



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
BR 222, Km 04, Bairro Boa Vista, Chapadinha – MA
Telefone (98) 3272-9902 E-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>

LUANA MILENA PINHEIRO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA, FERMENTAÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA,
ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE SORGO E DE RAÇÃO TOTAL
ADITIVADAS COM ADITIVOS QUÍMICO E MICROBIANOS**

Chapadinha – MA, Brasil

2025



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
BR 222, Km 04, Bairro Boa Vista, Chapadinha – MA
Telefone (98) 3272-9902 E-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>

LUANA MILENA PINHEIRO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA, FERMENTAÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA,
ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE SORGO E DE RAÇÃO TOTAL
ADITIVADAS COM ADITIVOS QUÍMICO E MICROBIANOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre, sob a orientação do Prof. Dr. Anderson de
Moura Zanine e coorientação da Profa. Dra. Daniele de
Jesus Ferreira e do Dr. Alberto Jefferson da Silva Macêdo

Área de concentração: Produção e Avaliação de Plantas
Forrageiras e Conservação de Forragens

Chapadinha – MA, Brasil

2025

Pinheiro Rodrigues, Luana Milena.

AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA, FERMENTAÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE SORGO E DE RAÇÃO TOTAL ADITIVADAS COM ADITIVOS QUÍMICO E MICROBIANOS / Luana Milena Pinheiro Rodrigues. - 2025.

108 f.

Coorientador(a) 1: Alberto Jefferson da Silva Macêdo.

Coorientador(a) 2: Daniele de Jesus Ferreira.

Orientador(a): Anderson de Moura Zanine.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal/ccch, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, Maranhão, 2025.

1. Estacionalidade Climática. 2. Fermentação. 3. Microbiota. 4. Metataxonômica. I. da Silva Macêdo, Alberto Jefferson. II. de Jesus Ferreira, Daniele. III.

LUANA MILENA PINHEIRO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA, FERMENTAÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA,
ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE SORGO E DE RAÇÃO TOTAL
ADITIVADAS COM ADITIVOS QUÍMICO E MICROBIANOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal.

Data de aprovação: 30 de janeiro de 2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anderson de Moura Zanine (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Daniele de Jesus Ferreira (Coorientadora interna)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Edson Mauro Santos
Universidade Federal da Paraíba

Dr. Arlan Araújo Rodrigues
Department of Animal & Dairy Science, University of Wisconsin-Madison

Dr. Mateus Lacerda Pereira Lemos
Universidade Federal do Maranhão

Confia no Senhor de todo o teu coração e não te estribes no teu próprio entendimento. Reconhece-o em todos os teus caminhos, e Ele endireitará as tuas veredas. **Provérbios 3: 5-6**

A Deus, pela vida, pelas bênçãos concedidas e pela força que me sustenta;

Aos meus familiares Raimundo Rodrigues, Maria Lúcia, Maria da Conceição, Leide Mila Rodrigues, Lurdimila Rodrigues, Liz Pinheiro e Socorro Serrão, por serem minha fortaleza, meu alicerce e a fonte de amor que me inspira a conquistar cada objetivo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser minha fonte de sabedoria, força e serenidade.

À minha família, que sempre foi meu porto seguro, meu alicerce de amor e apoio. Agradeço imensamente a Raimundo Pereiro Rodrigues, Maria Lúcia Coelho Pinheiro, Maria da Conceição Rodrigues, Leide Mila Rodrigues, Lurdimila Pinheiro Rodrigues, Liz Pinheiro e Socorro Serrão por estarem ao meu lado em cada passo dessa caminhada. O que conquistei é também fruto do carinho e dedicação de cada um de vocês.

Em especial ao meu pai, Raimundo Pereira Rodrigues, que com sua força, valores e exemplo, me inspira a nunca desistir, mesmo diante das dificuldades. Este trabalho é também um reflexo do legado que você continua a construir comigo, todos os dias.

À minha avó paterna, Raimunda Pereira (*in memoriam*) e ao meu avô materno, Raimundo Pinheiro (*in memoriam*), deixo minha eterna gratidão.

À Universidade Federal do Maranhão e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), meu sincero agradecimento por ser espaço que proporcionou meu crescimento profissional e pessoal. A infraestrutura, os recursos e a oportunidade de aprendizado foram fundamentais para minha formação.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e ao Laboratório de Forragicultura, pela infraestrutura disponibilizada para a execução dos experimentos.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ-PB), termo de outorga 2396/2023.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, tornando possível a realização da minha formação.

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

Ao Instituto Nacional do Semiárido (INSA), pelo suporte nas análises laboratoriais que viabilizaram a execução deste experimento. Em especial, agradeço a Iara Tamires Rodrigues Cavalcante e Romildo pela colaboração e apoio durante esse processo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Anderson de Moura Zanine, expresso minha sincera gratidão pela orientação e confiança. Sua sabedoria e dedicação foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, e sou profundamente grata pela oportunidade de aprender com sua experiência, que foi decisiva para o sucesso desta jornada.

À minha coorientadora interna, Profa. Dra. Daniele de Jesus Ferreira, sou imensamente grata pelos ensinamentos valiosos e pela orientação cuidadosa, especialmente nas análises

laboratoriais. Seu incentivo foi fundamental para que eu buscasse sempre mais conhecimento, superando desafios e aprimorando minhas habilidades.

Ao meu coorientador externo, Dr. Alberto Jefferson da Silva Macêdo, minha mais profunda gratidão pelo apoio incansável em todas as fases deste trabalho. Desde o início do experimento até a finalização, sua orientação foi essencial. Sua paciência, comprometimento e orientação me permitiram superar obstáculos, aprimorar o trabalho e alcançar resultados mais consistentes.

Aos professores e idealizadores desses projetos, Prof. Dr. Edson Mauro Santos e Profa. Dra. Juliana Silva de Oliveira, minha mais profunda gratidão. Além da competência que demonstram como profissionais, vocês me receberam com generosidade e cuidado, tornando o ambiente de trabalho não apenas produtivo, mas também acolhedor. A liderança de vocês no desenvolvimento e execução dos projetos foi crucial para o sucesso das pesquisas, e sou extremamente grata pela oportunidade.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Edson Mauro Santos, Prof. Daniele de Jesus Ferreira, Dr. Alberto Jefferson da Silva, Dr. Alan Araújo Rodrigues e Dr. Mateus Lacerda Pereira Lemos, pelas valiosas contribuições e sugestões que aprimoraram este trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisa em Produção e Conservação de Forragem, ao Grupo de Estudos em Produção de Ruminantes no Maranhão (GEPRUMA) e ao Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA) da UFMA, pela oportunidade de aprender e crescer ao lado de profissionais dedicados e inspiradores.

Ao Grupo de Estudos em Forragicultura (GEF), aos coordenadores Edson Mauro Santos e Juliana Silva de Oliveira pela orientação e acolhimento, e a todos os membros – Alberto Jefferson da Silva Macêdo, Guilherme Medeiros Leite, Liliane Pereira Santana, Luana da Silva Cordeiro, Bruna dos Santos Souza, Paloma Gabriela Batista Gomes, Vanessa Maria Rodrigues de Lima, Thácylla Beatriz Duarte Correia Gomes, Rubens Olegário da Silva Araújo, Bruno Rocha de Moura, Paulo da Cunha Tôrres Junior, Evandro de Sousa da Silva, Santiago Alves de Oliveira, Arthur Herculano Araújo, Anderson Lopes Pereira, e a todos os colaboradores atuais. A colaboração de cada um de vocês foi essencial para o sucesso deste trabalho, e sou muito grata pela parceria e contribuições valiosas ao longo de toda a jornada.

Aos doutores e pesquisadores Francisco Naysson de Sousa Santos, Danillo Marte Pereira, Fleming Sena Campos e Glayciane Costa Gois, pelo apoio contínuo e pelas valiosas contribuições ao longo desta jornada. Foi um privilégio aprender com profissionais exemplares como vocês. Em especial, a Francisco Naysson de Sousa Santos, pela sua energia positiva e disposição em ajudar, sempre com sorriso e palavra amiga. Sua presença tornou os momentos mais leves e agradáveis.

Ao Dr. Mateus Lacerda Pereira Lemos, pela condução da análise metagenômica, bem como pelo auxílio e paciência ao esclarecer pontos fundamentais e relevantes dessa etapa, contribuindo de forma significativa para este trabalho.

À casa rosa – Liliane Pereira Santana, Luana da Silva Cordeiro, Natália Costa de Araújo Arruda, Arthur Herculano Araújo, Maria Eunice Cabral, Gabriel Ravy, Luana Maria Lopes e Odin – por me receberem com tanto carinho e hospitalidade. Durante minha estadia na Paraíba, vocês me proporcionaram não apenas um lar, mas também um ambiente de amizade, apoio e acolhimento incondicional, pelo qual sou profundamente grata.

Aos discentes de Iniciação Científica da UFMA – George de Sousa Lima Paiva, Júlia Bianca Araújo Marinho, Diego Henrique Alves de Sousa, Victorya Maria Ferreira Martins e Felype Isac Meireles Boaventura – pela colaboração e pelo compartilhamento de saberes. Foi uma experiência enriquecedora trabalhar com cada um de vocês, e sou imensamente grata pelas contribuições feitas ao longo deste processo.

Aos mestres e mestrandos - Renata Sousa Costa, Francisca Cláudia da Silva de Sousa, Carlos Rodolfo do Nascimento Castro, Jéssica Maria de Sousa Oliveira, Gildeane Aquino Araujo Castelo Branco, Juscelino da Silva Castelo Branco e Tomaz de Melo Neto – pelo acolhimento em Chapadinha e na UFMA. Admiro imensamente cada um de vocês, tanto pela dedicação quanto pela generosidade, e sou grata por ter compartilhado este percurso ao lado de pessoas especiais.

Ao Guilherme Medeiros Leite, minha sincera gratidão pelo apoio fundamental nas análises laboratoriais. Sua paciência, dedicação e generosidade em compartilhar seu conhecimento foram cruciais para o sucesso deste projeto. Agradeço por ter me ensinado e por tornar o processo de aprendizado mais leve e enriquecedor. Desejo-lhe muito sucesso em sua trajetória profissional.

À Carolaine Silva Martins Carvalho, Yara Lima de Souza e Claudia Cristina Paiva Coutinho, por todo o carinho e apoio que tornaram minha jornada em Chapadinha mais leve. Cada desafio foi suavizado pela presença de vocês, e os momentos ao lado de cada uma se tornaram inesquecíveis. As tardes de café e as risadas compartilhadas são lembranças que guardo com muito afeto e que aqueceram meu coração.

À Luana da Silva Cordeiro, Bruna dos Santos Souza e Valquiria Sousa Lima, por todo carinho, apoio e momentos de cumplicidade compartilhados. Vocês tornaram minha jornada mais leve e significativa, com risadas, conversas e momentos de alegria que, sem dúvida, enriqueceram esta fase da minha vida.

Aos amigos externos, Rayssa Sthephanny Barros Ribeiro, Maria da Cruz Sabrina Cavalcante e Silva, Vanessa Nathalia Tavares Pereira, Ravana de Sousa Gomes, Dinaian Mariana Lima Campos, Laila Caroline Lima Cantanhede, Gleycy Kelly Moraes Santos Saldanha, Gleyce

Kelle Guimarães dos Santos, Ana Beatriz Reis Santos, Brenda Louise da Silva Martins, Arthur Mauricio Saraiva Silva, Raimundo Nonato da Conceição de Lima e Edjanio Gaspar Patrício, pelo apoio constante e amizade que me acompanharam, antes e durante essa jornada acadêmica. A presença de cada um de vocês tem sido uma verdadeira fonte de força, carinho e inspiração. Sou eternamente grata pelo amor genuíno e pelas risadas compartilhadas.

Aos meus orientadores da graduação, Prof. Dr. Geraldo Fábio Viana Bayão e Profa. Dra. Rejeana Márcia Lima Silva, pelos ensinamentos, incentivo e por acreditarem no meu potencial.

À Maria Nalu Soares e ao José Carlos Félix, pelo apoio constante desde o início da minha trajetória. O estágio realizado em sua fazenda e empresa foi um dos primeiros passos importantes e decisivos na minha formação, e desde então, continuo contando com seus valiosos conselhos e acolhimento. O carinho e a dedicação de vocês sempre foram essenciais para meu crescimento pessoal e profissional.

A todos vocês, meu sincero carinho, respeito e gratidão.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1 Cultura do sorgo	26
2.2 Silagem de Sorgo.....	28
2.3 Ração em mistura total (TMR).....	29
2.4 Utilização de aditivos em silagens.....	30
2.4.1 Inoculantes microbianos	30
2.4.2 Aditivos químicos.....	32
2.5 Diversidade microbiana.....	33
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO I.....	42
Sucessão microbiana das comunidades bacterianas e fúngicas, perfil fermentativo, estabilidade aeróbia e perdas de matéria seca em silagem de sorgo inoculada com <i>Lentilactobacillus buchneri</i> isoladamente ou em combinação com <i>Lentilactobacillus hilgardii</i> em diferentes períodos de ensilagem	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT	44
1 INTRODUÇÃO.....	45
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1 Local experimental, implantação e manejo do sorgo forrageiro	47
2.2 Delineamento experimental, colheita e ensilagem	47
2.3 Coleta e preparo das amostras	48
2.4 Perfil fermentativo e perdas de matéria seca	49
2.5 Quantificação de populações microbianas e ácidos orgânicos	50
2.6 Composição química	50
2.7 Estabilidade aeróbia.....	51
2.8 Diversidade microbiana.....	51
2.8.1 Extração de DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA	51

2.8.2 Análise da comunidade bacteriana baseada no gene marcador 16S rRNA	51
2.9 Análises estatísticas	52
3 RESULTADOS	53
3.1 Perfil fermentativo e perdas de matéria seca	53
3.2 Populações microbianas e ácidos orgânicos	54
3.3 Composição química	57
3.4 Estabilidade aeróbia.....	58
3.5 Diversidade microbiana	59
4 DISCUSSÃO	72
5 CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS	76
CAPÍTULO II.....	84
Efeitos da adição de um aditivo químico sobre silagens de ração em mistura total base de sorgo forrageiro	84
RESUMO.....	85
ABSTRACT	86
1 INTRODUÇÃO.....	87
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	88
2.1 Local experimental, implantação e manejo do sorgo forrageiro	88
2.2 Delineamento experimental, colheita e ensilagem	89
2.3 Coleta e preparo das amostras	90
2.4 Perfil fermentativo e perdas de matéria seca	91
2.5 Populações microbianas e ácidos orgânicos	91
2.6 Composição química	92
2.7 Estabilidade aeróbia.....	92
2.8 Análises estatísticas	93
3 RESULTADOS	93

4 DISCUSSÃO.....	99
5 CONCLUSÃO.....	103
REFERÊNCIAS	103

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AA	-	Ácido acético
AB	-	Ácido butírico
AL	-	Ácido láctico
AP	-	Ácido propiônico
BAL	-	Bactérias ácido lácticas
CHOs	-	Carboidratos solúveis em água
CT	-	Capacidade tampão
Control	-	Controle
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
EA	-	Estabilidade aeróbia
EE	-	Extrato etéreo
FDA	-	Fibra em detergente ácido
FDN	-	Fibra em detergente neutro
FUN	-	Fungos filamentosos
G	-	Grama
Há	-	Hectare
LB	-	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>
LEV	-	Leveduras
LH	-	<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>
Kg	-	Quilograma
Mbp	-	Megapares de bases
MM	-	Matéria mineral
MN	-	Matéria natural
MO	-	Matéria orgânica
MS	-	Matéria seca
N-NH ₃	-	Nitrogênio amoniacal
NDT	-	Nutrientes digestíveis totais
Pb	-	Pares de bases
PB	-	Proteína bruta
PF	-	Período de fermentação
pH	-	Potencial hidrogeniônico

UFC - Unidades formadoras de colônias
T - Tonelada
TMR - Ração em mistura total

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	-	Graus Celsius
±	-	Mais ou menos
%	-	Porcentagem
®	-	Marca registrada

LISTA DE TABELAS

Capítulo I: Sucessão da microbiota bacteriana e fúngica da silagem de sorgo, aditivada com *Lentilactobacillus buchneri*, ou combinado com *Lentilactobacillus hilgardii* durante a fermentação e estabilidade aeróbia em vários tempos de abertura

Tabela 1. Composição química e populações microbianas do sorgo forrageiro BRS Ponta Negra com aplicação de aditivos microbianos antes da ensilagem 48

Tabela 2. Perfil fermentativo e perdas de matéria seca das silagens à base de sorgo forrageiro inoculadas com *Lentilactobacillus buchneri* e *Lentilactobacillus hilgardii* armazenadas durante 20, 60 e 100 dias 54

Tabela 3. Quantificação das populações microbianas de bactérias ácido lácticas, leveduras e de fungos filamentosos das silagens à base de sorgo forrageiro inoculadas com *Lentilactobacillus buchneri* e *Lentilactobacillus hilgardii* armazenadas durante 20, 60 e 100 dias 55

Tabela 4. Teores de ácidos orgânicos das silagens à base de sorgo forrageiro inoculadas com *Lentilactobacillus buchneri* e *Lentilactobacillus hilgardii* armazenadas durante 20, 60 e 100 dias 56

Tabela 5. Composição química das silagens à base de sorgo forrageiro inoculadas com *Lentilactobacillus buchneri* e *Lentilactobacillus hilgardii* armazenadas durante 20, 60 e 100 dias 57

Tabela 6. Estabilidade aeróbia de silagens de sorgo forrageiro inoculadas com *Lentilactobacillus buchneri* e *Lentilactobacillus hilgardii* armazenadas durante 20, 60 e 100 dias 58

Capítulo II: Efeitos da adição de um aditivo químico sobre as silagens de ração em mistura total à base de sorgo forrageiro

Tabela 1. Proporção dos ingredientes com base na matéria natural, composição química e populações microbianas da ração em mistura total à base de sorgo forrageiro aditivada com FreshCUT Plus™ antes da ensilagem 90

Tabela 2. Perfil fermentativo e perdas de matéria seca das silagens de ração em mistura total à base de sorgo forrageiro aditivadas com FreshCUT Plus™ armazenadas durante 40d e 80d após ensilagem 94

Tabela 3. Quantificação das populações microbianas de bactérias ácido lácticas, leveduras e de fungos filamentosos das silagens de ração em mistura total à base de sorgo forrageiro aditivadas com FreshCUT Plus™ armazenadas durante 40d e 80d após ensilagem	95
Tabela 4. Teores médios de ácidos orgânicos das silagens de ração em mistura total à base de sorgo forrageiro aditivadas com FreshCUT Plus™ armazenadas durante 40d e 80d após ensilagem	96
Tabela 5. Composição química das silagens de ração em mistura total à base de sorgo forrageiro aditivadas com FreshCUT Plus™ armazenadas durante 40d e 80d após ensilagem	97
Tabela 6. Estabilidade aeróbia e temperatura das silagens de ração em mistura total à base de sorgo forrageiro aditivadas com FreshCUT Plus™ armazenadas durante 40d e 80d após ensilagem	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Índices de diversidade alfa bacteriana (Observed, Shannon, Simpson, Pielou e Faith PD) em silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 60

Figura 2. Índices de diversidade alfa fúngica (Observed, Shannon, Simpson, Pielou e Faith PD) em silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 61

Figura 3. Análise de coordenadas não métricas multidimensionais (NMDS) baseada na matriz de distância Bray-Curtis das comunidades bacterianas nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 62

Figura 4. Análise de coordenadas não métricas multidimensionais (NMDS) baseada na matriz de distância Bray-Curtis das comunidades fúngicas nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias, e após 144 horas de exposição aeróbia. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação; 144h AE: silagem exposta ao ar por 144 horas. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 62

Figura 5. Abundância relativa dos filos bacterianos nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 63

Figura 6. Abundância relativa dos filos fúngicos nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias, e após 144 horas de exposição aeróbia. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação; 144h AE: silagem exposta ao ar por 144 horas. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 64

Figura 7. Abundância relativa das famílias bacterianas nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 65

Figura 8. Abundância relativa das famílias fúngicas nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias, e após 144 horas de exposição aeróbia. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação; 144h AE: silagem exposta ao ar por 144 horas. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 65

Figura 9. Abundância relativa dos gêneros bacterianos nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 66

Figura 10. Abundância diferencial das bactérias nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos no período de fermentação de 20 dias. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 67

Figura 11. Abundância diferencial das bactérias nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos no período de fermentação de 60 dias. D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 67

Figura 12. Abundância diferencial das bactérias nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos no período de fermentação de 100 dias. D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri* 68

Figura 13. Abundância relativa dos gêneros fúngicos nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias, e após 144 horas de exposição aeróbia. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação; 144h AE: silagem exposta ao ar por 144 horas. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 69

Figura 14. Abundância diferencial fúngica nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias, e após 144 horas de exposição aeróbia. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação; 144h AE: silagem exposta ao ar por 144 horas 69

Figura 15. Predição gênica das bactérias nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos no período de fermentação de 20 dias. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 70

Figura 16. Predição gênica das bactérias nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos no período de fermentação de 60 dias. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa

Lentilactobacillus buchneri; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 71

Figura 17. Predição gênica das bactérias nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos no período de fermentação de 100 dias. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 71

RESUMO

A variabilidade climática impõe desafios para o crescimento do pasto no Brasil, impactando diretamente a alimentação dos rebanhos, e a ensilagem se destaca como uma estratégia eficaz para conservar as forragens, mantendo seu valor nutritivo e garantindo a disponibilidade de alimento durante períodos de escassez. O primeiro experimento teve como objetivo investigar os efeitos da inoculação com *Lentilactobacillus buchneri* (Lb) isoladamente, ou em combinação com *Lentilactobacillus hilgardii* (Lh) sobre o perfil fermentativo, a sucessão bacteriana e fúngica, a composição química, perdas de matéria seca e estabilidade aeróbia das silagens do sorgo planta-inteira, ensiladas durante 20, 60 e 100 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, arranjado em esquema fatorial 3×3, com três períodos de fermentação (20, 60 e 100 dias após ensilagem) e três aditivos microbianos (Controle, não inoculado; inoculante comercial à base de Lb, e outro inoculante comercial, composto por Lh com Lb), com cinco repetições por tratamento. As variáveis avaliadas foram perfil fermentativo, composição química, quantificação das populações microbianas, ácidos orgânicos e perdas de matéria seca. A estabilidade aeróbia foi monitorada por meio de *data-loggers*, enquanto a diversidade microbiana foi caracterizada por sequenciamento do gene 16S rRNA, utilizando a plataforma QIIME2. Observou-se interação significativa ($P<0,05$) entre os aditivos e o período fermentativo para as variáveis pH, carboidratos solúveis, nitrogênio amoniacal, matéria seca, proteína bruta, bactérias ácido-láticas, ácidos orgânicos e estabilidade aeróbia. A diversidade beta mostrou maior EA nas comunidades bacterianas dos grupos inoculados, enquanto o grupo controle teve maior dispersão e aumento de táxons indesejáveis. *Lentilactobacillus* dominou nos grupos inoculados, e *Kazachstania* foi o principal táxon fúngico. A inoculação com Lb isolado e combinado com Lh promoveu maior desenvolvimento da população de bactérias ácido-láticas e produziu compostos antifúngicos. Portanto, recomenda-se a inoculação com Lb ou Lb+Lh e o período de fermentação de 60 a 100 dias para otimizar a EA. No segundo experimento, objetivou-se avaliar o perfil fermentativo, as perdas de matéria seca, a composição química e a estabilidade aeróbia de silagens de ração em mistura total à base de sorgo forrageiro aditivadas com doses de FreshCUT Plus™ aos 40 e 80 dias após a ensilagem. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando dois períodos de fermentação, três aditivos e cinco repetições por tratamento, em esquema fatorial 2×3. Os aditivos empregados foram: ração em mistura total controle, sem aditivo; ração em mistura total aditivada com 1 kg FreshCUT Plus™/Mg base MN; ração em mistura total aditivada com 2 kg FreshCUT Plus™/Mg base MN. Observou-se interação significativa ($P<0,05$) entre o aditivo e o período fermentativo para extrato etéreo, pH, carboidratos solúveis, ácidos orgânicos e estabilidade aeróbia. Aos 80 dias, as silagens com 2 kg FreshCUT Plus™ eliminaram populações microbianas indesejáveis, apresentando maiores concentrações de ácido lático e acético, melhor estabilidade aeróbia e menores temperaturas, sem alterações significativas de matéria seca. Com base nos resultados, recomenda-se a adição de 2 kg FreshCUT Plus™/Mg e um período de fermentação de 80 dias para otimizar a qualidade da silagem de ração em mistura total.

Palavras-chave: estacionalidade climática, fermentação, microbiota, metataxonômica

ABSTRACT

The climatic variability poses challenges for pasture growth in Brazil, directly impacting livestock feeding, and silage stands out as an effective strategy for conserving forages, maintaining their nutritional value and ensuring the availability of food during periods of scarcity. The first experiment aimed to investigate the effects of inoculation with *Lentilactobacillus buchneri* (Lb) alone or in combination with *Lentilactobacillus hilgardii* (Lh) on the fermentation profile, bacterial and fungal succession, chemical composition, dry matter losses, and aerobic stability of whole-plant sorghum silages ensiled for 20, 60 and 100 days. The experimental design was fully randomized, arranged in a 3×3 factorial scheme, with three microbial additives (Control, non-inoculated; commercial Lb-based inoculant; and another commercial inoculant composed of Lh with Lb), with five repetitions per treatment. The evaluated variables were fermentation profile, chemical composition, microbial population quantification, organic acids, and dry matter losses. Aerobic stability was monitored using data loggers, while microbial diversity was characterized by 16S rRNA gene sequencing, using the QIIME2 platform. Significant interaction ($P<0,05$) was observed between the additives and the fermentation period for the variables pH, soluble carbohydrates, ammoniacal nitrogen, dry matter, crude protein, lactic acid bacteria, acids, and aerobic stability. Beta diversity showed higher aerobic stability in the bacterial communities of the inoculated groups, while the control group exhibited greater dispersion and an increase in undesirable taxa. *Lentilactobacillus* dominated the inoculated groups, and *Kazachstania* was the main fungal taxon. Inoculation with Lb alone and in combination with Lh promoted greater development of lactic acid bacteria and produced antifungal compounds. Therefore, inoculation with Lb or Lb+Lh and a fermentation period of 60 to 100 days are recommended to optimize aerobic stability. In the second experiment, the aim was to evaluate the fermentation profile, dry matter losses, chemical composition, and aerobic stability of total mixed ration silages based on forage sorghum, treated with doses of FreshCUT Plus™ at 40- and 80-days post-ensiling. The experimental design was fully randomized, using two fermentation periods, three additives, and five repetitions per treatment, organized in a 2×3 factorial scheme. The additives used were: control total mixed ration, without additive; total mixed ration with 1 kg FreshCUT Plus™/Mg of dry matter. A significant interaction ($P<0,05$) was observed between the additive and fermentation period for ether extract, pH, soluble carbohydrates, organic acids, and aerobic stability. At 80 days, the silages with 2 kg FreshCUT Plus™ eliminated undesirable microbial populations, presenting higher concentrations of lactic and acetic acids, better aerobic stability, and lower temperatures, without significant changes in dry matter. Based on the results, it is recommended to add 2 kg FreshCUT Plus™/Mg and a fermentation period of 80 days to optimize silage quality.

Keywords: climatic seasonality, fermentation, microbiota, metataxonomic

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil se destaca como uma potência agrícola e pecuária, possuindo o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 197,18 milhões de animais e cerca de 161,45 milhões de hectares dedicados às pastagens (ABIEC, 2024). No entanto, a produção de forragem enfrenta desafios significativos, especialmente durante o período de estiagem, quando a redução no crescimento das pastagens limita a disponibilidade de forragem de qualidade, impactando diretamente a alimentação dos rebanhos.

Para mitigar os efeitos da sazonalidade climática sobre o desenvolvimento das pastagens, a ensilagem é amplamente adotada como técnica eficaz para a conservação de forragens. Esse método possibilita armazenamento dos materiais em condições anaeróbias, preservando seu valor nutritivo e garantindo uma fonte constante de alimento durante períodos de escassez (PAULA, 2021).

Entre as culturas utilizadas para ensilagem, o sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] se destaca pela sua capacidade de adaptação a múltiplos estresses abióticos, como secas prolongadas, além de sua resiliência em diferentes condições de solo e clima (KHAVANINZADE et al., 2022). Essa gramínea é valorizada por suas características produtivas e alto valor nutritivo, apresentando teores de matéria seca variando entre 220 e 354,1 g/kg, proteína bruta de 90 a 130 g/kg, fibra em detergente neutro de 560 a 700 g/kg e nutrientes digestíveis totais de 490 a 620 g/kg, com base na matéria seca (SILVA et al., 2021).

Além da ensilagem convencional, a silagem de ração em mistura total (TMR) emerge como uma estratégia que combina forragens com alimentos energéticos, proteicos, minerais, vitaminas e aditivos, permitindo um balanceamento nutricional que atende às exigências alimentares dos animais (DAI et al., 2022). A ensilagem conjunta dos ingredientes na TMR é particularmente eficaz em situações de alta umidade das forrageiras, resultando em um perfil fermentativo adequado (MACÊDO et al., 2018).

A otimização do processo de ensilagem, seja por métodos convencionais ou na TMR, pode ser aprimorada com a utilização de aditivos. Esses compostos desempenham um papel fundamental na redução da fermentação alcoólica, no aumento da estabilidade aeróbia e na minimização de perdas durante o processo fermentativo (DA SILVA et al., 2021). Aditivos químicos, como os ácidos orgânicos – acético (AA), propiônico (AP) e benzoico – demonstram eficácia no controle do pH e na inibição de fermentações indesejáveis, contribuindo significativamente para a preservação da qualidade da silagem (MUCK et al., 2018).

Outra estratégia promissora para a melhoria da silagem é a utilização de inoculantes à base de bactérias ácido lácticas (BAL) heterofermentativas. O *Lentilactobacillus buchneri* é amplamente reconhecido por sua capacidade de aumentar a EA por meio da produção de compostos antifúngicos (MUCK et al., 2018). Em sinergia, o *Lentilactobacillus hilgardii* converte rapidamente lactato em acetato, inibindo o crescimento da população de leveduras (LEV) e contribuindo para a estabilização da silagem (DA SILVA et al., 2021). A inoculação simultânea de *L. buchneri* e *L. hilgardii* potencializa a produção de AA, 1,2-Propanodiol e AP, melhorando a qualidade da silagem ao controlar microrganismos indesejáveis, especialmente em períodos mais longos de fermentação (DROUIN et al., 2019; ARRIOLA et al., 2021).

Adicionalmente, a aplicação de técnicas de análise metataxonômica tem proporcionado avanços significativos na caracterização detalhada das comunidades microbianas nas silagens. Essas análises oferecem uma visão abrangente das interações entre os microrganismos presentes durante a fermentação, permitindo o desenvolvimento de inoculantes mais eficazes e adaptados às particularidades de cada tipo de silagem (DROUIN et al., 2019).

Diante do exposto, este estudo teve como hipóteses que a inoculação da silagem de sorgo forrageiro com a combinação de *L. buchneri* e *L. hilgardii* promoveria um rápido desenvolvimento de BAL, produzindo compostos antifúngicos e melhorando a estabilidade aeróbia e qualidade nutricional mesmo em curtos períodos de fermentação. Além disso a adição de FreshCUT Plus™ (1 kg ou 2 kg/Mg) à silagem de TMR capaz de aprimorar o perfil fermentativo e o valor nutritivo, com melhores resultados observados na dose de 2 kg/Mg devido à maior concentração de aditivos. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da inoculação com *L. buchneri* isoladamente, ou em combinação com *L. hilgardii* sobre o perfil fermentativo, a sucessão bacteriana e fúngica, a composição química, perdas de matéria seca e EA das silagens sorgo planta-inteira, bem como avaliar o impacto de diferentes doses de FreshCUT Plus™ em silagens de TMR a base de sorgo forrageiro, analisando as características fermentativas, perdas de matéria seca, composição química estabilidade aeróbia, ambos em diferentes períodos de abertura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura do sorgo

O sorgo se destaca como uma das principais culturas, especialmente em regiões semiáridas (BOREGOWDA et al., 2019). Originário da África e pertencente à família Poaceae, essa gramínea é caracterizada por um mecanismo fotossintético C4, o que confere uma eficiência superior na fixação de carbono em comparação a plantas de metabolismo C3, como o milho (SANTOS et al., 2015). Essa adaptação permite ao sorgo aproveitar a luz solar de maneira eficaz sob altas

temperaturas e baixa umidade, características comuns nas regiões semiáridas do Brasil, onde sua adoção se intensificou desde a década de 1970 (SILVA et al., 2021).

Atualmente, o sorgo ocupa a quinta posição entre os cereais mais cultivados no mundo, ficando atrás apenas do trigo, arroz, milho e cevada (BRASIL, 2021). Essa ascensão é atribuída a sua notável capacidade de adaptação a diferentes condições de clima e solo, além de apresentar menor sensibilidade à seca e exigir menos fertilidade em comparação com o milho (KHALIFA & ELTAHIR, 2023). Essas características tornam o sorgo uma cultura estratégica para maximizar a produção de forragem em regiões onde a sustentabilidade do sistema de produção e o desempenho animal são críticos.

Diversas variedades de sorgo foram desenvolvidas ao longo dos anos para atender a diferentes demandas produtivas, classificando-se em três categorias principais: forrageiro, grânifero e sacarino. O sorgo forrageiro, em particular, destaca-se na produção de silagem devido à sua elevada tolerância a condições adversas, como alagamentos e déficits hídricos prolongados (KHALIFA & ELTAHIR, 2023). Sua versatilidade permite que seja amplamente utilizado, tanto na alimentação animal quanto humana, podendo ser consumido *in natura*, na forma de farináceo ou em produtos processados como ração, amido, cera, bebidas e biocombustíveis (SILVA & BRITO, 2019).

A ampla utilização do sorgo em regiões sujeitas a períodos de déficit hídrico deve-se, em grande parte, à sua capacidade de ajuste osmótico. Durante períodos de déficit hídrico, o sorgo acumula solutos, como açúcares e íons, que ajudam a manter o turgor celular, a condutância estomática e a fotossíntese, mesmo sob estresse ambiental (TURNER, 2018). Esse mecanismo permite a absorção contínua de água pelas raízes, favorecendo o acúmulo de biomassa e aumentando a resiliência em períodos secos. Além disso, o sistema radicular profundo do sorgo proporciona resistência e estabilidade em solos de baixa fertilidade, resultando em menores custos de produção e na obtenção de forragem de qualidade para ensilagem (BRASIL, 2021).

Do ponto de vista fermentativo, o sorgo apresenta propriedades que o tornam ideal para a produção de silagem de boa qualidade. Sua elevada concentração de carboidratos solúveis (CHOs) e baixa capacidade tamponante (CT) favorecem uma rápida acidificação da massa ensilada, criando um ambiente fermentativo eficiente e resultando em silagens com teores nutricionais adequados e viabilidade econômica (SANTIN, 2020). A escolha da variedade apropriada, aliada à colheita no ponto ideal de maturação – quando os grãos estão no estágio pastoso e a planta apresenta entre 30 a 35% de matéria seca – é essencial para garantir a produção de qualidade superior (MCDONALD et al., 1991).

Nesse contexto, a ensilagem se configura como uma prática estratégica, assegurando a conservação de forragem durante o período seco e contribuindo na manutenção da alimentação dos rebanhos (FERNANDES, 2020).

2.2 Silagem de Sorgo

O sorgo forrageiro destaca-se por seus elevados níveis de carboidratos, que podem ultrapassar 15% da MS (LUCENA et al., 2021). Embora esses CHOs desempenhem um papel essencial no processo fermentativo, a sua presença em excesso pode resultar na redução do pH da silagem para níveis abaixo dos recomendados. Isso favorece a proliferação de microrganismos indesejáveis, como as LEV (SANTOS et al., 2021). Esses microrganismos acidotolerantes utilizam os CHOs e o AL como substrato, levando à produção de etanol e dióxido de carbono, o que resulta em perdas significativas de MS e na deterioração aeróbia da silagem após a abertura dos silos (KUNG et al., 2018).

A elevada população epifítica de leveduras presente no sorgo contribui para a fermentação alcoólica durante o armazenamento. Este efeito é intensificado pela grande disponibilidade de substratos fermentáveis, comprometendo a estabilidade do material ensilado, especialmente quando exposto ao oxigênio. A falta de controle sobre essa fermentação acarreta perdas adicionais de nutrientes, impactando negativamente a qualidade final da silagem (SANTOS et al., 2018).

Apesar dos desafios enfrentados, a silagem do sorgo continua a ser uma escolha estratégica para a alimentação animal, devido à sua produtividade superior em relação ao milho, aliada a um custo de produção reduzido. Quando adequadamente produzida, a silagem de sorgo pode apresentar uma qualidade nutricional semelhante à silagem de milho, tornando-se uma opção atrativa para produtores em diversas regiões (SANTIN et al., 2020).

Entretanto, o momento de corte da planta é crucial para a qualidade da silagem. Plantas colhidas tardiamente tendem a apresentar uma maior fração fibrosa, o que pode comprometer a digestibilidade e o consumo pelos animais (MARTINKOSKI et al., 2013). Além disso, o teor de MS da forragem, influenciado pela proporção de caules, folhas e panículas, impacta diretamente o processo de fermentação (COSTA et al., 2016). A menor proporção de panículas e grãos nas cultivares de sorgo forrageiro, em comparação com cultivares graníferos ou de duplo propósito, pode comprometer a composição da MS (PINHO et al., 2006).

Esses fatores evidenciam a complexidade do manejo da fermentação da silagem de sorgo, ressaltando a importância de estratégias que minimizem as perdas de MS e garantam a estabilidade do produto final. Diante disso, a inclusão de aditivos e a produção de silagens de

TMR surgem como alternativas promissoras, visando mitigar esses desafios e otimizar tanto a conservação quanto o valor nutritivo da silagem (KUNG et al., 2018).

2.3 Ração em mistura total (TMR)

A TMR é uma estratégia consolidada que integra forragens, concentrados, minerais, vitaminas e aditivos numa mistura homogênea, suprimindo as demandas nutricionais de ruminantes. Sua crescente adoção está ligada à eficiência em promover uma ingestão uniforme de nutrientes, reduzindo a seletividade e favorecendo a consistência alimentar (DAI et al., 2022). A TMR é especialmente vantajosa para sistemas de produção intensivos, onde a demanda por uma dieta balanceada impacta diretamente o desempenho animal e a rentabilidade da operação (MARROCO et al., 2020).

No processo de ensilagem, a TMR apresenta alta densidade, que contribui para a expulsão eficiente do oxigênio e favorece uma fermentação anaeróbica mais rápida, essencial para a qualidade da silagem. Essa compactação reduz a atividade de microrganismos deteriorantes e contribui para a retenção de nutrientes, minimizando perdas de MS e aumentando o valor nutricional da silagem (BORREANI et al., 2018; WANG et al., 2023). A utilização de ingredientes com baixo teor de umidade também é fundamental, pois diminui a produção de efluentes e promove a homogeneidade da mistura, reduzindo a seletividade animal e facilitando a inclusão de subprodutos nutricionalmente viáveis (CHEN et al., 2016).

Para otimizar o processo fermentativo da TMR, é essencial um equilíbrio entre MS, CHOs e controle de pH. Ingredientes tamponantes, como bicarbonato de sódio, ajudam a manter a estabilidade do pH durante a fermentação, o que é essencial para a preservação da integridade nutricional da silagem e para a viabilidade econômica do sistema (TIAN et al., 2020; LAZZARI et al., 2021). A adequada proporção de CHOs e tampões melhora a eficiência fermentativa, permitindo uma estabilização rápida do ambiente anaeróbico, o que reduz a proliferação de microrganismos indesejáveis (CHEN et al., 2016).

Um dos principais benefícios da TMR é a maior estabilidade aeróbia (EA), especialmente em relação a forragens frescas. Essa estabilidade permite que o material ensilado resista à deterioração mesmo após exposição ao ar, o que é vantajoso em regiões tropicais onde as altas temperaturas representam um desafio para a conservação (WANG & NISHINO, 2013). Pesquisas indicam que o armazenamento prolongado pode reduzir ainda mais a presença de LEV e fungos, resultando em uma resistência aprimorada contra a deterioração aeróbia (RESTELATTO et al., 2019).

A aplicação de aditivos, como ácidos orgânicos e inoculantes bacterianos, especialmente LB, é fundamental para otimizar a preservação da TMR, aumentando sua resistência e estabilidade ao longo do tempo. Esses aditivos inibem o crescimento de microrganismos deteriorantes e promovem uma fermentação mais eficiente, preservando nutrientes e estendendo a vida útil da silagem (ARRIOLA et al., 2021). A utilização de tecnologias de inoculação específicas oferece novas possibilidades de controle de qualidade, permitindo ajustes nas propriedades fermentativas que se adequam às variações de clima e composição da TMR (BUENO et al., 2020).

2.4 Utilização de aditivos em silagens

As variedades de sorgo apresentam atributos desejáveis; no entanto, seu alto teor de carboidratos, que varia entre 15% e 20% do conteúdo total da MS, pode causar perdas significativas durante o processo de ensilagem. Essas perdas são, em grande parte, atribuídas à ação das LEV, que ocasionam a fermentação alcoólica, comprometendo a qualidade da silagem (SANTOS et al., 2021).

Diante desses desafios, a utilização de aditivos na silagem desempenha um papel crucial na melhoria do valor nutritivo do material ensilado. Esses aditivos têm como principais objetivos reduzir a fermentação alcoólica, aumentar a EA e minimizar as perdas durante o processo fermentativo e na exposição ao ar, promovendo, assim melhorias no valor nutritivo da silagem (DA SILVA et al., 2021). De maneira geral, os aditivos podem ser classificados em quatro categorias principais: estimuladores de fermentação, inibidores de fermentação, inibidores da deterioração aeróbia, aditivos nutricionais e absorventes (MCDONALD, 1991).

Esses aditivos podem atenuar os riscos associados às características específicas da cultura e às condições ambientais adversas, inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis e a deterioração, além de reduzir as perdas de MS (MUCK et al., 2018). Para maximizar os benefícios e garantir a qualidade da silagem, é recomendada a utilização de diferentes tipos de aditivos de forma combinada, a depender das características do material que se pretende ensilar e dos objetivos a serem alcançados para otimizar a conservação do alimento na forma de silagem (ZOPOLLATO et al., 2009).

2.4.1 Inoculantes microbianos

O uso de inoculantes microbianos na ensilagem promove o desenvolvimento de BAL, fundamentais para suprimir fermentações indesejáveis e aprimorar a EA das silagens (NUSSIO et al., 2019). Cepas homofermentativas, como *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* e *Enterococcus faecium*, são preferidas pela eficiência na conversão rápida de CHOs em AL, o que

acelera a redução do pH e limita o crescimento microbiano indesejável, resultando em menor produção de AA, ácido butírico (AB) e etanol, além de maior retenção de MS (ZOPOLLATO et al., 2009; ZHANG et al., 2020).

Kung et al. (2018) observaram que essas bactérias homoláticas contribuem para um aumento de até 5% na recuperação de MS, reduzindo fermentações secundárias por clostrídios. Contudo, essas cepas promovem EA eficaz em apenas um terço dos casos, pois a menor produção de AA e compostos antifúngicos pode comprometer a resistência da silagem à deterioração aeróbia.

Por outro lado, as bactérias heterofermentativas, como *L. buchneri*, são notáveis por converterem AL em AA e AP, ambos com comprovadas propriedades antifúngicas (KUNG et al., 2018). A LB é uma bactéria heterofermentativa obrigatória, frequentemente utilizada como inoculante em silagens. Essa espécie possui dois genes que codificam a enzima fosfocetolase, comprovando sua natureza heterolática obrigatória (MCDONALD et al., 1991). Além disso, por meio dessa enzima, a *L. buchneri* redireciona o metabolismo do lactato para a produção de AA e propanodiol. Esse processo reduz a atividade das LEV, prolongando a EA da silagem após a abertura do silo, embora sua eficácia ideal seja alcançada apenas após 45 a 60 dias de fermentação (KUNG et al., 2018). Em condições ideais, um adequado pH potencializa o efeito de AA contra LEV e fungos (BERNARDI et al., 2019).

O AA desempenha um papel vital na inibição de LEV, atuando ao entrar nas células e acidificar o citoplasma, o que aumenta o consumo de ATP e resulta em esgotamento energético e morte celular (STRATFORD et al., 2013). Essa ação do AA também contribui para reduzir a produção de micotoxinas, que prejudicam o desempenho animal (AUERBACH et al., 2020).

A *L. hilgardii* é outra cepa promissora por sua capacidade de acelerar a estabilização das silagens. Da Silva et al. (2021) relataram que a combinação de *L. buchneri* e *L. hilgardii* melhorou significativamente a EA em apenas 10 dias de fermentação, sugerindo um efeito sinérgico com potencial para otimizar o processo fermentativo em prazos curtos. Essa característica torna a *L. hilgardii* especialmente para produtores que necessitam abrir silos a partir dos 30 dias, minimizando perdas durante períodos de estiagem (BORREANI et al., 2018).

Estudos anteriores corroboram a eficácia da *L. hilgardii* na melhoria da EA. Ferrero et al. (2019) observaram que a adição de *L. hilgardii* isoladamente aumentou a EA em um ensaio com silagem de milho, com valores mais altos após 15 e 30 dias de conservação. Drouin et al. (2019) relataram que no primeiro dia de ensilagem, as silagens tratadas com *L. hilgardii* apresentaram uma maior produção de AA em comparação às não inoculadas, evidenciando um efeito rápido na produção de ácidos orgânicos, o que favorece a preservação da silagem. Costa et al. (2021)

confirmaram que as silagens tratadas com *L. hilgardii* apresentaram maior EA e menor população de LEV em comparação às não tratadas. Além disso, Ferrero et al. (2021) demonstraram ainda que o *L. hilgardii* modificou o perfil fermentativo, promovendo a produção de AA e 1,2-Propanodiol, típicos de bactérias como o *L. buchneri*, reforçando sua capacidade de melhorar a conservação das silagens.

2.4.2 Aditivos químicos

Os aditivos químicos são essenciais para aprimorar a conservação das silagens, proporcionando maior recuperação de MS, melhor digestibilidade dos nutrientes e, como resultado, uma maior aceitação pelos animais (DAI et al., 2022). Durante o processo de ensilagem, o atraso na colheita é uma das principais razões para a utilização desses aditivos (COSTA et al., 2021). Quando ocorrem atrasos, a compactação pode ser insuficiente, e os aditivos auxiliam acelerando a queda do pH (BORREANI et al., 2018) ao estimular a fermentação láctica. Esses aditivos não apenas influenciam a acidificação, mas também modificam o ambiente fermentativo, favorecendo o crescimento de microrganismos benéficos e inibindo os indesejáveis, o que contribui significativamente para a qualidade final da silagem (NASCIMENTO et al., 2016).

Adicionalmente, a incorporação de aditivos químicos, como ácidos orgânicos, é uma estratégia valiosa para potencializar a conservação da silagem, atuando de maneira complementar aos inoculantes microbianos. De acordo com Oliveira et al. (2023) esses aditivos inibem a fermentação de açúcares em produtos indesejáveis, como álcool e AB, restringindo o crescimento de clostrídios.

Inicialmente, ácidos como sulfúrico e fórmico eram utilizados para acidificar a silagem, inibir microrganismos deteriorantes e reduzir o pH, minimizando assim as perdas de nutrientes (WILKINSON & RINNE, 2018). Atualmente, ácidos orgânicos como o AA, AP, ácido sórbico e ácido benzoico são os principais aditivos empregados para melhorar a EA (MUCK et al., 2018). Essas práticas têm demonstrado potencial para aumentar o consumo de MS pelos animais, mas também são essenciais para a qualidade da silagem (GERLACH et al., 2021).

Estudos mais recentes mostram que tanto o AA quanto o AP têm efeito direto na melhoria da EA, agindo na inibição de mofos e LEV (LI et al., 2024). De forma similar, Aslım et al. (2021) destacam que aditivos à base de AP têm se mostrado eficazes na inibição de LEV. Além disso, Silva et al. (2015) relataram que o ácido benzoico é capaz de inibir o metabolismo celular de microrganismos, interferindo diretamente na atividade enzimática do ciclo de citrato, reforçando seu potencial como aditivo antifúngico.

Esses benefícios são apoiados por Dai et al. (2022) que mostraram que a aplicação de aditivos químicos em silagens de TMR resultou em uma redução significativa do conteúdo de nitrogênio amoniacal, sugerindo inibição de proteólise. Observou-se um aumento no teor de AA e nas contagens de BAL, enquanto as LEV e bactérias aeróbias foram reduzidas nas silagens tratadas em comparação ao controle. A EA foi significativamente prolongada, estendendo o período em mais de 216 horas.

Dessa forma, os aditivos químicos são fundamentais na modulação da microbiota durante a ensilagem, influenciando a qualidade final da silagem. Sua ação não apenas preserva os nutrientes, mas também promove uma diversidade microbiana mais equilibrada, criando oportunidades para investigações mais detalhadas sobre a microbiota das silagens (DROUIN et al., 2020).

2.5 Diversidade microbiana

A caracterização das espécies microbianas no processo de ensilagem tradicionalmente utiliza métodos de cultura baseados no isolamento de cepas para classificação taxonômica. Contudo, esses métodos apresentam limitações, uma vez que meios seletivos podem restringir o crescimento de certos microrganismos, resultando em uma caracterização parcial da microbiota presente. Muitos microrganismos não se adaptam bem a esses meios, dificultando a compreensão completa da diversidade microbiana. Diante disso, a necessidade de adotar técnicas moleculares mais avançadas para caracterizar com precisão a comunidade microbiana em silagem tem crescido significativamente (DROUIN et al., 2019).

Entre essas técnicas, a metataxonomia destaca-se pela capacidade de analisar diretamente o DNA purificado, possibilitando uma avaliação detalhada tanto da diversidade quanto das funções das comunidades microbianas, sem a necessidade de cultivo isolado dos microrganismos (DROUIN et al., 2020). O sequenciamento de DNA proporciona uma visão detalhada da composição microbiana e permite entender profundamente as funções metabólicas desempenhadas pelas diferentes espécies (CAFFREY et al., 2010).

A microbiota envolvida na ensilagem é complexa e dinâmica, influenciada por fatores que impactam sua diversidade no momento da colheita, como tipo de forrageira, condições climáticas, manejo agrícola e estado fisiológico da planta (DROUIN et al., 2019). Estudos indicam que análise molecular é fundamental para esclarecer essa complexidade. Li & Nishino (2011), por exemplo, usaram eletroforese em gel gradiente desnaturante (DGGE) para examinar os efeitos da inoculação *Lactobacillus rhamnosus* e LB em silagens de milho, observando que, embora a inoculação tenha pouco efeito na comunidade bacteriana, houve alterações significativas na população de fungos após a deterioração aeróbia.

Outros estudos genômicos, como o de Heinl et al. (2012), revelaram a capacidade de LB CD034 de converter lactato em acetato e etanol. Além disso, Ávila et al. (2014) observaram que cepas de LH identificadas como CNCM I-4784 e CNCM I-4785 melhoram a fermentação e reduzem perdas de MS em silagens de cana-de-açúcar. Em testes, Santos et al. (2017) notaram que vacas alimentadas com silagem tratada com essa cepa apresentaram maior produção de leite e sólidos em comparação com silagens não tratadas. Esses estudos aprofundam o entendimento sobre o papel das espécies microbianas e fornecem informações valiosas para otimizar a fermentação e a qualidade das silagens.

Dada a complexidade das interações microbianas em silagens de sorgo, especialmente sob condições tropicais, pesquisas adicionais são necessárias. Compreender as condições que favorecem a prevalência de LH durante a fermentação pode otimizar seu uso, seja isoladamente ou em combinação com LB. Tais investigações buscam não apenas aprimorar a qualidade das silagens, mas também promover a sustentabilidade e eficiência na produção forrageira, com impacto positivo na produtividade animal e na segurança alimentar (FERRERO et al., 2019).

REFERÊNCIAS

- ABIEC. (2024). <https://www.AbiEC.Com.Br/Publicacoes/Beef-Report-2024-Perfil-Da-Pecuaria-No-Brasil/>. Acesso em: 02 de agosto de 2024
- ARRIOLA, K. G., VYAS, D., KIM, D., AGARUSSI, M. C. N., SILVA, V. P., FLORES, M., JIANG, Y., YANLIN, X., PECH-CERVANTES, A. A., FERRARETTO, L. F., & ADESOGAN, A. T. (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. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19512>
- ASLIM, A., OKUYUCU, B., & KOÇ, F. (2021). Propiyonik Asit Katkısının Toplam Karışım Rasyonu Yemin Aerobik Stabilité Özellikleri Üzerine Etkileri. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 9(1), 210–216. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v9i1.210-216.3848>
- ÁVILA, C. L. S., CARVALHO, B. F., PINTO, J. C., DUARTE, W. F., & SCHWAN, R. F. (2014). The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. *Journal of Dairy Science*, 97(2), 940–951. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6987>

- AUERBACH, H., & THEOBALD, P. (2020). Additive Type Affects Fermentation, Aerobic Stability and Mycotoxin Formation during Air Exposure of Early-Cut Rye (*Secale cereale* L.) Silage. *Agronomy*, 10(9), 1432. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091432>
- BERNARDI, A., HARTER, C. J., SILVA, A. W., REIS, R. A., RABELO, C. H. (2019). A meta-analysis examining lactic acid bacteria inoculants for maize silage: Effects on fermentation, aerobic stability, nutritive value and livestock production. *Grass and Forage Science*, 74(4), 596-612. <https://doi.org/10.1111/gfs.12452>
- BOREGOWDA, R. S., MURALI, N., UDAYASHANKAR, A. C., NIRANJANA, S. R., LOUND, O. S., PRAKASH, H. S. (2019). Antifungal activity of eclipta alba metabolites against Sorghum Pathogens. *Plants*, 8(3), 72. <https://doi.org/10.3390/plants8030072>
- BORREANI, G., TABACCO, E., SCHMIDT, R. J., HOLMES, B. J., MUCK, R. E. (2018). Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal Dairy Science*, 101(5), 3952-3979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>
- BRASIL. Portaria nº 288, de 6 de julho de 2021. (2021). Aprovar o Zoneamento Agrícola de Risco Climático para a cultura do sorgo forrageiro. Diário oficial da união: seção 1, Brasília, DF, ed. 126, p. 306.
- BUENO, A. V. I., LAZZARI, G., JOBIM, C. C., DANIEL, J. L. P. (2020). Ensiling Total Mixed Ration for Ruminants: A Review. *Agronomy*, 10(879). <https://doi.org/10.3390/agronomy10060879>
- CAFFREY, S. M. (2010). Which Microbial Communities Are Present? Sequence-Based Metagenomics. *Applied Microbiology and Molecular Biology in Oilfield Systems*, p. 63-76. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9252-6_8km
- CHEN, L., GUO, G., YUAN, X., ZHANG, J., LI, J., & SHAO, T. (2016). 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(5), 1678–1685. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7271>
- COSTA, D. M., CARVALHO, B. F., BERNANDES, T. F., SCHWAN, R. F., ÁVILA, C. L. S. (2021). New epiphytic strains of lactic acid bacteria improve the conservation of corn silage

- harvested at late maturity. *Animal Feed Science and Technology*, 274, 114852. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114852>
- COSTA, R. F., PIRES, D. A. DE A., MOURA, M. M. A., SALES, E. C. J. DE, RODRIGUES, J. A. S., & RIGUEIRA, J. P. S. (2016). Agronomic characteristics of sorghum genotypes and nutritional values of silage. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 38(2), 127. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v38i2.29567>
- DAI, T., DONG, D., WANG, S., ZONG, C., YIN, X., JIA, Y., & SHAO, T. (2022). The effectiveness of chemical additives on fermentation profiles, aerobic stability and *in vitro* ruminal digestibility of total mixed ration ensiled with Napier grass and wet distillers' grains in southeast China. *Italian Journal of Animal Science*, 21(1), 979–989. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2022.2078234>
- DA SILVA, E. B., SMITH, M. L., SAVAGE, M. R., POLUKIS, S. A., DROUIN, P. KUNG JR., L. (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*, 130, 1481-1493. <https://doi.org/10.1111/jam.14892>
- DROUIN, P., FERRERO, F. (2020). Testing selectivity of bacterial and fungal culture media compared to original silage samples using next generation sequencing. *J. Microbiol Methods*, 179, 106088. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106088>
- DROUIN, P., TREMBLAY, J., CHAUCHEYRAS-DURAND, F. (2019). Dynamic succession of microbiota during ensiling of whole plant corn following inoculation with *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus hilgardii* alone or in combination. *Microorganisms*, 7(12), 595. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120595>
- FERNANDES, P. B., THEODORO, G. F., GURGEL, A. L. C., COSTA, C. M. (2020). Aspectos relacionados ao potencial forrageiro do sorgo: revisão. *Pubvet*, 14(7), 1-7. <http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v14n7a603.1-7>
- FERRERO, F., PIANO, S., TABACCO, E., BORREANI, G. (2019). Effects of conservation period and *Lactobacillus hilgardii* inoculum on the fermentation profile and aerobic stability of whole corn and sorghum silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), 2530-2540. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9463>

- FERRERO, F., TABACCO, E., & BORREANI, G. (2021). *Lentilactobacillus hilgardii* Inoculum, Dry Matter Contents at Harvest and Length of Conservation Affect Fermentation Characteristics and Aerobic Stability of Corn Silage. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.675563>
- GERLACH, K., DANIEL, J. L. P., JOBIM, C. C., NUSSIO, L. G. (2021). A data analysis on the effect of acetic acid on dry matter intake in dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 272, 114782. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114782>
- HEINL, S., WIBBERG, D., EIKMEYER, F., SZCZEPANOWSKI, R., BLOM, J., LINKE, B., GOESMANN, A., GRABHERR, R., SCHWAB, H., PUHLER, A., SCHLUTER, A. (2012). Insights into the completely annotated genome of *Lactobacillus buchneri* CD034, a strain isolated from stable grass silage. *Journal of Biotechnology*, 161(2), 153-166. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.03.007>
- HOSODA, K., OHMORIB, H., NAKAMURA, Y., KAMIYA, M. (2019). Effect of inclusion rate of corn silage in ensiled total mixed ration on dry matter intake, nutrient digestibility, and ruminal fermentation in Japanese Wagyu steer. *Livestock Science*, 229, 126-130. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.09.028>
- KHALIFA, M., ELTAHIR, E. A. B. (2023). Assessment of global sorghum production, tolerance, and climate risk. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1184373>
- KIRCHNER, J.H., ROBAINA, A. D., PEITER, M., TORRES, R. R., MEZZOMO, W., BEN, L. H. B., PIMENTA, B. D., PEREIRA, A. C. (2019). Funções de produção e eficiência no uso da água em sorgo forrageiro irrigado. *Revista Brasileira de Ciência Agrárias*, 14(2), 1-9. <https://doi.org/10.5039/agraria.v14i2a5646>
- KUNG, JR. L., SMITH, M. L., SILVA, E. B., WINDLE, M. C., SILVA, T. C., POLUKIS, S. A. (2018). Avaliação da eficácia de um aditivo químico à base de benzoato de sódio, sorbato de potássio e nitrito de sódio na fermentação e estabilidade aeróbica da silagem de milho. *Journal of Dairy Science*, 101(7), 5949-5960. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14006>
- KUNG, 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(5), 4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>

- LAZZARI, G., POPPI, A. C. O., MACHADO, J., BUENO, A. V. I., GOMES, A. L. M., JOBIM, C. C., DANIEL, J. L. P. (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*, 99(2). <https://doi.org/10.1093/jas/skab032>
- LI, X., CHENG, Y., YANG, F., HU, J., MA, R., LIU, H., & SHAO, T. (2024). Improving Total Mixed Ration Silage: Effects of Lactic Acid Bacteria Inoculants and Antimicrobial Additives on Fermentation Quality and Aerobic Stability. *Agronomy*, 14(8), 1602. <https://doi.org/10.3390/agronomy14081602>
- LI, Y., NISHINO, N. (2011). Bacterial and fungal communities of wilted Italian Ryegrass silage inoculated with and without *Lactobacillus rhamnosus* or *Lactobacillus buchneri*. *Lett Appl Microbiol*, 52(4), 21-314. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2010.03000.x>
- LUCENA, N. T., SANTOS, E. M., OLIVEIRA, J. S., PERAZZO, A. F., CRUZ, G. F. L., PEREIRA, D. M., PEREIRA, G. A., MACÊDO, A. J. S., RAMOS, R. C. S., & NOGUEIRA, M. S. (2021). Agronomic traits and chemical composition of forage sorghum plants fertilized with poultry litter and fermentative profile of silages. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 81(4), 575–584. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392021000400575>
- MACÊDO, A. J. S, SANTOS, E. M., ARAÚJO, G. G. L., EDVAN, R. L., OLIVEIRA, J. S., PERAZZO, A. F., SÁ, W. C. C. S., PEREIRA, D.M. (2018). Silages in the form of diet based on spineless cactus and buffelgrass. *African Journal of Range & Forage Science*, 35(2), 121-129. <https://doi.org/10.2989/10220119.2018.1473494>
- MAROCCO, D. H., FAVERO, P., GURALSKI, R., BASI, C., ZACARON, W., SOLIVO, G., ZOTTI, C. A. (2020). Use of by-products in a total mixed ration silage. *Semina: Ciências Agrárias*, 41(6supl2), 3473-3480. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n6Supl2p3473>
- MARTINKOSKI, L., & VOGEL, G. F. (2014). Utilização de sorgo como alternativa na produção de silagem. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 8(5), 177–187.
- MCDONALD, P., HENDERSON, A. R., HERON, S. J. E. *The biochemistry of silage*. Second edition. Chalcomb Publications, Bucks, 1991.
- MUCK, R. E., NADEAU, E. M. G., MCALLISTER, T. A., CONTRERAS-GOVEA, F. E., SANTOS, M.C., KUNG, L. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage

- additives. *Journal Dairy Science*, 101(5), 3980-4000. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-13839>
- NASCIMENTO, T. V. C., DE CARVALHO, G. G. P., DE FREITAS JUNIOR, J. E., DE SOUZA, W. F. (2016). Volumosos tratados com aditivos químicos: valor nutritivo e desempenho de ruminantes. *Archivos de Zootecnia*, 65(252), 593-604. <https://doi.org/10.21071/az.v65i252.1932>
- OLIVEIRA, K. DA S., SALVATI, G. G. DE S., MORAIS, G. DE, CARVALHO-ESTRADA, P. DE A., SANTOS, W. P. DOS., SALVATTE, J. M. S., GRITTI, V. C., SALVO, P. A. R., ARTHUR, B. A. V., NAZATO, L. M., & NUSSIO, L. G. (2023). Effect of Length of Storage and Chemical Additives on the Nutritive Value and Starch Degradability of Reconstituted Corn Grain Silage. *Agronomy*, 13(1), 209. <https://doi.org/10.3390/agronomy13010209>
- PAULA, T. A., VÉRAS, A. S. C., GOMES, R. N., FERREIRA, M. A. (2021). Produção de silagem: aspectos agronômicos e valor nutricional em regiões semiáridas – revisão sistemática. *Arquivos do Mudi*, 25(2), 127-154. <https://doi.org/10.4025/arqmudi.v25i2.56240>
- PINHO, R. G. V., VASCONCELOS, R. C., BORGES, I. D., & REZENDE, A. V. (2006). Influência da Altura de Corte das Plantas nas Características Agronômicas e Valor Nutritivo das Silagens de Milho e de Diferentes Tipos de Sorgo. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 5(2), 266–279. <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v5n2p266-279>
- SANTIN, T. P., FRIGERI, K. D. M., AGOSTINI, A., SILVA, H. R., KALLES, N. Z., COELHO, E. M., DIAS, A. M. (2020). Características fermentativas e composição química da silagem de sorgo (*Sorghum bicolor*) com uso de aditivos absorventes. *Brazilian Journal of Development*, 6(8), 54931-54943. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n8-057>
- SANTOS, A. P. M. DOS, SANTOS, E. M., OLIVEIRA, J. S. DE, RIBEIRO, O. L., PERAZZO, A. F., MARTINS ARAÚJO PINHO, R., MACÊDO, A. J. DA S., & PEREIRA, G. A. (2018). Effects of urea addition on the fermentation of sorghum (*Sorghum bicolor*) silage. *African Journal of Range & Forage Science*, 35(1), 55–62. <https://doi.org/10.2989/10220119.2018.1458751>
- SANTOS, A. C. P., SANTOS, E. M., CARVALHO, G. G. P., PERAZZO, A. F., ARAÚJO, M. L. G. M. L., DE OLIVEIRA, J. S., PEREIRA, G. A., MACÊDO, A. J. DA S., SÁ, W. C. C. DOS S., & PEREIRA, D. M. (2021). Fermentation profile, microbial populations and aerobic

- stability of sorghum silages enriched with urea and *Lactobacillus buchneri*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 66(2), 128–144. <https://doi.org/10.1080/00288233.2021.2000437>
- SANTOS, R. F. PLACIDO, H. F., GARCIA, E. B., CANTU, C., ALBRECHT, A. J. P., ALBRECHT, L. P., FRIGO, K. D. A. (2015). Sorgo sacarino na produção de agroenergia. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, 4(1), 1-12. <https://doi.org/10.5380/rber.v3i3.39690>
- SANTOS, W. P., ÁVILA, C. L. S., PEREIRA, M. N., SCHWAN, R. F., LOPES, N. M., & PINTO, J. C. (2017). Effect of the inoculation of sugarcane silage with *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus buchneri* on feeding behavior and milk yield of dairy cows¹. *Journal of Animal Science*, 95(10), 4613–4622. <https://doi.org/10.2527/jas2017.1526>
- SILVA, D. F., GARCIA, P. H. M., FARIAS, I. M. S. C., PÁDUA, G. V. G., PEREIRA, P. H. B., SILVA, F. E., BATISTA, R. F., NETO, S. G., CABRAL, A. M. D. (2021). Características morfológicas, melhoramento genético e densidade de plantio das culturas do sorgo e do milho: uma revisão. *Research, Society and Development*, 10(3). <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13172>
- SILVA, T. C., SMITH, M. L., BARNARD, A. M., & KUNG, L. (2015). The effect of a chemical additive on the fermentation and aerobic stability of high-moisture corn. *Journal of Dairy Science*, 98(12), 8904–8912. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9640>
- STRATFORD, M., STEELS, H., NEBE-VON-CARON, G., NOVODVORSKA, M., HAYER, K., ARCHER, D. B. (2013). Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 126-134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.025>
- RESTELATTO, R., NOVINSKI, C. O., PEREIRA, L. M., SILVA, E. P. A., VOLPI, D., ZOPOLLATTO, M., SCHMIDT, P., & 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. <https://doi.org/10.1093/jas/skz030>
- TIAN, P., VYAS, D., NIU, D., ZUO, S., DI JIANG, XU, CH. (2020). Effects of calcium carbonate on the fermentation quality and aerobic stability of total mixed ration silage.

- Journal of animal and Feed Sciences*, 29(2), 167-174.
<https://doi.org/10.22358/jafs/124047/2020>
- TURNER, N. C. (2018). Turgor maintenance by osmotic adjustment: 40 years of progress. *Journal of Experimental Botany*, 69(13), 3223-3233. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery181>
- WANG, C., & NISHINO, N. (2013). Effects of storage temperature and ensiling period on fermentation products, aerobic stability and microbial communities of total mixed ration silage. *Journal of Applied Microbiology*, 114(6), 1687–1695.
<https://doi.org/10.1111/jam.12200>
- WANG, S., LIU, H., ZHAO, J., DONG, Z., LI, J., & SHAO, T. (2023). Influences of Organic Acid Salts and Bacterial Additives on Fermentation Profile, Aerobic Stability, and In Vitro Digestibility of Total Mixed Ration Silage Prepared with Wet Hulless Barley Distillers' Grains. *Agronomy*, 13(3), 672. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030672>
- WILKINSON, J. M., RINNE, M. (2018). Highlights of progress in silage conservation and future perspectives. *Grass and Forage Science*, 73(1), 40-52. <https://doi.org/10.1111/gfs.12327>
- ZHANG, Y., LIU, Y., MENG, Q., ZHOU, Z., & WU, H. (2020). A mixture of potassium sorbate and sodium benzoate improved fermentation quality of whole-plant corn silage by shifting bacterial communities. *Journal of Applied Microbiology*, 128(5), 1312–1323.
<https://doi.org/10.1111/jam.14571>
- ZOPOLLATTO, M., DANIEL, J. L. P., NUSSIO, L. G. (2009). Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38, 170-189. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982009001300018>

CAPÍTULO I

Sucessão microbiana das comunidades bacterianas e fúngicas, perfil fermentativo, estabilidade aeróbia e perdas de matéria seca em silagem de sorgo inoculada com *Lentilactobacillus buchneri* isoladamente ou em combinação com *Lentilactobacillus hilgardii* em diferentes períodos de ensilagem

RESUMO

A produção de silagem de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] pode ser afetada por seu alto teor de carboidratos solúveis, que intensifica a fermentação, reduz rapidamente o pH e diminui a estabilidade aeróbia, resultando em perdas de nutrientes nas fases anaeróbica e aeróbia. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da inoculação com *Lentilactobacillus buchneri* (Lb) isoladamente, ou em combinação com *Lentilactobacillus hilgardii* (Lh) sobre o perfil fermentativo, a sucessão bacteriana e fúngica, a composição química, perdas de matéria seca e estabilidade aeróbia das silagens do sorgo planta-inteira, ensiladas durante 20, 60 e 100 dias. O experimento foi realizado no Laboratório de Forragicultura da Universidade Federal da Paraíba, localizado em Areia, PB, utilizando um delineamento experimental inteiramente casualizado, arranjado em esquema fatorial 3×3. Os fatores foram: três períodos de fermentação (20, 60 e 100 dias após ensilagem) e três aditivos microbianos (Controle, não inoculado; inoculante comercial à base de Lb, e outro inoculante comercial, composto por Lh com Lb), com cinco repetições por tratamento. Observou-se interação significativa ($P<0,05$) entre os aditivos e o período fermentativo para as variáveis pH, carboidratos solúveis, nitrogênio amoniacal, matéria seca, proteína bruta, população de bactérias ácido-láticas (BAL), ácido lático, ácido acético (AA), ácido propiônico (AP), a relação láctica: acético, ácido butírico, estabilidade aeróbia (EA), temperatura máxima e temperatura média. Houve efeito isolado ($P<0,05$) dos aditivos sobre matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM) e população de leveduras (LEV). O período fermentativo apresentou efeito isolado ($P<0,05$) para MO, MM, LEV e fungos (FUN), temperatura mínima e tempo máxima temperatura. Não houve diferença ($P>0,05$) para fibra em detergente neutro. Os resultados mostraram que a inoculação com Lb e Lb+Lh favoreceu a proliferação de BAL, aumentou a produção de AA e AP, reduziu a população de LEV e eliminou os mofos aos 100 dias de fermentação, promovendo maior EA nos períodos de 60 e 100 dias. A diversidade beta mostrou maior EA nas comunidades bacterianas dos grupos inoculados, enquanto o grupo controle teve maior dispersão e aumento de táxons indesejáveis. *Lentilactobacillus* dominou nos grupos inoculados, e *Kazachstania* foi o principal táxon fúngico. Conclui-se que a inoculação com Lb isolado e combinado com Lh promoveu maior desenvolvimento de BAL melhorou a EA das silagens. Recomenda-se a utilização de Lb ou Lb+Lh e o período de 60 e 100 dias para otimizar a EA de silagens de sorgo.

Palavras-chave: ácido acético, beta diversidade, heterofermentação, taxonomia microbiana

ABSTRACT

The production of sorghum silage [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] can be affected by its high soluble carbohydrate content, which intensifies fermentation, rapidly reduces pH, and decreases aerobic stability, resulting in nutrient losses during both anaerobic phases. The objective of this study was to investigate the effects of inoculation with *Lentilactobacillus buchneri* (Lb) alone or in combination with *Lentilactobacillus hilgardii* (Lh) on the fermentation profile, bacterial and fungal succession, chemical composition, dry matter losses, and aerobic stability of whole-plant sorghum silages ensiled for 20, 60 and 100 days. The experiment was conducted at the Forage Laboratory of the Federal University of Paraíba, located in Areia, PB, using a completely randomized experimental design arranged in a 3×3 factorial scheme. The factors were: three fermentation periods (20-, 60- and 100-days post-ensiling) and three microbial additives (Control, non-inoculated; commercial inoculant based on Lb, and another commercial inoculant composed of Lh with Lb), with five replications per treatment. Significant interaction ($P<0,005$) was observed between the additives and the fermentation period for the variables pH, soluble carbohydrates, ammonia nitrogen, dry matter, crude protein, population of lactic acid bacteria (LAB), lactic acid, acetic acid (AA), propionic acid (PA), lactic: acetic ratio, butyric acid, aerobic stability (AS), maximum temperature, and average temperature. Isolated effects ($P<0,05$) of the additives were observed for organic matter (OM), mineral matter (MM), and yeast population (YP). The fermentation period had an isolated effect ($P<0,05$) on OM, MM, YP, fungi (FUN), minimum temperature, and maximum temperature duration. No differences ($P<0,05$) were observed for neutral detergent fiber. The results showed that inoculation with Lb and Lb+Lh favored LAB proliferation, increased AA and PA production, reduced LEV populations, and eliminated FUN at 100 days of fermentation, promoting greater AS at 60 and 100 days. Beta diversity showed higher AS in the bacterial communities of the inoculated groups, while the control group had higher dispersion and increased undesirable taxa. *Lentilactobacillus* dominated the inoculated groups, and *Kazachstania* was the main fungal taxon. It is concluded that inoculation with Lb alone or combined with Lh promoted greater LAB development and improved the AS of the silages. The use of Lb or Lb+Lh and a fermentation period of 60 to 100 days is recommended to optimize AS.

Keywords: acetic acid, beta diversity, heterofermentation, microbial taxonomy

1 INTRODUÇÃO

A escassez de forragem durante períodos de seca em regiões áridas e semiáridas compromete a produtividade pecuária, mas a ensilagem oferece uma solução ao preservar culturas como o sorgo, que se adapta bem a ambientes secos e possui menor demanda hídrica em comparação ao uso tradicional do milho (Khalifa & Eltahir, 2023). A ensilagem garante um suprimento contínuo de alimento ao longo do ano e atenua os efeitos da seca ao armazenar a forragem em um ambiente anaeróbico, ácido e estável (Muck et al., 2018).

Além da sua adaptação a condições de baixa disponibilidade hídrica, o sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] se destaca pelo rendimento forrageiro, boa capacidade de rebrota e resistência a variações climáticas adversas (Xiao et al., 2021). Essa cultura apresenta características produtivas e um alto valor nutritivo, com teores de matéria seca variando de 220 a 354,1 g/kg, proteína bruta de 90 a 130 g/kg, fibra em detergente neutro de 560 a 700 g/kg e nutrientes digestíveis totais entre 490 a 620 g/kg, com base na matéria seca (Silva et al., 2021). Seu potencial produtivo varia de 9 a 17 t MS/ha, com produção de massa verde de 50 a 70 t/ha (Perazzo et al., 2017).

Embora o sorgo apresente excelentes características produtivas, bem como para produção de silagem, o alto teor de carboidratos solúveis em água, pode causar fermentações intensas, promovendo uma redução acentuada do pH em um curto espaço de tempo, alta produção de ácido láctico, bem como elevado teor de carboidratos solúveis em água residuais (Arriola et al., 2021). Esses elementos servem como substrato para leveduras e fungos filamentosos, ou mesmo bactérias aeróbias, desencadeando um processo fermentativo secundário que leva à rápida deterioração, logo que, silagens com o perfil de fermentação como ocorre na silagem de sorgo sem o uso de aditivos apresentam baixa estabilidade aeróbia e conseqüentemente são propensas a elevadas perdas de nutrientes tanto na fase anaeróbia devido a fermentação alcoólica, como também na fase aeróbia de abertura do silo (Da Silva et al., 2021).

Para minimizar essas perdas, os aditivos desempenham um papel crucial na melhoria do valor nutritivo das silagens, reduzindo a fermentação alcoólica, aumentando a estabilidade aeróbia e diminuindo perdas durante a fermentação e exposição ao ar (Drouin et al., 2021). Entre os aditivos, os inoculantes microbianos, especialmente heterofermentativos como *Lentilactobacillus buchneri* (Lb), tem mostrado resultados promissores. Esse microrganismo se destaca pela produção de ácidos orgânicos, como ácido acético, que possui propriedades antifúngicas, melhorando a estabilidade aeróbia da silagem, uma vez que inibe microrganismos deterioradores e preserva a qualidade do alimento (Arriola et al., 2021).

A eficácia do Lb se torna evidente após um período de fermentação de 45 a 60 dias, quando os níveis de ácido acético atingem valores adequados para garantir a estabilidade aeróbia (Kung et al., 2018). Contudo, a abertura do silo antes desse prazo pode comprometer sua eficácia. Assim, outras cepas estão sendo investigadas para avaliar seu impacto na fermentação e na estabilidade aeróbia. O *Lentilactobacillus hilgardii* (Lh) se destaca por seu desenvolvimento mais rápido na massa ensilada, produzindo compostos antifúngicos precocemente, o que melhora a estabilidade em períodos curtos de fermentação. Essa característica representa uma estratégia eficaz para produtores que necessitam abrir silos a partir dos 30 dias, reduzindo perdas durante períodos de estiagem (Borreani et al., 2018).

A inoculação combinada de Lb e Lh oferece vantagens significativas. Ambas as espécies são bactérias lácticas heterofermentativas obrigatórias, mas o Lh produz ácido láctico e ácido acético por meio da via heterolática e pode produzir ácido acético e 1,2-propanodiol a partir do metabolismo anaeróbico do ácido láctico, com este composto ocasionalmente convertido em ácido propiônico, em um período de fermentação menor comparado ao Lb (Da Silva et al., 2021).

Para uma compreensão mais aprofundada das populações microbianas, torna-se essencial o uso de métodos mais avançados, como técnicas moleculares (Drouin et al., 2019). A metataxonômica, em particular, supera as limitações da microbiologia convencional ao permitir a análise direta do DNA microbiano, abrangendo tanto microrganismos cultiváveis quanto aqueles não cultiváveis. Além disso, possibilita a identificação de genes associados a funções metabólicas específicas, ampliando a compreensão dos processos microbianos em silagens (Drouin et al., 2020).

Neste contexto, o presente estudo propõe que a inoculação da silagem de sorgo forrageiro planta-inteira com a combinação Lb+Lh promova um rápido desenvolvimento da população de bactérias ácido lácticas e produção de compostos antifúngicos, modificando as comunidades bacterianas e fúngicas, diminuindo a fermentação alcoólica e melhorando significativamente a estabilidade aeróbia dessas silagens, mesmo após um período relativamente curto de ensilagem, em comparação com um inoculante de controle positivo à base de apenas Lb. Essa estratégia permitiria aos produtores utilizar a silagem logo após um curto período de fermentação sem comprometer a qualidade nutricional, higiênica e a estabilidade aeróbia.

Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da inoculação com Lb isoladamente, ou em combinação com Lh sobre o perfil fermentativo, a sucessão bacteriana e fúngica, a composição química, perdas de matéria seca e estabilidade aeróbia das silagens de sorgo, armazenadas durante 20, 60 e 100 dias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local experimental, implantação e manejo do sorgo forrageiro

O experimento foi realizado no Laboratório de Forragicultura da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), localizado em Areia, Paraíba, Brasil. O município de Areia está situado na microrregião do Brejo Paraibano, com coordenadas geográficas de latitude Sul 6°58'12", longitude Oeste 35°42'15" e ±619 m de altitude. De acordo com a classificação de Köppen, o clima é do tipo As' (semiárido quente e úmido, com chuvas predominantemente outono a inverno) (Alvares et al., 2013).

A cultivar utilizada foi o sorgo forrageiro BRS Ponta Negra (Guansafra Sementes®, Fortaleza-CE, Brasil) implantado em uma área de 0,76 ha em março de 2023 na Fazenda Quixabá, situada no município de Riachão, Paraíba, Brasil, localizado na latitude Sul 06°32'25" e longitude Oeste 35°39'35", com altitude média de ±175 m e média pluviométrica anual de 432 mm (AESAs, 2024). Realizou-se o preparo do solo por meio de aração e gradagem, corrigido e adubado para atender às exigências em fertilidade para o cultivar do sorgo.

O sorgo forrageiro foi implantado utilizando uma semeadora manual tipo matraca (Semeadora Krupp®, São Leopoldo-RS, Brasil), semeado com aproximadamente 2 cm de profundidade e espaçamento de 0,10 x 0,80 m, com dez sementes por metro linear. A adubação foi realizada durante a semeadura com aplicação de 100 kg/ha na forma de Superfosfato simples (Fertilizantes Heringer®, São Paulo-SP, Brasil). A adubação de cobertura foi realizada no estágio V4 da planta, utilizando 45 kg N/ha na forma de ureia (Fertilizantes Heringer®, São Paulo-SP, Brasil).

2.2 Delineamento experimental, colheita e ensilagem

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com esquema fatorial 3×3, sendo três períodos de fermentação (PF): [20 (D20), 60 (D60) e 100 (D100) dias após ensilagem], três aditivos microbianos (I): [Controle, não inoculado (Control); inoculante comercial à base de *L. buchneri*, Lallemand®, Aparecida de Goiânia-GO, Brasil (Lb) e outro inoculante comercial, composto por *L. hilgardii* CNCM I-4785 com *L. buchneri* NCIMB-40788, Lallemand®, Aparecida de Goiânia-GO, Brasil (Lb+Lh), com cinco repetições por tratamento, totalizando 45 silos experimentais com capacidade de 4 L (630EE, GrouPack®, Cabedelo-PB, Brasil) (55 cm diâmetro × 19 cm altura).

A colheita do sorgo forrageiro BRS Ponta Negra foi realizada de forma manual com auxílio de faca de corte, com aproximadamente 110 dias após o plantio. Em seguida, o material foi processado em máquina forrageira estacionária (EN9-F3B, Nogueira®, Itapira-SP, Brasil) em

tamanhos de partículas de ± 10 mm. Os aditivos microbianos foram aplicados com auxílio de um borrifador tipo spray conforme recomendação do fabricante [3×10^5 unidade formadora de colônia (ufc) g/forragem (1 g/t de forragem)], e diluído em 50 mL de água destilada. O mesmo volume de água destilada utilizado para a aplicação dos inoculantes (Lb e Lb+Lh) também foi adicionado ao tratamento Control. A aplicação dos inoculantes e da água sem inoculante foi realizada sequencialmente, por ordem de repetição, sobre as pilhas de sorgo individuais de 5 kg, em função de cada tratamento experimental. Posteriormente, foi realizada a pesagem dos baldes (peso vazio) e a prensagem do material, estimando a compactação ideal com densidade ± 600 kg MN/m³. Os silos foram devidamente vedados com fita adesiva, pesados e armazenados a temperatura ambiente até o momento da abertura (15 baldes/abertura). Ao todo foram confeccionados 45 silos experimentais, armazenados em temperatura ambiente. As amostras da planta (momento da ensilagem) foram coletadas e analisadas para caracterização do material (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química e populações microbianas do sorgo forrageiro BRS Ponta Negra com aplicação de aditivos microbianos antes da ensilagem.

Variáveis	Inoculante		
	Control	Lb	Lb+Lh
Matéria seca (g/kg MN ^a)	273,80 $\pm$ 2,14	252,55 $\pm$ 0,27	249,93 $\pm$ 0,52
Matéria orgânica (g/kg MS ^b)	953,30 $\pm$ 0,24	958,82 $\pm$ 0,40	949,62 $\pm$ 0,63
Matéria mineral (g/kg MS)	46,69 $\pm$ 0,24	41,18 $\pm$ 0,40	50,37 $\pm$ 0,63
Proteína bruta (g/kg MS)	70,93 $\pm$ 1,42	52,85 $\pm$ 0,37	44,46 $\pm$ 0,007
FDN ^c (g/kg MS)	569,27 $\pm$ 2,35	586,84 $\pm$ 0,97	578,56 $\pm$ 2,58
pH	5,87 $\pm$ 0,04	5,90 $\pm$ 0,14	5,75 $\pm$ 0,03
CHOs ^d (g/kg MS)	122,88 $\pm$ 2,53	139,37 $\pm$ 0,14	142,41 $\pm$ 0,61
CT ^e (Emg NaOH/100g MS)	0,135 $\pm$ 0,01	0,161 $\pm$ 0,006	0,167 $\pm$ 0,009
Populações microbianas (UFC log.10/g) ^f			
Bactérias ácido lácticas	5,38 $\pm$ 0,22	5,36 $\pm$ 0,32	6,14 $\pm$ 0,52
Leveduras	5,57 $\pm$ 0,12	5,59 $\pm$ 0,21	5,50 $\pm$ 0,05
Fungos filamentosos	5,25 $\pm$ 0,10	5,19 $\pm$ 0,008	5,09 $\pm$ 0,04

Inoculante: Control, Controle (sem inoculante). Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri* (Lallemand®, Brasil). Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB-40788 (Lallemand®, Brasil); ^aMN, Matéria natural; ^bMS, Matéria seca; ^cFDNcp, Fibra insolúvel em detergente neutro; ^dCHOs, Carboidratos solúveis em água; ^eCT (Emg NaOH/100g MS), Capacidade tampão expressa em mmol/valência de hidróxido de sódio para cada 100 g de matéria seca; ^fUFC log.10/g, Unidade formadora de colônia/g forragem na escala logarítmica de base 10.

2.3 Coleta e preparo das amostras

Após os períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias, os silos experimentais foram pesados e abertos para a coleta das amostras. Para evitar a contaminação das camadas superficiais devido à exposição ao oxigênio, uma camada superficial foi descartada, com espessura ajustada

conforme as características de cada silo. O material remanescente foi retirado e distribuído sobre uma lona previamente higienizada com álcool, garantindo a integridade microbiológica e química das amostras.

O material foi então homogeneizado para garantir a uniformidade das amostras, seguido de um processo de quarteamento, no qual a porção representativa foi selecionada para análises subsequentes. A primeira fração da silagem foi imediatamente processada para análises de pH, quantificação de ácidos orgânicos, caracterização das populações microbianas e determinação do teor de nitrogênio amoniacal. Uma segunda fração foi acondicionada em sacos de papel para o processo de pré-secagem, visando a análise da composição química. A terceira fração foi reservada para avaliação da estabilidade aeróbia, enquanto a última foi armazenada para análises futuras.

2.4 Perfil fermentativo e perdas de matéria seca

Para analisar os o pH, os teores de ácidos orgânicos, as amostras de 25 g da planta e das silagens aos 20, 60 e 100 dias após ensilagem foram homogeneizadas em 225 mL de solução salina [0,85 g NaCl P.A. (Dinâmica®, São Paulo-SP, Brasil) /100 mL H₂O destilada] em liquidificador industrial (LAR.2, METVISA®, Brusque-SC, Brasil) durante 1min. Posteriormente, o extrato aquoso obtido foi filtrado em gaze estéril de algodão e dividido em três alíquotas.

A primeira alíquota foi usada para medição do pH, utilizando-se potenciômetro digital (K39-1420A, KASVI®, São José dos Pinhais-PR, Brasil). Posteriormente, a segunda alíquota de 50 mL do extrato aquoso foi acidificado (H₂SO₄ P.A. 1:1 v/v, Neon®, Suzano-SP, Brasil) e armazenados a -20°C para análises dos teores de ácidos orgânicos e de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) pelo método descrito por Bolsen et al. (1992). Os teores de carboidratos solúveis em água (CHOs) foram determinados pelo método do ácido sulfúrico concentrado de acordo com a metodologia descrita por Dubois et al. (1956).

As perdas de matéria seca (PMS) foram quantificadas por diferença de pesagem dos baldes (peso inicial subtraindo o peso final expresso em relação ao peso inicial). Sendo calculada de acordo com Magalhães et al. (2012) pela equação:

$$PMS \text{ (g MS/kg MN)} = 1000 - [(MS_{ab}/MS_{fe}) \times 1000]$$

Onde: PMS (g MS/kg MN): perdas de matéria seca em gramas por quilograma de matéria natural; MS_{ab}: kg matéria seca da silagem na abertura (quantidade de silagem em kg × % MS); MS_{fe}: kg matéria seca da forragem no fechamento do silo (quantidade de forragem em kg × % MS).

2.5 Quantificação de populações microbianas e ácidos orgânicos

A segunda alíquota do extrato aquoso foi usada para quantificação dos ácidos orgânicos [ácido láctico (AL), ácido acético (AA), ácido propiônico (AP), e ácido butírico (AB)]. Foi usado 10 mL do extrato aquoso, em que, foi adicionado em tubos de ensaio com tampa rosqueada (AJ03, PlenaLab®, Jundiaí-SP, Brasil) e foram centrifugados em vórtex (Vortex Mixer VX-200, LabNet®, New Jersey, EUA) e adicionado 2,0 mL de ácido metafosfórico P.A. (Neon®, Suzano-SP, Brasil) e a solução formada foi centrifugada (Mikro-120, Hettich Zentrifugen®, Tuttlingen, Germany) durante 15 min a $13.000 \times g$. Após esse processo, o sobrenadante foi coletado armazenado em tubos microtubos de centrifugação tipo eppendorf (CralPlast®, Cotia-SP, Brasil), identificados, selados e congelados até serem analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; SHIMADZU, SPD-10A VP) (Siegfried et al., 1984). As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal e Solos da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

A terceira alíquota do extrato aquoso foi destinada para quantificação das populações microbianas: bactérias ácido lácticas (BAL), leveduras (LEV) e fungos filamentosos (FUN). Foram realizadas diluições seriadas de 10^1 a 10^8 . Em seguida, o plaqueamento foi conduzido em placas de Petri estéreis (90×15mm, FirstLab®, São José dos Pinhais-PR, Brasil) utilizando o método *pour-plate* em meios de cultura (Kung Jr. et al., 2003). O ágar MRS (De Man, Rogosa & Sharpe, K25-1043, Kasvi®, São José dos Pinhais-PR, Brasil) foi utilizado para o cultivo de BAL (37°C/48 h) e ágar DRBC (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) para cultivo de LEV (25°C/72 h) e de FUN (25°C/120 h). Para a quantificação de ufc foram consideradas placas contendo entre 25 e 250 ufc (American Public Health Association, 2015).

2.6 Composição química

As amostras da planta no dia da ensilagem e das silagens, após cada período de abertura dos silos, foram submetidas à secagem parcial em estufa de circulação forçada de ar (55°C/72 h). Em seguida, as amostras foram moídas em moinho de facas (Wiley®, Arthur H. Thomas, PA, EUA), com peneira de crivo de 1mm, para análises da composição química.

As amostras da planta e das silagens 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) e proteína bruta (PB, N $\times$ 6,25, método 984,13) de acordo com AOAC (1990). Nessas amostras também foram determinados os teores de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), utilizando-se α -amilase termoestável sem o uso de sulfito de sódio (Van Soest et al., 1991).

2.7 Estabilidade aeróbia

Para avaliar da estabilidade aeróbia (EA), foi coletado 1 kg de silagem no momento da abertura, pesado e retornado para seu respectivo balde sem compactação. Essas amostras foram expostas durante seis dias (144 horas) em uma sala com temperatura controlada (± 25 °C). Um *data-logger* (AK285 New, AKSO®, São Leopoldo-RS, Brasil) foi inserido no centro da massa de cada silagem, para que a temperatura fosse registrada a cada 10 min. Três outros *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, considerando o início da deterioração quando a temperatura interna das silagens atingiu dois graus Celsius acima da temperatura ambiente (Kung et al., 2021).

2.8 Diversidade microbiana

2.8.1 Extração de DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA

Para cada amostra, 25 g de silagem macerada foram homogeneizadas em 225 mL de PBS padrão. A mistura foi filtrada utilizando gaze estéril e, em seguida, centrifugada a $6.000 \times g$ por 4 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi lavado novamente em PBS para remoção de resíduos. O pellet foi ressuscitado em 900 μ L de PBS antes de ser armazenado a -20 °C. O DNA total foi extraído do pellet usando um kit comercial (PowerSoil DNA Isolation Kit, Qiagen) de acordo com os protocolos do fabricante. As regiões hipervariáveis V3-V4 do gene 16S rRNA microbiano foram amplificadas por PCR com as seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 3 minutos, a 95 °C por 30 segundos (s), anelamento a 55 °C por 30 s, e extensão a 72 °C por 30 s repetindo 25 ciclos, usando os primers 341F: 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG-30 e 785R: 50-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C-3'. A preparação da biblioteca foi realizada de acordo com o protocolo padrão do gene 16S rRNA da Illumina (Illumina). Os produtos da ampliação foram visualizados em gel de agarose 1,5% (120 volts por 60 minutos) para verificar a integridade das bandas antes da purificação do amplicon usando AMPure bead (Beckman Coulter). Os produtos purificados do PCR foram quantificados por fluorometria (Qubit2.0, Life Invitrogen) e a qualidade foi avaliada usando um sistema de eletroforese capilar (Fragment Analyzer, Agilent). O sequenciamento foi realizado com o kit Illumina V2 (2 x 250 ciclos) usando Illumina MiSeq. A concentração final da biblioteca foi obtida após carregar 6 pM na célula de fluxo, com 15% PhiX para comparação de diversidade.

2.8.2 Análise da comunidade bacteriana baseada no gene marcador 16S rRNA

As reads brutas (pareadas e demultiplexadas) foram importadas para o QIIME2 v. 2023.2 (Bolyen et al., 2019). O DADA2 foi utilizado para filtrar leituras de baixa qualidade e gerar uma tabela de abundância com Amplicon Sequence Variants (ASVs) únicas, usando as configurações padrão com ambas as reads truncadas em 240 bp (Callahan et al., 2016). Um classificador de baseado no banco de dados SILVA v.138 treinado nas regiões hipervariáveis V3-V4 do gene 16S rRNA usando o método Naive Bayes foi aplicado para a classificação taxonômica de todas as amostras (Quast et al., 2013). Os nomes dos táxons no nível de filo foram atualizados de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura para Procariontes (ICNP) de 2021 (Oren & Garrity, 2021). Um classificador baseado no Genome Taxonomy Database (GTDB) v. 207.0 foi usado para reclassificar ASVs previamente classificadas como *Lactobacillus* para identificar as novas categorias de lactobacilos que fazem parte das 23 novas classificações de micróbios (Zheng et al., 2020). ASVs classificados como cloroplasto, Rhizobiales e D__0 foram removidos do estudo. A árvore filogenética enraizada foi construída com base no SATé-enabled Phylogenetic Placement (SEPP) para análises filogenéticas (Mirarab et al., 2012).

As amostras foram normalizadas para análises de diversidade comunitária. As figuras foram plotadas no R v. 4.1.3 usando os pacotes ggplot2, phyloseq e microbiomeR para análise de diversidade da comunidade microbiana (McMurdie & Holmes, 2013; Gilmore et al., 2019). Para análise de diversidade alfa, foram calculados o número de features identificadas, os índices de entropia de Shannon e diversidade filogenética de Faith para avaliar a riqueza da comunidade microbiana, definida como o número de espécies diferentes em cada comunidade, enquanto os índices de uniformidade de Simpson e Pielou foram calculados para avaliar a uniformidade da comunidade microbiana, definida como a distribuição uniforme entre as diferentes espécies (Thukral, 2017). Para a análise de diversidade beta, as métricas que são sensíveis à relação filogenética foram empregadas: Weighted Unifrac, a qual leva em conta a abundância de espécies, e a métrica Unweighted Unifrac, que não leva em conta a abundância de espécies (Lozupone & Knight, 2015).

2.9 Análises estatísticas

Todos os dados foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade e homogeneidade de variâncias. Os dados da avaliação microbiológica expressos em unidades formadoras de colônia (ufc) foram transformados para unidade logarítmica na base dez (UFC log₁₀). Os dados foram analisados de acordo com o delineamento experimental inteiramente casualizado, arranjado em esquema fatorial 3 × 3, com três períodos de fermentação e

três aditivos, com nove tratamentos fatoriais e cinco repetições, conforme o seguinte modelo estatístico:

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

Em que: Y_{ijk} = variável resposta; μ = média geral; PF_i = efeito do período de fermentação i (efeito fixo); I_j = efeito de inoculante j (efeito fixo); $(PF \times I)_{ij}$ = efeito da interação entre período de fermentação e inoculante ij (efeito fixo); e_{ijk} = erro experimental aleatório.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), quando significativo para efeito de período de fermentação ou para efeito de aditivo ou interação entre período de fermentação e aditivo onde foi realizado o desdobramento destes, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a um nível de significância de 5%, como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I, utilizando o software Sisvar (Ferreira, 2019).

A diversidade alfa microbiana foi analisada por meio do teste não paramétrico Kruskal-Wallis para comparações entre todos os grupos, enquanto o teste de soma de postos Wilcoxon Mann-Whitney foi utilizado para comparações pareadas entre os grupos. O teste de Análise de Variância Multivariada por Permutação (PERMANOVA) foi usado com comparações pareadas e 999 permutações para comparar a significância das dissimilaridades das matrizes de distância entre amostras e seus respectivos grupos para análise de diversidade beta. A Análise Discriminante Linear do Tamanho do Efeito (LEfSe) foi usada para analisar a abundância diferencial de gêneros específicos entre os tratamentos (Segata et al., 2011).

A correlação de Spearman foi aplicada utilizando as contagens de abundância de *Lentilactobacillus* para os grupos inoculados e de *Lactiplantibacillus*, *Levilactobacillus* e *Secundilactobacillus* para o grupo controle, com os valores transformados em log10 da média de pH e temperatura.

3 RESULTADOS

3.1 Perfil fermentativo e perdas de matéria seca

Observou-se interação significativa entre $PF \times I$ ($P < 0,05$) para pH, CHOs, N-NH₃ e PMS (Tabela 2). A silagem Control apresentou o maior pH em D20, enquanto o Lb registrou o menor em D100. O teor de CHOs foi maior no Lb em D20 (45,35 g/kg MS), com redução em D100 para todos os tratamentos. Em D20, o N-NH₃ foi mais alto no Lb+Lh (5,67 g/kg NT), enquanto o Lb (4,75 g/kg NT) não diferiu do Control (4,13 g/kg NT). Em D20, Lb+Lh manteve as maiores concentrações (6,15 g/kg NT), e em D100, o Lb destacou-se (6,94 g/kg NT). As menores PMS ocorreram no Lb em D20 (108,83 g/kg MS) e no Lb+Lh em D100 (99,72 g/kg MS). O PF

influenciou pH, CHOs, N-NH₃ e PMS, enquanto o I não teve efeito significativo sobre CHOs, N-NH₃ e PMS.

Tabela 2. Perfil fermentativo e perdas de matéria seca (PMS) das silagens à base de sorgo forrageiro inoculadas com *Lentilactobacillus buchneri* e *Lentilactobacillus hilgardii* armazenadas durante 20, 60 e 100 dias.

Período F. ^a	Inoculante ^b			Média	EPM ^c	<i>P-valor</i> ^d		
	Control	Lb	Lb+Lh			PF	I	PF×I
pH								
20d	3,62 Aa	3,56 Ba	3,55 Ba	3,58 a	0,005	<0,001	<0,001	<0,001
60d	3,53 Ab	3,54 Aa	3,55 Aa	3,54 b				
100d	3,33 Bc	3,28 Cb	3,37 Ab	3,33 c				
Média	3,50 A	3,46 B	3,49 A					
CHOs ^e (g/kg MS)								
20d	37,19 Ba	45,35 Aa	34,44 Ba	38,99 a	1,32	<0,001	0,440	<0,001
60d	34,68 BAa	24,89 Bb	36,37 Aa	31,98 b				
100d	28,86 Ab	24,12 Ab	23,69 Ab	25,55 c				
Média	33,57	31,45	31,50					
N-NH ₃ (g/kg NT) ^f								
20d	4,13 Bb	4,75 ABb	5,67 Aa	4,85 b	0,21	<0,001	0,061	0,002
60d	4,55 Bb	5,16 ABb	6,15 Aa	5,29 b				
100d	6,46 ABa	6,94 Aa	5,41 Ba	6,27 a				
Média	5,04	5,62	5,74					
PMS (g/kg MS)								
20d	192,38 Aa	108,83Bab	184,18 Aa	161,79 a	10,0	0,002	0,150	<0,001
60d	97,71 ABb	80,35 Bb	145,66 Aab	107,91 b				
100d	141,28ABab	167,65 Aa	99,72 Bb	136,22ab				
Média	143,79	118,94	143,19					

^aPeríodo F.: 20d, silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação. 60d, silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação. 100d, silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação; ^bInoculante: Control, Controle (sem inoculante). Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri* (Lallemand®, Brasil). Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 (Lallemand®, Brasil); ^cEPM, Erro padrão da média; ^dP-valor, Probabilidade de efeitos para Período Fermentação (PF), Inoculante (I) e interação PF com I (PF×I); ^eCHOs, carboidratos solúveis em água; ^fN-NH₃ (g/kg NT), nitrogênio amoniacal expresso em relação ao nitrogênio total. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas linhas e as médias seguidas por letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si para efeito de Inoculante e efeito de Período de fermentação, respectivamente, de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$).

3.2 Populações microbianas e ácidos orgânicos

Observou-se interação significativa entre PF × I ($P < 0,05$) para a população de BAL (Tabela 3). Em D20, as maiores contagens foram observadas nas silagens inoculadas com Lb+Lh (8,09 log₁₀ UFC/g) e Lb (7,60 log₁₀ UFC/g). O Lb+Lh manteve-se superior em D60 e D100, com contagens de 7,48 e 5,83 log₁₀ UFC/g, respectivamente. O efeito isolado do PF mostrou que as

menores contagens de LEV ocorreram em D60 (1,40 log₁₀ UFC/g), enquanto em D100 aumentaram para 4,16 log₁₀ UFC/g. As contagens de FUN foram maiores em D20 e D60, com eliminação total em D100. Para os I, houve um efeito significativo nas contagens de BAL e LEV, com maiores contagens de BAL no Lb+Lh (7,13 log₁₀ UFC/g) e as menores contagens de LEV nos tratamentos Lb+Lh (2,12 log₁₀ UFC/g) e Lb (2,78 log₁₀ UFC/g). Não houve efeito significativo dos I sobre FUN, com média de 1,50 log₁₀ UFC/g.

Tabela 3. Quantificação das populações microbianas de bactérias ácido lácticas (BAL), leveduras (LEV) e de fungos filamentosos (FUN) das silagens à base de sorgo forrageiro inoculadas com *Lentilactobacillus buchneri* e *Lentilactobacillus hilgardii* armazenadas durante 20, 60 e 100 dias.

Período F. ^a	Inoculante ^b			Média	EPM ^c	P-valor ^d		
	Control	Lb	Lb+Lh			PF	I	PF×I
BAL (log10 UFC/g) ^e								
20d	6,36 Ba	7,60 Aa	8,09 Aa	7,35 a	0,11	<0,001	<0,001	0,014
60d	6,67 Ba	6,73 Bb	7,48 Aa	6,96 b				
100d	5,10 Bb	5,71 ABc	5,83 Ab	5,55 c				
Média	6,04 C	6,68 B	7,13 A					
LEV (log10 UFC/g)								
20d	3,00	2,37	2,51	2,63 b	0,25	<0,001	0,009	0,170
60d	1,81	1,34	1,04	1,40 c				
100d	5,03	4,63	2,81	4,16 a				
Média	3,28 A	2,78 AB	2,12 B					
FUN (log10 UFC/g)								
20d	2,33	2,09	2,10	2,17 a	0,12	<0,001	0,063	0,114
60d	2,69	2,57	1,75	2,34 a				
100d	0,00	0,00	0,00	0,00 b				
Média	1,67	1,55	1,28					

^aPeríodo F.: 20d, silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação. 60d, silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação. 100d, silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação; ^bInoculante: Control, Controle (sem inoculante). Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri* (Lallemand®, Brasil). Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 (Lallemand®, Brasil); ^cEPM, Erro padrão da média; ^dP-valor, Probabilidade de efeitos para Período Fermentação (PF), Inoculante (I) e interação PF com I (PF×I); ^elog₁₀ UFC/g, Unidade formadora de colônia/g forragem na escala logarítmica de base 10. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas linhas e as médias seguidas por letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si para efeito de Inoculante e efeito de Período de fermentação, respectivamente, de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Observou-se interação significativa entre PF × I ($P < 0,05$) para os ácidos orgânicos (Tabela 4). O AL foi mais elevado na silagem Control em D20 (52,06 g/kg MS) e no Lb em D100 (71,14 g/kg MS). A concentração de AA foi maior no tratamento Lb+Lh em D60 (26,96 g/kg MS) e no Lb em D100 (39,48 g/kg MS). A relação AL: AA foi maior no Control, com média de 2,37. O AP

teve as maiores concentrações no Lb em D20 (14,26 g/kg MS) e D100 (10,23 g/kg MS), com menores concentrações no Lb+Lh em D100 (7,13 g/kg MS). O AB foi maior no Lb em D20 (0,14 g/kg MS) e D100 (0,10 g/kg MS). O PF influenciou todos os ácidos, enquanto o I afetou principalmente AL, AA e AP.

Tabela 4. Teores de ácidos orgânicos das silagens à base de sorgo forrageiro inoculadas com *Lentilactobacillus buchneri* e *Lentilactobacillus hilgardii* armazenadas durante 20, 60 e 100 dias.

Período F. ^a	Inoculante ^b			Média	EPM ^c	P-valor ^d		
	Control	Lb	Lb+Lh			PF	I	PF×I
Ácido láctico (AL, g/kg MS ^e)								
20d	52,06 Aa	48,17 Bb	49,95 ABab	50,06 b	0,53	<0,001	<0,001	<0,001
60d	42,51 Bb	49,37 Ab	47,89 Ab	46,59 c				
100d	44,48 Cb	71,14 Aa	52,36 Ba	56,00 a				
Média	46,35 C	56,22 A	50,07 B					
Ácido acético (AA, g/kg MS)								
20d	22,18 Aa	21,88 Ab	21,71 Ab	21,92 b	0,32	<0,001	<0,001	<0,001
60d	18,32 Cb	22,41 Bb	26,96 Aa	22,56 b				
100d	18,14 Cb	39,48 Aa	28,22 Ba	28,62 a				
Média	19,55 C	27,92 A	25,63 B					
Relação AL:AA								
20d	2,35 Aab	2,21 Ba	2,30 ABa	2,84 a	0,02	<0,001	<0,001	<0,001
60d	2,32 Ab	2,20 Ba	1,78 Cb	2,10 b				
100d	2,45 Aa	1,80 Bb	1,86 Bb	2,04 c				
Média	2,37 A	2,07 B	1,98 C					
Ácido propiônico (AP, g/kg MS)								
20d	8,09 Ba	14,26 Aa	10,02 Ba	10,79 a	0,37	0,002	<0,001	0,003
60d	8,97 Aa	9,19 Ab	8,93 Aab	9,03 b				
100d	9,36 Aba	10,23 Ab	7,13 Bb	8,91 b				
Média	8,81 B	11,23 A	8,69 B					
Ácido butírico (AB, g/kg MS)								
20d	0,08 Ca	0,14 Aa	0,10 Ba	0,11 a	0,01	0,001	<0,001	<0,001
60d	0,09 Aa	0,09 Ab	0,09 Aab	0,09 b				
100d	0,09 Aba	0,10 Ab	0,07 Bb	0,09 b				
Média	0,09 B	0,11 A	0,08 B					

^aPeríodo F.: 20d, silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação. 60d, silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação. 100d, silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação; ^bInoculante: Control, Controle (sem inoculante). Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri* (Lallemand®, Brasil). Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 (Lallemand®, Brasil); ^cEPM, Erro padrão da média; ^dP-valor, Probabilidade de efeitos para Período Fermentação (PF), Inoculante (I) e interação PF com I (PF×I). ^eMS: Matéria seca. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas linhas e as médias seguidas por letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si para efeito de Inoculante e efeito de Período de fermentação, respectivamente, de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$).

3.3 Composição química

Observou-se interação significativa entre PF × I ($P < 0,05$) para MS e PB (Tabela 5). A silagem Control apresentou os maiores teores de MS e PB em D20 (254,49 e 61,23 g/kg MS), enquanto o Lb teve os maiores teores em D60 (262,80 e 72,92 g/kg MS). Em D100, a silagem inoculada com Lb+Lh registrou os maiores teores de MS e PB. Para os teores de MO e MM, o tempo de fermentação teve efeito isolado, com o maior teor de MO observado em D60 (949,22 g/kg MS), seguido pelos D100 e D20 (946,97 e 948,81 g/kg MS, respectivamente). O I também teve efeito isolado, com as silagens Control e Lb apresentando maiores teores de MO (949,50 e 948,78 g/kg MS) em comparação à silagem inoculada com Lb+Lh (946,72 g/kg MS). Em relação ao teor de MM, a silagem em D100 apresentou maior valor em comparação a D60 e D20, enquanto a silagem inoculada com Lb+Lh teve maior teor de MM do que as silagens Control e Lb. Não houve efeito de PF ou I sobre o teor de FDN, que apresentou valor médio de 628,25 g/kg MS.

Tabela 5. Composição química das silagens à base de sorgo forrageiro inoculadas com *Lentilactobacillus buchneri* e *Lentilactobacillus hilgardii* armazenadas durante 20, 60 e 100 dias.

Período F. ^a	Inoculante ^b			Média	EP M ^c	<i>P-valor</i> ^d		
	Control	Lb	Lb+Lh			PF	I	PF×I
Matéria seca (g/kg MN ^e)								
20d	254,49 Aa	229,75 Bb	233,35 Bb	239,20 b	2,51	<0,001	0,049	<0,001
60d	256,90 ABa	262,30 Aa	245,57 Bb	254,92 a				
100d	247,68 Ba	240,12 Bb	262,80 Aa	250,20 a				
Média	253,02 A	244,06 B	247,24 AB					
Matéria orgânica (g/kg MS ^f)								
20d	949,84	947,94	948,65	948,81 ab	0,56	0,017	0,003	0,094
60d	950,59	949,50	947,56	949,22 a				
100d	948,07	948,89	943,94	946,97 b				
Média	949,50 A	948,78 A	946,72 B					
Matéria mineral (g/kg MS)								
20d	50,16	52,06	51,35	51,20 ab	0,56	0,017	0,003	0,094
60d	49,41	50,50	52,44	50,78 b				
100d	51,93	51,11	56,06	53,03 a				
Média	50,50 B	51,22 B	53,28 A					
Proteína bruta (g/kg MS)								
20d	61,23 Aa	55,09 Bb	53,36 Bc	56,56 b	0,74	<0,001	<0,001	<0,001
60d	58,75 Ba	66,34 Aa	60,21 Bb	61,76 a				
100d	53,30 Bb	55,67 Bb	72,92 Aa	60,63 a				
Média	57,76 B	59,03 B	62,16 A					
Fibra em detergente neutro (g/kg MS ^g)								
20d	627,45	638,47	610,46	625,46	6,21	0,325	0,498	0,075

20d	25,56 Ac	25,14 Ab	25,18 Ab	25,29 b				
60d	30,56 Ab	25,28 Bb	25,14 Bb	26,99 b	0,63	<0,001	<0,001	0,014
100d	37,36 Aa	30,46 Ba	29,70 Ba	32,51 a				
Média	31,16 A	26,96 B	26,67 B					

^aPeríodo F.: 20d, silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação. 60d, silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação. 100d, silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação; ^bInoculante: Control, Controle (sem inoculante). Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri* (Lallemand®, Brasil). Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788 (Lallemand®, Brasil); ^cEPM, Erro padrão da média; ^dP-valor, Probabilidade de efeitos para Período Fermentação (PF), Inoculante (I) e interação PF com I (PF×I). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas linhas e as médias seguidas por letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si para efeito de Inoculante e efeito de Período de fermentação, respectivamente, de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$).

3.5 Diversidade microbiana

Foram recuperados 3997 e 1818 ASVs após a etapa de desnoising para os conjuntos de dados bacterianos e fúngicos, respectivamente, o que foi suficiente para cobrir a diversidade de espécies em todos os grupos.

Não houve diferença significativa nos índices de diversidade alfa entre os diferentes períodos de abertura dos silos para as comunidades bacterianas, enquanto o uso de inoculantes e seus efeitos de interação foram significativos ($P < 0,01$) (Figura 1). O grupo Control apresentou inicialmente valores ligeiramente baixos de riqueza e uniformidade bacteriana em D20, mas esse padrão se inverteu em D60 e D100, com o grupo Control exibindo índices de diversidade alfa significativamente mais altos do que os grupos inoculados (Figura 1). Por outro lado, o PF e sua interação com a inoculação tiveram efeito significativo ($P < 0,01$) sobre as comunidades fúngicas, enquanto o uso isolado de inoculantes não apresentou influência significativa (Figura 2).

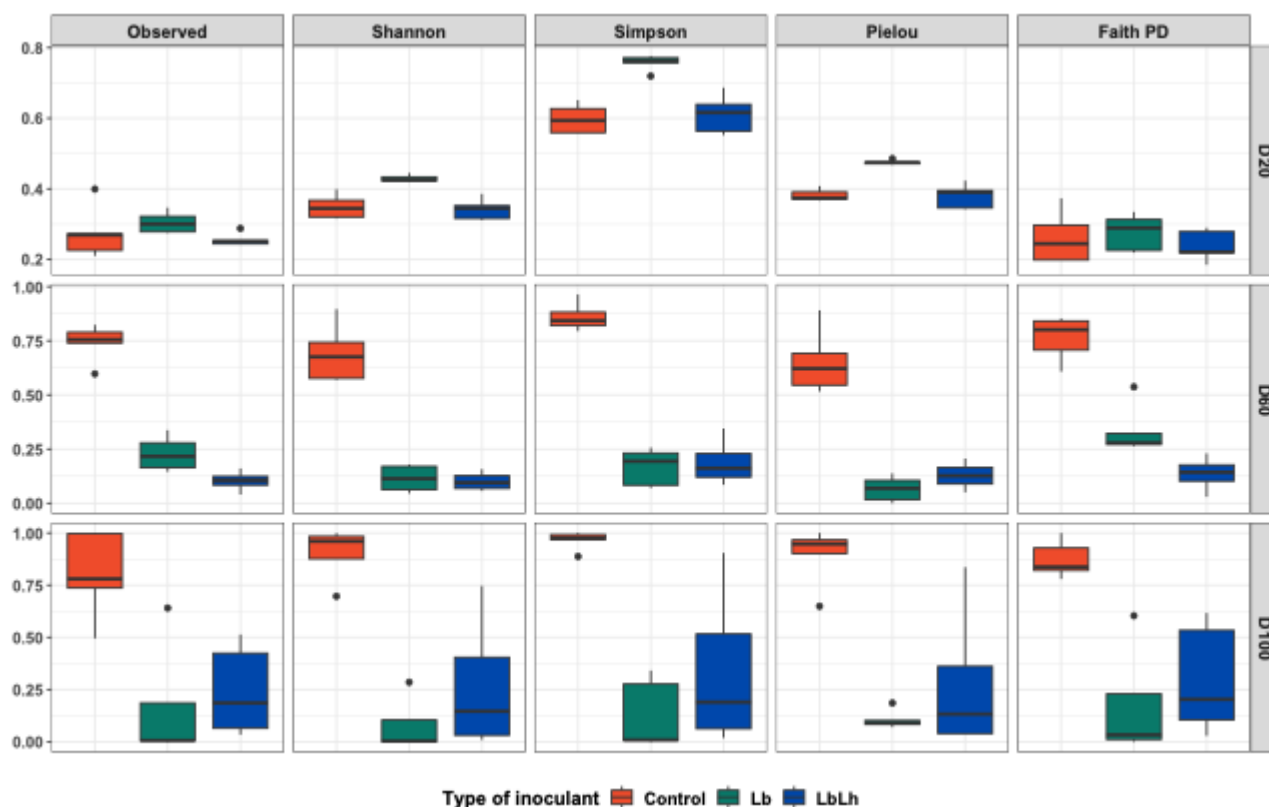


Figura 1. Índices de diversidade alfa bacteriana (Observed, Shannon, Simpson, Pielou e Faith PD) em silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788.

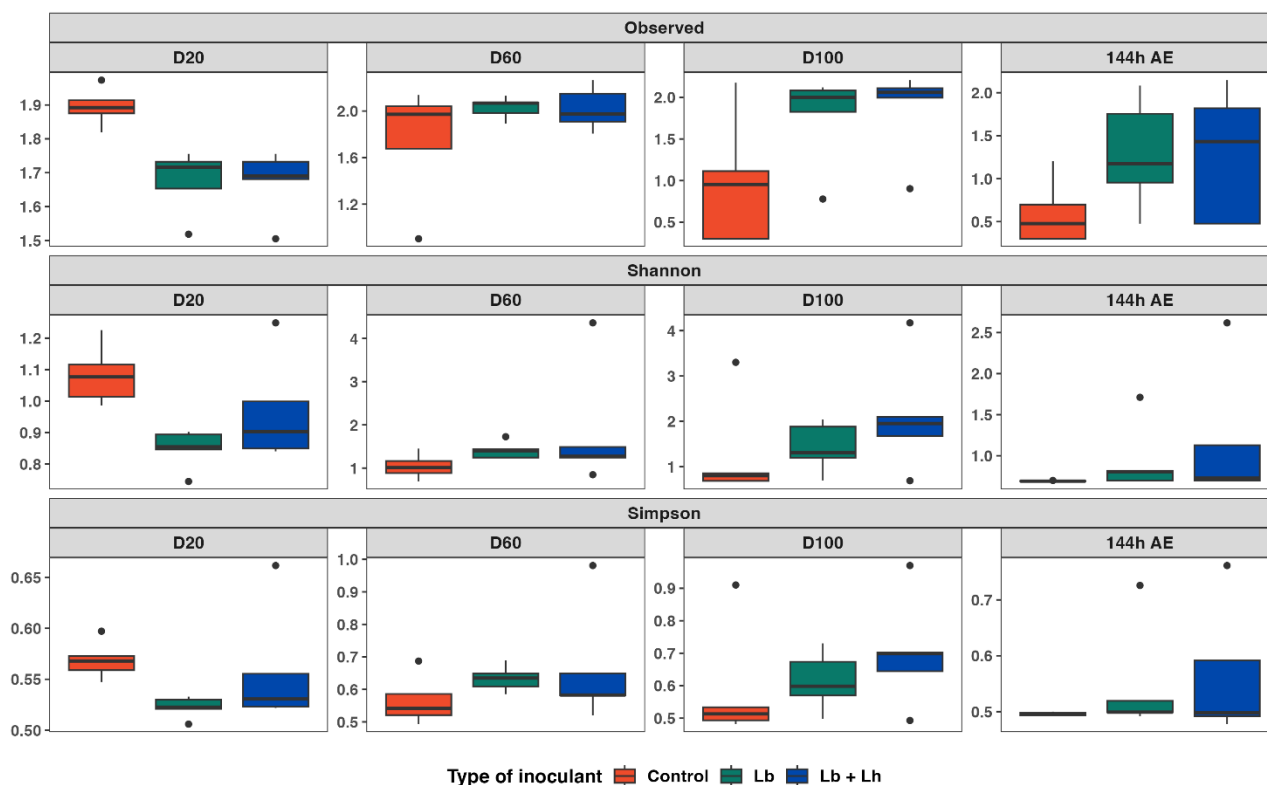


Figura 2. Índices de diversidade alfa fúngica (Observed, Shannon, Simpson, Pielou e Faith PD) em silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788.

A diversidade beta revelou uma composição bacteriana distintamente diferente entre todos os grupos, com ambos os fatores (tempo e inoculação) e sua interação sendo altamente significativos ($P < 0,01$). Foram observadas formações de clusters distintos em D20, que se dispersaram progressivamente em D60 e D100, indicando aumento na dispersão e dissimilaridade, especialmente ao comparar os grupos inoculados com o Control (Figura 3). As comunidades fúngicas apresentaram maior dissimilaridade entre os grupos em D20, com maior dispersão e formação de clusters menos evidentes em D60 e D100, além de 144h de exposição ao ar (Figura 4).

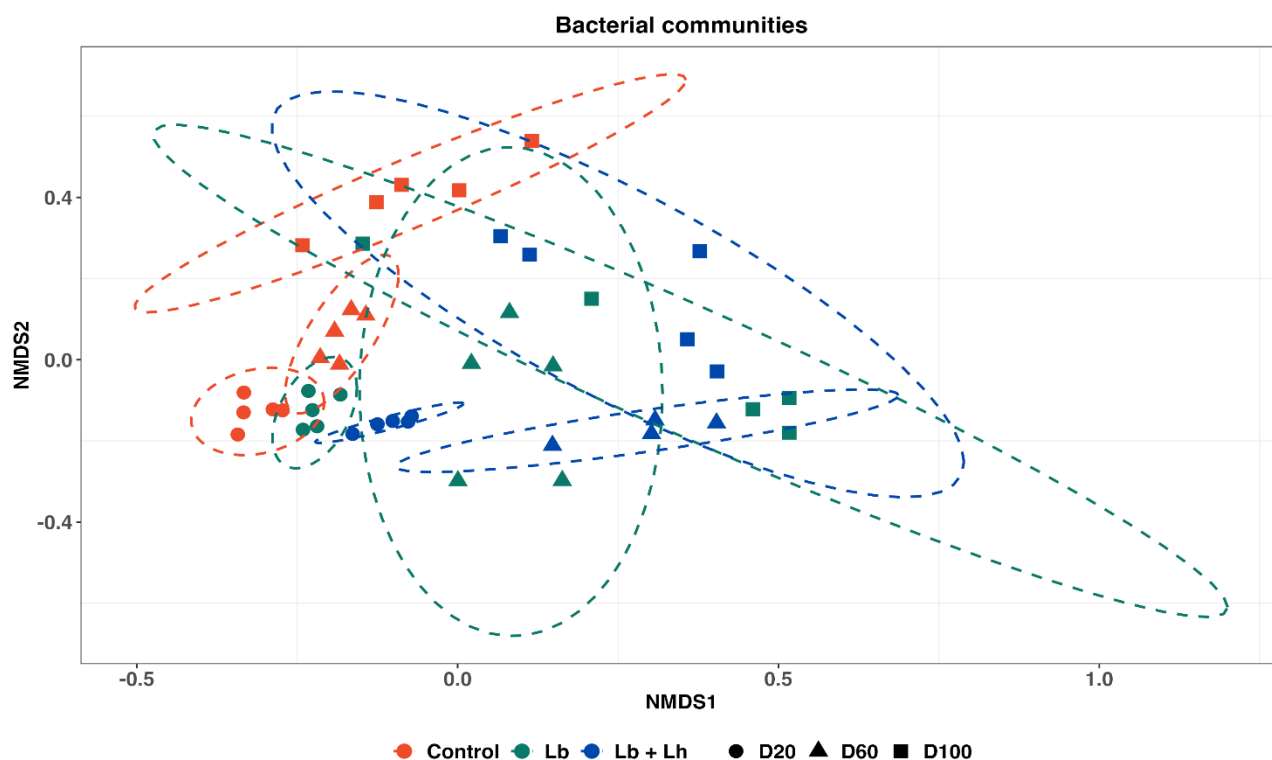


Figura 3. Análise de coordenadas não métricas multidimensionais (NMDS) baseada na matriz de distância Bray-Curtis das comunidades bacterianas nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788.

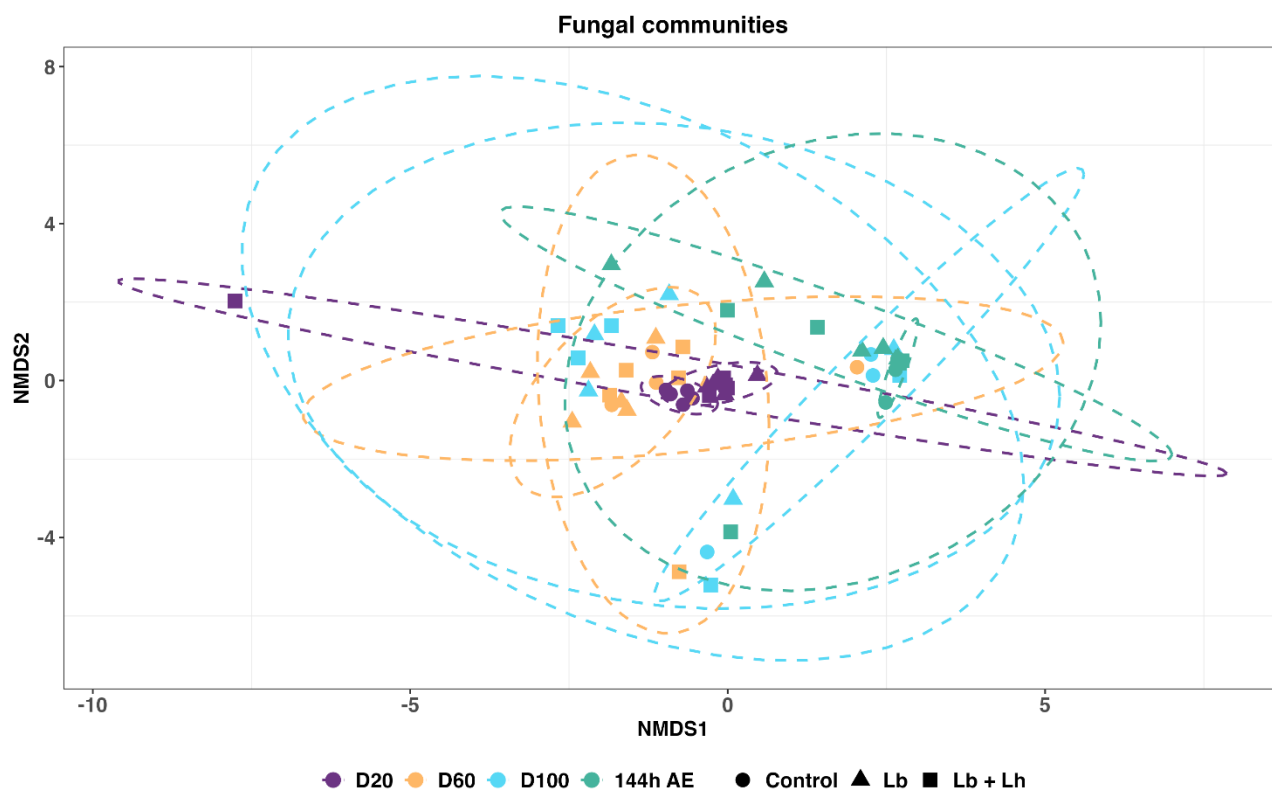


Figura 4. Análise de coordenadas não métricas multidimensionais (NMDS) baseada na matriz de distância Bray-Curtis das comunidades fúngicas nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias, e após 144 horas de exposição aeróbia. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação; 144h AE: silagem exposta ao ar por 144 horas. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788.

O gráfico de abundância relativa mostrou o filo *Bacillota* como predominante em todos os grupos, com aumento progressivo das proporções de *Pseudomonadota* e *Actinomycetota* em D60 e D100 (Figura 5). Nos dados fúngicos, os filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* foram os principais táxons identificados (Figura 6).

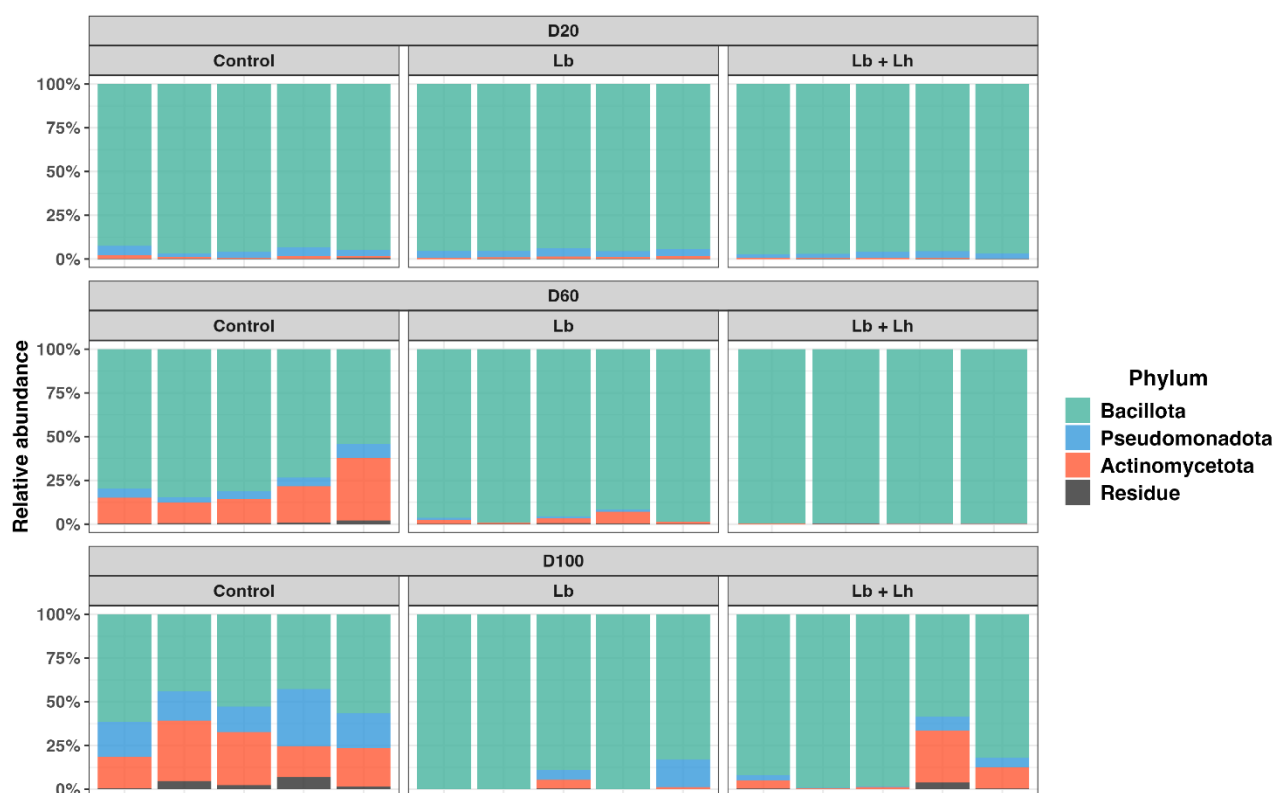


Figura 5. Abundância relativa dos filos bacterianos nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788.



Figura 6. Abundância relativa dos filos fúngicos nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias, e após 144 horas de exposição aeróbia. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação; 144h AE: silagem exposta ao ar por 144 horas. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788.

A família *Lactobacillaceae* foi a principal responsável pela fermentação da silagem de sorgo em todos os grupos em D20 (Figura 7). Embora os grupos inoculados mantivessem essa família como a mais abundante ao longo do tempo, o grupo CTRL apresentou um aumento em outros táxons, como *Micrococcaceae*, *Bacillaceae_D*, *Moraxellaceae*, *Staphylococcaceae*, *Clostridiaceae*, *Paenibacillaceae* e *Lachnospiraceae* em D60 e D100 (Figura 7). A família *Saccharomycetaceae* foi amplamente distribuída em todos os grupos, dominando a composição fúngica em nível de família, seguida por *Mycosphaerellaceae*, *Glomerellaceae* e *Aspergillaceae*, que estavam presentes em algumas amostras (Figura 8).

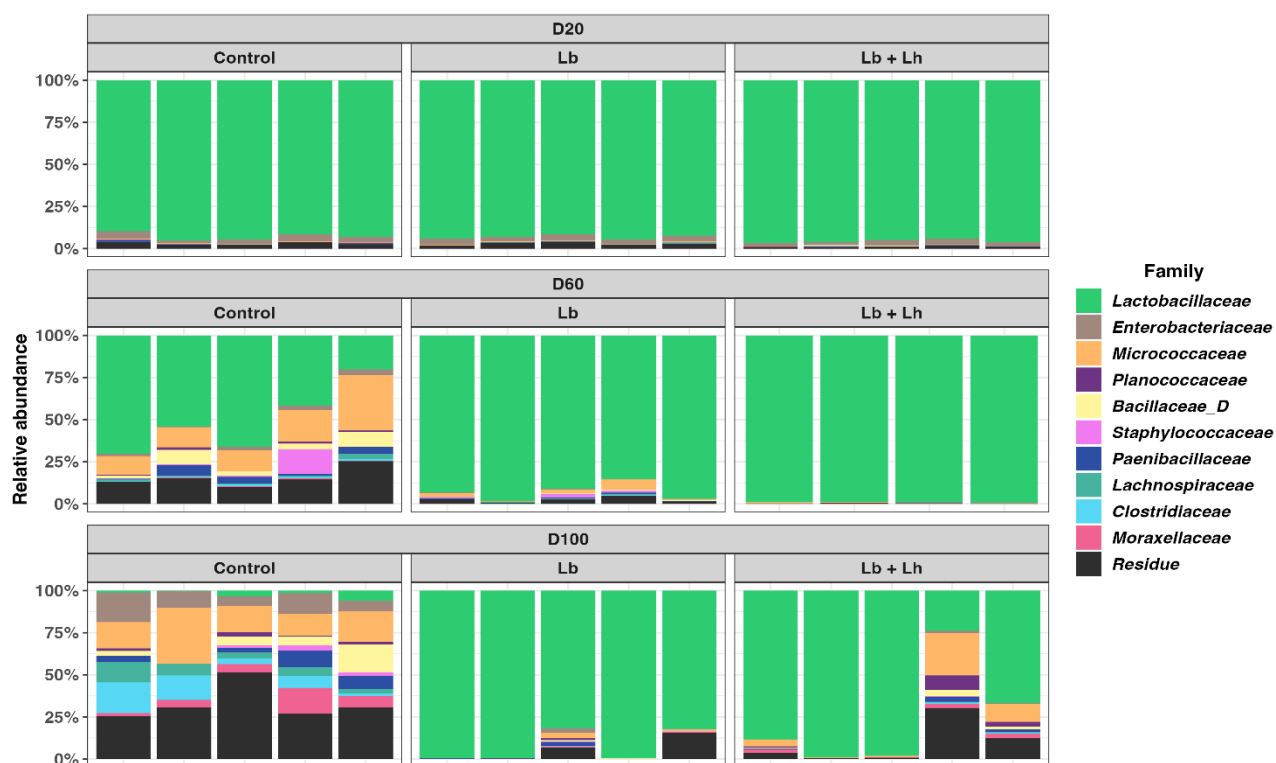


Figura 7. Abundância relativa das famílias bacterianas nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788.

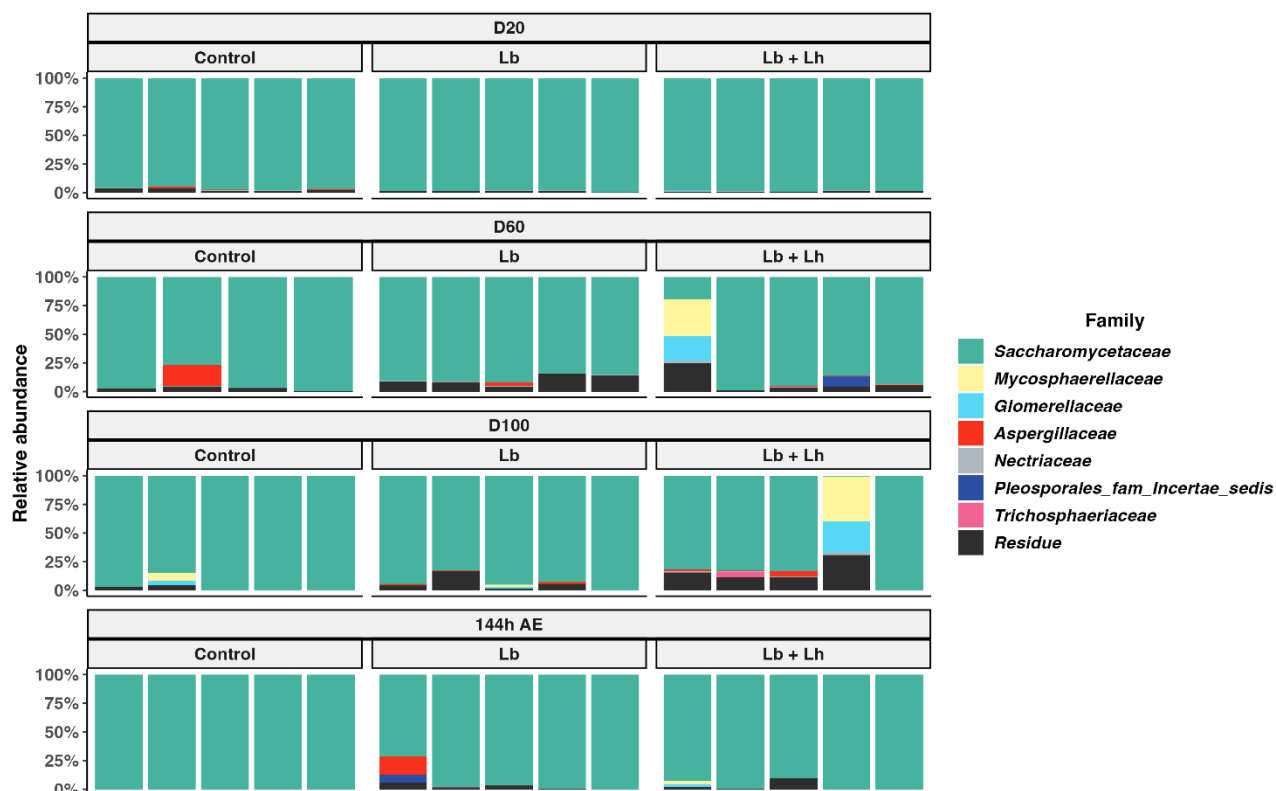


Figura 8. Abundância relativa das famílias fúngicas nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias, e após 144 horas de exposição aeróbia. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação; 144h AE: silagem exposta ao ar por 144 horas. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788.

O padrão fermentativo também foi influenciado pela inoculação, conforme mostrado no gráfico de gêneros. *Lentilactobacillus* foi o gênero mais prevalente em D20 no grupo Lb+Lh e, em menor proporção, no grupo Lb, enquanto no grupo Control não teve efeito, com *Lactiplantibacillus* sendo o táxon mais abundante (Figura 9). Os gêneros *Lactocaseibacillus*, *Secundilactobacillus* e *Levilactobacillus* também contribuíram para a fermentação no estágio inicial (Figura 9). Enquanto os grupos inoculados permaneceram estáveis ao longo do tempo, o grupo Control apresentou mudança na composição microbiana em D60, com aumento na abundância relativa de *Alkalihalobacillus* A, *Clostridium_B*, *Paenibacillus* e *Staphylococcus*, além de uma inversão microbiana completa impulsionada por clostrídios e outros táxons não BAL, como *Lelliottia* (Figura 9). A análise de abundância diferencial mostrou o mesmo padrão, com a dominância de comunidades em todos os períodos de abertura, enquanto o grupo Control apresentou táxons não BAL predominantes em D60 e D100 (Figuras 10, 11 e 12).

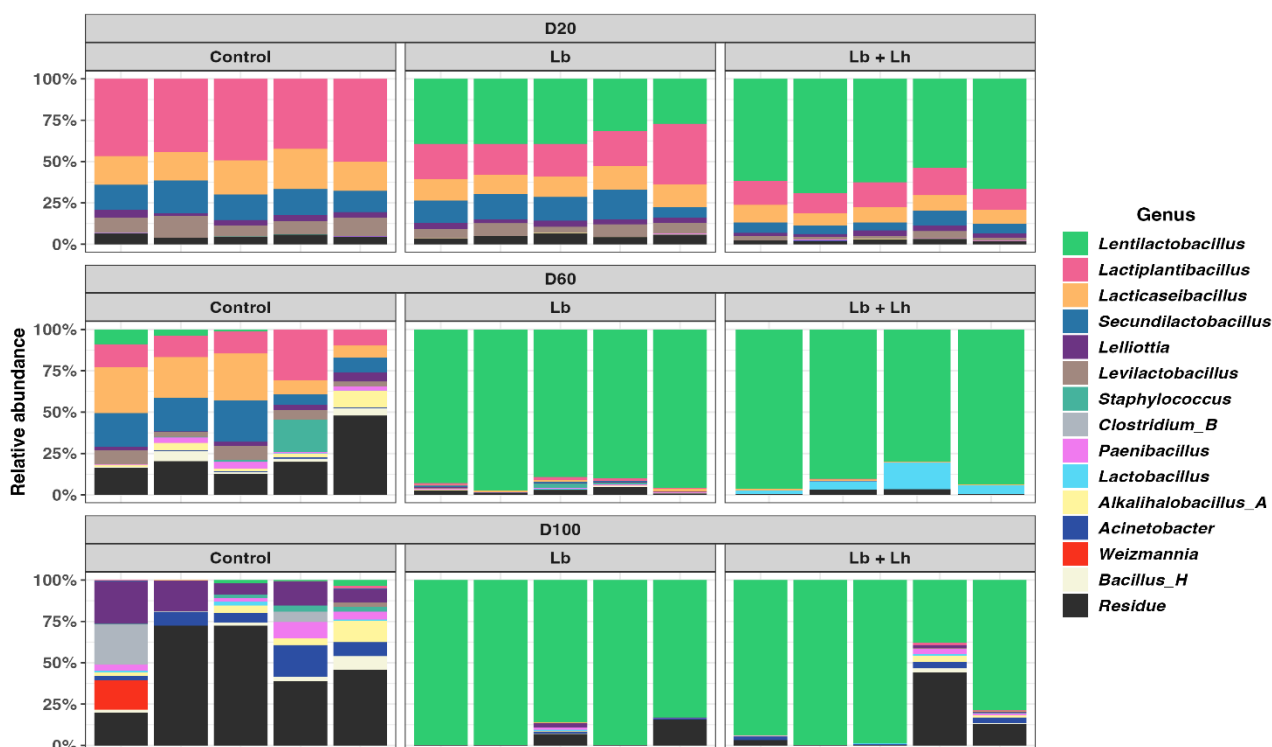


Figura 9. Abundância relativa dos gêneros bacterianos nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro

inoculada após 100 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788.

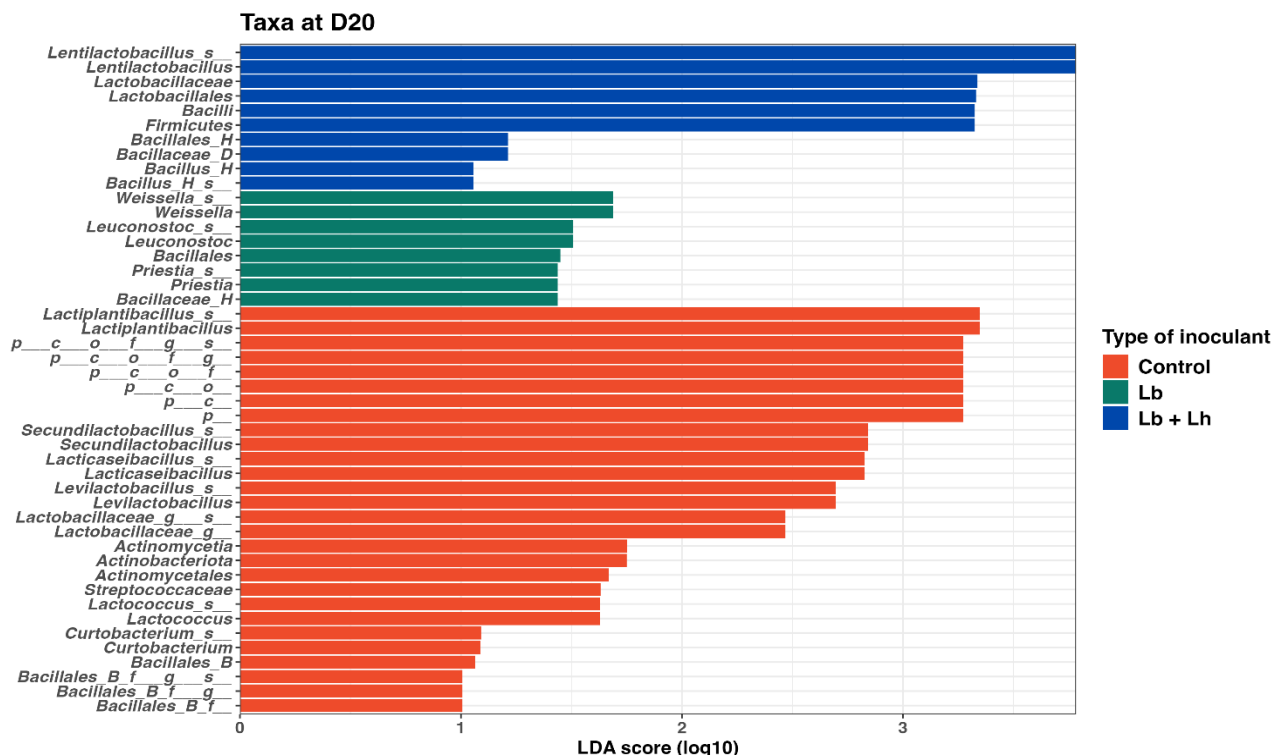


Figura 10. Abundância diferencial das bactérias nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos no período de fermentação de 20 dias. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788.

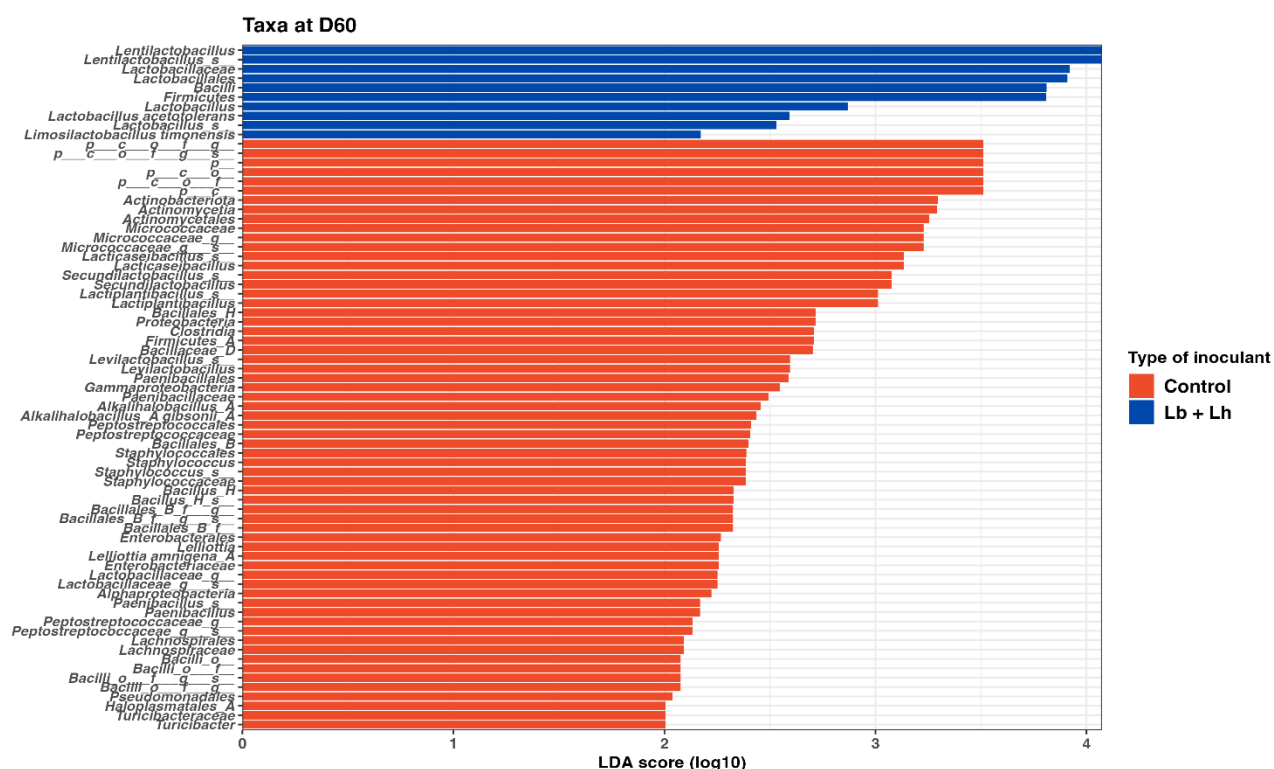


Figura 11. Abundância diferencial das bactérias nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos no período de fermentação de 60 dias. D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788.

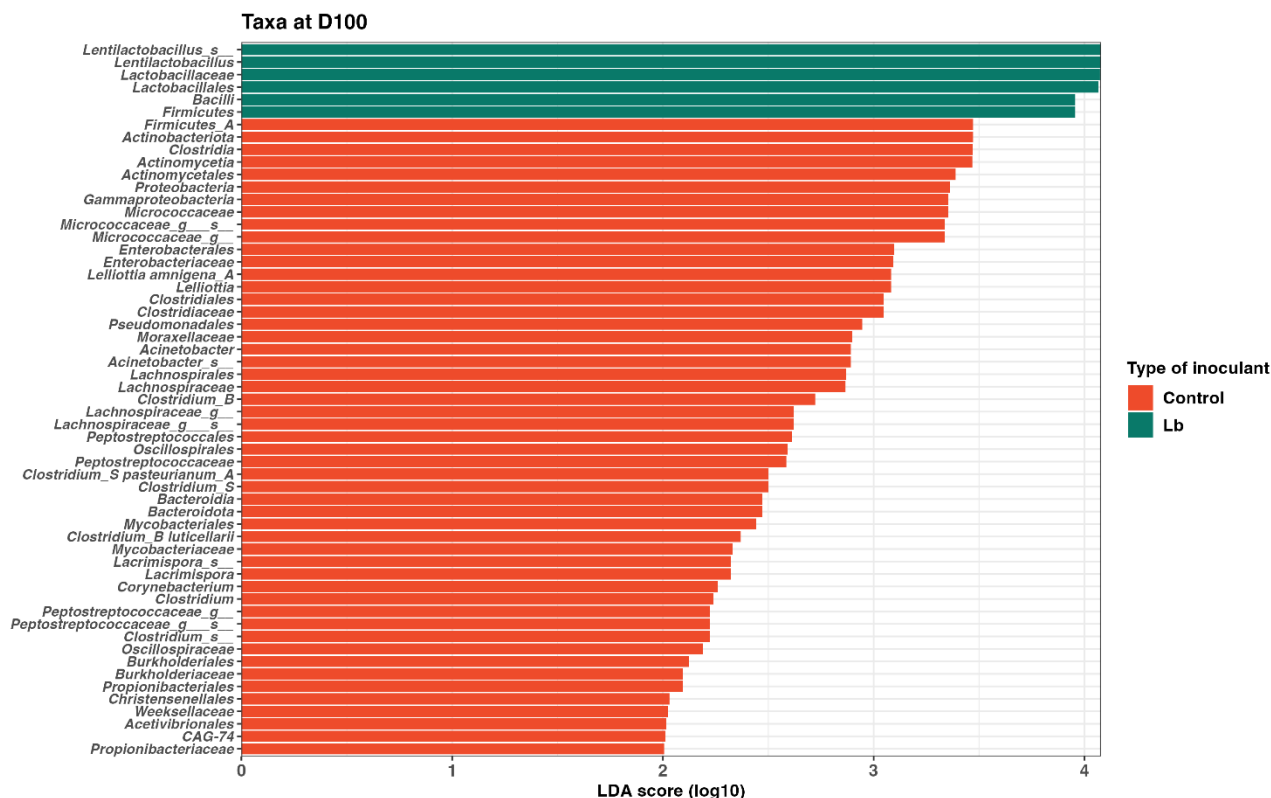


Figura 12. Abundância diferencial das bactérias nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos no período de fermentação de 100 dias. D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*.

De forma semelhante ao padrão familiar, as comunidades fúngicas exibiram menor biodiversidade no nível de gênero em comparação às comunidades bacterianas, como *Kazachstania* como táxon dominante em todos os períodos, incluindo após a exposição ao ar, enquanto *Aspergillus*, *Lysurus*, *Zasmidium*, *Pleosporales genus Incertae sedis*, *Colletotrichum* e *Saccharomycetales genus Incertae sedis* estiveram presentes em menores proporções nas amostras (Figura 13). A análise de abundância diferencial mostrou uma associação de *Kazachstania* com o estágio inicial de fermentação, enquanto táxons de baixa abundância, como *Wallemia*, *Fungi_phy_Incertae_sedis* e *Lysurus*, foram associados aos estágios finais da fermentação (Figura 14).

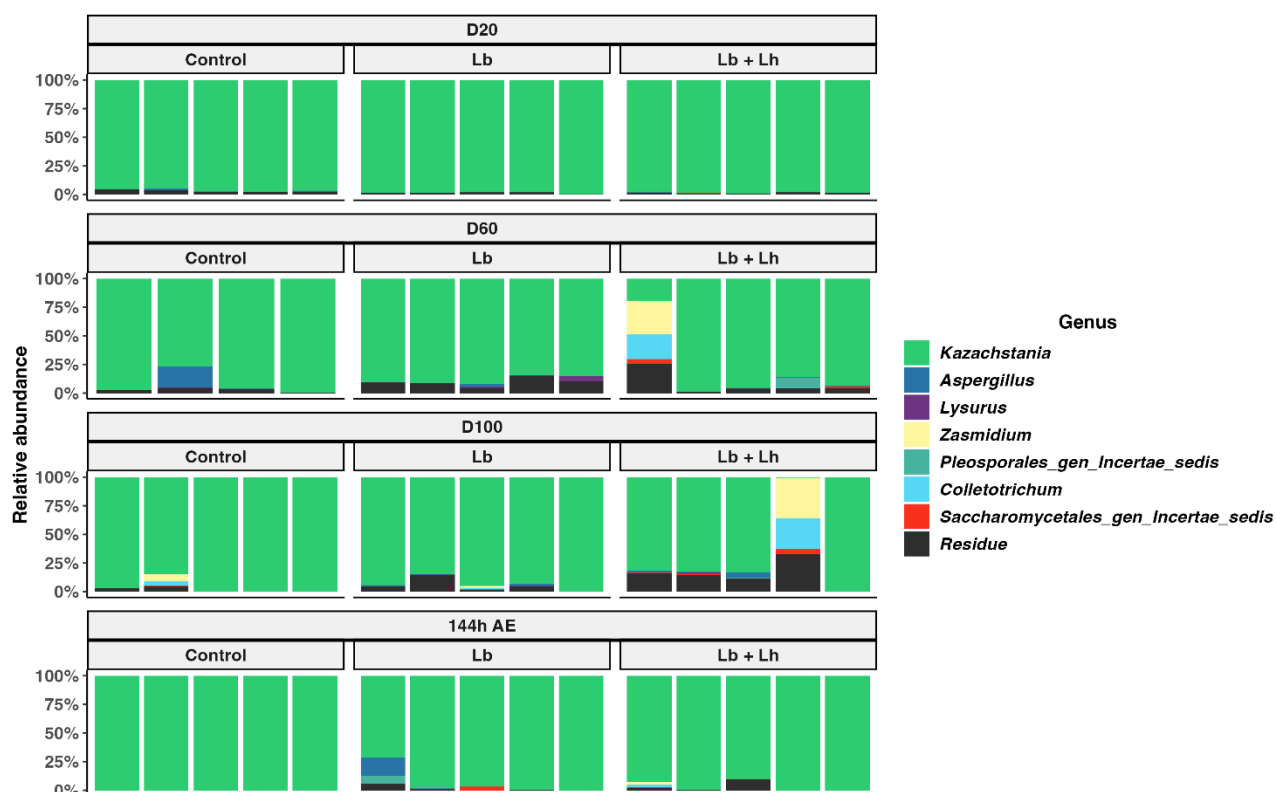


Figura 13. Abundância relativa dos gêneros fúngicos nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias, e após 144 horas de exposição aeróbia. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação; 144h AE: silagem exposta ao ar por 144 horas. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788.

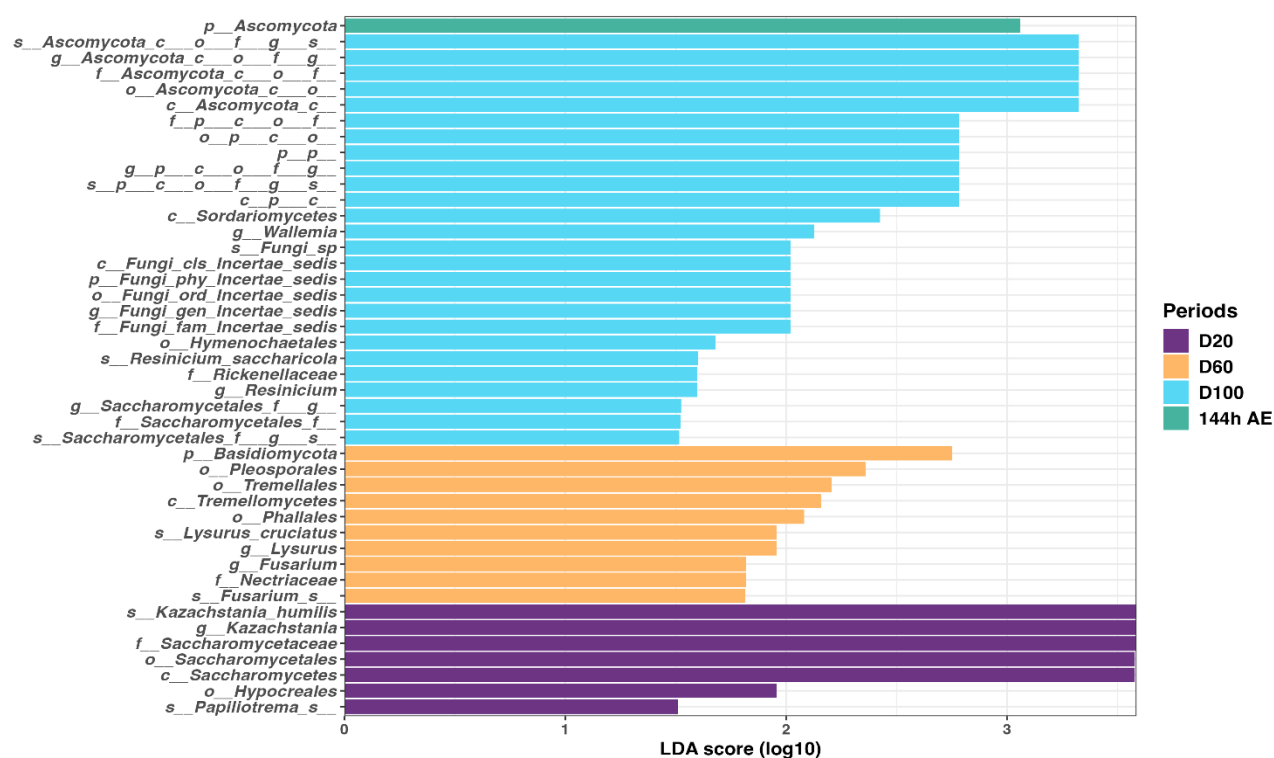


Figura 14. Abundância diferencial fúngica nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos nos períodos de fermentação de 20, 60 e 100 dias, e após 144 horas de exposição aeróbia. D20: silagem à base de sorgo forrageiro após 20 dias de fermentação; D60: silagem à base de sorgo forrageiro após 60 dias de fermentação; D100: silagem à base de sorgo forrageiro inoculada após 100 dias de fermentação; 144h AE: silagem exposta ao ar por 144 horas.

A análise de predição de genes revelou intensa biossíntese de aminoácidos (e.g., biossíntese de L-ornitina, L-lisina VI, supervia da biossíntese de L-treonina, supervia da biossíntese de S-adenosil-metionina) e degradação de carboidratos (e.g., fermentação do ácido misto, degradação de D-fructuronato, degradação de sacarose IV via fosforilase de sacarose, supervia da degradação de β -D-glucuronídeo e D-glucuronato) em D20 nos grupos inoculados, em comparação ao Control (Figura 15). Esse padrão mudou completamente em D60, quando o grupo Control apresentou aumento significativo na biossíntese de proteínas (Figura 16). Em D100, observou-se um ressurgimento da atividade anaeróbica (e.g., fermentação heterolática, fermentação de piruvato para acetato e lactato II, degradação de acetileno) nos grupos inoculados, em comparação ao Control (Figura 17).

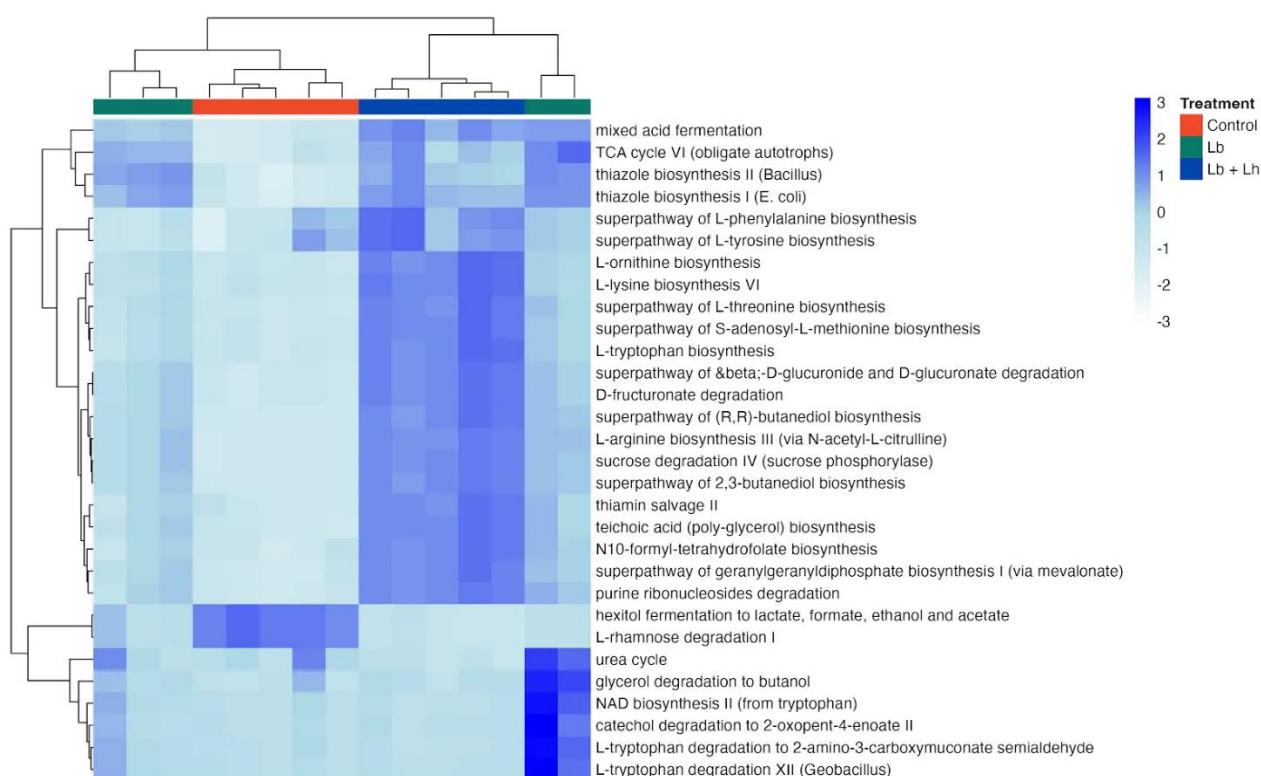


Figura 15. Predição gênica das bactérias nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos no período de fermentação de 20 dias. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788.



Figura 16. Predição gênica das bactérias nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos no período de fermentação de 60 dias. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788.



Figura 17. Predição gênica das bactérias nas silagens de sorgo inoculadas com aditivos microbianos no período de fermentação de 100 dias. Control, Controle (sem inoculante); Lb, cepa *Lentilactobacillus buchneri*; Lb+Lh, cepa *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 com o *L. buchneri* NCIMB 40788.

Não houve correlação direta significativa entre os valores de pH e temperatura com as BAL em todos os grupos.

4 DISCUSSÃO

O pH permaneceu abaixo da faixa ideal ao longo da fermentação. No entanto, apesar das preocupações sobre a inibição das BAL abaixo de 3,8, nenhum efeito adverso foi observado, pois as silagens inoculadas apresentaram altas contagens de BAL em D20, consumindo rapidamente CHO e produzindo AL, o que reduziu significativamente os níveis de pH, AB e N-NH₃. A sucessão microbiana ocorreu em D20, mas com padrões distintos, como *Lentilactobacillus* como o principal táxon nas silagens inoculadas, especialmente no tratamento Lb+Lh, uma vez que este gênero demonstrou ser menos competitivo em comparação com outras BAL nativas, como *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus* e *Secundilactobacillus*. Xu et al. (2022) relataram resultados semelhantes em silagem de sorgo inoculada com a uma combinação de *L. buchneri*, observando o domínio de *Lentilactobacillus* já três semanas após a inoculação. *Lactiplantibacillus* domina a fermentação nativa do sorgo, mas, quando inoculado, ocorre uma transição para *Lentilactobacillus*, acelerando a fermentação em estágios avançados e evidenciando sua afinidade com a silagem de sorgo (Xu et al., 2022; Xu et al., 2024). *Lentilactobacillus* supera as espécies nativas no uso de amido durante a ensilagem de sorgo, fermentando grânulos de proteína-amido por meio de enzimas proteolíticas e, com uma relação AL:AA otimizada, melhora a fermentação da silagem e a EA (Muck et al., 2018). Embora a análise microbiana baseada em 16S rRNA seja limitada à resolução no nível de gênero, o efeito inicial pós inoculação provavelmente decorreu da proliferação de *L. hilgardii* e da produção inicial de AA, enquanto *L. buchneri* converteu posteriormente AL em AA e 1,2P (Heinl et al., 2012; Ávila et al., 2014). A atividade metabólica precoce de *L. hilgardii*, combinada com a ação prolongada de *L. buchneri*, contrasta com a atividade limitada de fermentação láctica inicial de espécies homofermentativas, o que pode inibir bactérias associadas à deterioração tanto no curto quanto no longo prazo, durante a abertura do silo (Fernandes et al., 2020; Arriola et al., 2021). Aos D60, a sucessão microbiana se encerrou com *Lentilactobacillus* com táxon dominante, sem diferenças entre Lb e Lb+Lh, refletindo a transição para a fase de equilíbrio fermentativo. Nesse estágio, a disponibilidade de açúcares fermentáveis diminuiu, pois a fermentação já se deslocou completamente de homoláctica para heterofermentativa, aumentando as concentrações AA e AP observadas aos D60 e D100. Kung et

al. (2018) e Muck et al. (2018) enfatizaram o papel de *L. buchneri* na estabilização das silagens entre 45 e 60 dias, quando os níveis de AA reduzem a deterioração, o que está alinhado com Da Silva et al. (2021), Drouin et al. (2021) e Gomes et al. (2021), que relacionaram cepas heterofermentativas a maior EA via aumento de AA e supressão microbiana.

Por outro lado, a sucessão microbiana foi indesejável em D60, pois táxons não pertencentes às BAL compuseram a maior parte da microbiota. *Paenibacillus* e *Acinetobacter* são bactérias consumidoras de ácidos orgânicos associadas ao aumento do pH em silagens, enquanto *Clostridium* e *Lelliottia* podem causar proteólise indesejável, levando à formação de NH_3^+ , o que compromete a qualidade geral do produto fermentado (Zhang et al., 2019; Zhao et al., 2021). No entanto, os valores N- NH_3 permaneceram abaixo de 100 g/kg do nitrogênio total e, embora as silagens inoculadas tenham apresentado níveis ligeiramente superiores de N- NH_3 em comparação ao Control, esses valores ainda refletiram uma fermentação proteica controlada (Kung et al., 2018; Silva et al., 2018; Tavares et al., 2024). Essa tendência pode estar associada à ação das BAL heterofermentativas, cuja atividade metabólica pode contribuir para a liberação de amônia, mesmo com a inibição de enterobactérias pelos inoculantes (Junges et al., 2017).

Em D100, os níveis mais elevados de N- NH_3 no tratamento Lb indicam degradação de PB, enquanto Lb+Lh preservou melhor a proteína, evidenciando sua sinergia, pois os baixos níveis de AB em todas as silagens sugerem fermentação controlada, mesmo diante do predomínio de táxons não pertencentes às BAL, indicando estabilidade e mínimas perdas. Arriola et al. (2021) também observaram baixa produção de AB em silagens de sorgo tratadas com *L. buchneri* e com a combinação Lb+Lh, demonstrando a eficiência desses inoculantes na preservação da proteína. Essa instabilidade influenciou as perdas de MS durante a fase aeróbia, refletindo as características fermentativas da silagem de sorgo, onde altos teores de CHO e baixa capacidade tampão promovem acidificação rápida, mas aumentam a suscetibilidade a deterioração e reduzem a EA. A acidificação é mais rápida quando o sorgo apresenta alto teor de MS ($\leq 33\%$), possivelmente gerando um excesso de CHO residual ligados proteínas vegetais, que pode servir como substrato para microrganismos deteriorantes, fazendo com que a silagem não inoculada apresente sinais de deterioração mesmo antes da exposição ao ar (Santos et al., 2021; Xu et al., 2022; Nascimento et al., 2023; Li et al., 2024). Isso pode ter favorecido a sucessão microbiana aos D60 em direção ao crescimento de *Paenibacillus*, *Acinetobacter*, *Clostridium* e *Lelliottia* no grupo Control. Nesse sentido, tanto Lb quanto Lb+Lh demonstraram maior eficiência na utilização de CHO, auxiliando na preservação da silagem, ao mesmo tempo em que mantiveram níveis estáveis de AL e menor variação de CHO, auxiliando na preservação da silagem, ao mesmo tempo em que mantiveram níveis estáveis de AL e menor variação de CHO durante a exposição ao ar. Isso reforça a

superioridade competitiva dos inoculantes heterofermentativos sobre microrganismos deteriorantes, pois o perfil fermentativo é aprimorado pela redução dos níveis de CHO residual em silagens de sorgo sacarino quando pelo menos um desses inoculantes é aplicado (Xu et al., 2024). O CHO residual pode ser compensado pelo aumento da atividade antifúngica em silagens tratadas com *L. buchneri*, onde o ambiente acidificado, combinado com a atividade antimicrobiana do AA e do AP, melhora a proteção durante o armazenamento e a exposição ao ar (Gomes et al., 2021; Kung Jr. et al., 2021). A combinação Lb+Lh apresentou um efeito sinérgico, intensificando a produção de AA e AP, que, conforme estudos, aumentou a EA tanto em silagens de alta umidade armazenadas a curto quanto a longo prazo (Ferrero et al., 2019; Ferrero et al., 2021; Da Silva et al., 2021).

As PMS foram controladas nos tratamentos inoculados, com menores perdas no Lb aos D20 e D60 devido a ação inibitória do AA sobre microrganismos indesejáveis. No entanto, em D100, o acúmulo de AA e AP aumentou as perdas devido à volatilização dos compostos (Drouin et al., 2019; Arriola et al., 2021). Embora BAL heterofermentativas produzam etanol e dióxido de carbono, o que pode aumentar o potencial de perdas de MS, esse efeito não é equivalente ao das leveduras produtoras de etanol, o que pode explicar os efeitos inconsistentes na recuperação da MS (Kleinschmit & Kung, 2006; Oliveira et al., 2017; Da Silva et al., 2021). Isso também é corroborado pela redução observada na MO, provavelmente causada pelo metabolismo heterofermentativo de *Lentilactobacillus* sobre o consumo de CHO (Heinl et al., 2012; Drouin et al. 2019). Nos estágios iniciais da ensilagem, os níveis de MS foram semelhantes entre os tratamentos devido à produção limitada de AA e ao controle da deterioração. No entanto, aos D60, a intensificação da heterofermentação nos tratamentos Lb+Lh aumentou a produção de AA e metabólitos secundários, melhorando a conservação, mas elevando as perdas de MS. Aos D100, o metabolismo microbiano equilibrou os metabólitos fermentativos e a retenção de MS. Esses resultados corroboram Arriola et al. (2021) e Da Silva et al. (2021) ao destacarem a importância da regulação da heterofermentação para a preservação ideal da MS, uma vez que a inoculação reduziu a razão AL:AA em Lb e Lb+Lh, aumentou a produção de AA e inibiu microrganismos deteriorantes, alinhando-se com Morais et al. (2024), que associaram menores razões AL:AA em silagens de sorgo ao metabolismo heterofermentativo de *L. buchneri*.

A ausência de microrganismos deteriorantes como *Pichia*, *Candida* e *Saccharomyces* sugere que os altos níveis de AA e as condições anaeróbicas atuaram como fatores seletivos. No entanto, algumas leveduras, como *Kazachstania*, toleraram AL e contribuíram para a deterioração aeróbia precoce em silagens com baixo pH, mesmo na presença de inoculantes heterofermentativos. Esse fenômeno já foi observado em diferentes silagens, incluindo planta-

inteira de milho, cevada e ponteiros de cana-de-açúcar (Liu et al., 2019; Zhang et al., 2019; Wang et al., 2021). De fato, cepas de *Kazachstania* podem crescer e tolerar alta osmolaridade, acidez e a presença de ácidos orgânicos, etanol e sal. No entanto, a presença de leveduras não indica necessariamente deterioração da silagem, como demonstrado pela presença inicial de *Kazachstania* aos D20, enquanto as silagens inoculadas, especialmente aquelas tratadas com a combinação de *L. buchneri* e *L. hilgardii*, apresentaram melhora na EA (Korcari et al., 2021). Segundo Ferrero et al. (2019), a combinação de *L. buchneri* e *L. hilgardii* em silagens de sorgo melhora a qualidade fermentativa e a EA já aos 15 dias após a ensilagem, destacando a adaptabilidade dessas espécies ao substrato do sorgo. A ausência de mofos aos D100 é provavelmente resultado do pH ácido da silagem (3,28 – 3,37), criando um ambiente desfavorável ao crescimento fúngico, o que corrobora estudos de Borreani et al. (2018) e Reis et al. (2018) sobre o papel antifúngico do baixo pH. As concentrações elevadas de AA e AP nas silagens tratadas dificultaram o crescimento fúngico e retardaram a deterioração aeróbia. A menor razão AL:AA nas silagens tratadas reflete uma fermentação heterofermentativa mais eficiente, estabilizando o perfil contra a exposição ao oxigênio. Além disso, a atividade prolongada de *Lentilactobacillus* a partir dos D60 intensificou a produção de metabólitos antimicrobianos, controlando o crescimento fúngico e melhorando a EA. O uso de cepas heterofermentativas minimiza a exposição a altas temperaturas e evita microrganismos deteriorantes em contato com oxigênio devido ao papel inibitório do AA sobre leveduras e mofos, melhorando a EA das silagens de sorgo tratadas com *L. buchneri* (Arriola et al., 2021; Gomes et al., 2021; Alves et al., 2023). Entretanto, Lb+Lh superou Lb no controle fúngico a partir dos D60, pois o ambiente estabilizado apresentou níveis crescentes de AA e AP. Os ácidos orgânicos podem inibir efetivamente fungos em silagens de sorgo inoculadas com heterofermentativos (Ferrero et al., 2019; Ferrero et al., 2021). Destacamos que o qPCR quantifica contagens microbianas absolutas na silagem, fornecendo insights sobre a dinâmica da deterioração e o metabolismo microbiano, incluindo a produção de micotoxinas e a deterioração da ração (Shahrajabian & Sun, 2024).

Em síntese, os resultados desta pesquisa destacaram a efetividade dos inoculantes heterofermentativos Lb, isoladamente ou em combinação em Lh, na melhoria da fermentação e conservação da silagem de sorgo planta inteira. Ambos os tratamentos promoveram a rápida proliferação das BAL, com destaque para o gênero *Lentilactobacillus*, e a produção compostos antifúngicos, reduzindo o crescimento de LEV e FUN, como demonstrado pela ausência desses microrganismos em D100. Embora não tenha sido observada diferença significativa entre Lb isolado e Lb+Lh, a ação prolongada do Lb foi determinante para a maior EA e conservação da silagem em D60 e D100, indicando seu papel crucial na manutenção de silagens de alta qualidade.

A inoculação influenciou significativamente a diversidade bacteriana, com o grupo Control apresentando maior diversidade alfa em D60 e D100. Nas comunidades fúngicas, a inoculação teve efeito apenas em interação com o tempo, e *Kazachstania* foi o gênero dominante ao longo do PF, enquanto a composição bacteriana dos grupos inoculados permaneceu estável, contrastando com maior variabilidade observada no grupo Control.

5 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a inoculação da silagem de sorgo planta inteira com *L. buchneri*, isoladamente ou em combinação com *L. hilgardii*, melhorou a fermentação, a estabilidade bacteriana e a produção de AA e AP, suprimindo a maioria das leveduras e bolores, enquanto favoreceu *Kazachstania* e manteve a qualidade da silagem. Ambos os tratamentos aumentaram a estabilidade aeróbia e a preservação, mas a combinação promoveu consistentemente *Lentilactobacillus*, com a inoculação remodelando a diversidade bacteriana no D20 e estabilizando a sucessão microbiana no D100 em comparação com a silagem não inoculada, que apresentou maior variabilidade.

REFERÊNCIAS

- AESA. (2024). *Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba*. <http://www.aesa.pb.gov.br/>.
- Alvares, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, P. C., de Moraes Gonçalves, J. L., & Sparovek, G. (2013). Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22(6), 711–728. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>
- American Public Health Association. (2015). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5th Ed. (Y. Salfinger and M. Lou Tortorello, Editors.). American Public Health Association (APHA), Washington, DC, USA.*
- AOAC International. (1990). *Official Methods of Analysis of AOAC International. 15th Edition. Arlington, VA (USA).*
- Arriola, K. G., Vyas, D., Kim, D., Agarussi, M. C. N., Silva, V. P., Flores, M., Jiang, Y., Yanlin, X., Pech-Cervantes, A. A., Ferraretto, L. F., & Adesogan, A. T. (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. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19512>

- Ávila, C. L. S., Carvalho, B. F., Pinto, J. C., Duarte, W. F., & Schwan, R. F. (2014). The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. *Journal of Dairy Science*, 97(2), 940–951. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6987>
- Bolsen, K. K., Lin, C., Brent, B. E., Feyerherm, A. M., Urban, J. E., & Aimutis, W. R. (1992). Effect of Silage Additives on the Microbial Succession and Fermentation Process of Alfalfa and Corn Silages. *Journal of Dairy Science*, 75(11), 3066–3083. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78070-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78070-9)
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R. J., Holmes, B. J., & Muck, R. E. (2018). Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3952–3979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Da Silva, E. B., Smith, M. L., Savage, R. M., Polukis, S. A., Drouin, P., & Kung, L. (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*, 130(5), 1481–1493. <https://doi.org/10.1111/jam.14892>
- Drouin, P., Ferrero, F. (2020). Testing selectivity of bacterial and fungal culture media compared to original silage samples using next generation sequencing. *J. Microbiol Methods*, 179, 106088. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106088>
- Drouin, P., Tremblay, J., & Chaucheyras-Durand, F. (2019). Dynamic Succession of Microbiota during Ensiling of Whole Plant Corn Following Inoculation with *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus hilgardii* Alone or in Combination. *Microorganisms*, 7(12), 595. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120595>

- Drouin, P., Tremblay, J., Renaud, J., & Apper, E. (2021). Microbiota succession during aerobic stability of maize silage inoculated with *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788 and *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM-I-4785. *Microbiology Open*, 10(1). <https://doi.org/10.1002/mbo3.1153>
- Dubois, M. et al. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- Fernandes, T., Paula, E. M., Sultana, H., & Ferraretto, L. F. (2020). Short communication: Influence of sorghum cultivar, ensiling storage length, and microbial inoculation on fermentation profile, N fractions, ruminal in situ starch disappearance and aerobic stability of whole-plant sorghum silage. *Animal Feed Science and Technology*, 266, 114535. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114535>
- Ferreira, D. F. (2019). SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. *Revista Brasileira de Biometria*, 37(4), 529–535. <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>
- Ferrero, F., Piano, S., Tabacco, E., & Borreani, G. (2019). Effects of conservation period and *Lactobacillus hilgardii* inoculum on the fermentation profile and aerobic stability of whole corn and sorghum silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), 2530–2540. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9463>
- Ferrero, F., Tabacco, E., & Borreani, G. (2021). *Lentilactobacillus hilgardii* Inoculum, Dry Matter Contents at Harvest and Length of Conservation Affect Fermentation Characteristics and Aerobic Stability of Corn Silage. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.675563>
- Gilmore, R., Hutchins, S., Zhang, X., & Vallender, E. (2019). MicrobiomeR: An R Package for Simplified and Standardized Microbiome Analysis Workflows. *Journal of Open-Source Software*, 4(35), 1299. <https://doi.org/10.21105/joss.01299>
- Gomes, A. L. M., Bueno, A. V. I., Osmari, M. P., Machado, J., Nussio, L. G., Jobim, C. C., & Daniel, J. L. P. (2021). Effects of Obligate Heterofermentative Lactic Acid Bacteria Alone or in Combination on the Conservation of Sugarcane Silage. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.643879>
- Heinl, S., Wibberg, D., Eikmeyer, F., Szczepanowski, R., Blom, J., Linke, B., Goesmann, A., Grabherr, R., Schwab, H., Pühler, A., & Schlüter, A. (2012). Insights into the completely

- annotated genome of *Lactobacillus buchneri* CD034, a strain isolated from stable grass silage. *Journal of Biotechnology*, 161(2), 153–166. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.03.007>
- Junges, D., Morais, G., Spoto, M. H. F., Santos, P. S., Adesogan, A. T., Nussio, L. G., & Daniel, J. L. P. (2017). Short communication: Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. *Journal of Dairy Science*, 100(11), 9048–9051. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12943>
- Khalifa, M., Eltahir, E. A. B. (2023). Assessment of global sorghum production, tolerance, and climate risk. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1184373>
- Kleinschmit, D. H., & Kung, L. 2006. A Meta-Analysis of the Effects of *Lactobacillus buchneri* on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn and Grass and Small-Grain Silages. *Journal of Dairy Science*, 89(10), 4005–4013. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72444-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72444-4)
- Korcari, D., Ricci, G., Capusoni, C., & Fortina, M. G. (2021). Physiological performance of *Kazachstania unispora* in sourdough environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 88. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03027-0>
- Kung, L., Savage, R. M., da Silva, E. B., Polukis, S. A., Smith, M. L., Johnson, A. C. B., & Miller, M. A. (2021). The effects of air stress during storage and low packing density on the fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* 40788. *Journal of Dairy Science*, 104(4), 4206–4222. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19746>
- Kung, L., Shaver, R. D., Grant, R. J., & Schmidt, R. J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
- Kung, L., Taylor, C. C., Lynch, M. P., & Neylon, J. M. (2003). The Effect of Treating Alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on Silage Fermentation, Aerobic Stability, and Nutritive Value for Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 336–343. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73611-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73611-X)
- Li, X., Cheng, Y., Yang, F., Hu, J., Ma, R., Liu, H., & Shao, T. (2024). Improving Total Mixed Ration Silage: Effects of Lactic Acid Bacteria Inoculants and Antimicrobial Additives on

- Fermentation Quality and Aerobic Stability. *Agronomy*, 14(8), 1602. <https://doi.org/10.3390/agronomy14081602>
- Lozupone, C. A., & Knight, R. (2015). The unifracs significance test is sensitive to tree topology. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0640-y>
- Magalhães, F. A., Valadares Filho, S. C., Menezes, G. C. C., Machado, M. G., Zanetti, D., Pina, D. S., Pereira, O. G., & Paulino, M. F. (2012). Composição química e perdas fermentativas de ensilagem de cana com diferentes graus Brix, com ou sem óxido de cálcio. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(2), 256–263.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Morais, L. B., Carvalho, B. F., Batista, L. R., Schwan, R. F., & Ávila, C. L. S. (2024). Mycological diversity in whole-plant corn silages inoculated with *Lentilactobacillus buchneri* or *Lentilactobacillus farraginis*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 76(1), 114–130. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-13023>
- Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., McAllister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C., & Kung, L. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3980–4000. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>
- Nascimento, M. E., Edvan, R. L., Santos, E. M., de Oliveira, J. S., de S. Miranda, R., do Nascimento, R. R., de S. Barros, L., de Oliveira, C. J. B., de S. Santos, F. N., Pereira, D. M., Lacerda P. Lemos, M., Santana, L. P., Leite, G. M., & dos Santos, D. G. (2023). Effect of *Lactobacillus buchneri* and sodium benzoate on the fermentative profile, bacterial taxonomic diversity, and aerobic stability of sorghum silages at different fermentation times. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 83(5), 539–552. <https://doi.org/10.4067/s0718-58392023000500539>
- Oliveira, A. S., Weinberg, Z. G., Ogunade, I. M., Cervantes, A. A. P., Arriola, K. G., Jiang, Y., Kim, D., Li, X., Gonçalves, M. C. M., Vyas, D., & Adesogan, A. T. (2017). Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(6), 4587–4603. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11815>

- Oren, A., & Garrity, G. M. (2021). Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(10). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056>
- Perazzo, A. F., Carvalho, G. G. P., Santos, E. M., Bezerra, H. F. C., Silva, T. C., Pereira, G. A., Ramos, R. C. S., & Rodrigues, J. A. S. (2017). Agronomic Evaluation of Sorghum Hybrids for Silage Production Cultivated in Semiarid Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01088>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D590-6. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Reis, C. B., de Oliveira dos Santos, A., Carvalho, B. F., Schwan, R. F., & Ávila, C. L. da S. (2018). Wild *Lactobacillus hilgardii* (CCMA 0170) strain modifies the fermentation profile and aerobic stability of corn silage. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 632–638. <https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1371609>
- Santos, A. C. P., Santos, E. M., Carvalho, G. G. P., Perazzo, A. F., Araújo, M. L. G. M. L., DE Oliveira, J. S., Pereira, G. A., Macêdo, A. J. da S., Sá, W. C. C. dos S., & Pereira, D. M. (2021). Fermentation profile, microbial populations and aerobic stability of sorghum silages enriched with urea and *Lactobacillus buchneri*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 66(2), 128–144. <https://doi.org/10.1080/00288233.2021.2000437>
- Santos, A. P. M. dos, Santos, E. M., Oliveira, J. S. de, Ribeiro, O. L., Perazzo, A. F., Martins Araújo Pinho, R., Macêdo, A. J. da S., & Pereira, G. A. (2018). Effects of urea addition on the fermentation of sorghum (*Sorghum bicolor*) silage. *African Journal of Range & Forage Science*, 35(1), 55–62. <https://doi.org/10.2989/10220119.2018.1458751>
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- Shahrajabian, M. H., & Sun, W. 2024. The Significance and Importance of dPCR, qPCR, and SYBR Green PCR Kit in the Detection of Numerous Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 30(3), 169–179. <https://doi.org/10.2174/0113816128276560231218090436>

- Siegfried, V. R., Ruckemann, H., & Stumpf, G. (1984). Eine HPLC-methode zur bestimmung organischer säuren in silagen. *Landwirtsch Forsch*, 298–304.
- Silva, D. F., Garcia, P. H. M., Farias, I. M. S. C., Pádua, G. V. G., Pereira, P. H. B., Silva, F. E., Batista, R. F., Neto, S. G., Cabral, A. M. D. (2021). Características morfológicas, melhoramento genético e densidade de plantio das culturas do sorgo e do milho: uma revisão. *Research, Society and Development*, 10(3). <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13172>
- Tavares, B. C., Dias, M., Royer, J. L., Nascimento, V. A., Dias, F. J. dos S., Saenz, E. A. C., Câmara, L. R. de A., & Silveira, D. M. da. (2024). Doses de inoculante bacteriano *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788® na silagem de grão de milho reidratado. *Cuadernos de Educación y Desarrollo*, 16(11), e6339. <https://doi.org/10.55905/cuadv16n11-073>
- Thukral, A. K. (2017). A review on measurement of Alpha diversity in biology. *Agricultural Research Journal*, 54(1), 1. <https://doi.org/10.5958/2395-146X.2017.00001.1>
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Xiao, M. Z., Sun, R., Du, Z. Y., Yang, W. B., Sun, Z., & Yuan, T. Q. (2021). A sustainable agricultural strategy integrating Cd-contaminated soils remediation and bioethanol production using sorghum cultivars. *Industrial Crops and Products*, 162, 113299. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113299>
- Xu, H., Wu, N., Na, N., Ding, H., Sun, L., Fang, Y., Li, D., Li, E., Yang, B., Wei, X., & Xue, Y. (2024). Dynamics of fermentation quality, bacterial communities, and fermentation weight loss during fermentation of sweet sorghum silage. *BMC Microbiology*, 24(1), 429. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03573-1>
- Zhang, L., Zhou, X., Gu, Q., Liang, M., Mu, S., Zhou, B., Huang, F., Lin, B., & Zou, C. (2019). Analysis of the correlation between bacteria and fungi in sugarcane tops silage prior to and after aerobic exposure. *Bioresource Technology*, 291, 121835. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121835>
- Zhao, S., Yang, F., Wang, Y., Fan, X., Feng, C., & Wang, Y. (2021). Dynamics of Fermentation Parameters and Bacterial Community in High-Moisture Alfalfa Silage with or without Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms*, 9(6), 1225. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061225>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

CAPÍTULO II

Efeitos da adição de um aditivo químico sobre silagens de ração em mistura total
a base de sorgo forrageiro

RESUMO

Objetivou-se avaliar o perfil fermentativo, composição química e estabilidade aeróbia de silagens de ração em mistura total à base de sorgo forrageiro aditivadas com doses de um aditivo químico aos 40 e 80 dias após ensilagem. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando dois períodos de fermentação, três aditivos e cinco repetições por tratamento, organizado em esquema fatorial 2×3 . Os aditivos empregados foram: ração em mistura total controle, sem aditivo; ração em mistura total aditivada com 1 kg/Mg base MN; ração em mistura total aditivada com 2 kg/Mg base MN. Observou-se interação significativa ($P < 0,05$) entre o aditivo e o período fermentativo para extrato etéreo (EE), pH, carboidratos solúveis (CHOs), nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$), capacidade tampão (CT), população de leveduras (LEV) e mofos, ácido lático (AL), ácido acético (AA), ácido propiônico (AP), relação ácido lático: acético (AL:AA), 1,2-Propanodiol (1,2P), ácido butírico (AB), temperatura máxima (T. máxima) e temperatura média (T. média). Foi observado efeito isolado de aditivo ($P < 0,05$) para matéria seca (MS), EE, fibra em detergente neutro, $N-NH_3$, CT, LEV, mofos, AL, AA, AP, AL:AA, 1,2P, AB, estabilidade aeróbia (EA), T. máxima e T. média. Houve efeito isolado de período fermentativo ($P < 0,05$) para pH, CHOs, $N-NH_3$, bactérias ácido lácticas, LEV, AL, AA, AP, AL:AA, 1,2P, EA, T. máxima, T. média e Tempo máxima temperatura. Não houve diferença ($P > 0,05$) para matéria orgânica, matéria mineral, proteína bruta, perdas de MS e temperatura mínima. Em termos de perfil fermentativo e EA, aos 80 dias, as silagens aditivadas com 2 kg demonstraram completa eliminação de populações microbianas indesejáveis, com as concentrações mais elevadas de AL e AA, resultando em uma EA superior e menores temperaturas. As perdas MS foram semelhantes entre os tratamentos. Conclui-se que a adição de aditivo químico em silagens de ração em mistura total à base de sorgo forrageiro melhora as características fermentativas e a estabilidade aeróbia das silagens. Portanto, recomenda-se a adição de 2 kg/Mg do aditivo químico e o período de fermentação de 80 dias.

Palavras chave: ácidos orgânicos, estabilidade aeróbia, fermentação microbiana, silagem

ABSTRACT

The objective was to evaluate the fermentation profile, chemical composition, and aerobic stability of total mixed ration silages based on forage sorghum, treated with doses of a chemical additive at 40 and 80 days after ensiling. The experimental design was completely randomized, utilizing two fermentation periods, three additives, and five repetitions per treatment, organized in a factorial scheme of 2×3. The additives used were: control total mixed ration without additive; total mixed ration treated with 1 kg/Mg of fresh matter; and total mixed ration treated with 2 kg/Mg of fresh matter. The additives used were: control total mixed ration without additive; total mixed ration treated with 1 kg/Mg of fresh matter; and total mixed ration treated with 2 kg/Mg of fresh matter. A significant interaction ($P<0.05$) was observed between the additive and the fermentation period for ether extract (EE), pH, soluble carbohydrates (CHOs), ammoniacal nitrogen ($N-NH_3$), buffering capacity (BC), yeast population (LEV) and molds, lactic acid (LA), acetic acid (AA), propionic acid (PA), lactic acid to acetic acid ratio (LA:AA), 1,2-Propanediol (1,2P), butyric acid (BA), maximum temperature (T.max), and average temperature (T.avg). An isolated effect of the additive ($P<0.05$) was observed for dry matter, EE, neutral detergent fiber, $N-NH_3$, BC, LEV, molds, LA, AA, PA, LA: AA, 1,2P, BA, aerobic stability (AS), T.max, and T.avg. An isolated effect of the fermentation period ($P<0.05$) was observed for pH, CHOs, $N-NH_3$, lactic acid bacteria, LEV, LA, AA, PA, LA: AA, 1,2P, AS, T.max, T.avg, and maximum temperature. No differences ($P>0.05$) were found for organic matter, mineral matter, crude protein, dry matter losses, and minimum temperature. In terms of fermentative profile and aerobic stability (AS), at 80 days, the silages treated with 2 kg demonstrated complete elimination of undesirable microbial populations, with the highest concentrations of LA and AA, resulting in superior AS and lower temperatures. The dry matter losses were similar among the treatments. It can be concluded that the addition of a chemical additive to total mixed rations based on forage sorghum improves the fermentative characteristics and aerobic stability of the silages. Therefore, it is recommended to add 2 kg/Mg of the chemical additive and to use a fermentation period of 80 days.

Keywords: organic acids, aerobic stability, microbial fermentation, silage

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de tecnologias avançadas para a ensilagem tem sido foco de pesquisas globais, visando aprimorar a conservação de alimentos e promover o uso eficiente de recursos, elementos essenciais para sustentar a crescente intensificação da população de ruminantes. Nesse contexto, a ração em mistura total (*Total Mixed Ration*, TMR) tem se destacado como uma estratégia eficiente, ao combinar forragens, alimentos concentrados, minerais, vitaminas e aditivos em uma formulação balanceada, atendendo às necessidades nutricionais específicas de diferentes categorias de ruminantes (Dai et al., 2022).

O sorgo forrageiro [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] é amplamente utilizado na produção de silagem, destacando-se pela sua adaptabilidade a condições ambientais adversas, particularmente em regiões com escassez hídrica (Santin et al., 2020). No entanto, o elevado teor de carboidratos solúveis, que pode ultrapassar 15% da matéria seca (Lucena et al., 2021), tende a reduzir o pH abaixo dos níveis ideais, criando um ambiente propício à proliferação de leveduras. Essas leveduras podem se multiplicar rapidamente e produzir etanol, ocasionando perdas significativas e deterioração quando expostas ao ar, resultando na assimilação de lactato e carboidratos residuais (Kung et al., 2018; Santos et al., 2021).

Para mitigar esses problemas, a utilização de aditivos químicos apresenta-se como uma solução promissora. Esses aditivos podem atenuar os riscos associados às características específicas da cultura e às condições ambientais adversas, inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis ou deterioração e reduzindo as perdas de matéria seca (Muck et al., 2018). Dentre os aditivos disponíveis, o FreshCUT Plus™ destaca-se por sua composição, que combina ácidos orgânicos, como ácido propiônico, benzoico e acético, visando aumentar a estabilidade aeróbica da silagem. Este produto utiliza ácidos tamponados, neutralizados com bases ou sais, reduzindo sua corrosividade e aumentando a segurança durante a aplicação, resultando em silagens mais estáveis e bem conservadas (Kung et al., 2018).

Estudos recentes têm demonstrado os benefícios de aditivos à base de ácidos orgânicos na melhoria da fermentação e da estabilidade aeróbia das silagens. Oliveira et al. (2023) relataram que a adição de ácidos orgânicos, como o ácido propiônico e o ácido acético, aumentou a digestibilidade da matéria seca e intensificou a produção de ácido lático. De maneira semelhante, Da Silva Neto et al. (2023) observaram que a aplicação desses ácidos em silagens de milho reidratado promoveu maior produção de ácido lático, preservou a qualidade fermentativa e reduziu a deterioração aeróbia. Esses achados evidenciam o potencial dos ácidos orgânicos como moduladores eficazes da fermentação e inibidores do desenvolvimento de microrganismos

indesejáveis, atributos que também são investigados no presente estudo, com foco na conservação e no valor nutricional da silagem.

Além disso, o ácido propiônico tamponado tem mostrado ser eficaz na inibição de leveduras, contribuindo para a estabilidade aeróbia das silagens (Muck et al., 2018). O ácido benzoico e o ácido acético também são conhecidos por limitar o crescimento de microrganismos indesejáveis, promovendo uma melhor conservação das silagens (Qiu et al., 2014; Da Silva et al., 2015).

Diante disso, tem-se como hipótese de que a adição de FreshCUT Plus™ na ensilagem de TMR à base de sorgo forrageiro sejam capazes de promover melhorias sobre o perfil fermentativo, estabilidade aeróbia e valor nutritivo das silagens em ambos os períodos de fermentação, com efeitos mais evidenciados nas silagens com maior concentração do aditivo, devido a uma maior concentração dos seus componentes químicos, capazes de modular a fermentação e inibir a atuação de microrganismos indesejáveis.

Neste contexto, objetivou-se avaliar o perfil fermentativo, composição química e estabilidade aeróbia de silagens de ração em mistura total à base de sorgo forrageiro aditivadas com doses do aditivo químico aos 40 e 80 dias de fermentação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local experimental, implantação e manejo do sorgo forrageiro

O experimento foi conduzido no Laboratório de Forragicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) em Areia, Paraíba, Brasil, localizada na latitude Sul 6°58'12" e longitude Oeste 35°42'15" com ± 619 m de altitude. Foi utilizado a cultivar de sorgo forrageiro BRS Ponta Negra (Guansafra Sementes®, Fortaleza-CE, Brasil) implantado em uma área de 0,76 ha no município de Riachão, Paraíba, Brasil, localizado na latitude Sul 06°32'25" e longitude Oeste 35°39'35", com altitude média de ± 175 m e média pluviométrica anual de 432 mm (AESAs, 2024). O clima da região segundo a classificação de Köppen é do tipo As' (semiárido quente e úmido com chuvas de outono a inverno) (Alvares et al., 2013).

O solo da área experimental foi caracterizado como solo arenoso, textura leve (SBCS, 2018), o mesmo foi preparado através de aração e gradagem, e adubado para atender à exigência em fertilidade para a cultura do sorgo.

O sorgo forrageiro foi implantado utilizando uma semeadora manual tipo matraca (Semeadora Krupp®, São Leopoldo-RS, Brasil). O sorgo foi semeado a uma profundidade de aproximadamente 1 cm e espaçamento de 0,10 x 0,80 m, com dez sementes por metro linear. A adubação foi realizada durante a semeadura com aplicação de 100 kg/ha na forma de Superfosfato

simples (Fertilizantes Heringer®, São Paulo-SP, Brasil). A adubação de cobertura foi realizada no estágio V4 da planta, utilizando 45 kg N/h na forma de ureia (Fertilizantes Heringer®, São Paulo-SP, Brasil).

2.2 Delineamento experimental, colheita e ensilagem

Foi usado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), arranjado em esquema fatorial 2×3 e cinco repetições por tratamento, sendo dois períodos de fermentação (PF) e três aditivos (AD). Os PF foram 40 dias (40d) e 80 dias (80d) após ensilagem. Os AD foram: Ração em mistura total controle, sem aditivo (TMR-C); Ração em mistura total aditivada com 1 kg FreshCUT Plus™/Mg base MN, composto por propionato de amônio, ácido acético, polioxietileno, sorbitan monoleato (Polisorbato 80), ácido benzoico, água, amarelo tartazina e azul brilhante (Kemin-América do Sul, Indaiatuba-SP, Brasil) (TMR-1); Ração em mistura total aditivada com 2 kg FreshCUT Plus™/Mg base MN (TMR-2).

O sorgo forrageiro BRS Ponta Negra foi colhido de forma manual aos 110 dias após semeadura em julho de 2023. Logo em seguida, foi transportado para o Laboratório de Forragicultura da universidade Federal da Paraíba, onde foi processado em tamanhos de partículas ± 10 mm, através de máquina forrageira estacionária (EN9-F3B, Nogueira®, Itapira-SP, Brasil). O AD “FreshCUT Plus™” foi diluído em 50 mL de água destilada e aplicado em pilhas individuais de 15 kg com uso de borrifadores tipo spray (Nobre, GoedertGroup™, Biguaçu-SC, Brasil), sendo aplicado o mesmo volume de água destilada para TMR-C.

A TMR foi formulada para atender as exigências nutricionais de ovinos deslanados em crescimento, com ganho de 150 g peso corporal/dia, com base NRC (2007). Foi usada uma relação volumoso:concentrado V:C-50:50 base matéria seca (MS). Para a confecção da TMR realizou-se a mistura dos ingredientes: milho moído, torta de algodão, ureia/sulfato de amônio (9:1) e núcleo mineral-vitamínico (cálcio: 14 g/kg; fósforo: 6,5 g/kg; magnésio: 1 g/kg; enxofre: 1,2 g/kg; sódio: 13 g/kg; cobalto: 8 mg/kg; ferro: 100 mg/kg; iodo: 6 mg/kg; manganês: 300 mg/kg; selênio: 1 mg/kg; zinco: 500 mg/kg; ferro: 65 mg/kg; vitamina A: 5000 U.I./kg; vitamina E: 31,2 U.I./kg) com o sorgo forrageiro in natura.

Foram confeccionados 30 silos experimentais em baldes plásticos de 4 L (630EE, GrouPack®, Cabedelo-PB, Brasil) (55 cm diâmetro×19 cm altura) previamente pesados (peso vazio) e compactado manualmente, adotando-se uma densidade ± 600 kg MN/m³. Os baldes foram vedados com fita adesiva 45 mm, pesados e armazenados a temperatura ambiente até o momento da abertura. Na Tabela 1 são mostrados a proporção dos ingredientes da TMR, bem como a caracterização do material antes da ensilagem.

Tabela 1. Proporção dos ingredientes com base na matéria natural (MN), composição química e populações microbianas da ração em mistura total à base de sorgo forrageiro aditivada com FreshCUT Plus™ antes da ensilagem.

Ingredientes (% MN)	Ração em mistura total ^a		
	TMR-C	TMR-1	TMR-2
Sorgo forrageiro	74,50	74,50	74,50
Milho moído	12,50	12,50	12,50
Torta de algodão	12,00	12,00	12,00
Ureia/Sulfato amônio (9:1)	0,50	0,50	0,50
Núcleo mineral-vitamínico	0,50	0,50	0,50
Composição química [g/kg matéria seca (MS)]			
Matéria seca (g/kg MN)	384,48	393,03	376,20
Matéria orgânica (g/kg MS)	956,00	954,20	952,80
Matéria mineral (g/kg MS)	44,00	45,80	47,20
Proteína bruta (g/kg MS)	155,37	155,05	153,73
FDN ^b (g/kg MS)	538,03	461,64	459,80
pH	5,68	5,66	5,46
CHOs ^c (g/kg MS)	84,02	77,76	86,40
CT ^d (Emg NaOH/100 g MS)	0,209	0,257	0,261
Populações microbianas (log10 UFC/g) ^e			
Bactérias ácido lácticas	6,01	5,83	5,54
Leveduras	4,65	4,80	4,93
Fungos filamentosos	4,56	4,87	4,69

^aRação em mistura total: TMR-C, Controle (sem aditivo); TMR-1, 1 kg FreshCUT Plus™ (Kemin-América do Sul, Indaiatuba-SP, Brasil) /Mg MN. TMR-2, 2 kg FreshCUT Plus™/Mg MN; ^bFibra insolúvel em detergente neutro; ^cCHOs: Carboidratos solúveis em água; ^dCT (Emg NaOH/100 g MS), Capacidade tampão expressa em mmol/valência de hidróxido de sódio para cada 100 g MS; ^elog10 UFC/g, Unidade formadora de colônia na escala logarítmica de base 10/g MN.

2.3 Coleta e preparo das amostras

Após os períodos de fermentação de 40 e 80 dias, os silos experimentais foram pesados e abertos para a coleta das amostras. Para evitar a contaminação das camadas superficiais devido à exposição ao oxigênio, uma camada superficial foi descartada, com espessura ajustada conforme as características de cada silo. O material remanescente foi retirado e distribuído sobre uma lona previamente higienizada com álcool, garantindo a integridade microbiológica e química das amostras.

O material foi então homogeneizado para garantir a uniformidade das amostras, seguido de um processo de quarteamento, no qual a porção representativa foi selecionada para análises subsequentes. A primeira fração da silagem foi imediatamente processada para análises de pH, quantificação de ácidos orgânicos, caracterização das populações microbianas e determinação do

teor de nitrogênio amoniacal. Uma segunda fração foi acondicionada em sacos de papel para o processo de pré-secagem, visando a análise da composição química. A terceira fração foi reservada para avaliação da estabilidade aeróbia, enquanto a última foi armazenada para análises futuras.

2.4 Perfil fermentativo e perdas de matéria seca

Para a realização das análises referentes ao perfil fermentativo, quantificação das populações microbianas e de ácidos orgânicos, as amostras de 25 g da planta e das silagens aos 40d e 80d de fermentação foram homogeneizadas em 225 mL de solução salina [0,85 g NaCl P.A. (Dinâmica®, São Paulo-SP, Brasil) /100 mL H₂O destilada] em liquidificador industrial (LAR.2, METVISA®, Brusque-SC, Brasil) durante 1 min. O extrato aquoso obtido foi filtrado em gaze estéril de algodão e dividido em três alíquotas.

A primeira alíquota foi usada para mensuração do pH, utilizando-se potenciômetro digital (K39-1420A, KASVI®, São José dos Pinhais-PR, Brasil). Em seguida, a segunda alíquota de 50 mL do extrato aquoso foi acidificado (H₂SO₄ P.A. 1:1 v/v, Neon®, Suzano-SP, Brasil) e armazenados a -20°C para quantificação do teor de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) pelo método descrito por Bolsen et al. (1992). Os teores de carboidratos solúveis em água (CHOs) também foram determinados pelo método do ácido sulfúrico concentrado de acordo com a metodologia descrita por Dubois et al. (1956). A capacidade tampão (CT) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Playne & McDonald (1966).

As perdas de matéria seca (PMS) foram quantificadas por diferença de pesagem dos baldes (peso final menos o peso inicial expresso em relação ao peso inicial). Sendo calculada de acordo com Magalhães et al. (2012) pela equação:

$$PMS \text{ (g MS/kg MN)} = 1000 - [(MS_{ab}/MS_{fe}) \times 1000]$$

Onde: PMS (g MS/kg MN): perdas de matéria seca em gramas por quilograma de matéria natural; MS_{ab}: kg matéria seca da silagem na abertura (quantidade de silagem em kg×% MS); MS_{fe}: kg matéria seca da forragem no fechamento do silo (quantidade de forragem em kg×% MS).

2.5 Populações microbianas e ácidos orgânicos

A segunda alíquota do extrato aquoso foi destinada para quantificação das populações microbianas: bactérias ácido lácticas (BAL), leveduras (LEV) e fungos filamentosos (FUN). Foram realizadas diluições seriadas de 10¹ a 10⁸. Em seguida, o plaqueamento foi realizado em placas de

Petri estéreis (90×15mm, FirstLab®, São José dos Pinhais-PR, Brasil) pelo método *pour-plate* em meios de cultura (Kung Jr. et al., 2003). Foi utilizado o ágar MRS (De Man, Rogosa & Sharpe, K25-1043, Kasvi®, São José dos Pinhais-PR, Brasil) para o cultivo de BAL (37°C/48 h) e ágar DRBC (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) para cultivo de LEV (25°C/72 h) e de FUN (25°C/120 h). Para a quantificação de ufc foram consideradas placas contendo entre 25 a 250 ufc (American Public Health Association, 2015).

A terceira alíquota do extrato aquoso foi usada para quantificação dos ácidos orgânicos [ácido láctico (AL), ácido acético (AA), ácido propiônico (AP), 1,2-Propanodiol (1,2P) e ácido butírico (AB)]. Foi usado 10 mL do extrato aquoso, em que, foi adicionado em tubos de ensaio com tampa rosqueada (AJ03, PlenaLab®, Jundiaí-SP, Brasil) a serem centrifugados em vórtex (Vortex Mixer VX-200, LabNet®, New Jersey, EUA) e adicionado 2,0 mL de ácido metafosfórico P.A. (Neon®, Suzano-SP, Brasil) e a solução formada foi centrifugada (Mikro-120, Hettich Zentrifugen®, Tuttlingen, Germany) durante 15 min a 13.000 g. Após este processo, o sobrenadante foi coletado acondicionado em tubos microtubos de centrifugação tipo eppendorf (CralPlast®, Cotia-SP, Brasil), que foram selados, identificados e congelados até serem analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; SHIMADZU, SPD-10A VP) (Siegfried et al., 1984). As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal e Solos da Universidade Federal do Piauí.

2.6 Composição química

As amostras da planta, dos ingredientes e das silagens 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 (Wiley®, Arthur H. Thomas, PA, EUA), com peneira de crivo de 1 mm, para análises da composição química.

As amostras da planta, dos ingredientes e das silagens 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) e extrato etéreo (EE, método 920,39) de acordo com AOAC (1990). Nessas amostras também foram determinados os teores de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), utilizando-se α -amilase termoestável sem o uso de sulfito de sódio (Van Soest et al., 1991).

2.7 Estabilidade aeróbia

Para avaliação da estabilidade aeróbia (EA), foram coletadas no momento da abertura 1 kg da silagem foi pesado e retornou para seu respectivo balde sem compactação, onde foram expostos

durante seis dias (144 horas) em sala com temperatura controlada ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$). Foi inserido um *datalogger* (AK285 New, AKSO®, São Leopoldo-RS, Brasil) no centro da massa de cada silagem, para que a temperatura da mesma fosse registrada a cada 10 min. Outros três *dataloggers* 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 dois graus centígrados acima da temperatura ambiente (Kung Jr. et al., 2021).

2.8 Análises estatísticas

Todos os dados foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade e homogeneidade de variâncias. Os dados da avaliação microbiológica expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) foram transformados para unidade logarítmica na base dez (UFC $\log_{10}$). Os dados foram analisados de acordo com o DIC, arranjado em esquema fatorial 2×3 , com dois PF e três AD e cinco repetições, conforme o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + PF_i + AD_j + (PF*AD)_{ij} + e_{ijk}$$

Em que: Y_{ijk} = variável resposta; μ = média geral; PF_i = efeito do período de fermentação i (efeito fixo); AD_j = efeito de aditivo j (efeito fixo); $(PF*AD)_{ij}$ = efeito da interação entre período de fermentação e aditivo ij (efeito fixo); e_{ijk} = erro experimental aleatório.

Todos os dados foram analisados através da análise de variância (ANOVA), quando significativo para efeito de PF as médias foram comparadas pelo teste F ($P\leq 0,05$), quando significativo para efeito de AD ou interação entre $PF\times AD$ onde foi realizado o desdobramento destes, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a um nível de significância de 5%, como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2019).

3 RESULTADOS

3.1 Perfil fermentativo e perdas de matéria seca

Observou-se interação significativa $PF\times AD$ ($P<0,05$) para o pH, CHOs, N-NH_3 e CT (Tabela 2). Aos 40d os maiores valores de pH foram observados para TMR-C e TMR-1 (3,92 e 3,94 pH), enquanto o TMR-2 teve o menor valor (3,88 pH), enquanto aos 80d verificou-se maior e menor valor de pH para TMR-1 e TMR-2, 4,10 e 3,89 pH, respectivamente. Verificou-se que aos 40d o teor de CHOs foi igual independentemente do tipo de AD, enquanto aos 80d foi verificado maior teor de CHOs para TMR-2 (24,35 g/kg MS) comparado aos demais. Em relação aos teores de N-NH_3 e CT verificou-se que em ambos os períodos as silagens aditivadas com TMR-2

apresentaram maior teor de N-NH₃ (2,77 g/kg NT), bem como de CT 0,53 e 057 Emg NaOH/100g MS, respectivamente, comparado aos demais AD. Não houve efeito de nenhuma das fontes de variação para PMS apresentando valor médio de 41,14 g/kg MN.

Tabela 2. Perfil fermentativo e perdas de matéria seca (PMS) das silagens de ração em mistura total (TMR) à base de sorgo forrageiro aditivadas com FreshCUT Plus™ armazenadas durante 40d e 80d após ensilagem.

Período F.	Aditivo ^a			Média	EPM ^b	P-valor ^c		
	TMR-C	TMR-1	TMR-2			PF	AD	PF×AD
pH								
40d	3,92Ab	3,94Ab	3,88Ba	3,91b	0,01	<0,001	<0,001	<0,001
80d	4,06Ba	4,10Aa	3,89Ca	4,02 ^a				
Média	3,89B	4,02A	3,89B					
CHOs ^d (g/kg MS)								
40d	40,12Aa	31,91Aa	28,51Aa	33,51a	0,38	<0,001	0,348	0,005
80d	12,13Bb	12,06Bb	24,35Aa	16,18b				
Média	26,13	21,99	26,43					
N-NH ₃ (g/kg NT) ^e								
40d	2,24Ba	2,29Ba	2,77Aa	2,43 ^a	0,06	<0,001	<0,001	<0,001
80d	0,88Cb	2,00Ba	2,77Aa	1,88b				
Média	1,56C	2,15B	2,77 ^a					
CT (Emg NaOH/100g MS) ^f								
40d	0,47Ba	0,48Ba	0,53Ab	0,50	0,01	0,060	<0,001	<0,001
80d	0,48Ba	0,46Cb	0,57Aa	0,51				
Média	0,48B	0,47B	0,55 ^a					
PMS (g/kg MN)								
40d	38,81	36,54	41,92	39,09	1,54	0,072	0,726	0,454
80d	44,01	43,38	42,20	43,20				
Média	41,41	39,96	42,06					

^aAditivo: TMR-C, Controle (sem aditivo). TMR-1, 1 kg FreshCUT Plus™ (Kemin-América do Sul, Indaiatuba-SP, Brasil) /Mg base matéria natural (MN). TMR-2, 2 kg FreshCUT Plus™/Mg base MN; ^bEPM: Erro padrão da média; ^c*P*-valor: Probabilidade de efeitos para Período Fermentação (PF), Aditivo (AD) e interação PF com AD (PF×AD); ^dCHOs, carboidratos solúveis em água; ^eN-NH₃ (g/kg NT), nitrogênio amoniacal expresso em relação ao nitrogênio total; ^fCT (Emg NaOH/100 g MS), Capacidade tampão expressa em mmol/valência de hidróxido de sódio para cada 100 g MS; Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) para efeito de AD. Médias seguidas por letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste F ($P \leq 0,05$) para efeito de PF.

3.2 Populações microbianas e ácidos orgânicos

Observou-se interação significativa PF×AD ($P < 0,05$) para as populações de LEV e FUN (Tabela 3). Aos 40d, as contagens de LEV apresentaram valores médios variando entre 3,84 a 4,18 log₁₀ UFC/g, sem diferenças significativas entre os tratamentos, enquanto aos 80d, a

contagem de LEV foi reduzida para 0,00 log₁₀ UFC/g. Para as populações de FUN, o TMR-2 apresentou uma redução considerável aos 40d (1,47 log₁₀ UFC/g), enquanto aos 80d não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Foi observado efeito de tempo de fermentação sobre as BAL, com contagens mais elevadas aos 40d (6,65 log₁₀ UFC/g), que diminuíram significativamente aos 80d (4,32 log₁₀ UFC/g). Não houve efeito do AD sobre as populações de BAL, nem efeito do tempo sobre a população de FUN, com médias de 5,49; 5,49; 2,93 log₁₀ UFC/g, respectivamente.

Tabela 3. Quantificação das populações microbianas de bactérias ácido lácticas (BAL), leveduras (LEV) e de fungos filamentosos (FUN) das silagens de ração em mistura total (TMR) à base de sorgo forrageiro aditivadas com FreshCUT Plus™ armazenadas durante 40d e 80d após ensilagem.

Período F.	Aditivo ^a			Média	EPM ^b	<i>P-valor</i> ^c		
	TMR-C	TMR-1	TMR-2			PF	AD	PF×AD
BAL (log10 UFC/g) ^d								
40d	6,48	6,70	6,77	6,65a	0,49	0,002	0,402	0,242
80d	5,81	3,84	3,32	4,32b				
Média	6,15	5,27	5,05					
LEV (log10 UFC/g)								
40d	4,18Aa	3,84Aa	3,98Aa	4,00a	0,12	<0,001	<0,001	<0,001
80d	2,17Ab	2,62Ab	0,00Bb	1,60b				
Média	3,18A	3,23A	1,99B					
FUN (log10 UFC/g)								
40d	3,86Aa	3,66Aa	1,47Bb	2,99	0,22	0,685	<0,001	0,007
80d	2,42Ab	3,44Aa	2,74Aa	2,87				
Média	3,14A	3,55A	2,11B					

^aAditivo: TMR-C, Controle (sem aditivo). TMR-1, 1 kg FreshCUT Plus™ (Kemin-América do Sul, Indaiatuba-SP, Brasil) /Mg base matéria natural (MN). TMR-2, 2 kg FreshCUT Plus™/Mg base MN; ^bEPM: Erro padrão da média; ^cP-valor: Probabilidade de efeitos para Período Fermentação (PF), Aditivo (AD) e interação PF com AD (PF×AD); ^dlog₁₀ UFC/g, Unidade formadora de colônia na escala logarítmica de base 10/g MN. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) para efeito de AD. Médias seguidas por letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste F ($P \leq 0,05$) para efeito de PF.

Houve efeito de interação PF×AD ($P < 0,05$) para todos os ácidos orgânicos (Tabela 4). Aos 40d, o TMR-2 apresentou maior concentração de AL (52,19 g/kg MS). Aos 80d, os teores de AL foram semelhantes e superiores nos tratamentos TMR-C e TMR-2. As silagens TMR-2 se destacaram pelos maiores teores de AA em ambos os períodos de fermentação, com média 36,56 g/kg MS. A relação AL:AA foi mais elevada no TMR-1 em ambos os períodos. As concentrações de 1,2P e AP permaneceram superiores no TMR-2 durante todo o período. Embora os níveis de AB tenham sido semelhantes aos 40d, o TMR-C apresentou a maior concentração aos 80d (0,102

g/kg MS). Não foram observados efeitos isolados de tempo e AD para AB, com médias de 0,09 e 0,08 g/kg MS, respectivamente.

Tabela 4. Teores médios de ácidos orgânicos das silagens de ração em mistura total (TMR) à base de sorgo forrageiro aditivadas com FreshCUT Plus™ armazenadas durante 40d e 80d após ensilagem.

Período F.	Aditivo ^a			Média	EPM ^b	P-valor ^c		
	TMR-C	TMR-1	TMR-2			PF	AD	PF×AD
Ácido láctico (AL, g/kg MS ^d)								
40d	47,84Bb	49,10Bb	52,19Ab	49,71b	0,21	<0,001	<0,001	0,002
80d	56,86Aa	54,65Ba	57,98Aa	56,50a				
Média	52,35B	51,87B	55,08 ^a					
Ácido acético (AA, g/kg MS)								
40d	29,72Bb	25,23Cb	37,06Aa	30,67b	0,16	<0,001	<0,001	<0,001
80d	34,79Ba	27,68Ca	36,06Ab	32,85a				
Média	32,26B	26,46C	36,56 ^a					
Relação AL:AA								
40d	1,61Ba	1,95Aa	1,41Cb	1,65b	0,01	<0,001	<0,001	<0,001
80d	1,63Ba	1,97Aa	1,61Ba	1,74a				
Média	1,62B	1,96A	1,51C					
1,2-Propanodiol (g/kg MS)								
40d	2,43Ba	1,99Ca	2,88Aa	2,42a	0,24	0,007	<0,001	0,006
80d	2,37Ba	2,01Ca	2,61Ab	2,33b				
Média	2,40B	2,00C	2,75 ^a					
Ácido propiônico (g/kg MS)								
40d	0,34Bb	0,35Bb	0,39Ab	0,36b	0,01	<0,001	<0,001	0,003
80d	0,54Aa	0,50Ba	0,55Aa	0,53a				
Média	0,44B	0,42 C	0,47 ^a					
Ácido butírico (g/kg MS)								
40d	0,077Ab	0,087Aa	0,077Aa	0,08	0,01	0,318	0,155	0,007
80d	0,102Aa	0,080Ba	0,082Ba	0,09				
Média	0,090	0,083	0,080					

^aAditivo: TMR-C, Controle (sem aditivo). TMR-1, 1 kg FreshCUT Plus™ (Kemin-América do Sul, Indaiatuba-SP, Brasil) /Mg base matéria natural (MN). TMR-2, 2 kg FreshCUT Plus™/Mg MN; ^bEPM: Erro padrão da média; ^cP-valor: Probabilidade de efeitos para Período Fermentação (PF), Aditivo (AD) e interação PF com AD (PF×AD); ^dMS: Matéria seca. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) para efeito de AD. Médias seguidas por letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste F ($P \leq 0,05$) para efeito de PF.

3.3 Composição química

Observou-se efeito de interação PF×AD ($P < 0,05$) apenas para o teor de EE (Tabela 5). Aos 40d as TMR-2 apresentou menores valores de EE (35,69 g/kg MS), enquanto aos 80d, os teores de

EE se equipararam entre os tratamentos. O AD influenciou os teores de MS, EE e FDN, com TMR-C e TMR-1 apresentando maiores valores de MS (403,49 e 399,44 g/kg MS) e TMR-2 destacando-se com o maior teor de FDN 482,66 g/kg MS. Não houve efeito significativo de nenhuma das fontes de variação para MO, MM e PB, com valores médios de 953,5; 46,5 e 145,52 g/kg MS, respectivamente.

Tabela 5. Composição química das silagens de ração em mistura total (TMR) à base de sorgo forrageiro aditivadas com FreshCUT Plus™ armazenadas durante 40d e 80d após ensilagem.

Período F.	Aditivo ^a			Média	EPM ^b	P-valor ^c		
	TMR-C	TMR-1	TMR-2			PF	AD	PF×AD
Matéria seca (g/kg MN ^d)								
40d	402,39	397,84	376,33	392,18	2,61	0,157	<0,001	0,684
80d	404,59	401,03	384,92	396,85				
Média	403,49A	399,44A	380,62B					
Matéria orgânica (g/kg MS ^e)								
40d	955,84	952,01	950,63	952,83	1,02	0,362	0,379	0,121
80d	952,86	956,17	953,48	954,17				
Média	954,35	954,09	952,06					
Matéria mineral (g/kg MS)								
40d	44,16	47,99	49,37	47,17	1,02	0,363	0,379	0,121
80d	47,14	43,83	46,52	45,83				
Média	45,65	45,91	47,94					
Proteína bruta (g/kg MS)								
40d	147,12	144,89	147,54	146,51	1,45	0,339	0,395	0,506
80d	141,70	144,32	147,52	144,51				
Média	144,41	144,60	147,53					
Extrato etéreo (g/kg MS)								
40d	42,00Aa	44,01Aa	35,69Ba	40,57	0,61	0,056	<0,001	0,050
80d	40,00Aa	39,71Ab	36,85Aa	38,85				
Média	41,00A	41,86A	36,27B					
FDN ^f (g/kg MS)								
40d	434,19	454,72	474,90	454,60	3,99	0,377	<0,001	0,348
80d	438,95	449,69	490,41	459,68				
Média	436,57B	452,21B	482,66 ^a					

^aAditivo: TMR-C, Controle (sem aditivo). TMR-1, 1 kg FreshCUT Plus™ (Kemin-América do Sul, Indaiatuba-SP, Brasil) /Mg base matéria natural (MN). TMR-2, 2 kg FreshCUT Plus™/Mg base MN; ^bEPM: Erro padrão da média; ^cP-valor: Probabilidade de efeitos para Período Fermentação (PF), Aditivo (AD) e interação PF com AD (PF×AD); ^dMN, Matéria natural; ^eMS, Matéria seca; ^fFibra insolúvel em detergente neutro. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) para efeito de AD. Médias seguidas por letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste F ($P \leq 0,05$) para efeito de PF.

3.4 Estabilidade aeróbia

Observou-se efeito de interação PF×AD ($P<0,05$) para t. máxima e t. média (Tabela 6). Aos 40d, o TMR-2 apresentou a menor t. máxima (28,02°C), mantendo essa tendência aos 80d, com 25,32°C. Para a t. média, o TMR-2 também registrou os menores valores, como 25,78°C aos 40d e 24,53°C aos 80d. Em relação ao efeito isolado AD, o TMR-2 demonstrou maior EA, com média de 129,38h, superando o TMR-C (77,48h) e o TMR-1 (67,92h). Quanto ao efeito isolado do PF, a EA foi maior aos 80d (104,62h) em comparação aos 40d (78,57h). Observou-se efeito significativo do tempo de fermentação sobre a t. máxima, com maior valor aos 40d (123,22h), reduzindo para 104,62 h aos 80d. Não houve efeito significativo de nenhuma das fontes de variação sobre t. mínima, que apresentou valor médio de 23,58°C. Além disso, não se observou efeito de AD sobre o tempo máxima t., que apresentou uma média de 113,92 h.

Tabela 6. Estabilidade aeróbia (EA, h) e temperatura (T., °C) das silagens de ração em mistura total (TMR) à base de sorgo forrageiro aditivadas com FreshCUT Plus™ armazenadas durante 40d e 80d após ensilagem.

Período F.	Aditivo ^a		Média	EPM ^b	<i>P</i> -valor ^c			
	TMR-C	TMR-1	TMR-2		PF	AD	PF×AD	
EA (h)								
40d	58,03	62,90	114,77	78,57b	5,16	0,002	<0,001	0,278
80d	96,93	72,93	144,00	104,62a				
Média	77,48B	67,92B	129,38A					
T. máxima (°C)								
40d	36,38Aa	34,58Aa	28,02Ba	32,99a	0,83	0,031	<0,001	0,004
80d	28,42Bb	37,20Aa	25,32Ba	30,31b				
Média	32,40A	35,90A	26,67B					
T. mínima (°C)								
40d	23,32	23,62	23,64	23,53	0,07	0,311	0,066	0,890
80d	23,48	23,74	23,68	23,63				
Média	23,40	23,68	23,66					
T. média (°C)								
40d	29,92Aa	29,28Aa	25,78Ba	28,33a	0,39	0,004	<0,001	0,022
80d	25,94Bb	29,27Aa	24,53Ba	26,58b				
Média	27,93A	29,27A	25,16B					
Tempo máxima T. (h)								
40d	122,30	112,53	134,83	123,22a	4,88	0,013	0,693	0,212
80d	107,00	107,40	99,47	104,62b				
Média	114,65	109,97	117,15					

^aAditivo: TMR-C, Controle (sem aditivo). TMR-1, 1 kg FreshCUT Plus™ (Kemin-América do Sul, Indaiatuba-SP, Brasil) /Mg base matéria natural (MN). TMR-2, 2 kg FreshCUT Plus™/Mg base MN; ^bEPM: Erro padrão da média; ^cP-valor: Probabilidade de efeitos para Período Fermentação (PF), Aditivo (AD) e interação PF com AD (PF×AD). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($P\leq 0,05$) para efeito de

AD. Médias seguidas por letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste F ($P \leq 0,05$) para efeito de PF.

4 DISCUSSÃO

4.1 Perfil fermentativo e perdas de matéria seca

As silagens analisadas apresentaram valores de pH dentro da faixa recomendada por Kung et al. (2018), variando entre 3,8 e 4,2. Como esperado, as silagens tratadas com a maior dose do aditivo químico exibiram pH mais baixo, resultado que se alinha às observações de Dai et al. (2022) e Han et al. (2022). Esses autores ressaltam que os aditivos químicos promovem uma fermentação láctica mais eficiente, devido às suas propriedades antimicrobianas, que inibem o crescimento de microrganismos deteriorantes. No presente estudo, essa eficiência foi demonstrada pelo aumento na produção de AL, maior CT e estabilização do pH, fatores que retardam o crescimento de LEV e mofos, minimizando os danos à silagem.

A maior CT observada nas silagens tratadas com TMR-2 foi essencial para a manutenção de um pH estável e para a conservação do material ensilado aos 80d. Esses resultados são consistentes com os de Tian et al. (2020), que relataram melhorias nas concentrações de ácidos orgânicos e aumento da CT em silagens tratadas. Em relação aos níveis de N-NH₃, embora tenha ocorrido um leve aumento nos níveis de N-NH₃ no TMR-2, os valores observados permaneceram dentro da faixa recomendada, com proporções variando de 0,88 a 2,77 g de N-NH₃/kg de NT. De acordo com Kung et al. (2018), silagens bem preservadas devem apresentar até 100 g de N-NH₃/kg de NT, indicando que a qualidade da silagem foi mantida.

O controle microbiano está associado ao aumento de ácidos orgânicos, como ácido acético e propiônico, reconhecidos por suas potentes ações antimicrobianas (Oliveira et al., 2023). Nas silagens tratadas com a dose mais elevada aos 80d, os altos teores de carboidratos residuais podem ser atribuídos à menor atividade fermentativa das LEV, resultante do efeito inibitório desses ácidos sobre seu crescimento e metabolismo, conforme também observado por Da Silva et al. (2015). Esse efeito ocorre porque os ácidos orgânicos, ao atravessarem a membrana celular das leveduras na forma não dissociada, provocam a acidificação do citoplasma, o que aumenta o consumo de energia e resulta em esgotamento energético, comprometendo sua sobrevivência e atividade fermentativa (Stratford et al., 2013). Além disso, Da Silva et al. (2015) sugerem que a baixa disponibilidade de água metabólica em ambientes com altas concentrações desses ácidos pode limitar a atividade microbiana, favorecendo a preservação dos carboidratos na silagem. Esse mecanismo é corroborado por Li et al. (2024), que associam a maior retenção de açúcares residuais em silagens aditivadas a um ambiente ácido e a inibição de microrganismos indesejáveis

4.2 Populações microbianas e ácidos orgânicos

A aplicação da maior dose do aditivo resultou em um aumento significativo na concentração de AL nas silagens. Esse efeito pode ser atribuído à intensificação da acidificação promovida pelo aditivo, que favoreceu a fermentação homofermentativa (Wei et al., 2021). A maior população de BAL no início da fermentação se deve à intensa acidificação, que favorece seu crescimento. Com o avanço do período de fermentação, essa população se estabiliza devido à redução dos CHOs e à competição com outros microrganismos (Li et al., 2015). Essa acidificação não apenas inibiu o crescimento de LEV, mas também reduziu a degradação da proteína em amônia, criando um ambiente propício a produção de AL (Tyrolová et al., 2017). Além disso, a presença de LEV assimiladoras de CHOs pode ter também contribuído para a conversão desses CHOs em AL, aumentando ainda mais a eficiência de fermentação e a queda do pH (Zhang et al., 2020).

Durante o processo de ensilagem, as LEV metabolizam CHOs, resultando na produção de etanol e dióxido de carbono, o que contribui para PMS e deterioração da silagem (Han et al., 2022). Em nosso estudo, a maior dose de FreshCUT Plus™ demonstrou eficácia na inibição do crescimento de LEV aos 80d e na diminuição dos fungos aos 40d, conforme evidenciado pelas contagens microbiológicas. Esse efeito pode ser atribuído à propriedade antimicrobiana desses aditivos químicos, que inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis e promovem uma fermentação láctica (Dai et al., 2022; Han et al., 2022). Wang et al. (2023) e Oliveira et al. (2023) também relataram que aditivos contendo ácidos orgânicos promovem uma rápida acidificação do meio, reduzindo o pH e limitando o desenvolvimento desses microrganismos indesejáveis. As concentrações elevadas de AA, AP e 1,2P observadas neste tratamento eram esperadas e ajudam a explicar a redução de microrganismos indesejáveis, devido às suas propriedades antifúngicas. O AA e o AP, em particular, desempenham um papel essencial na inibição de LEV e mofos, enquanto o 1,2P pode ser convertido em propionato, potencializando ainda mais essa ação antimicrobiana (Da Silva et al., 2021).

Tyrolová et al. (2017) afirmam que silagens de alta qualidade devem apresentar uma relação elevada entre AL e AA, indicando a predominância da fermentação homofermentativa, que é crucial para a estabilidade e preservação do material. No presente estudo, todos os tratamentos resultaram em uma maior produção de AL em comparação ao AA, confirmando essa predominância da fermentação homofermentativa. No entanto, observou-se que a maior dose de FreshCUT Plus™ resultou em uma diminuição dessa relação. Esse achado sugere que a adição de ácidos orgânicos pode favorecer o crescimento de bactérias heterofermentativas, promovendo uma maior produção de AA (Wei et al., 2021).

O AB é comumente produzido pela fermentação *Clostridium* em condições de baixa MS e CHO (Wei et al., 2021). Para garantir uma fermentação adequada, é recomendado que os níveis de AB permaneçam abaixo de 5 g/kg de MS (Kung et al., 2018). No presente estudo, as concentrações de AB foram relativamente baixas e, provavelmente, não apresentam impacto biológico relevante. Resultados semelhantes foram reportados por Wang et al. (2023), que investigaram o uso de sais orgânicos, e por Gheller et al. (2021), que testaram o AP, ambos observando baixos níveis de AB, indicando uma fermentação eficiente.

4.3 Composição química

Os teores de MS encontrados nas silagens de ração total estão acima da faixa considerada ideal, que está entre 28% a 32% (Kung et al., 2018). Apesar dessa elevação, o processo fermentativo não foi comprometido, o que é esperado, uma vez que as TMRs, por sua natureza, apresentam teores de MS mais elevados, devido à inclusão de ingredientes com características higroscópicas, que ajudam a minimizar as perdas durante a fermentação (Marocco et al., 2020). Além disso, Han et al. (2022) apontam que altos teores de MS podem ser benéficos, pois inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis, como clostrídios e enterobactérias, o que pode explicar os baixos teores de AB e N-NH₃ observados em nossos resultados.

Os teores de PB mantiveram-se dentro das faixas estabelecidas na formulação das dietas. Essa constância pode ser explicada pelo uso de ingredientes com propriedades tamponantes, que contribuem para a diminuição da umidade e do N-NH₃, favorecendo a manutenção da PB (Lazzari et al., 2021). Ademais, segundo Junges et al. (2017), em situações de elevada umidade, as enzimas presentes nas plantas e as de origem bacteriana podem atuar em até 90% da proteólise. O aumento de FDN nas silagens tratadas com a maior dose pode ter inibido a atividade das enzimas como celulasas e hemicelulasas. Segundo Wei et al. (2021), essa inibição reduz a degradação da parede celular, preservando a estrutura fibrosa.

Em relação ao teor de EE, todas as silagens apresentaram valores abaixo dos limites estabelecidos pelo National Research Council (NRC), que recomenda um valor máximo de 60-70 g/kg MS nas dietas (NRC, 2001). Esse limite é indicado, pois a presença excessiva de lipídeos pode comprometer a digestibilidade e a taxa de passagem da fibra, favorecendo o crescimento de microrganismos indesejáveis e prejudicando a eficiência da fermentação ruminal (Humer et al., 2018). Contudo, as silagens tratadas com a maior dose de aditivo apresentaram menores teores de EE aos 40 dias. Wang et al. (2023) também observaram uma redução nos níveis de EE nas TMRs aditivadas com sais orgânicos, associando essa diminuição ao aumento da produção de compostos antifúngicos e redução na população de microrganismos indesejáveis. Além disso, a torta de

algodão, ingrediente presente em todas as silagens e rica em lipídeos (Dias et al., 2019), pode ter influenciado os níveis de EE observados, embora seu impacto não tenha sido o foco deste estudo.

4.4 Estabilidade aeróbia

Como esperado, a maior EA foi observada nas silagens tratadas com maior dose, evidenciada pela manutenção de um pH equilibrado e pela eficiente inibição de microrganismos indesejáveis, como LEV e mofos. Essa dosagem também contribuiu para um ambiente térmico controlado, com temperaturas mais baixas, além de uma elevada CT. Conforme Wilkinson e Davies (2013), uma CT elevada é essencial para resistir a variações que favorecem microrganismos deterioradores. O AA e o AP, componentes principais do aditivo, desempenham um papel decisivo na supressão das LEV, corroborando as afirmações de Da Silva et al. (2021), que destacam a eficácia desses ácidos em criar um ambiente que retarda a deterioração, favorecendo a produção de compostos orgânicos a partir da maior disponibilidade de CHOs, o que estabelece condições desfavoráveis à proliferação de microrganismos indesejáveis, como também observamos neste estudo.

Esse tratamento, aos 80d, apresentou uma EA de 144h, resultado não apenas da ação sinérgica entre os ácidos orgânicos, mas também da maior concentração desses ácidos devido à dose aplicada. A maior quantidade desses ácidos favoreceu a produção de compostos antifúngicos, promovendo uma inibição mais eficaz de microrganismos deterioradores e, conseqüentemente, melhorando a EA (Da Silva et al., 2021). Nesse contexto, Da Silva Neto et al. (2023) demonstraram que o uso do aditivo Mycoflake™, composto por AA e AP, também melhorou a EA, agindo de maneira similar ao que foi observado no estudo. A ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos, que inibem o crescimento de FUN e LEV, preserva os nutrientes da silagem durante a exposição ao ar. De acordo com Li et al. (2024), essa inibição da atividade das LEV resulta em teores aceitáveis de N-NH₃ e AB, reduzindo a deterioração das silagens quando expostas ao ar.

Estudos realizados por Dai et al. (2022) confirmaram que silagens de TMR tratadas com aditivos químicos aumentaram significativamente a EA (>216h) em comparação ao CTRL (168h). De maneira similar, Aslım et al. (2021) avaliaram o efeito da aplicação de AP em silagens de TMR e observaram EA superior a 168h.

Os achados do presente estudo demonstraram que a adição de FreshCUT Plus™ nas silagens de TMR à base de sorgo forrageiro é eficaz na melhoria das características fermentativas e na EA. A interação observada entre os períodos de fermentação e a adição deste aditivo resultou em melhorias significativas no pH e na concentração de CHOs, acompanhadas por uma redução

nas populações de LEV aos 80d, sustentando a hipótese de que a aplicação apropriada de aditivos pode otimizar o processo fermentativo.

A dosagem de 2 kg/Mg de FreshCUT Plus™ destacou-se por elevar os níveis de ácidos orgânicos, como AL e AA, essenciais para a preservação e a qualidade do material ensilado. Além disso, essa dosagem foi associada a uma maior EA das silagens aos 80d, indicando que a utilização estratégica desse aditivo não apenas melhora a eficiência da fermentação, mas também potencializa a durabilidade e o valor nutritivo das silagens de sorgo forrageiro por períodos prolongados.

5 CONCLUSÃO

A adição de FreshCUT Plus™ em silagens de ração em mistura total à base de sorgo forrageiro melhorou as características fermentativas e a estabilidade aeróbia das silagens. Portanto, recomenda-se a adição de 2 kg/Mg de FreshCUT Plus™ e o período de fermentação de 80 dias.

REFERÊNCIAS

- AESA. (2024). *Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba*. <http://www.aesa.pb.gov.br/>.
- Alvares, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, P. C., de Moraes Gonçalves, J. L., & Sparovek, G. (2013). Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22(6), 711–728. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>
- American Public Health Association. (2015). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5th Ed. (Y. Salfinger and M. Lou Tortorello, Editors.). American Public Health Association (APHA), Washington, DC, USA.*
- AOAC International. (1990). *Official Methods of Analysis of AOAC International. 15th Edition. Arlington, VA (USA).*
- Arriola, K. G., Vyas, D., Kim, D., Agarussi, M. C. N., Silva, V. P., Flores, M., Jiang, Y., Yanlin, X., Pech-Cervantes, A. A., Ferraretto, L. F., & Adesogan, A. T. (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. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19512>

- Aslim, A., Okuyucu, B., & Koç, F. (2021). Propiyonik Asit Katkısının Toplam Karışım Rasyonu Yemin Aerobik Stabilité Özellikleri Üzerine Etkileri. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 9(1), 210–216. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v9i1.210-216.3848>
- Bolsen, K. K., Lin, C., Brent, B. E., Feyerherm, A. M., Urban, J. E., & Aimutis, W. R. (1992). Effect of Silage Additives on the Microbial Succession and Fermentation Process of Alfalfa and Corn Silages. *Journal of Dairy Science*, 75(11), 3066–3083. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78070-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78070-9)
- Da Silva, E. B., Smith, M. L., Savage, R. M., Polukis, S. A., Drouin, P., & Kung, L. (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*, 130(5), 1481–1493. <https://doi.org/10.1111/jam.14892>
- Da Silva Neto, A. B., Ribeiro, A. P., Volpato, A., Machado, J., Nazato, L. M., Santos, D. P., Francisco, L. F., Arthur, B. A. V., Morais, G., Reis, R. H. P., Daniel, J. L. P., Greco, L. F., & Nussio, L. G. (2023). Propionic acid-based additive with surfactant action on the feeding value of rehydrated corn grain silage for dairy cows performance. *Livestock Science*, 275, 105292. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2023.105292>
- Da Silva, T. C., Smith, M. L., Barnard, A. M., & Kung, L. (2015). The effect of a chemical additive on the fermentation and aerobic stability of high-moisture corn. *Journal of Dairy Science*, 98(12), 8904–8912. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9640>
- Dai, T., Dong, D., Wang, S., Zong, C., Yin, X., Jia, Y., & Shao, T. (2022). The effectiveness of chemical additives on fermentation profiles, aerobic stability and *in vitro* ruminal digestibility of total mixed ration ensiled with Napier grass and wet distillers' grains in southeast China. *Italian Journal of Animal Science*, 21(1), 979–989. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2022.2078234>
- Dias, E. C. B., Cândido, M. J. D., Furtado, R. N., Pompeu, R. C. F. F., & Silva, L. V. da. (2019). Nutritive value of elephant grass silage added with cottonseed cake in diet for sheep. *Revista Ciência Agronômica*, 50(2). <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20190038>
- Dubois, M. et al. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.

- Ferreira, D. F. (2019). SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. *Revista Brasileira de Biometria*, 37(4), 529–535. <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>
- Gheller, L. S., Ghizzi, L. G., Takiya, C. S., Grigoletto, N. T. S., Silva, T. B. P., Marques, J. A., Dias, M. S. S., Freu, G., & Rennó, F. P. (2021). Different organic acid preparations on fermentation and microbiological profile, chemical composition, and aerobic stability of whole-plant corn silage. *Animal Feed Science and Technology*, 281, 115083. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115083>
- Han, Z., Xu, G., Wang, S., Dai, T., Dong, D., Zong, C., Yin, X., Jia, Y., & Shao, T. (2022). Antimicrobial effects of four chemical additives on fermentation quality, aerobic stability, and in vitro ruminal digestibility of total mixed ration silage prepared with local food by-products. *Animal Science Journal*, 93(1). <https://doi.org/10.1111/asj.13755>
- Humer, E., Petri, R. M., Aschenbach, J. R., Bradford, B. J., Penner, G. B., Tafaj, M., Südekum, K.-H., & Zebeli, Q. (2018). Invited review: Practical feeding management recommendations to mitigate the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 101(2), 872–888. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13191>
- Kung, L., Savage, R. M., da Silva, E. B., Polukis, S. A., Smith, M. L., Johnson, A. C. B., & Miller, M. A. (2021). The effects of air stress during storage and low packing density on the fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* 40788. *Journal of Dairy Science*, 104(4), 4206–4222. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19746>
- Kung, L., Shaver, R. D., Grant, R. J., & Schmidt, R. J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
- Kung, L., Taylor, C. C., Lynch, M. P., & Neylon, J. M. (2003). The Effect of Treating Alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on Silage Fermentation, Aerobic Stability, and Nutritive Value for Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 336–343. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73611-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73611-X)
- Li, D., Ni, K., Pang, H., Wang, Y., Cai, Y., & Jin, Q. (2015). Identification and Antimicrobial Activity Detection of Lactic Acid Bacteria Isolated from Corn Stover Silage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(5), 620–631. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0439>

- Li, X., Cheng, Y., Yang, F., Hu, J., Ma, R., Liu, H., & Shao, T. (2024). Improving Total Mixed Ration Silage: Effects of Lactic Acid Bacteria Inoculants and Antimicrobial Additives on Fermentation Quality and Aerobic Stability. *Agronomy*, 14(8), 1602. <https://doi.org/10.3390/agronomy14081602>
- Magalhães, F. A., Valadares Filho, S. C., Menezes, G. C. C., Machado, M. G., Zanetti, D., Pina, D. S., Pereira, O. G., & Paulino, M. F. (2012). Composição química e perdas fermentativas de ensilagem de cana com diferentes graus Brix, com ou sem óxido de cálcio. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(2), 256–263.
- Marocco, D. H., Favero, P., Guralski, R., Basi, C., Zacaron, W., Solivo, G., Zotti, C. A. (2020). Use of by-products in a total mixed ration silage. *Semina: Ciências Agrárias*, 41(6supl2), 3473-3480. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n6Supl2p3473>
- Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., McAllister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C., & Kung, L. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3980–4000. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>
- NRC (National Research Council). (2007). Nutrient requirements of small ruminants. Washington, DC: National Academy Press.
- NRC. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle* (2001). National Academies Press: Washington, DC, USA, 7th ed.
- Oliveira, K. da S., Salvati, G. G. de S., Morais, G. de, Carvalho-Estrada, P. de A., Santos, W. P. dos., Salvatte, J. M. S., Gritti, V. C., Salvo, P. A. R., Arthur, B. A. V., Nazato, L. M., & Nussio, L. G. (2023). Effect of Length of Storage and Chemical Additives on the Nutritive Value and Starch Degradability of Reconstituted Corn Grain Silage. *Agronomy*, 13(1), 209. <https://doi.org/10.3390/agronomy13010209>
- Playne, M. J., & McDonald, P. (1966). The buffering constituents of herbage and of silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 17(6), 264–268. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740170609>
- Qiu, X., Guo, G., Yuan, X., & Shao, T. (2014). Effects of adding acetic acid and molasses on fermentation quality and aerobic stability of total mixed ration silage prepared with hullless barley straw in Tibet. *Grassland Science*, 60(4), 206–213. <https://doi.org/10.1111/grs.12062>

- Santin, T. P., Frigeri, K. D. M., Agostini, A., Silva, H. R. da., Frigeri, K. D. M., Kalles, N. Z., Coelho, E. M., & Dias, A. M. (2020). Características fermentativas e composição química da silagem de sorgo (*Sorghum bicolor*) com uso de aditivos absorventes. *Brazilian Journal of Development*, 6(8), 54931–54943. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n8-057>
- Santos, A. C. P., Santos, E. M., Carvalho, G. G. P., Perazzo, A. F., Araújo, M. L. G. M. L., de Oliveira, J. S., Pereira, G. A., Macêdo, A. J. da S., SÁ, W. C. C. dos S., & Pereira, D. M. (2021). Fermentation profile, microbial populations and aerobic stability of sorghum silages enriched with urea and *Lactobacillus buchneri*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 66(2), 128–144. <https://doi.org/10.1080/00288233.2021.2000437>
- SBCS. (2018). Sistema brasileiro de classificação de solos. *Embrapa Solos*.
- Siegfried, V. R., Ruckemann, H., & Stumpf, G. (1984). Eine HPLC-methode zur bestimmung organischer säuren in silagen. *Landwirtsch Forsch*, 298–304.
- Stratford, M., Steels, H., Nebe-Von-Caron, G., Novodvorska, M., Hayer, K., Archer, D. B. (2013). Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 126-134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.025>
- Tian, P., Vyas, D., Niu, D., Zuo, S., Jiang, D., & Xu, CH. (2020). Effects of calcium carbonate on the fermentation quality and aerobic stability of total mixed ration silage. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 29(2), 167–174. <https://doi.org/10.22358/jafs/124047/2020>
- Tyrolová, Y., Bartoň, L., & Loučka, R. (2017). Effects of biological and chemical additives on fermentation progress in maize silage. *Czech Journal of Animal Science*, 62(7), 306–312. <https://doi.org/10.17221/67/2016-CJAS>
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Wang, S., Liu, H., Zhao, J., Dong, Z., Li, J., & Shao, T. (2023). Influences of Organic Acid Salts and Bacterial Additives on Fermentation Profile, Aerobic Stability, and In Vitro Digestibility of Total Mixed Ration Silage Prepared with Wet Hullless Barley Distillers' Grains. *Agronomy*, 13(3), 672. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030672>

- Wei, S. N., Li, Y. F., Jeong, E. C., Kim, H. J., & Kim, J. G. (2021). Effects of formic acid and lactic acid bacteria inoculant on main summer crop silages in Korea. *Journal of Animal Science and Technology*, 63(1), 91–103. <https://doi.org/10.5187/jast.2021.e7>
- Wilkinson, J. M., & Rinne, M. (2018). Highlights of progress in silage conservation and future perspectives. *Grass and Forage Science*, 73(1), 40–52. <https://doi.org/10.1111/gfs.12327>
- Zhang, Y., Liu, Y., Meng, Q., Zhou, Z., & Wu, H. (2020). A mixture of potassium sorbate and sodium benzoate improved fermentation quality of whole-plant corn silage by shifting bacterial communities. *Journal of Applied Microbiology*, 128(5), 1312–1323. <https://doi.org/10.1111/jam.14571>