma maior estabilidade aeróbia, demandando maior tempo para aquecimento e resistência a deterioração. Portanto recomenda-se a ensilagem de cana-de-açúcar na forma de ração mista total de cana-de-açúcar com inclusão de até 60% de concentrado.