

JOÃO PAULO SANTOS ROSEIRA

**SILAGENS DE SORGO TRATADAS COM CEPAS AUTÓCTONES DE
Lactobacillus buchneri E USO DE PROTEASE EXÓGENA EM GRÃOS DE
MILHO E SORGO REIDRATADOS E ENSILADOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

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

T

R799s
2019
Roseira, João Paulo Santos, 1988-
Silagens de sorgo tratadas com cepas autóctones de
Lactobacillus buchneri e uso de protease exógena em grãos de
milho e sorgo reidratados e ensilados / João Paulo Santos
Roseira. – Viçosa, MG, 2019.
ix, 67f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Odilon Gomes Pereira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Silagem. 2. RNA ribossômico. 3. Reação em cadeia de
polimerase. 4. Enzimas proteolíticas. 5. Digestibilidade.
6. Amido. 7. Proteínas. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.174

JOÃO PAULO SANTOS ROSEIRA

**SILAGENS DE SORGO TRATADAS COM CEPAS AUTÓCTONES DE
Lactobacillus buchneri E USO DE PROTEASE EXÓGENA EM GRÃOS DE
MILHO E SORGO REIDRATADOS E ENSILADOS**

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

APROVADA: 12 de abril de 2019.



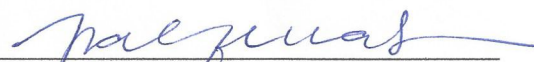
Hilário Cuquetto Mantovani
(Coorientador)



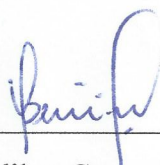
Karina Guimarães Ribeiro
(Coorientadora)



Eliana dos Santos Leandro



Poliane Alfenas Zerbini



Odilon Gomes Pereira
(Orientador)

“... Pois estou com você; não tenha medo, pois sou o seu Deus. Eu o fortalecerei e o ajudarei; eu o segurarei com a minha mão direita vitoriosa.” Is 41:10

A Deus por me abençoar, guiando os meus caminhos.

Ao meu pai, Paulo, meu exemplo de vida e a minha mãe Cleusa (*in memoriam*), minha rainha, que realizou esse sonho junto comigo, mas Deus em sua infinita graça a levou para junto dele, AMO VOCÊS!

Ao meu amado filho, Hugo, por cada sorriso, que me renova a cada manhã.

A minha linda e amada, Tâmara, sempre ao meu lado.

Aos meus irmãos, fundamentais em minha vida.

Aos sobrinhos, em vocês existe a felicidade.

Ao professor Rasmô Garcia, exemplo de profissional e ser humano.

Enfim, aos amigos, tios (as), avós, cunhadas (o), primos (as), professores (as).

MINHA VITÓRIA ESTENDE-SE A VOCÊS!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre guiar os meus caminhos, me dando saúde, força e paz.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, dedicação e confiança...minha base.

Ao meu amado filho, Hugo, pelos abraços e sorrisos me encorajando a continuar.

À minha linda e amada, Tâmara, pela ajuda, paciência e compreensão nos momentos de ausência.

A Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Zootecnia e Microbiologia e sua equipe docente, pela capacitação profissional e por disponibilizar suas instalações para condução do experimento.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa.

Ao professor Odilon Gomes Pereira, pela orientação, ensinamentos e confiança.

Ao professor Hilário Cuquetto Mantovani pela co-orientação, ensinamentos e disponibilidade sempre que necessário.

A professora Poliane Alfenas Zerbini, por disponibilizar as instalações e contribuir com a realização das análises, pelos ensinamentos e disponibilidade sempre que necessário.

A professora Eliana dos Santos Leandro pela paciência, dedicação e ensinamentos durante a condução do trabalho.

Aos membros da banca, pelas sugestões para melhoria do trabalho.

A equipe do Laboratório de Forragicultura e Laboratório de Culturas láticas, pela amizade, ensinamentos e apoio na realização das análises laboratoriais, em especial aos pós-doutores Rosinea Aparecida e Renan Cascardo, pela orientação nas análises microbiológicas, sem vocês seria mais difícil.

Aos irmãos de orientação pelo companheirismo e ensinamentos.

Aos colegas da pós-graduação, pelo aprendizado e excelente convivência.

Aos estagiários pela ajuda na montagem e condução do experimento.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia pela colaboração e auxílio sempre que necessário.

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

MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

JOÃO PAULO SANTOS ROSEIRA, filho de Cleusa Coutinho Santos Roseira e Paulo Neri Roseira, nasceu em Vitória da Conquista, BA, em 10 de Junho de 1988.

Em Agosto de 2008, ingressou no curso de Engenharia Agrônômica na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, concluindo em Julho de 2013.

Em agosto de 2013, ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa, UFV, área de concentração Forragicultura e Pastagem, concluindo em Julho de 2015.

Em agosto de 2015, ingressou no curso de Doutorado em Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa, UFV, área de concentração Forragicultura e Pastagem, concluindo em Abril de 2019.

SUMÁRIO

Resumo	vi
Abstract.....	viii
Introdução geral.....	1
Literatura citada	6
Capítulo 1- Isolamento de bactérias lácticas e quantificação de <i>Lactobacillus buchneri</i> usando qPCR em silagem de sorgo inoculadas com cepas autóctones.....	9
Resumo.....	9
Abstract.....	10
Introdução.....	11
Material e Métodos.....	12
Resultados.....	17
Discussão.....	31
Conclusão.....	37
Literatura Citada.....	38
Capítulo 2- Efeitos da adição de protease exógena na fermentação e valor nutritivo de grãos de milho e sorgo reidratados.....	43
Resumo.....	43
Abstract.....	44
Introdução.....	45
Material e Métodos.....	46
Resultados.....	50
Discussão.....	61
Conclusão.....	67
Literatura Citada.....	67
Conclusões gerais.....	69

RESUMO

ROSEIRA, João Paulo Santos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2019. **Silagens de sorgo tratadas com cepas autóctones de *Lactobacillus buchneri* e uso de protease exógena em grãos de milho e sorgo reidratados e ensilados.** Orientador: Odilon Gomes Pereira. Coorientadores: Hilário Cuquetto Mantovani e Karina Guimarães Ribeiro.

Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, UFV, *campus* de Viçosa, gerando informações apresentadas em dois capítulos. No primeiro capítulo, objetivou-se isolar e identificar bactérias do ácido láctico em silagem de sorgo, quantificar por qPCR a população do *L. buchneri*, bem como, avaliar mudanças no perfil fermentativo e valor nutritivo de silagens de sorgo inoculadas com cepas autóctones. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 4×5 , sendo quatro inoculantes (I), controle (CON), *L. buchneri* estirpe 50.1 (LB.1), *L. buchneri* estirpe 50.4 (LB.4) e LALSIL AS, *L. buchneri* CNCM I-4323, Lallemand (LAS) e cinco períodos de fermentação (7, 14, 28, 45 e 90 dias) no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Foram obtidos quarenta e sete isolados, com predominância de *L. buchneri* após 45 e 90 dias de fermentação. Os dados do qPCR demonstraram que *L. buchneri* predominou durante todos períodos de fermentação (P) nas silagens inoculadas. Foi verificado efeito da interação $I \times P$ ($P < 0,05$) sobre as variáveis do perfil fermentativo e populações microbianas das silagens. Maiores concentrações de AA e menores concentrações de AL foram obtidas nas silagens inoculadas. A silagem CON apresentou população de leveduras superiores ($P < 0,05$) às silagens inoculadas aos 14, 28, 45 e 90 dias de fermentação. Ao avaliar a composição química das silagens aos 45 e 90 dias de fermentação, foi verificada interação $I \times P$ ($P < 0,05$) para as variáveis MS, FDN, DIVMS e DIVFDN. Aos 90 dias de fermentação, silagens tratadas com *L. buchneri* apresentaram maiores ($P < 0,05$) DIVMS comparadas à silagem CON. A inoculação com o *L. buchneri* resultou em silagens com melhor qualidade fermentativa, menor população de leveduras e mais digestíveis. As cepas autóctones LB.1 e LB.4 apresentam potencial para serem utilizadas como inoculantes para produção de silagem com efeitos na fermentação aos 45 dias de armazenamento. No segundo capítulo, avaliou-se os efeitos da adição de protease exógena (E) na fermentação e valor nutritivo de silagens de grãos (G) de milho e sorgo reidratados em diferentes períodos de armazenamento (P). Os grãos de milho e sorgo foram moídos em tamanho de partícula de 3 mm e a umidade reconstituída para

35%. Foi utilizado um esquema fatorial $2 \times 6 \times 3$, sendo dois grãos (milho e sorgo), seis doses de enzima (0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 e 1,5% com base na MN) e três períodos de fermentação (0, 60 e 90 dias) no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. A protease utilizada, aspergiloepsina I, é de origem fúngica produzida por *Aspergillus niger* (FoodPro PAL[®], DANISCO). Houve efeito ($P < 0,05$) da interação $G \times E \times P$ sobre AL, N-NH₃, P-Sol, CHO, amido, DISAM, FDN, FDA e leveduras. Verificou-se aumento linear nas concentrações de AL ($P < 0,05$), com o aumento da dose de enzima nas silagens de grãos de milho (GM) e de sorgo (GS), aos 60 e 90 dias de fermentação. Silagens de GM e GS apresentaram concentrações de ETA semelhantes ($P > 0,05$), exceto nas doses de 1,2 e 1,5% da enzima, nas quais silagens de GS apresentaram maiores concentrações ($P < 0,05$) comparadas a GM. Aos 60 e 90 dias de fermentação foi verificada população de BAL semelhante ($P > 0,05$) entre silagens de GM e GS. Silagens de GS apresentaram populações de LEV superiores ($P < 0,05$) às de GM aos 60 e 90 dias de fermentação, em todas as doses de enzima avaliadas. Os dados de concentração de N-NH₃, P-Sol, FDN e DISAM nas silagens de GM e GS foram ajustados a um modelo polinomial quadrático com resposta platô. Verificaram-se aumentos ($P < 0,05$) nas concentrações de N-NH₃, DISAM e P-Sol nas silagens de GM e GS reidratados e tratadas com enzima, comparados as silagens não tratadas. A adição de 0,3% de protease exógena no momento da ensilagem de GM e 0,5% em GS reidratados aumentou a atividade proteolítica durante a fermentação e proporcionou aumento da digestibilidade *in situ* do amido em menor tempo de armazenamento.

ABSTRACT

ROSEIRA, João Paulo Santos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2019. **Sorghum silages treated with native strains of *Lactobacillus buchneri* and use of exogenous protease in rehydrated and ensiled corn and sorghum grains.** Adviser: Odilon Gomes Pereira. Co-advisers: Hilário Cuquetto Montavani and Karina Guimarães Ribeiro.

The experiments were carried at the Department of Animal Science of the Federal University of Vicosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil, and the information obtained from them is presented in two chapters. In the first chapter, the objective was to isolate and identify lactic acid bacteria (LAB), as well as to quantify the population of *Lactobacillus buchneri* by qPCR in sorghum silage. It was also evaluated changes on the fermentative profile and nutritional value of sorghum silages inoculated with native strains of *L. buchneri*. The treatments were arranged in a 4 × 5 factorial scheme, in a randomized design with three replicates. Fresh sorghum was treated with four inoculants (I) and silages were opened at five periods of fermentation (P) (7, 14, 28, 45 and 90 d). The inoculants were: Control (CON), *L. buchneri* 50.1 strain (LB.1), *L. buchneri* 50.4 strain (LB.4), and LALSIL AS, which contains the *L. buchneri* CNCM I-4323 strain (Lallemand, Brazil) (LAS). Forty-seven LAB strains were isolated from control silage, and *L. buchneri* was the predominant species at 45 and 90 d of fermentation. The qPCR data showed that *L. buchneri* predominated during all fermentation periods (P) in the inoculated silages. There was an effect (P<0.05) of I × P interaction on all studied variables of the fermentative profile and microbial population. Inoculated silages presented greater (P<0.05) concentration of acetic (AA) and lower (P<0.05) of lactic acid (LA). The CON silage showed greater yeast population (P<0.05) at 14, 28, 45 and 90 d of fermentation compared to inoculated silages. It was observed an effect (P<0.05) of I × P interaction on the DM, NDF, *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) and *in vitro* neutral detergent fiber digestibility (IVNDFD) variables. Inoculated silages showed greater (P<0.05) IVDMD in relation to CON silage at 90 d of fermentation. The inoculation with *L. buchneri* resulted in silages with better fermentative quality, less yeast population and more digestible. The native LB.1 and LB.4 strains have potential to be used as inoculants in sorghum silage production with effects on fermentation quality at 45 d of storage. In the second chapter, the effects of adding exogenous protease (E) on the fermentation and nutritive value of rehydrated

corn and sorghum grain silages (G) at different storage periods (P) were evaluated. Corn and sorghum grains were ground through a mill retrofitted with a 3-mm screen. Prior to ensiling, ground grains were rehydrated up to 35% of moisture. A $2 \times 6 \times 3$ factorial scheme was used, with two grains (corn and sorghum), six doses of enzyme (0; 0.3; 0.6; 0.9; 1.2 and 1.5% on fresh matter basis) and three fermentation periods (0, 60 and 90 d), in a randomized design, with four replicates. The enzyme was a protease, aspergillopepsin I, which is produced by the *Aspergillus niger* (FoodPro PAL[®], DANISCO). There was an effect ($P < 0.05$) of $G \times E \times P$ interaction on the concentrations of LA, ammonia nitrogen (N-NH₃), soluble protein (P-Sol), water-soluble carbohydrate (WSC), starch, NDF and ADF, and on yeast count. There was a positive linear increase on LA concentrations ($P < 0.05$) with increasing doses of enzyme in corn (CG) and sorghum grain (SG) silages at 60 and 90 d of fermentation. Sorghum grain silages showed greater ($P < 0.05$) concentrations of ethanol (ETA) at doses of 1.2 and 1.5% of enzyme compared to CG. It was found similar ($P > 0.05$) LAB count between CG and SG silages at 60 and 90 d of fermentation. Sorghum grain silages showed greater yeast population ($P < 0.05$) compared to CG at 60 and 90 d of fermentation, in all evaluated enzyme doses. The data of N-NH₃, P-Sol, NDF and *in situ* starch digestibility (ISSD) of CG and SG silages were adjusted to a quadratic polynomial model with plateau response. Ammonia nitrogen, ISSD and P-Sol increased ($P < 0.05$) in CG and SG silages rehydrated and treated with enzyme in relation to untreated silages. The addition of 0.3 and 0.5% of exogenous protease at ensiling of rehydrated CG and SG, respectively, increased the proteolytic activity and *in situ* starch digestibility during silage fermentation in a shorter storage time.

Introdução geral

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é uma importante forrageira utilizada para a produção de silagem em locais de clima tropical e subtropical. Silagem é o produto obtido após a fermentação anaeróbica, na qual os micro-organismos consomem carboidratos solúveis (frutose e pentoses) e produz ácidos orgânicos de cadeia curta, predominantemente o ácido lático, o que leva a redução do pH da massa ensilada. As condições ácidas e de anaerobiose no interior do silo previne o crescimento de fungos e bactérias deterioradoras, sendo suficiente para conservar a forragem ensilada por longos períodos (Muck e Pitt, 1994; Pahlow et al., 2003; Klocke et al., 2006).

As bactérias produtoras do ácido lático (BAL) são as populações de maior interesse na microbiota das culturas forrageiras. Dividem-se em espécies homofermentativas, as quais produzem em maior quantidade o ácido lático (AL) e caracterizam-se pela taxa de fermentação mais rápida, menor proteólise e maior recuperação de energia e matéria seca. As espécies heterofermentativas, além do AL, produzem ácido acético, etanol e dióxido de carbono (CO₂) (McDonald et al., 1991; Zopollatto et al., 2009; Vlková et al., 2012).

Frequentemente, aditivos microbianos contendo BAL oriundas dos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus* são utilizados para garantir uma fermentação desejável e melhorar a qualidade e estabilidade aeróbia das silagens (Ávila et al., 2009; Tabacco et al., 2011; Sá Neto et al., 2013; Babaeinasab et al., 2015; Silva et al., 2016). Estabilidade aeróbia pode ser definida como o período em que a silagem, quando exposta ao ar, permanece sem deterioração por micro-organismos. As leveduras iniciam o processo de deterioração, consumindo carboidratos residuais e produtos da fermentação (ácido lático e etanol), resultando em aumento do pH da silagem, e conseqüentemente, favorecendo a multiplicação de bactérias oportunistas (exemplo, *Bacillus*) e mofo (*Aspergillus*, *Fusarium* e *Pencillium*) acelerando a deterioração da silagem (McDonald et al., 1991; Kung Jr., 2014). A presença desses micro-organismos constitui risco para saúde do homem e animal, uma vez que podem produzir toxinas (Ogunade et al., 2018).

Dentre os micro-organismos, o *Lactobacillus buchneri*, é a BAL heterofermentativa mais pesquisada em todo mundo com a finalidade de aumentar a estabilidade aeróbia de silagens. Essa bactéria metaboliza o ácido lático e produz quantidades moderadas de ácido acético, o qual apresenta atividade antifúngica (Moon, 1983; Schmidt et al., 2008). No entanto, os resultados obtidos em alguns estudos são

contraditórios. Thomas et al. (2013) avaliaram o efeito do inoculante comercial composto por *L. buchneri*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *L. plantarum*, e *E. faecium*, em silagens de sorgo e não verificaram melhorias no perfil fermentativo e estabilidade aeróbia da silagem tratada.

Segundo Oude Elferink et al. (2001) a efetiva conversão anaeróbia do ácido láctico em ácido acético por *L. buchneri* ocorre entre 45 e 60 dias de fermentação. No entanto, existe uma demanda na busca de cepas dessa espécie, que sejam mais eficientes em períodos mais curtos de fermentação. Deste modo, detectar quantitativamente a presença de *L. buchneri* em diferentes períodos de fermentação pode contribuir para o uso mais eficaz desse micro-organismo no processo de ensilagem.

Neste sentido, a utilização de técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) mostrou-se específica e sensível para rápida detecção de bactérias, a partir das sequências do gene 16S rDNA, em diferentes ambientes, como silagens (Klocke et al., 2006; Schmidt et al., 2008, Lynch et al., 2012) e rúmen (Ding et al., 2014). A técnica baseia-se no monitoramento do acúmulo de produtos de PCR em uma reação, em tempo real, utilizando sondas químicas fluorescentes (Glynn et al., 2006).

Dentre os benefícios do qPCR destaca-se a sensibilidade, a reprodutibilidade, a velocidade e a capacidade quantitativa. Contudo, estas aplicações requerem *primers* projetados que são apropriados para o alvo de interesse. Fatores como especificidade do *primer* e o comprimento do fragmento amplificado podem influenciar a eficiência da qPCR (McAllister et al., 2018).

A competição entre as bactérias é um dos fatores apontados para o insucesso da utilização de inoculantes em silagens, uma vez que, se a população epifítica for suficientemente maior do que o número de bactérias aplicadas via inoculante, será difícil para essas bactérias introduzidas competirem com as existentes na forragem (Muck, 1988; Kung Jr. et al., 2003).

A maioria dos inoculantes comerciais, é composta por estirpes de bactérias isoladas de forragens produzidas em clima temperado (Heinritz et al., 2012), indicando a necessidade da condução de estudos em condições tropicais que identifiquem micro-organismos com potencial para utilização como inoculantes em silagens. No Brasil, alguns estudos foram desenvolvidos para avaliar a população de BAL nas silagens de milho (Silva et al., 2018); cana-de-açúcar (Ávila et al., 2009); alfafa (Agarussi et al.,

2018) e amendoim forrageiro (Leandro et al., 2019). No entanto, estudos sobre a ecologia microbiana do sorgo e suas silagens são escassos, no Brasil.

Em estudo conduzido na Argélia, Chahrour et al. (2013) isolaram e caracterizaram BAL em silagens de sorgo. Dentre a espécies encontradas destacam-se *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus manihotivorans* (bactéria amilolítica), *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Weissella cibaria*, *W. minor*, *W. soli*, *W. viridescense* e *Leuconostoc mesenteroides* as quais desempenham papel importante durante a fermentação.

Na China, Pholsen et al. (2016) utilizaram inoculantes comerciais e estirpes de *L. casei*, *L. plantarum* e *L. plantarum* isoladas da cultura do milho, cana-de-açúcar e arroz, respectivamente, na ensilagem do sorgo. Observaram que o *L. casei* aumentou a produção de ácido lático em comparação aos demais tratamentos, resultando em melhorias no perfil fermentativo da silagem. Portanto, apresenta potencial de uso como inoculante para a produção de silagem com culturas tropicais.

Atualmente, é crescente o interesse na utilização de silagens de grãos de milho e sorgo reidratados em dietas de bovinos de corte e leite no Brasil. A técnica da reidratação consiste na adição de água para elevar a umidade dos grãos, após serem moídos, para valores em torno de 28 a 35% (Benton et al., 2005). Deste modo, ao final do processo de fermentação é possível obter um alimento que será melhor aproveitado pelos animais (Arcari et al., 2016, Santos et al., 2019).

Basicamente, os grãos são compostos de um pericarpo protetor, o germe e o endosperma, contendo proteína e amido. O amido é o principal carboidrato de reserva dos cereais e representa cerca 60 - 80% do peso dos grãos de milho e sorgo (Kotarski et al., 1992; Hill et al., 2012). Caracteriza-se como polissacarídeo composto principalmente de amilose e amilopectina, que por meios de ligações de hidrogênio conferem estabilidade aos grânulos de amido (Rooney e Pflugfelder, 1986).

O amido é envolto por uma matriz protéica denominada prolaminas, que apresentam um alto teor de prolina e glutamina, que agem como barreira físico-química em torno do amido, o que dificulta o acesso de micro-organismos e enzimas para digestão (Simpson, 2001). No milho, as prolaminas representam cerca de 50 - 60% do conteúdo total de proteínas (Hamaker et al., 1995), sendo conhecidas como de zeínas. No sorgo, a matriz proteica é chamada de kaferinas, a qual representa 77 a 82% da proteína presente no endosperma (Belton et al., 2006). Comparado ao milho, o sorgo apresenta no endosperma periférico maior proporção de proteínas, o que ocasiona maior

resistente à penetração de água, tornando-o mais resistente à degradação enzimática (Rooney e Pflugfelder, 1986).

No processo de fermentação, os micro-organismos da silagem secretam enzimas que degradam a matriz protéica (Junges et al., 2017). Além disso, as prolaminas são solúveis em ácidos orgânicos, os quais são produtos da fermentação na massa ensilada (Lawton, 2002). Esses feitos, possivelmente, promovem aumento da superfície de contato para os micro-organismos ruminais, aumentando assim a digestibilidade do amido.

Estudos demonstram que os maiores tempos de armazenamento proporcionam redução das prolaminas em diferentes silagens e aumento na digestibilidade da matéria seca e do amido (Benton et al., 2005; Hoffman et al., 2011., Carvalho et al., 2017).

A utilização de aditivos enzimáticos, a exemplo de proteases, tem sido utilizados com objetivo de hidrolisar as cadeias peptídicas das proteínas que envolvem os grânulos de amido, tornando-o mais digestível em menor tempo de armazenamento. Ferrareto et al. (2015) relataram que a adição de proteases exógenas, obtidas de *Bacillus licheniformis*, no momento da ensilagem de grão de milho reidratado acelerou o processo proteolítico durante a fermentação, resultando em aumento na degradação ruminal *in vitro* do amido.

Windle et al. (2014) trataram plantas inteiras de milho com proteases exógena oriunda de *Aspergillus niger* e armazenaram durante 45, 90 e 150 dias. Os autores observaram que a utilização da protease aumentou a proteólise nas silagens tratadas e a digestibilidade do amido com 45 dias foi semelhante aos demais dias de armazenamento.

A utilização de protease exógena, obtida de *Aspergillus niger*, na ensilagem de grãos de alta umidade também mostrou-se promissora para aumentar a digestibilidade do amido em menor tempo de armazenamento, 70 dias (Kung Jr. et al., 2014).

Face ao exposto, objetivou-se isolar e identificar bactérias do ácido lático em silagem de sorgo, quantificar por qPCR a população do *L. buchneri*, bem como, avaliar mudanças no perfil fermentativo e composição química de silagens de sorgo inoculadas com cepas autóctones; e avaliar os efeitos da adição de protease exógena na ensilagem de grãos de milho e sorgo reidratados.

Literatura citada

- Agarussi, M.C.N., Pereira, O.G., Silva, V.P., Leandro, E.S., Ribeiro, K.G., Santos, S.A., 2018. Fermentative profile and lactic acid bacterial dynamics in non-wilted and wilted alfalfa silage in tropical conditions. *Mol. Biol. Rep.* 46, 451-460.
- Arcari, M.A., Martins, C.M.M.R., Tomazi, T., Goncalves, J.L., Santos, M.V., 2016. Effect of substituting dry corn with rehydrated ensiled corn on dairy cow milk yield and nutrient digestibility. *Anim. Feed Sci. Tech.* 221, 167-173.
- Ávila, C.L.S., Pinto, J.C., Figueiredo, H.C.P., Schwan, R.F., 2009. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. *Grass Forage Sci.* 64, 384-394.
- Babaeinasab, Y., Rouzbehan, Y., Fazaeli, H., Rezaei, J., 2015. Chemical composition, silage fermentation characteristics, and in vitro ruminal fermentation parameters of potato-wheat straw silage treated with molasses and lactic acid bacteria and corn silage. *J. Anim. Sci.* 93, 4377-4386.
- Belton, P.S., Delgadillo, I., Halford, N.G., Shewry, P.R., 2006. Kafirin structure and functionality. *J. Cereal Sci.* 44, 272-286.
- Benton, J.R., Klopfenstein, T., Erickson, G.E., 2005. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. *Nebraska Beef Cattle Reports: 31-33.* University of Nebraska, Lincoln.
- Carvalho, B.F., Ávila, C.L.S., Bernardes, T.F., Pereira, M.N., Santos, C., Schwan, R.F., 2017. Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of rehydrated corn kernel silage. *J. Appl. Microbiol.* 122, 589-600.
- Chahrour, W., Merzouk, Y., Henni, J. E., Haddaji, M., Kihal, M., 2013. Screening and identification of lactic acid bacteria isolated from sorghum silage processes in west Algeria. *Afr. J. Biotechnol.* 12, 1703-1709.
- Ding, G., Chang, Y., Zhao, L., Zhou, Z., Ren, L., Meng, Q., 2014. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on alfalfa nutrient degradation characteristics and rumen microbial populations of steers fed diets with different concentrate-to-forage ratios. *J. Anim. Sci. Biotech.* 5, 24-32.
- Ferrareto, L.F., Fredin, S.M., Shaver, R.D., 2015. Influence of ensiling, exogenous protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 98, 7318-7327.
- Glynn, B., Lahiff, S., Wernecke, M., Barry, T., Smith, T. J., Maher, M., 2006. Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. *Int. J. Dairy Technol.* 59, 126-139.
- Heinritz, S.N., Martens, S.D., Avila, P., Hoedtke, S., 2012. The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability. *Anim. Feed Sci. Tech.* 174, 201-210.
- Hill, H., Lee, L.S., Henry, R.J., 2012. Variation in sorghum starch synthesis genes associated with differences in starch phenotype. *Food. Chem.* 131, 175-183.
- Hoffman, P.C., Esser, N.M., Shaver, R.D., Coblenz, W.K., Scott, M.P., Bodnar, A.L., Schmidt, R.J., Charley, C.R., 2011. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch protein matrix in high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 94, 2465-2474.
- 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. *J. Dairy Sci.* 100, 9048-9051.

- Klocke, M., Mundt, K., Idler, C., McEniry, J., O'Kiely, P., Barth, S., 2006. Monitoring *Lactobacillus plantarum* in grass silages with the aid of 16S rDNA-based quantitative real-time PCR assays. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 49-58.
- Kotarski, S.F., Waniska, R.D., Thurn, K.K., 1992. Starch hydrolysis by the ruminal microflora. *Nutr. J.* 122, 178-190.
- Kung, L. Jr., 2014. Managing the aerobic stability of silages. In: 16^o International Symposium of Forage Conservation. Proceedings... Brno by Mendel University at Brno, CZ. 47-53.
- Kung, L. Jr., Stokes, M.R., Lin, C.J., 2003. Silage additives. In: Buxton, D.R.; Muck, R.E.; Harrison, J.H. (Eds.) *Silage science and technology*. Wisconsin: ASA; CSSA; SSSA. 305-360.
- Kung, L.Jr., Windle, M.C., Walker, N., 2014. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high moisture corn. *J. Dairy Sci.* 97, 1707-1712.
- Lawton, J.W., 2002. Zein: A history of processing and use. *Cereal Chem.* 79, 1-18.
- Leandro, E.S., de Oliveira, M.N.V., Rufino, L.D., Ribeiro, K.G., Pereira, O.G., 2019. Microbial characterization of *Arachis pinto* and its silages at different fermentation periods. *Mol. Biol. Rep.* 46, 5019-5024.
- Lynch, J.P., O'Kiely, P., Waters, S.M., Doyle, E.M., 2012. Conservation characteristics of corn ears and stover ensiled with the addition of *Lactobacillus plantarum* MTD-1, *Lactobacillus plantarum* 30114, or *Lactobacillus buchneri* 11A44. *J. Dairy Sci.* 95, 2070-2080.
- McAllister, T.A., Dunière, L., Drouin, P., Xu, S., Wang, Y., Munns, K., Zaheer, R., 2018. Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. *J. Dairy Sci.* 101, 4060-4074.
- McDonald, P., Henderson, A.R., Heron, S.J.E., 1991. *The biochemistry of silage*. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, UK.
- Moon, N.J., 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *J. Appl. Bacteriol.* 55, 453-460.
- Muck, R.E., 1988. Factors influencing silage quality and their implications for management. *J. Dairy Sci.* 71, 2992-3002.
- Muck, R.E., Pitt, R.E., 1994. Aerobic deterioration in corn silage relative to the silo face. *Trans. ASAE.* 37, 735-743.
- Ogunade, I.M., Martinez-Tupia, C., Queiroz, O.C.M., Jiang, Y., Drouin, P., Wu, F., Vyas, D., Adesogan, A.T., 2018. Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *J. Dairy Sci.* 101, 4034-4059.
- Oude Elferink, S.J.W.H., Krooneman, J., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F., Faber, F., Driehuis, F., 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 125-132.
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H., Spoelstra, S.F., 2003. Microbiology of ensiling. In: Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H. (eds) *Silage science and technology*, 31-93. Madison, WI, USA: Agronomy Publication N^o 42, American Society of Agronomy.
- Pholsen, S., Khota, W., Pang, H., Higgs, D., Cai, Y., 2016. Characterization and application of lactic acid bacteria for tropical silage preparation. *Anim. Sci. J.* 87, 1202-1211.
- Rooney, L.W., Pflugfelder, R.L., 1986. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. *J. Anim. Sci.* 63, 1607-1623.

- Sá Neto, A.D., Nussio, L.G., Zopollatto, M., Junges, D., Bispo, Á.W., 2013. Silagem de milho ou de cana-de-açúcar com *Lactobacillus buchneri* exclusivamente ou em associação com *L. plantarum*. Pesq. Agropec. Bras. 48, 528-535.
- Santos, W.P., Salvati, G.G.S., Arthur, B.A.V., Daniel, J.L.P., Nussio, L.G., 2019. Short communication: The effect of sodium benzoate on the nutritive value of rehydrated sorghum grain silage for dairy cows. Anim. Feed Sci. Technol. 256, 1-6.
- Schmidt, R.J., Emara, M.G., Kung, L.Jr., 2008. The use of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay for identification and enumeration of *Lactobacillus buchneri* in silage. J. Appl. Microbiol. 105, 920-929.
- Silva, L.D., Pereira, O.G., Silva, T.C., Leandro, E.S., Paula, R.A., Santos, S.A., Ribeiro, K.G., Valadares Filho, S.C., 2018. Effects of *Lactobacillus buchneri* isolated from tropical maize silage on fermentation and aerobic stability of maize and sugarcane silages. Grass Forage Sci. 73, 660-670, 2018.
- Silva, V. P., Pereira, O.G., Leandro, E.S., Da Silva, T.C., Ribeiro, K.G., Mantovani, H. C., Santos, S.A., 2016. Effects of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential on the fermentation profile and chemical composition of alfalfa silage in tropical conditions. J. Dairy Sci. 99, 1895-1902.
- Simpson, D.J., 2001. Proteolytic degradation of cereal prolamins-the problem with proline. Plant Sci. 161, 825-838.
- Tabacco, E., Righi, F., Quarantelli, A., Borreani, G., 2011. Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by different lactic acid bacteria inocula. J. Dairy Sci. 94, 1409-1419.
- Thomas, M.E., Foster, J.L., McCuiston, K.C., Redmon, L.A., Jessup, R.W., 2013. Nutritive value, fermentation characteristics, and in situ disappearance kinetics of sorghum silage treated with inoculants. J. Dairy Sci. 96, 7120-7131.
- Vlková, E., Rada, V., Bunešová, V., Ročková, Š., 2012. Growth and survival of lactic acid bacteria in lucerne silage. Folia Microbiol. 57, 359-362.
- Windle, M.C., Walker, N., Kung, L.Jr., 2014. Effects of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of corn silage harvested at different dry matter contents and ensiled for various lengths of time. J. Dairy Sci. 97, 3053-3060.
- 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. R. Bras. Zootec. 38, 170-189.

CAPÍTULO 1

Isolamento de bactérias lácticas e quantificação de *Lactobacillus buchneri* usando qPCR em silagem de sorgo inoculadas com cepas autóctones

Resumo - Objetivou-se isolar e identificar bactérias do ácido láctico em silagem de sorgo, quantificar por qPCR a população do *L. buchneri*, bem como, avaliar mudanças no perfil fermentativo e valor nutritivo de silagens de sorgo inoculadas com cepas autóctones. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 4 × 5, sendo quatro inoculantes (I), controle (CON), *L. buchneri* estirpe 50.1 (LB.1), *L. buchneri* estirpe 50.4 (LB.4) e LALSIL AS, *L. buchneri* CNCM I-4323, Lallemand (LAS) e cinco períodos de fermentação (7, 14, 28, 45 e 90 dias) no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Foram obtidos, quarenta e sete isolados, com predominância de *L. buchneri* após 45 e 90 dias de fermentação. Os dados do qPCR demonstraram que *L. buchneri* predominou durante todos períodos de fermentação (P) nas silagens inoculadas. Foi verificado efeito da interação I × P (P<0,05) sobre as variáveis do perfil fermentativo e populações microbianas das silagens. Maiores concentrações de AA e menores concentrações de AL foram obtidas nas silagens inoculadas. A silagem CON apresentou população de leveduras superior (P<0,05) às silagens inoculadas aos 14, 28, 45 e 90 dias de fermentação. Ao avaliar a composição química das silagens aos 45 e 90 dias de fermentação, foi verificada interação I × P (P<0,05) para as variáveis MS, FDN, DIVMS e DIVFDN. Aos 90 dias de fermentação silagem tratadas com *L. buchneri* apresentaram valores superiores (P<0,05) de DIVMS comparados à silagem CON. A inoculação com o *L. buchneri* resultou em silagens com melhor qualidade fermentativa, menor população de leveduras e mais digestíveis. As cepas autóctones LB.1 e LB.4 apresentam potencial para serem utilizadas como inoculantes para produção de silagem com efeitos na fermentação aos 45 dias de armazenamento.

Palavras chave: gene 16S rRNA, gramínea tropical, técnica molecular.

Isolation of lactic acid bacteria and quantification of *Lactobacillus buchneri* using qPCR in sorghum silage inoculated with native strains

Abstract- The objective was to isolate and identify lactic acid bacteria, as well as to quantify the population of *Lactobacillus buchneri* by qPCR in sorghum silage. It was also evaluated changes on the fermentative profile and nutritional value of sorghum silages inoculated with native strains of *L. buchneri*. The treatments were arranged in a 4 × 5 factorial scheme, with four inoculants (I) and five fermentation periods (P) (7, 14, 28, 45 and 90 d), in a completely randomized design, with three replicates. The inoculants were: Control (CON), *L. buchneri* 50.1 strain (LB.1), *L. buchneri* 50.4 strain (LB.4), and LALSIL AS, which contains the *L. buchneri* CNCM I-4323 strain (Lallemand, Brazil) (LAS). Forty-seven LAB strains were isolated from control silage, and *L. buchneri* was the predominant species at 45 and 90 d of fermentation. The qPCR data showed that *L. buchneri* predominated during all fermentation periods (P) in the inoculated silages. There was an effect (P<0.05) of I × P interaction on all studied variables of the fermentative profile and microbial population. Inoculated silages presented greater (P<0.05) concentration of acetic (AA) and lower (P<0.05) of lactic acid (LA). The control silage showed greater yeast population (P<0.05) at 14, 28, 45 and 90 d of fermentation compared to inoculated silages. It was observed an effect (P<0.05) of I × P interaction on the DM, NDF, *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) and *in vitro* neutral detergent fiber digestibility (IVNDFD) variables. Control silage showed a higher yeast population (P<0.05) than silages inoculated at 14, 28, 45 and 90 days of fermentation. When evaluating the chemical composition of silages at 45 and 90 days of fermentation, I × P interaction (P<0.05) was verified for the variables DM, NDF, IVDMD and IVNDFD. Inoculated silages showed greater (P<0.05) IVDMD in relation to CON silage at 90 d of fermentation. At 90 days of fermentation silage treated with *L. buchneri* showed higher values (P<0.05) of IVDMD compared to CON silage. The inoculation with *L. buchneri* resulted in silages with better fermentative quality, less yeast population and more digestible. The native LB.1 and LB.4 strains have potential to be used as inoculants in sorghum silage production with effects on fermentation quality at 45 d of storage.

Key words: 16S rRNA gene, tropical grass, molecular technique

Introdução

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é uma importante forrageira utilizada para a produção de silagem em locais de clima tropical e subtropical. Além das características adequadas para o processo de fermentação, o sorgo apresenta alto rendimento de matéria seca, tolerâncias ao déficit hídrico, altas temperaturas e baixa fertilidade do solo, bem como possibilita a colheita da rebrota das plantas (Weinberg et al., 2011; Amer et al., 2012; Costa et al., 2016).

As bactérias produtoras do ácido láctico (BAL) são os principais componentes de interesse da microbiota de culturas forrageiras destinadas à produção de silagem. Deste modo, em regiões de clima tropical tem sido desenvolvidos estudos com objetivo de isolar, caracterizar e identificar micro-organismos epifíticos que apresentem potencial de utilização como inoculante (Ávila et al., 2009; Silva et al., 2018), pois a maioria dos inoculantes comerciais no mundo é composto por estirpes de bactérias isoladas de forragens de clima temperado (Heinritz et al., 2012).

O *Lactobacillus buchneri*, é uma BAL heterolática, frequentemente usada como inoculante com a finalidade de melhorar o perfil fermentativo e aumentar a estabilidade aeróbia em silagens (Rabelo et al., 2017; Da Silva et al., 2018; Gallo et al., 2018). Estes micro-organismos metabolizam o ácido láctico e produzem quantidade moderadas de ácido acético, o qual, em condições de baixo pH apresenta atividade antifúngica (Moon, 1983). Oude Elferink et al. (2001) observaram *in vitro* que conversão anaeróbia do ácido láctico em ácido acético ocorre entre 45 e 60 dias de fermentação, indicando a necessidade da condução de estudos para melhor compreender o crescimento de *L. buchneri* em silagens. Detectar quantitativamente sua presença nos diferentes períodos de fermentação e sua relação com os produtos da fermentação podem auxiliar na utilização mais eficiente deste micro-organismo e melhorar a qualidade das silagens.

Neste sentido, a utilização de técnicas moleculares como a reação quantitativa em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) mostrou-se específica e sensível para rápida detecção de bactérias, a partir das sequências do gene rRNA 16S, em diferentes ambientes, como silagens (Schmidt et al., 2008; Lynch et al., 2012; Tran et al., 2018; Xu et al., 2019) e rúmen (Ding et al., 2014).

As hipóteses do nosso estudo são que o isolamento, identificação e caracterização de BAL permitem obter cepas potenciais para serem utilizadas como inoculantes em culturas sob condição tropical e a inoculação de silagem de sorgo com estirpes autóctones de *L. buchneri*, isoladas em condições tropicais favorece o perfil

fermentativo das silagens. Portanto, objetivou-se isolar e identificar bactérias do ácido láctico em silagem de sorgo, quantificar por qPCR a população de *L. buchneri*, bem como, avaliar mudanças no perfil fermentativo e composição química de silagens de sorgo inoculadas com cepas autóctones.

Material e Métodos

Local e preparo da silagem

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, UFV, entre Março e Junho de 2017. Viçosa está localizada no estado de Minas Gerais, a 657 m de altitude, a 20°45' de latitude sul e 42°51' de longitude oeste. O clima é do tipo Cwa, segundo a classificação proposta por KÖPPEN, com precipitação média anual de 1341 mm.

O sorgo forrageiro Volumax (Agroceres®), foi cultivado em uma área de 0,10 ha, após preparo do solo, usando taxa de semeadura de 4,6 kg/ha, e espaçamento de 0,8 m. As adubações de plantio e cobertura foram realizadas conforme as recomendações da Embrapa Milho e Sorgo (Coelho, 2008). O sorgo foi colhido manualmente, após 120 dias do plantio, grãos no estágio leitoso a farináceo e, em seguida, picado em máquina forrageira estacionária (modelo PN Plus 2000, Nogueira S.A., São João da Boa Vista, Brazil), em tamanho médio de partícula de 1,5 cm. Foram preparados três montes (replicas), contendo 5 kg da forragem para cada inoculante, totalizando 12 montes, que foram inoculados individualmente. Após homogeneização, 500 g da forragem foram ensilados em *bags* (25 cm x 35 cm, Doug Care Equipment, Springville, CA) e a condição de anaerobiose no interior do mini-silo foi realizada com seladora a vácuo (Eco vacuum 1040, Orved, Italy). Foram preparados cinco *bags* de cada monte, referentes aos períodos de fermentação. Os *bags* foram armazenados em laboratório à temperatura ambiente.

Delineamento experimental e aplicação dos inoculantes

Foi utilizado um esquema fatorial 4 × 5, sendo quatro inoculantes, controle (CON), *L. buchneri* estirpe 50.1 (LB.1), *L. buchneri* estirpe 50.4 (LB.4) e LALSIL AS, *L. buchneri* CNCM I-4323, Lallemand (LAS) e cinco períodos de fermentação (7, 14, 28, 45 e 90 dias) no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os inoculantes foram diluídos em 100 ml de água e pulverizados sobre a forragem, a uma taxa de aplicação de 10⁶ ufc g⁻¹ de forragem. A mesma quantidade de água utilizada

para diluir os inoculantes foi adicionada no tratamento CON. As culturas de *L. buchneri* estirpes 50.1 e 50.4 pertencem à coleção de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia da Silagem do Departamento de Zootecnia-UFV, previamente isoladas de silagens de sorgo forrageiro em condição tropical aos 56 dias de fermentação.

Perfil fermentativo

Um extrato aquoso foi preparado com 25 g de amostra da planta antes da ensilagem ou silagem e 225 mL de solução salina estéril (Ringer Solution, Oxoid[®], Hampshire) e homogeneizados por um minuto em liquidificador industrial. Em seguida, o extrato foi filtrado em dupla camada de gaze estéril e mensurado o pH com auxílio de um potenciômetro (Tecnal, SP, Brasil) (Kung Jr., 1996).

Uma alíquota de 15 mL do extrato foi filtrada em papel de filtro Whatman 54 (Whatman, Florham, NJ) e acondicionada em tubos contendo 100 µL de H₂SO₄ 50%, para análises posteriores de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) (Okuda et al., 1965), carboidratos solúveis em água (Nelson, 1944), ácidos lático, acético, propiônico e butírico; e etanol, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) (Siegfried et al., 1984). O HPLC foi equipado com um detector de índice de refração Shodex R1-101 (Showa Denko America, Inc., NY, USA) e uma coluna Rezex ROA-Organic Acid H⁺, 300mm x 7,8mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) com fase móvel contendo ácido sulfúrico 5 mmol l⁻¹ a uma vazão de 0,7 ml min⁻¹ a 45°C.

Populações microbianas

Foram quantificadas as populações de bactérias do ácido lático (BAL), enterobactérias, mofos e leveduras da forragem antes da ensilagem e das respectivas silagens. Uma alíquota (10 mL) do extrato aquoso (25 g silagem/225 mL solução salina estéril) foi submetida às diluições seriadas (10⁻¹ a 10⁻⁸). O cultivo dos micro-organismos foi realizado em placas de Petri estéreis, em meio de cultura MRS Ágar (Man, Rogosa e Sharpe) para BAL; VRB (Violet Red Bile) para enterobactérias e PDA (Potato Dextrose Ágar), acrescido com 1,5% de ácido tartárico a 10%, para mofos e leveduras, utilizando a técnica de plaqueamento *Spread-plate* para BAL e *Pour-plate* para os demais micro-organismos. As placas foram incubadas em estufa BOD, com temperaturas e períodos determinados para cada grupo de micro-organismo: enterobactérias, 37°C/24 h; BAL, 37 °C/48 h; leveduras e mofos, 25°C/72 e 120 h, respectivamente. Ao final do tempo de

incubação, a contagem foi realizada com auxílio de um contador de colônias manual (Phoenix, Modelo CP 608). Foram passíveis de contagem as placas que apresentaram entre 30 e 300 unidades formadoras de colônias (UFC). Para avaliação e interpretação dos dados, os resultados obtidos foram convertidos para base logarítmica (\log_{10} ufc).

Isolamento e identificação das bactérias lácticas

As BAL foram isoladas das silagens controle (CON), nos períodos 45 e 90 dias de fermentação. Após a contagem, foram selecionadas colônias de diferentes tamanhos, formas e colorações, no total equivalente à raiz quadrada do valor de unidades formadoras de colônias presente nas placas, conforme recomendações de Holt et al. (1994). Em seguida, foram estriadas em meio ágar MRS acrescido de 0,04 g l⁻¹ de púrpura de bromocresol e 5,0 g l⁻¹ de carbonato de cálcio. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose em estufa BOD a 37°C por 48 horas. Após esse período foi realizado o teste de catalase, com peróxido de hidrogênio 3% (H₂O₂). Os isolados com capacidade de produção de ácidos e catalase negativa foram estocados em meio MRS adicionado de glicerol 20% e armazenados a -20 e -80°C, para posterior extração do DNA.

O DNA dos isolados foi extraído usando kit comercial (Wizard Genomic Kit de Purificação de DNA, Promega). As sequências do gene rRNA 16S foram amplificadas por PCR usando os *primers* P027F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3') (Heuer et al., 1997). A reação de PCR foi realizada em microtubos contendo 50 µL da seguinte mistura: 4 µl de DNA genômico (20 ng µl⁻¹); 10 µl do tampão da reação GoTaq (5X); 3 µl de MgCl₂ (25 mmol l⁻¹); 1 µl dNTP (10 mmol l⁻¹) (Promega, Madison, WI, USA); 0,4 µl de Taq DNA polimerase (5U/µl) (Promega, Madison, WI, USA); 0,6 µl de cada primer (10 µmol l⁻¹) e água ultrapura autoclavada para completar o volume final. A amplificação ocorreu em termociclador (Thermal Cycler, Techne TC-512, Analytical) nas seguintes condições: desnaturação inicial 94°C/5 min; 30 ciclos (desnaturação, 94°C/30s; anelamento, 60°C/30s; polimerização, 72°C/2 min) e extensão final: 72°C/5 min. O produto do PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose (1,2 g l⁻¹) em tampão de Tris Borato EDTA (TBE 0,5X). O gel foi corado com 0,5 µg mL⁻¹ de brometo de etídio e as bandas foram visualizadas sobre iluminação UV (Transluminador UVB, modelo LTB-20X20 HE, Loccus Biotecnologia, Brasil). O produto PCR de aproximadamente 1500 pb foi encaminhado à empresa Macrogen[®] (Seoul, Coreia do

Sul) para purificação e sequenciamento. Pesquisas de similaridade das sequências foram realizadas usando o banco de dados de DNA do GenBank, e alinhadas usando o algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos. As sequências do gene rDNA 16S que apresentaram similaridade igual ou superior a 97% foram consideradas como pertencentes a mesma Unidade Taxonômica Operacional (OTU) (Altschul et al., 1990).

As sequências dos isolados obtidos no presente estudo foram depositadas no banco de dados do GenBank, conforme descrito na Tabela 4.

Caracterização das espécies de *L. buchneri* e *L. rossiae*

Testes fisiológicos, bioquímicos e antimicrobianos foram utilizados para caracterização das espécies de *L. buchneri* e *L. rossiae*. As cepas foram cultivadas em caldo MRS por 16 h a 37°C. Posteriormente, foram reativadas e o inóculo foi padronizado a uma densidade óptica (DO) entre 0,4 - 0,5, utilizando espectrofotômetro (630 nm). O inóculo (400 µl) foi transferido para 40 ml de caldo MRS, que foi incubado a 37°C. Nos tempos 0; 6; 12; 24; 30; 48 e 72 h foram coletados amostras para análise do crescimento microbiano, utilizando técnica de plaqueamento por microgota (Romeiro, 2001) e pH.

As cepas foram cultivadas em diferentes temperaturas (15, 37 e 45°C) e valores de pH (3,5; 4,5 e 8,5). O crescimento foi monitorado pela leitura da DO em espectrofotômetro (630 nm), após incubação em caldo MRS por 24h (Silva et al., 2018).

Atividade antimicrobiana foi avaliada conforme método proposto por Tagg et al. (1976). Após padronização da DO (0,4 - 0,5) os isolados foram plaqueados e incubados em jarra de anaerobiose a 37°C/24 h. As leveduras *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kudriavzevii*, e *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizadas como culturas indicadoras e inoculadas nas placas numa concentração de células de 10^5 ufc ml⁻¹.

A técnica BOX-PCR foi utilizada para avaliar a diversidade genética das espécies de *Lactobacillus buchneri*. A reação foi realizada usando o primer BOX-A1, 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' (Versalovic et al., 1994). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial, 95°C/7 min; 30 ciclos (desnaturação, 90°C/30 s; anelamento, 52°C/1 min; polimerização, 65°C/8 min) e extensão final, 65°C/16 min em termociclador (Termociclador, Techne TC-512, Analytical) conforme proposto por Koeuth et al. (1995). Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1,6% a 80

V por aproximadamente 5 h. Foi utilizado marcador de massa molecular de 1 kb (DNA Ladder, Promega) no momento da corrida eletroforética. O gel foi corado com $0,5 \mu\text{L}^{-1}$ de brometo de etídio e as bandas foram visualizadas sobre iluminação UV. Os perfis de bandas foram analisados e agrupados em dendograma pelo método Dice Ward com auxílio do programa BioNumerics versão 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

PCR quantitativo

O DNA das bactérias foi extraído a partir do extrato aquoso da planta e das silagens pelo método de purificação com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Os *primers* utilizados na reação quantitativa em tempo real (qPCR) específicos para *L. buchneri* foram LBF2 (5'-GAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACCA-3') e o primer reverso LBR1 (5'-CGCCTTGGTAGGCCGTTACCTTACCAACA-3') (Integrated DNA Tech., Coralville, IA, USA), os quais produzem um fragmento de aproximadamente 130 pb conforme Schmidt et al. (2008). As amostras, em triplicata, foram analisadas em termociclador (CFX 96 Real Time System, Bio-Rad) nas seguintes condições: desnaturação, 95°C/15 s; anelamento/extensão, 60°C/60 s por 40 ciclos. A mistura da reação continha 6 μL da enzima GoTaq® qPCR Master Mix (A6001, Promega), 2 μL de DNA ($50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), 0,3 μL de cada *primer* ($10 \mu\text{mol l}^{-1}$) e água (Nuclease free water, Promega) para ajuste do volume final de 12 μL . O *L. buchneri* SS45.25 foi utilizada para construção da curva padrão. O isolado foi cultivado em meio caldo MRS a 37°C/16 horas. Em seguida, foram coletadas células para contagem das unidades formadoras de colônias. O DNA foi extraído, conforme descrito anteriormente, quantificado em Nanodrop (Thermo Scientific, 2000) e submetido a diluições seriadas (base 10) para construção da curva padrão. O programa Microsoft Excel 2010 foi usado para construção da curva padrão, plotando o número de células com o valor do *threshold cycle* (CT), $Y = -0,2918x + 11,982$; $R^2 = 0,99$.

Composição química e digestibilidade *in vitro*

Amostras da forragem antes da ensilagem e de suas silagens foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72h, em seguida moídas em moinho tipo Willey com peneira de crivo 1 mm. Os teores de MS (método 934.01), proteína bruta, PB (método 984.13), fibra em detergente ácido, FDA (método 973.18), matéria mineral,

MM (método 942.05) foram analisados conforme AOAC (1990) e fibra em detergente neutro (FDN) conforme Mertens (2002).

A digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da FDN (DIVFDN) foram estimadas em ensaios replicados em momentos diferentes utilizando a incubadora Daisy incubator (ANKOM Technology Corp.), seguindo o método proposto por Tilley e Terry (1963) adaptado por Holden (1999). O inóculo foi coletado em três vacas em lactação fistuladas no rúmen, alimentados com dieta a base de silagem de milho (60%) e concentrado (40%).

Análise estatística

Os dados foram analisados em esquema fatorial, em delineamento inteiramente casualizado. Os inoculantes, os períodos de fermentação, bem como, a interação entre os fatores, foram considerados efeitos fixos, conforme modelo:

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

onde Y_{ijk} = variável resposta; μ = constante geral; I_i = efeito do inoculante i ; P_j = efeito do período j ; $(IP)_{ij}$ = interação do inoculante i e o período j ; e e_{ijk} = erro aleatório assumindo uma distribuição normal independente, NID $(0, \sigma^2)$. Após análise de variância, as interações significativas entre os fatores foram desdobradas e comparadas pelo teste Tukey. Adotou-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I, por intermédio do PROC MIXED do SAS versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Resultados

Composição da planta e perfil fermentativo das silagens

A composição química e a população de micro-organismos do sorgo antes da ensilagem estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Composição química (g kg⁻¹ de MS), população microbiana (log ufc g⁻¹) e pH do sorgo antes da ensilagem

Item ¹	
MS (g/kg MN)	263,0
PB	58,9
FDN	507,9
FDA	280,3
CHO	106,4
MM	51,0
BAL	7,08
Enterobactéria	7,45
Leveduras	6,29
Mofos	5,39
pH	5,76

¹PB= proteína bruta; FDN= fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; CHO= carboidratos solúveis em água; MM= matéria mineral; BAL= bactéria do ácido lático.

Houve efeito da interação I × P (P<0,05) sobre todas as características avaliadas das silagens (Tabela 2).

Tabela 2- Efeito dos fatores inoculante (I), período (P) e interação (I × P) nas variáveis de MS, carboidratos solúveis, perfil fermentativo, populações microbianas e população de *L. buchneri* das silagens de sorgo

Item ¹	P-valor			EPM ²
	I	P	I × P	
MS	0,13	<0,01	<0,01	1,326
CHO	<0,01	<0,01	<0,01	2,583
pH	0,02	<0,01	0,02	0,008
Ácido lático	<0,01	<0,01	<0,01	1,329
Ácido acético	<0,01	<0,01	<0,01	1,966
Ácido propiônico	<0,01	<0,01	<0,01	0,0891
Etanol	<0,01	<0,01	<0,01	0,7975
N-NH ₃	<0,01	<0,01	0,03	0,1707
BAL	<0,01	<0,01	<0,01	0,1086
Levedura	<0,01	<0,01	<0,01	0,2673
Mofos	<0,01	<0,01	<0,01	0,0741
LBq	<0,01	<0,01	<0,01	0,2148

¹CHO= carboidratos solúveis em água; N-NH₃= nitrogênio amoniacal; BAL= bactérias do ácido lático; LBq= população de *L. buchneri* estimada pela qPCR.

²EPM= erro padrão da média.

Os valores de pH diferiram (P<0,05) nos dias 7 e 90 de fermentação. No sétimo dia a silagem CON, apresentou pH superior (P<0,05) quando comparada as demais

silagens (Tabela 3). No entanto, aos 90 dias de fermentação a silagem CON, apresentou pH inferior ($P < 0,05$) aos das silagens inoculadas com *L. buchneri* (Tabela 3).

A silagem CON apresentou maior ($P < 0,05$) concentração de AL aos 28, 45 e 90 dias de fermentação comparada às silagens inoculadas. No decorrer da fermentação, em todas as silagens, foram verificadas maiores ($P < 0,05$) concentrações de AL e AA aos 45 e 90 dias de fermentação comparado aos 7, 14 e 28 dias (Tabela 3).

Em todos os períodos de fermentação, a silagem CON apresentou concentrações de ácido acético (AA) inferiores ($P < 0,05$) às silagens tratadas. Silagens inoculadas com as cepas LB.1 e LB.4 aos 14 e 45 dias de fermentação apresentaram concentrações de AA superiores ($P < 0,05$) às silagens tratadas com LAS (Tabela 3). No entanto, aos 90 dias de fermentação as concentrações de AA foram semelhantes ($P > 0,05$) entre as silagens inoculadas com *L. buchneri* (Tabela 3). Silagens tratadas com LAS apresentaram maiores concentrações ($P < 0,05$) de AA aos 90 dias de fermentação comparados aos demais dias. Entretanto, as concentrações de AA nas silagens inoculadas com as cepas LB.1 e LB.4 aos 45 dias de fermentação foram semelhantes ($P > 0,05$) aos 90 dias de fermentação (Tabela 3).

Maiores concentrações ($P < 0,05$) de ácido propiônico (AP) foram observadas em silagens inoculadas com as cepas LB.1 e LB.4 comparado ao LAS, exceto aos 45 dias de fermentação. Não foi detectado presença de AP na silagem CON durante a fermentação (Tabela 3).

Não foi verificado presença de ácido butírico (AB) nas silagens avaliadas (Tabela 3). A silagem CON apresentou maior concentração ($P < 0,05$) de etanol comparada às silagens inoculadas com *L. buchneri* em todos os períodos de fermentação. Ao longo da fermentação, foi verificado aumento nas concentrações ($P < 0,05$) de etanol nas silagens CON até 28 dias de fermentação, posteriormente não foi verificado diferença (Tabela 3). Aos 45 e 90 dias de fermentação não foi detectado presença de etanol nas silagens inoculadas (Tabela 3).

Ao longo do período de fermentação, em todas as silagens, foi verificado maiores valores de N-NH₃ ($P < 0,05$) aos 90 dias de fermentação (Tabela 3).

Tabela 3- Médias dos teores de matéria seca, carboidratos solúveis em água, perfil fermentativo e populações microbianas (log ufc g⁻¹), das silagens de sorgo com ou sem inoculante em diferentes períodos de fermentação

Item ¹	Período de fermentação (dias)																			
	7				14				28				45				90			
	CON	LB.1	LB.4	LAS	CON	LB.1	LB.4	LAS	CON	LB.1	LB.4	LAS	CON	LB.1	LB.4	LAS	CON	LB.1	LB.4	LAS
MS (g/kg MN)	251,2 ^{aA}	250,2 ^{aA}	252,5 ^{aA}	254,2 ^{aA}	247,8 ^{aAB}	238,6 ^{aB}	243,7 ^{aAB}	243,8 ^{aB}	237,1 ^{aBC}	234,3 ^{aBC}	229,8 ^{aC}	232,3 ^{aCD}	229,6 ^{aC}	233,5 ^{aBC}	235,7 ^{aBC}	235,7 ^{aC}	215,0 ^{bd}	229,4 ^{aC}	230,6 ^{aC}	228,8 ^{ad}
CHO (g/kg MS)	62,2 ^{ba}	58,8 ^{ba}	54,6 ^{ba}	70,9 ^{aA}	46,3 ^{aB}	29,8 ^{bb}	27,8 ^{bb}	50,0 ^{aB}	24,4 ^{aC}	13,3 ^{bc}	11,4 ^{bc}	16,7 ^{bc}	18,8 ^{aC}	14,2 ^{bc}	10,4 ^{aC}	14,8 ^{bc}	18,9 ^{aC}	14,8 ^{bc}	10,9 ^{aC}	9,6 ^{aC}
pH	3,86 ^{aA}	3,79 ^{ba}	3,80 ^{bb}	3,79 ^{ba}	3,74 ^{aB}	3,72 ^{aB}	3,73 ^{aC}	3,70 ^{aB}	3,8 ^{aAB}	3,78 ^{aAB}	3,81 ^{aAB}	3,80 ^{aA}	3,77 ^{aAB}	3,80 ^{aA}	3,85 ^{aA}	3,79 ^{aA}	3,55 ^{bc}	3,80 ^{aC}	3,82 ^{ad}	3,79 ^{aC}
AL (g/kg MS)	37,67 ^{aC}	36,40 ^{aC}	37,92 ^{ad}	35,23 ^{aC}	42,73 ^{abC}	40,19 ^{bBC}	40,93 ^{abCD}	44,49 ^{aB}	63,73 ^{aB}	45,30 ^{bb}	47,55 ^{bBC}	46,31 ^{bb}	66,41 ^{aAB}	54,19 ^{aA}	55,20 ^{aA}	50,11 ^{baB}	71,29 ^{aA}	54,09 ^{ba}	53,93 ^{baB}	55,42 ^{ba}
AA (g/kg MS)	2,39 ^d	26,20 ^{abd}	27,80 ^{ab}	20,77 ^{bc}	4,11 ^c	30,62 ^{aC}	30,12 ^{aB}	24,59 ^{bc}	7,49 ^{cb}	33,68 ^{ab}	25,62 ^{bb}	25,08 ^{bc}	8,61 ^{cb}	47,28 ^{aA}	46,41 ^{aA}	40,65 ^{bb}	12,34 ^{ba}	48,61 ^{aA}	48,99 ^{aA}	47,99 ^{aA}
AP (g/kg MS)	ND	1,16 ^{bd}	1,17 ^{aC}	0,42 ^{bd}	ND	1,30 ^{cd}	1,27 ^{abc}	0,44 ^{bd}	ND	1,80 ^{aA}	1,56 ^{baBC}	0,60 ^c	ND	1,53 ^{ab}	1,64 ^{aAB}	1,76 ^{aA}	ND	1,42 ^{bcB}	1,90 ^{aA}	1,24 ^b
AB (g/kg MS)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Etanol (g/kg MS)	1,32 ^c	2,28 ^{ba}	5,82 ^{aA}	2,21 ^{bb}	5,87 ^{aB}	1,89 ^{baB}	2,13 ^{bb}	1,21 ^c	18,71 ^{aA}	1,49 ^{bc}	1,29 ^c	3,35 ^{ba}	18,61 ^{aA}	ND	ND	ND	18,87 ^{aA}	ND	ND	ND
N-NH ₃ (% NT)	4,44 ^{bb}	4,00 ^{bc}	4,65 ^{abb}	5,54 ^{aB}	5,27 ^{aB}	4,37 ^{abc}	4,25 ^{ab}	4,98 ^{aB}	5,66 ^{aB}	4,85 ^{abb}	4,36 ^{bb}	4,95 ^{abb}	5,60 ^{aB}	4,93 ^{ab}	4,71 ^{ab}	5,00 ^{aB}	8,35 ^{aA}	7,49 ^{aA}	7,48 ^{aA}	7,86 ^{aA}
BAL	9,36 ^{aA}	9,71 ^{aA}	9,52 ^{aA}	9,36 ^{aB}	8,42 ^{baB}	9,80 ^{aA}	9,80 ^{aA}	9,66 ^{aAB}	7,82 ^{cbC}	9,01 ^{bb}	9,23 ^{bb}	9,82 ^{aA}	7,12 ^{aC}	8,86 ^{bBC}	8,93 ^{bb}	9,10 ^{bc}	7,20 ^{bc}	8,43 ^{aC}	8,34 ^{aC}	8,84 ^{aC}
LEV	4,97 ^{ad}	2,49 ^{ba}	3,95 ^{aA}	3,60 ^{aba}	5,41 ^{aC}	2,53 ^{ba}	2,49 ^{bb}	3,14 ^{ba}	6,73 ^{aB}	3,52 ^{ba}	ND	3,04 ^{ba}	7,16 ^{aA}	3,34 ^{ba}	ND	2,75 ^{ba}	5,62 ^{aC}	2,95 ^{ba}	ND	3,16 ^{ba}
Mofo	2,61 ^{aA}	ND ²	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ENT	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

¹CHO= carboidratos solúveis em água; AL= ácido láctico; AA= ácido acético; AP= ácido propiónico; AB= ácido butírico; N-NH₃= nitrogênio amoniacal; BAL= bactérias do ácido láctico; LEV= leveduras; ENT= enterobactérias;

²ND= não detectado na menor diluição realizada (10⁻¹)

CON= controle; LB.1= *L. buchneri* estirpe 50.1; LB.4= *L. buchneri* estirpe 50.4; LAS= Lalsil AS (*L. buchneri* CNCM I – 4323, Lallemand).

Médias seguidas de mesma letra minúscula, desdobramento de inoculante em cada período; e maiúscula, desdobramento do período em cada inoculante na linha não diferem (P>0,05) entre si pelo teste Tukey.

Populações microbianas

As populações de BAL, leveduras e mofos foram afetadas pela interação $I \times P$ ($P < 0,05$) (Tabela 2). O tratamento com *L. buchneri* proporcionou maior ($P < 0,05$) população de BAL quando comparado à silagem CON, aos 14, 28, 45 e 90 dias de fermentação (Tabela 3). Ao longo da fermentação, silagens inoculadas com LB.1 e LB.4 mostraram populações de BAL superiores ($P < 0,05$) aos 7 e 14 dias de fermentação, com posterior redução até o dia 90. Para o inoculante LAS, foram verificadas populações inferiores aos 45 e 90 dias ($P < 0,05$) quando comparado ao demais dias de fermentação (Tabela 3).

Nos dias 14, 28, 45 e 90 a silagem CON, apresentou população de leveduras superior ($P < 0,05$) quando comparado às silagens inoculadas (Tabela 3). Nas silagens CON, foi observado aumento ($P < 0,05$) na população destes micro-organismos até aos 45 dias de fermentação, com posterior redução. A partir dos 28 dias de fermentação não foram detectadas leveduras nas silagens inoculadas com o isolado LB.4. Não foi verificado efeito ($P > 0,05$) para população de leveduras nas silagens tratadas com LB.1 e LAS no decorrer da fermentação, cujos valores médios observados foram 2,97 e 3,14 $\log \text{ufc g}^{-1}$, respectivamente (Tabela 3).

Foi verificado mofo apenas na silagem CON, aos sete dias de fermentação. Não foi detectado enterobactérias nas silagens avaliadas (Tabela 3).

Isolamento e identificação de bactérias lácticas

Foram isoladas quarenta e sete culturas, sendo trinta e cinco obtidas aos 45 dias de fermentação, identificados como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (Tabela 4). As espécies predominantes foram *L. buchneri* e *L. rossiae*, que representaram 74,29 e 8,57% do total dos isolados aos 45 dias de fermentação, respectivamente (Tabela 5). Aos 90 dias de fermentação, além de bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, foram identificadas espécies dos gêneros *Pediococcus* e *Enterococcus*. As espécies *L. buchneri* e *Pediococcus pentosaceus*, representaram 50 e 33,34% do total dos isolados aos 90 dias de fermentação, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 4- Identidade taxonômica dos isolados obtidos da silagem de sorgo¹ aos 45 e 90 dias de fermentação.

Identificação	Espécie	Similaridade	Código de acesso
SS45.1	<i>Lactobacillus casei</i>	99%	MH936275.1
SS45.2	<i>Lactobacillus farciminis</i>	97%	MH936276.1
SS45.3	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936277.1
SS45.4	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936278.1
SS45.5	<i>Lactobacillus buchneri</i>	97%	MH936279.1
SS45.6	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936280.1
SS45.7	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936281.1
SS45.8	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936282.1
SS45.10	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936283.1
SS45.12	<i>Lactobacillus rossiae</i>	98%	MH936284.1
SS45.13	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936285.1
SS45.14	<i>Lactobacillus rossiae</i>	98%	MH936286.1
SS45.15	<i>Lactobacillus rossiae</i>	98%	MH936287.1
SS45.17	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936288.1
SS45.18	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936289.1
SS45.19	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936290.1
SS45.21	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936291.1
SS45.22	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936292.1
SS45.23	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936293.1
SS45.24	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936294.1
SS45.25	<i>Lactobacillus buchneri</i>	99%	MH936295.1
SS45.26	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936296.1
SS45.27	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936297.1
SS45.28	<i>Lactobacillus farciminis</i>	98%	MH936298.1
SS45.29	<i>Lactobacillus kimchicus</i>	98%	MH936299.1
SS45.31	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936300.1
SS45.32	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936301.1
SS45.33	<i>Lactobacillus kimchicus</i>	98%	MH936302.1
SS45.34	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99%	MH936303.1
SS45.35	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936304.1
SS45.36	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936305.1
SS45.37	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936306.1
SS45.38	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936307.1
SS45.40	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936308.1
SS45.41	<i>Lactobacillus buchneri</i>	97%	MH936309.1
SS90.7	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	98%	MH936310.1
SS90.9	<i>Enterococcus sp.</i>	98%	MH936311.1
SS90.11	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	97%	MH936312.1
SS90.13	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936313.1

Tabela 4- Identidade taxonômica dos isolados obtidos da silagem de sorgo¹ aos 45 e 90 dias de fermentação (cont.)

Identificação	Espécie	Similaridade	Código de acesso
SS90.14	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936314.1
SS90.16	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	98%	MH936315.1
SS90.17	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	98%	MH936316.1
SS90.25	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99%	MH936317.1
SS90.26	<i>Lactobacillus buchneri</i>	98%	MH936318.1
SS90.27	<i>Lactobacillus buchneri</i>	97%	MH936319.1
SS90.28	<i>Lactobacillus buchneri</i>	97%	MH936320.1
SS90.31	<i>Lactobacillus buchneri</i>	99%	MH936321.1

¹Culturas isoladas apenas do tratamento controle (CON).

Tabela 5- Abundância de bactérias lácticas isoladas em silagens de sorgo aos 45 e 90 dias de fermentação

Espécies	Período de fermentação (dias)			
	45		90	
	Número absoluto	% do total	Número absoluto	% do total
<i>Lactobacillus buchneri</i>	26	74,29	6	50
<i>Lactobacillus rossiae</i>	3	8,57	-	-
<i>Lactobacillus farciminis</i>	2	5,71	-	-
<i>Lactobacillus kimchicus</i>	2	5,71	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	1	2,86	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	2,86	1	8,33
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-	-	4	33,34
<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	1	8,33
Total	35	100	12	100

Caracterização das cepas de *L. buchneri* e *L. rossiae*

As cepas de *L. buchneri* apresentaram em meio de cultivo em batelada crescimento exponencial, com aumento aproximado de dois ciclos log, até 24 horas, enquanto que o pH do meio reduziu, com valores finais variando entre 4 e 4,5 (Figura 1). Os isolados SS45.27, SS45.32 e SS45.38 mostraram menor crescimento em pH 3,5. O crescimento máximo da maioria dos isolados foi observado em pH 4,5, nas temperaturas de 37 e 45°C (Tabela 6).

As cepas de *L. rossiae* cresceram até 12 horas de fermentação, cujo pH registrado variou entre 4,34 - 4,43. Posteriormente, foi verificada redução das células viáveis até 72 horas, com valores finais de pH de 4,11 - 4,18 (Figura 2, Tabela 6).

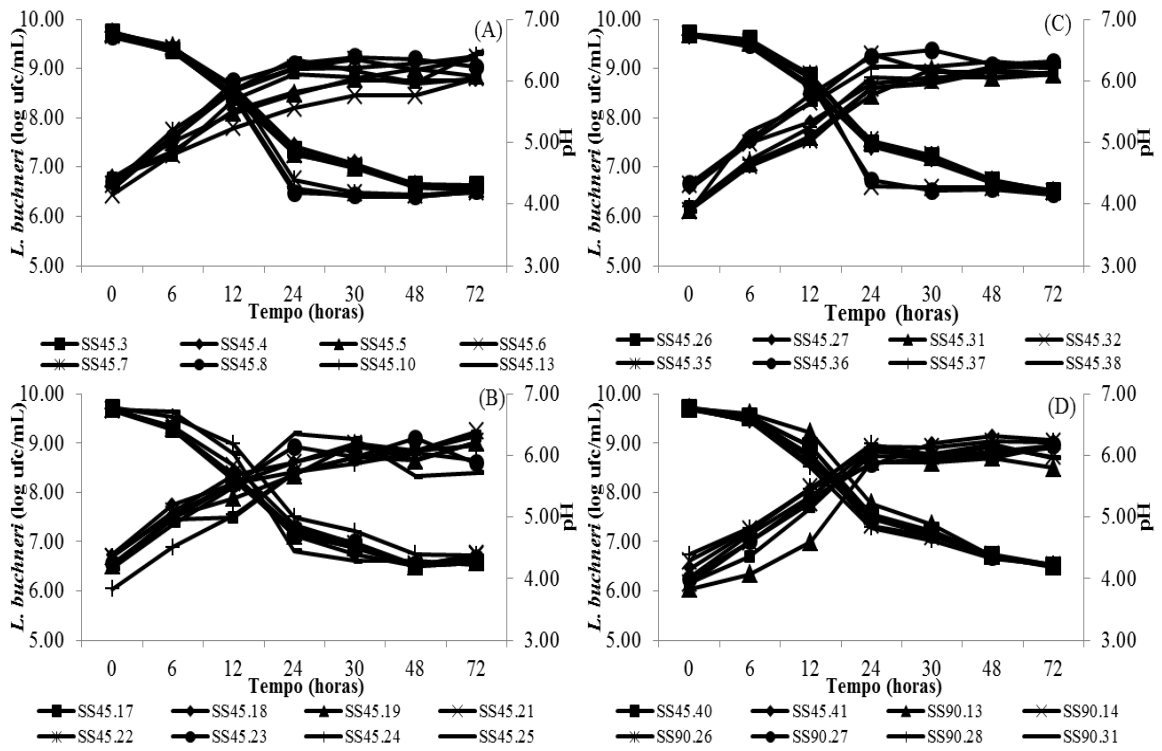


Figura 1- Curvas de crescimento de cepas de *Lactobacillus buchneri* e pH do meio em diferentes tempos de cultivo *in vitro* em batelada

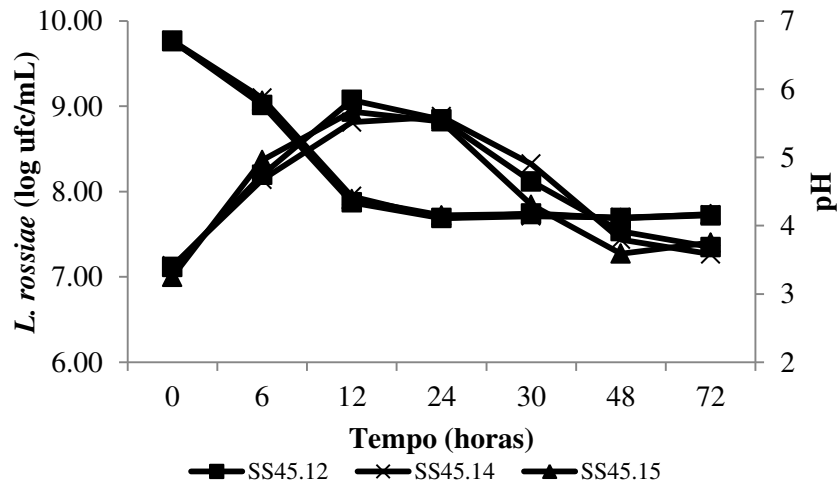


Figura 2- Curva de crescimento de cepas de *Lactobacillus rossiae* e pH do meio em diferentes tempos de cultivo *in vitro* em batelada

Tabela 6- Crescimento em diferentes pH e temperaturas e atividade antagonista das cepas de *Lactobacillus buchneri* e *Lactobacillus rossiae* isoladas de silagem de sorgo

Isolado	<i>L. buchneri</i> ¹										
	pH			Temperatura (°C)			Leveduras ³				
	3,5	4,5	8,5	15	37	45	SC	CT	CG	TD	PK
SS45.3	++	+++	+++	+	+++	+++	+++	-	-	+	-
SS45.4	++	+++	+++	+	+++	+++	+	-	-	+	-
SS45.5	++	+++	++	+	+++	++	+	-	-	+	-
SS45.6	++	+++	++	+	+++	++	+	-	-	+	-
SS45.7	++	+++	+++	+	+++	++	++	-	-	++	-
SS45.8	++	+++	+++	+	+++	++	-	-	-	+	-
SS45.10	++	+++	+++	+	+++	++	+	-	-	+	-
SS45.13	++	+++	+++	+	+++	+++	+	-	-	+	-
SS45.17	++	+++	++	+	+++	++	+	-	-	+	-
SS45.18	++	+++	++	+	+++	++	+	-	-	+	-
SS45.19	++	+++	++	+	+++	+++	+	-	-	-	-
SS45.21	++	+++	++	+	+++	+++	+	-	-	+	-
SS45.22	++	+++	++	+	+++	++	+	-	-	-	-
SS45.23	++	+++	+++	+	+++	+++	+	-	-	+	-
SS45.24	++	+++	+++	+	+++	+++	+	-	-	-	-
SS45.25	++	+++	+++	+	+++	++	+	-	-	-	-
SS45.26	++	+++	+++	+	+++	+++	+	-	-	-	-
SS45.27	+	+++	++	+	+++	+++	+	-	-	+	-
SS45.31	++	+++	++	+	+++	+++	+	-	-	+	-
SS45.32	+	++	+++	+	+++	+++	+	-	-	+	-
SS45.35	++	+++	++	+	+++	+++	+	-	-	+	-
SS45.36	++	+++	++	+	+++	+++	+	-	-	+	-
SS45.37	++	+++	++	+	+++	+++	+++	-	-	+++	-
SS45.38	+	+++	+++	+	+++	+++	+++	-	-	+++	-
SS45.40	++	+++	++	+	+++	+++	+++	-	-	+++	-
SS45.41	++	+++	++	+	+++	+++	+	-	-	+	-
SS90.13	++	+++	++	+	+++	+++	+	-	-	+	-
SS90.14	++	+++	++	+	+++	++	+	-	-	+	-
SS90.26	++	+++	++	+	+++	+++	+	-	-	+	-
SS90.27	++	+++	+++	+	+++	+++	+++	-	-	+++	-
SS90.28	++	+++	++	+	+++	+++	+++	-	-	+++	-
SS90.31	++	+++	+++	+	+++	+++	+++	-	-	+++	-
	<i>L. rossiae</i> ²										
SS45.12	+	+++	+++	+	+++	++	-	-	-	+	-
SS45.14	+	+++	+++	+	+++	++	+	-	-	+	-
SS45.15	+	+++	+++	+	+++	++	-	-	-	+	-

Crescimento mesurado por densidade óptica (630 nm): ¹pH, 0,4 a 0,9= +; >0,9 a 1,10= ++; >1,10= +++.

¹Temperatura, 0,10 a 0,5= +; >0,5 a 1,10= ++; >1,10= +++. ²pH, 0,25 a 1= +; >1= +++. ²Temperatura, 0,06 a 0,09= +; >0,09 a 0,2= ++; >1= +++. ³Culturas indicadoras: SC, *Saccharomyces cerevisiae*; CT, *Candida tropicalis*; CG, *Candida glabrata*; TD, *Torulaspora delbrueckii*; PK, *Pichia kudriavzevii*. Raio de inibição em mm: >2 a ≤6 mm= +; >6 a ≤8 mm= ++; >8mm= +++; - ausência de inibição.

Apenas *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspota delbrueckii* foram inibidas na presença de cepas de *L. buchneri* e *L. rossiae*, cujos maiores halos de inibição foram verificados para os isolados SS45.3; SS45.37; SS45.38; SS45.40; SS90.27; SS90.28 e SS90.31 (Tabela 6).

Trinta e duas cepas foram identificadas como *L. buchneri*, porém as cepas SS45.7; SS45.8; SS45.10; SS45.13; SS45.32 e SS 45.36 não apresentaram perfil de banda após análise do BOX-PCR. As sequências repetitivas do DNA amplificado, dos vinte e seis isolados, apresentaram bandas que variam entre 750 a 8000 pb. O polimorfismo de bandas apresentados pelos isolados permitiu a distribuição das espécies em seis clados distintos. Apenas o isolado SS45.24 não apresentou clone, cuja similaridade considerada foi de 90 a 100% (Figura 3).

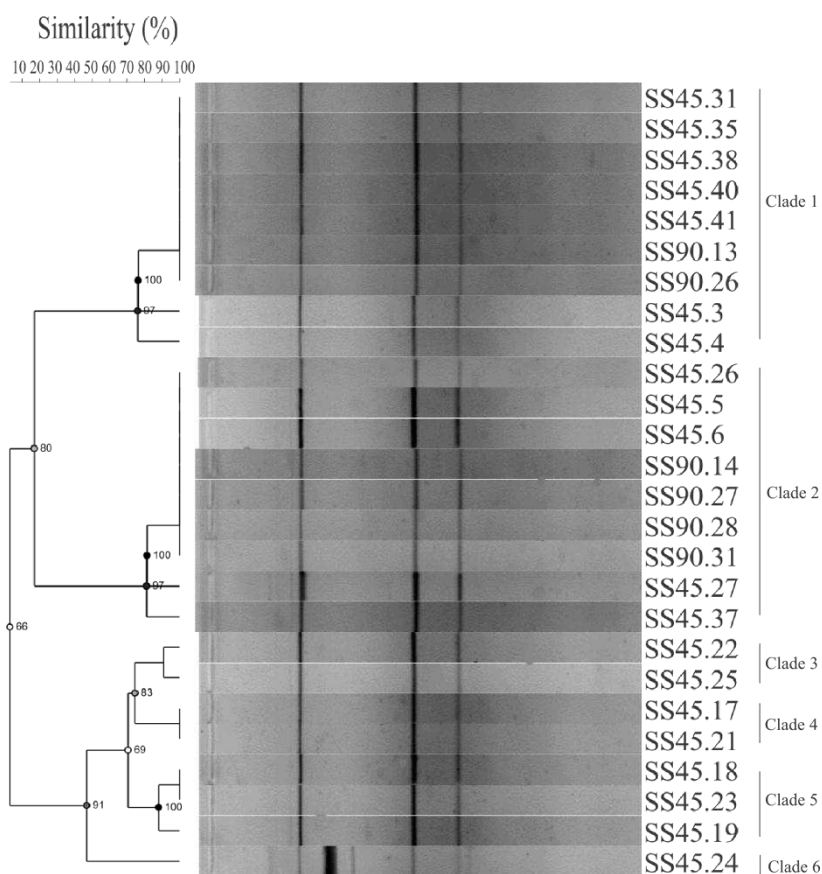


Figura 3- Dendrograma de similaridade genética de vinte e seis isolados de *L. buchneri*, analisado com auxílio do programa BioNumerics versão 7.6.

PCR quantitativo

Os dados do qPCR demonstraram que a população natural de *L. buchneri* na forragem antes da ensilagem foi de 2,54 log ufc g⁻¹, com aumento de aproximadamente

2,4 ciclos log aos 90 dias de fermentação, 5,02 log ufc g⁻¹ (Figura 4). As silagens inoculadas com *L. buchneri* apresentaram população superior (P<0,05) à silagem CON em todos os períodos de fermentação (Figura 4). A maior população, 8,01 log ufc g⁻¹ foi verificado na silagem tratada com LB.4, aos 7 dias de fermentação quando comparada às demais silagens. Aos 90 dias de fermentação verificou-se maior (P<0,05) população de *L. buchneri* em silagens inoculadas com LAS, quando comparadas às silagens inoculadas com LB.1 e LB.4, com valores de 7,13; 6,52 e 6,51 log ufc g⁻¹, respectivamente (Figura 4).

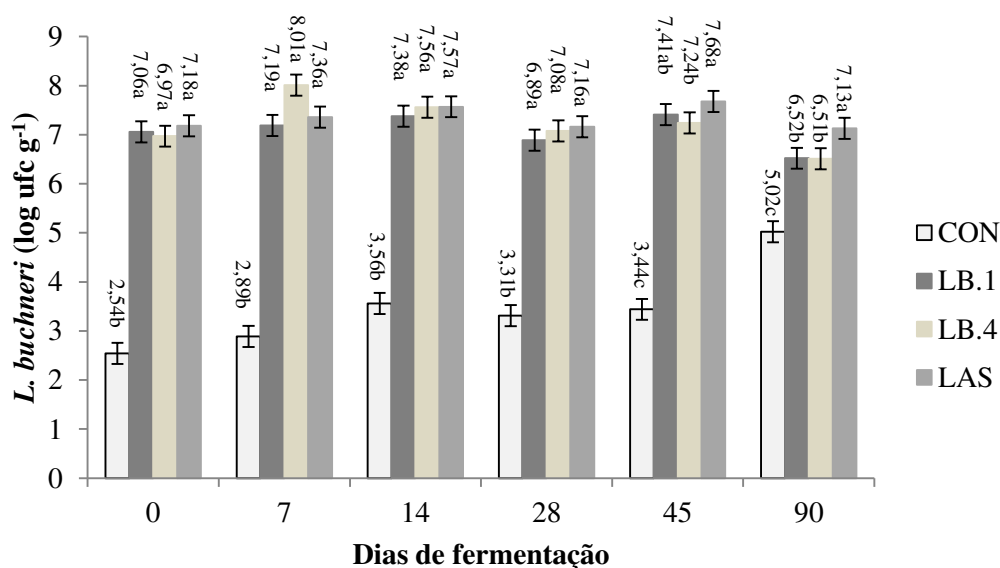


Figura 4- População de *L. buchneri* estimada pela qPCR das silagens de sorgo em diferentes períodos de fermentação. CON= controle; LB.1= *L. buchneri* estirpe 50.1; LB.4= *L. buchneri* estirpe 50.4; LAS= Lalsil AS (*L. buchneri* CNCM I - 4323, Lallemand). Barras de erro indicam o EPM. Médias seguidas de mesma letra, em cada período, não diferem entre si pelo teste Tukey (P>0,05).

A análise de regressão entre a população de *L. buchneri* estimada pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) e a concentração de AA nas silagens mostrou correlação linear positiva (R²= 0,54; P<0,001) ao longo da fermentação (Figura 5A). No entanto, verificou-se aumento desta correlação (R²=0,79; P<0,001) ao se avaliar os períodos finais de fermentação (45 e 90 dias) (Figura 5B).

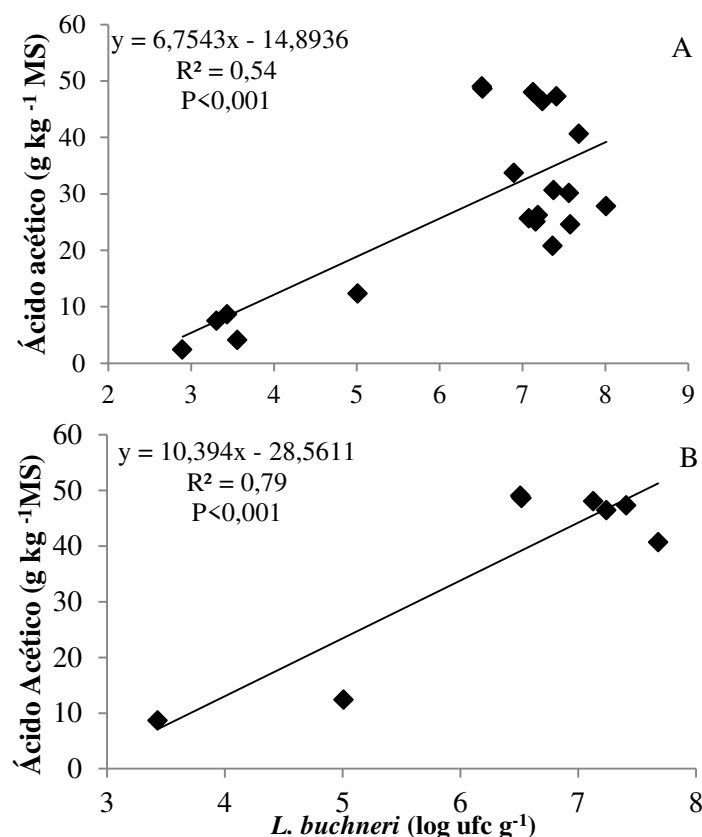


Figura 5- Correlação entre a concentração de ácido acético e a população de *L. buchneri* estimada pela qPCR durante toda fermentação (A) e aos 45 e 90 dias de fermentação (B).

Composição química e digestibilidade *in vitro*

As variáveis MS e CHO foram afetadas pela interação $I \times P$ (Tabela 2). As silagens inoculadas apresentaram valores superiores de MS ($P < 0,05$) quando comparadas a silagem CON, aos 90 dias de fermentação (Tabelas 3 e 7). Nas silagens CON e inoculadas foram verificadas reduções ($P < 0,05$) no teor de MS quando comparado 7 aos 90 dias de fermentação (Tabela 3) e quando comparado 45 aos 90 dias de fermentação (Tabela 7).

A concentração de CHO na silagem CON, foi superior ($P < 0,05$) comparada às silagens inoculadas aos 28, 45 e 90 dias de fermentação. Foi observada redução ($P < 0,05$) nos teores de CHO até aos 28 dias em todas as silagens (Tabela 3).

Ao avaliar a composição química das silagens aos 45 e 90 dias de fermentação, foi verificado efeito da interação $I \times P$ ($P < 0,05$) sobre MS, FDN, DIVMS e DIVFDN (Tabela 7). Foi observado efeito de I ($P < 0,05$) e P ($P < 0,05$) sobre o teor de PB, enquanto o teor de FDA foi afetado ($P < 0,05$) apenas por I e MM não foi afetada ($P > 0,05$) pelos fatores estudados (Tabela 7).

Aos 90 dias de fermentação, silagens inoculadas com *L. buchneri* apresentaram valores inferiores ($P < 0,05$) de FDN comparadas à silagem CON (Tabela 7). A inoculação com LB.1; LB.4 e LAS proporcionou redução ($P < 0,05$) nos teores de FDA comparada à silagem CON, registrando-se valores de 316,4; 315,7; 312,8 e 330,6 g kg⁻¹ de MS, respectivamente.

A DIVMS das silagens aos 45 dias de fermentação foi semelhante ($P > 0,05$). No entanto, aos 90 dias, as silagens tratadas com *L. buchneri* apresentaram maiores ($P < 0,05$) valores. Ao comparar os dias de fermentação, silagens inoculadas com as cepas LB.1 e LAS apresentaram valores semelhantes ($P > 0,05$) para DIVMS (Tabela 7). A inoculação com LAS resultou em maior ($P < 0,05$) DIVFDN comparado às silagens CON; LB.1 e LB.4 aos 90 dias de fermentação (Tabela 7). Valores semelhantes ($P > 0,05$) foram observados para essa variável na silagem inoculada com a cepa LB.1 aos 45 e 90 dias de fermentação. Entretanto, silagens CON; LB.4 e LAS apresentaram maiores valores ($P < 0,05$) para DIVFDN aos 90 dias de fermentação comparada aos 45 dias (Tabela 7).

Tabela 7- Médias da composição química (g kg⁻¹ de MS), digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) (g kg⁻¹ de MS) das silagens de sorgo com ou sem inoculante aos 45 e 90 dias de fermentação

Item ¹	Período de fermentação (dias)								P-valor ²			
	45				90				EPM	I	P	I × P
	CON	LB.1	LB.4	LAS	CON	LB.1	LB.4	LAS				
MS (g/kg da MN)	229,6 ^{aA}	233,5 ^{aA}	235,7 ^{aA}	235,7 ^{aA}	215,0 ^{bB}	229,4 ^{aA}	230,6 ^{aA}	228,7 ^{aB}	1,430	0,03	<0,01	<0,01
PB	57,4	53,8	57,1	56,7	58,7	56,1	58,3	57,3	0,384	<0,01	0,03	0,79
FDN	559,3 ^{aB}	554,2 ^{aA}	548,6 ^{aA}	544,3 ^{aA}	594,0 ^{aA}	547,8 ^{bA}	543,0 ^{bA}	559,8 ^{bA}	3,795	<0,01	0,06	0,02
FDA	319,0	315,4	318,3	309,4	342,1	317,3	313,0	316,2	2,612	0,04	0,14	0,15
DIVMS	685,3 ^{aA}	693,7 ^{aA}	685,1 ^{aB}	701,8 ^{aA}	654,7 ^{bB}	694,2 ^{aA}	709,0 ^{aA}	709,3 ^{aA}	3,837	<0,01	0,94	0,02
DIVFDN	462,9 ^{bB}	497,2 ^{abA}	476,0 ^{abB}	501,6 ^{aB}	485,9 ^{bA}	503,6 ^{bA}	514,1 ^{bA}	559,3 ^{aA}	6,070	<0,01	<0,01	0,02
MM	56,3	56,0	55,4	53,5	57,6	54,5	58,1	57,0	0,440	0,26	0,07	0,14

¹PB= proteína bruta; FDN= fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; MM= matéria mineral

²I= inoculante; P= período; I × P= interação.

CON= controle; LB.1= *L. buchneri* estirpe 50.1; LB.4= *L. buchneri* estirpe 50.4; LAS= Lalsil AS (*L. buchneri* CNCM I – 4323, Lallemand).

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, desdobramento de inoculante em cada período, não diferem (P>0,05) entre si pelo teste Tukey. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, desdobramento do período em cada inoculante, não diferem (P>0,05) entre si pelo teste F.

Discussão

Composição da planta e perfil fermentativo das silagens

Os teores de CHO e a população de BAL do sorgo antes da ensilagem foram adequados para fermentação da massa ensilada. A concentração inicial de CHO tem um efeito importante na taxa de declínio do pH durante a ensilagem, pois é o substrato utilizado para o metabolismo das BAL. Teores de CHO entre 60 - 80 g kg⁻¹ de MS são adequados para produzir silagens de boa qualidade, conforme sugeriram Woolford, (1984) e McDonald et al. (1991). As concentrações residuais de CHO, aos 28, 45 e 90 dias de fermentação, superiores (P<0,05) nas silagens CON em comparação as silagens inoculadas, indicam que a aplicação de *L. buchneri*, aumentou a população de BAL nessas silagens, resultando em maior consumo de CHO durante a fermentação (Tabela 3).

Os valores de pH que variaram de 3,55 a 3,86, foram adequados para as silagens avaliadas. É reconhecido que o pH é afetado diretamente pela concentração de ácidos orgânicos produzidos pelas BAL, sendo o AL o mais efetivo na redução do pH durante a fermentação (Kung Jr. et al., 2018). O AL, normalmente é encontrado na forma dissociada (Kung Jr. et al., 2018) e em maiores concentrações na massa ensilada comparado aos demais ácidos (Ferrero et al., 2019; Fernandes et al., 2020), conforme verificado no nosso estudo (Tabela 3). Os valores de pH mais elevados, aos 90 dias de fermentação nas silagens tratadas com *L. buchneri* se deve a menor concentração de AL e à maior produção de ácido acético (AA) nessas silagens (Rabelo et al., 2017; Da Silva et al., 2018).

Maiores concentrações de AA (P<0,05) foram observadas em silagens inoculadas com *L. buchneri* nos diferentes períodos de fermentação e menores concentrações de CHO residual (P<0,05) aos 28, 45 e 90 dias de fermentação comparado a silagem CON (Tabela 3). A redução na concentração de CHO no processo de fermentação e alteração do pH do meio condicionam ao *L. buchneri* a necessidade de metabolizar novos substratos (Johanningsmeier e McFeeters, 2015). O ácido láctico é metabolizado em ácido acético e álcool, deste modo reduz a concentração de ácido não dissociado no meio o que favorece sua sobrevivência (Oude Elferink et al., 2001). Heintz et al. (2012) estudaram o genoma do *L. buchneri* CD034 isolado de silagem estável de capim e identificaram um conjunto de genes envolvidos na síntese de exopolissacarídeos. A produção de exopolissacarídeos apresenta correlação positiva com a resistência a condições de baixo pH em espécies de *Lactobacillus* (Sabir et al.,

2010), o que provavelmente contribui para a resistência do *L. buchneri* em ambiente ácido, como ocorre no silo.

A concentração final de ácido propiônico (AP) em silagens bem fermentadas é baixa (<1 g kg⁻¹ de MS) (Kung Jr. et al., 2018). No nosso estudo, não foi encontrado AP na silagem CON, como observado por Ferrero et al. (2019). No entanto, silagens inoculadas com *L. buchneri* apresentaram valores de AP inferiores aos reportados por esses autores em silagem de sorgo com 100 dias de fermentação. A inoculação de *L. buchneri* em silagens pode proporcionar aumentos nas concentrações do ácido propiônico, devido à conversão do ácido láctico em 1,2-propanodiol (Oude Elferink et al., 2001), seguida da conversão de 1,2-propanodiol em ácido propiônico por outros micro-organismos presentes no meio. Vale ressaltar que, até 2014 considerava-se que cepas de *L. buchneri* produziam 1,2 propanodiol, porém não metabolizava este composto para ácido propiônico. A primeira descoberta sobre esta capacidade foi apresentada por Zielińska et al. (2014). Em 2017, Zielińska et al. confirmaram que espécies de *L. diolivorans*, *L. reuteri* e *L. buchneri* apresentaram capacidade efetiva em metabolizar 1,2 propanodiol e convertê-lo em ácido propiônico. Tal efeito foi mais evidente quando adicionado a cobalamina (vitamina B12) e glicose ao meio de cultivo dos micro-organismos. Gomes et al. (2019) ao inocularem *L. buchneri* na ensilagem da aveia com baixo teor de MS (205,0 g kg⁻¹ de MN) registraram alto valor de AP, 13,32 g kg⁻¹ de MS.

A ausência do ácido butírico nas silagens avaliadas no presente estudo indica que não houve atividade metabólica significativa de micro-organismos indesejáveis o que corrobora com as demais características fermentativas observadas nas silagens inoculadas ou não com *L. buchneri* (Tabela 3).

Populações microbianas

Na silagem CON, houve aumento de aproximadamente dois ciclos log na população de BAL no sétimo de fermentação, quando comparado à planta no momento da ensilagem (7,07 log ufc g⁻¹), com posterior redução da população até aos 45 dias de fermentação (Tabelas 1 e 3). Ao longo da fermentação é comum a redução da população total de BAL, pois além do baixo pH, a falta de substrato e produtos da fermentação inibem o crescimento das BAL (McDonald et al., 1991; Pahlow et al., 2003).

O sucesso no uso de BAL como inoculante depende da capacidade das bactérias inoculadas crescerem rapidamente na massa ensilada, da presença de substrato

adequado e da população de bactérias inoculadas em relação à população epífita da forragem (McDonald et al., 1991; Muck, 2010). A maior população de BAL aos 14, 28, 45 e 90 dias de fermentação mostra que a inoculação com *L. buchneri* superou a população natural de BAL, fato este importante na seleção de inoculantes para silagem (Muck, 2010). Lynch et al. (2012) observaram que a inoculação de *L. buchneri* não apresentou efeito na ensilagem de espiga de milho aos 45 e 130 dias de fermentação. Os autores atribuíram isso a alta população natural de *L. buchneri* observada nas silagens controle, 6,11 e 7,57 log ufc g⁻¹, nos respectivos períodos de fermentação.

A não detecção de enterobactérias nos diferentes períodos de fermentação provavelmente se deve à rápida acidificação da massa ensilada, conforme sugeriram Pahlow et al. (2003).

A menor população de leveduras nas silagens tratadas com *L. buchneri*, em todos os períodos de fermentação, exceto aos sete dias, pode ser atribuída à maior produção de AA nessas silagens e, portanto, sua atividade antifúngica (Moon, 1983; Danner et al., 2003), o que pode proporcionar maior estabilidade aeróbia das silagens (Tabacco et al., 2011; Silva et al., 2018a; Gallo et al., 2018). A população de leveduras nas silagens tratadas foi em torno de 3 log ufc/g nesses períodos, enquanto na silagem não tratada foi de 6 log ufc/g, o que pode torná-la mais instável aerobiamente, conforme sugerido por Nishino et al. (2004). Outra hipótese para essa menor população de leveduras nas silagens tratadas seria a produção de AP, que apresenta efeito positivo no controle desses micro-organismos (Ferrero et al., 2019a). Esse ácido em pH inferior ao seu pKa (4,87) permanece na forma não dissociada; e sendo a membrana dos micro-organismos permeável a ácidos na forma não dissociada, a sua entrada na célula ocorre via transporte passivo (Davidson, 1997; Kung Jr. et al., 2018).

Durante a ensilagem os mofos se desenvolvem no início do processo, quando ainda há oxigênio remanescente no interior do silo. Contudo, no decorrer da fermentação a ausência de oxigênio associado à presença de ácidos orgânicos inibem o crescimento desses micro-organismos (Woolford, 1984; McDonald et al., 1991), o que pode explicar a detecção de mofos apenas na silagem controle, no primeiro período de fermentação.

Isolamento, caracterização e quantificação das bactérias lácticas

O isolamento de BAL em meio MRS, cultivadas em placas e sob condições anaeróbias, com posterior da análise do fragmento do gene rDNA 16S, permite a

identificação de diferentes espécies em silagens (Ni et al., 2015, Silva et al., 2018). A predominância de isolados do gênero *Lactobacillus* no nosso estudo, aos 45 e 90 dias de fermentação corrobora com resultados reportados por outros estudos, como Chahrour et al. (2013), Dunière et al. (2017), Silva et al. (2018) e Agarussi et al. (2018) para silagens de sorgo, pequenos grãos, milho e alfafa, respectivamente. Com o avançar da fermentação, ocorre redução do pH da massa ensilada o que seleciona grupos mais resistentes às condições ácidas, a exemplo de espécies do gênero *Lactobacillus* (Woolford, 1984). Ogunade et al. (2018) demonstraram que o pH das silagens de milho se correlacionou negativamente ($R^2 = -0,59$) com o gênero *Lactobacillus*.

O percentual de 74,29 e 50% do total de isolados identificados como *L. buchneri*, explica a maior participação de isolados desta espécie na silagem CON, aos 45 e 90 dias de fermentação, demonstrado pelo teste de qPCR (Tabela 5, Figura 4). Isto, provavelmente, se deve ao fato destes micro-organismos apresentarem maior efetividade na conversão anaeróbia do ácido láctico em ácido acético, entre 45 e 60 dias de fermentação (Oude Elferink et al., 2001). Corroborando com nossos dados, Silva et al. (2018) isolaram 16 cepas de *L. buchneri*, em silagem de milho, aos 56 dias de fermentação, correspondendo a 60% da população total de BAL.

A quantificação de maiores populações de *L. buchneri* pela técnica de qPCR nas silagens tratadas (Figura 4), bem como maiores concentrações de AA nessas silagens (Tabela 3) demonstram que as cepas adicionadas dominaram a população epifítica em todos períodos de fermentação. Além disso, a análise de regressão mostrou correlação positiva ($R^2 = 0,54$, $P < 0,001$) entre a população de *L. buchneri* estimada pelo qPCR e as concentrações de AA ao longo da fermentação, com aumento dessa correlação ($R^2 = 0,79$, $P < 0,001$) ao analisar apenas os períodos finais de fermentação, 45 e 90 dias (Figura 5). Esses resultados demonstram maior efetividade metabólica do *L. buchneri* a partir de 45 dias de fermentação, conforme sugerem Oude Elferink et al. (2001). Corroborando com a assertiva, Ferrero et al. (2019) ao inocularem bactérias lácticas heterofermentativas, incluindo *L. buchneri*, na ensilagem do sorgo, observaram efeito significativo de inoculante e período de fermentação, com maiores valores de AA obtidos aos 250 dias de fermentação.

Um achado interessante no presente estudo, é que silagens inoculadas com as cepas LB.1 e LB.4 apresentaram estabilidade na produção de AA a partir de 45 dias de fermentação, apesar da redução da população estimada pelo qPCR aos 90 dias de fermentação (Tabela 3, Figura 4). Deste modo, é possível inferir que estes isolados

podem ser efetivos no controle de estabilidade aeróbia de silagens de sorgo em períodos de fermentação inferiores a 45 dias de fermentação. Investigações adicionais são necessárias para avaliar as características genéticas e metabólicas das cepas isoladas sob condição tropical, para compreender seus efeitos ao serem inoculadas, uma vez que pode existir variabilidade intraespecífica entre as cepas (Tanizawa et al., 2020).

Schmidt et al. (2009) também observaram redução da população de *L. buchneri* estimada pelo qPCR em silagens de alfafa inoculadas a partir dos 45 dias de fermentação. Oude Elferink et al. (2001) ressaltaram que o AL pode entrar livremente nas células microbianas, o que diminui pH interno. Então, as bactérias para retirar o próton, hidrolisam ATP, o que ocasiona em gasto de energia. Assim, ao utilizar o lactato como substrato o *L. buchneri* pode apresentar redução no crescimento durante a fermentação.

A maior população de *L. buchneri*, $5,02 \log \text{ufc g}^{-1}$, estimada pela qPCR obtido aos 90 dias de fermentação na silagem CON (Figura 4), seguido de aumento da concentração de AA nessa silagem (Tabela 3), indica que a ensilagem de sorgo sem utilização de *L. buchneri* requer maior tempo de fermentação para aumento na concentração de AA. Ou seja, apesar da presença de *L. buchneri*, oriundo da flora epifítica dessa silagem, a adição de inoculantes microbianos contendo cepas dessa espécie, resultaram em maiores concentrações de ácido acético e menores populações de leveduras, o que pode proporcionar maior estabilidade aeróbia das silagens, conforme já reportado.

Com relação aos isolados de *L. rossiae* identificados aos 45 dias de fermentação não encontramos na literatura consultada, relatos da identificação desta espécie em silagens. *Lactobacillus rossiae* é caracterizada como bactéria heterofermentativa obrigatória, cujas características principais são: produção de vitamina B12 e cofator de outras vitaminas do complexo B (riboflavina e ácido fólico), capacidade de usar várias fontes de carbono, que fornece flexibilidade metabólica em termos de disponibilidade de nutrientes. Além disso, o elevado número de genes correlacionado com os sistemas reguladores indica que *L. rossiae* é uma espécie versátil com alto potencial de colonização de diferentes ambientes (De Angelis et al., 2014) e produção de diferentes compostos antifúngicos (Gorofalo et al., 2012; Crowley et al., 2013).

Nos testes realizados as cepas de *L. buchneri* apresentam maior tolerância à condição de ambiente ácido comparadas as espécies de *L. rossiae* (Tabela 6), o que pode ser atribuída a características genéticas do *L. buchneri*, resultando em maior

efetividade metabólica sob condições ácidas (Oude Elferink et al., 2001; Heintz et al., 2012).

Quanto à análise do BOX-PCR, estudos demonstram que a técnica é adequada para diferenciação de cepas bacterianas, incluindo bactérias lácticas (Mantovani et al., 2001; Brusetti et al., 2008; Agarussi et al., 2018). Este método é capaz de examinar simultaneamente diferentes regiões do DNA distribuídas no genoma bacteriano (Brusetti et al., 2008). No presente estudo, os isolados de *L. buchneri* foram distribuídos em seis clados, sendo que apenas o isolado SS45.24 não apresentou clone (Figura 3), o que permite inferir que este isolado pode apresentar particularidades genéticas que podem ser favoráveis quando utilizado como inoculante de silagem.

Composição química e digestibilidade *in vitro*

Durante o processo de fermentação devido à atividade dos micro-organismos verifica-se redução nos teores de MS da forragem ensilada (Roth et al., 2016; Michel et al., 2017; Rabelo et al., 2017). No entanto, ao controlar micro-organismos indesejáveis durante a ensilagem, a exemplo das leveduras, as reduções no teor de MS podem ser minimizadas (Roth et al., 2016). No presente estudo, silagens inoculadas com o *L. buchneri* apresentaram menores ($P < 0,05$) populações de leveduras em comparação à silagem CON, o que refletiu em menores reduções de MS nestas silagens aos 90 dias de fermentação (Tabela 3).

O menor teor de FDN aos 90 dias de fermentação nas silagens inoculadas com *L. buchneri* pode ser atribuído a degradação do conteúdo da parede celular, que segundo Junges et al. (2013) pode ser considerada positiva no processo de fornecimento de carboidratos solúveis aos microrganismos e aumento da ingestão de silagem pelos animais.

A maior DIVMS, aos 90 dias de fermentação nas silagens tratadas com *L. buchneri*, possivelmente pode estar associada à produção da enzima ferulato esterase, conforme sugerido por Kang et al. (2009). Essa enzima rompe a ligação do ácido ferúlico na parede celular vegetal, e, portanto, podem aumentar a digestão das fibras ou aumentar a susceptibilidade da parede celular a uma hidrólise celulolítica. Estes autores ao inocularem *L. buchneri* em silagem de milho observaram aumento de 4,1 pontos percentuais na digestibilidade da MS e 5,7 para digestibilidade da FDN quando comparado à silagem controle. Weinberg et al. (2007) reportaram aumento na DIVMS e DIVFDN ao inocularem *L. buchneri* em silagem de trigo.

No presente estudo, aos 90 dias de fermentação, a silagem inoculada com LAS apresentou DIVFDN superior ($P < 0,05$) às demais silagens (Tabela 7). Embora tenha sido registrados maiores DIVFDN aos 90 dias quando comparado aos 45 dias de fermentação nas silagens CON; LB.4 e LAS, alguns estudos demonstraram redução da DIVFDN e destacaram que esta variável é pouco afetada com o tempo de ensilagem (Der Bedrosian et al., 2012; Young et al., 2012). Um achado interessante no nosso estudo é que as silagens inoculadas com a cepa LB.1 não apresentaram diferença nas digestibilidades da MS e da FDN nos diferentes períodos de fermentação, o que permite inferir que o valor nutritivo da silagem não seria comprometido ao abrir o silo aos 45 dias de fermentação.

Além da melhoria na qualidade da silagem, o *L. buchneri* apresenta efeito probiótico potencial, pois ocorre maior síntese de proteína microbiana no rúmen, conseqüentemente, aumenta o desempenho de animais que consomem silagens inoculadas (Basso et al., 2014; Rabelo et al., 2016).

Conclusão

O *L. buchneri* foi à espécie epifítica predominante em silagens de sorgo aos 45 e 90 dias de fermentação. A inoculação com o *L. buchneri* resultou em silagens com maior conteúdo de ácido acético e menor população de leveduras a partir dos 14 dias de fermentação, o que pode resultar em silagem com maior estabilidade aeróbia. A inoculação proporciona maior DIVMS, aos 90 dias de fermentação. As cepas autóctones LB.1 e LB.4 apresentam potencial para serem utilizados como inoculantes para produção de silagem com efeitos na fermentação aos 45 dias de armazenamento.

Literatura citada

- Agarussi, M.C.N., Pereira, O.G., Silva, V.P., Leandro, E.S., Ribeiro, K.G., Santos, S.A., 2018. Fermentative profile and lactic acid bacterial dynamics in non-wilted and wilted alfalfa silage in tropical conditions. *Mol. Biol. Rep.* 46, 451-460.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Amer, S., Hassanat, F., Berthiaume, R., Seguin, P., Mustafa, A.F., 2012. Effects of water soluble carbohydrate content on ensiling characteristics, chemical composition and in vitro gas production of forage millet and forage sorghum silages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 177, 23-29.
- Association of Official Analytical Chemists. In: *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Methods Inc., Arlington, VA, USA770, 15th ed, 1990.

- Ávila, C.L.S., Pinto, J.C., Figueiredo, H.C.P., Schwan, R.F., 2009. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. *Grass Forage Sci.* 64, 384-394.
- Basso, F.C., Adesogan, A.T., Lara, E.C., Rabelo, C.H.S., Berchielli, T.T., Teixeira, I.A.M.A., Siqueira, G.R., Reis, R.A., 2014. Effects of feeding corn silage inoculated with microbial additives on the ruminal fermentation, microbial protein yield and growth performance of lambs. *J. Anim. Sci.* 92, 5640-5650.
- Brusetti, L., Malkhazova, I., Mora, D., Borin, S., Merabishvili, M., Zaccaria, A., Colnago, D., Chanishvili, N., Daffonchio, D., 2008. Fluorescent-Box-PCR, an improved tool for resolving bacterial genetic diversity and biogeography studies. *BMC Microbiol.* 8, 220-232.
- Chahrour, W., Merzouk, Y., Henni, J. E., Haddaji, M., Kihal, M., 2013. Screening and identification of lactic acid bacteria isolated from sorghum silage processes in west Algeria. *Afr. J. Biotechnol.* 12, 1703-1709.
- Coelho, A.M. Embrapa milho e sorgo. Disponível em <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo_4_ed/adubacao.htm>. Acesso em 31 de Julho de 2017.
- Costa, R.F., Pires, D.A.A., Moura, M.M.A., Rodrigues, J.A.S., Rocha Júnior, V.R., Tolentino, D.C., 2016. *In situ* degradability of dry matter and fibrous fraction of sorghum silage. *Acta Sci. Anim. Sci.* 38, 171-176.
- Crowley, S., Mahony, J., Van Sinderen, D., 2013. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 33, 93-109.
- Da Silva, N.C., Nascimento, C.F., Nascimento, F.A., Resende, F.D., Daniel, J.L.P., Siqueira, G.R., 2018a. Fermentation and aerobic stability of rehydrated corn grain silage treated with different doses of *Lactobacillus buchneri* or a combination of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*. *J. Dairy Sci.* 101, 4158-4167.
- Danner, H., Holzer, M., Mayrhuber, E., Braun, R., 2003. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 562-567.
- Davidson, P.M., 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM, Washington, 520-556.
- De Angelis, M., Bottacini, F., Fosso, B., Kelleher, P., Calasso, M., Di Cagno, R., Ventura, M., Picardi, E., Van Sinderen, D., Gobbetti, M., 2014. *Lactobacillus rossiae*, a vitamin B₁₂ producer, represents a metabolically versatile species within the genus *Lactobacillus*. *PLoS ONE.* 9, 1-11.
- Der Bedrosian, M.C., Nestor, K.E., Kung, L.Jr., 2012. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. *J. Dairy Sci.* 95, 5115-5126.
- Ding, G., Chang, Y., Zhao, L., Zhou, Z., Ren, L., Meng, Q., 2014. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on alfalfa nutrient degradation characteristics and rumen microbial populations of steers fed diets with different concentrate-to-forage ratios. *J. Anim. Sci. Biotech.* 5, 24-32.
- Duniere, L., Xu, S., Long, J., Elekwachi, C., Wang, Y., Turkington, K., Forster, R., McAllister, T.A., 2017. Bacterial and fungal core microbiomes associated with small grain silages during ensiling and aerobic spoilage. *BMC Microbiol.* 50, 1-16.
- Fernandes, T., Paula, E.M., Sultana, H., Ferraretto, L.F., 2020. 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. *Anim. Feed Sci. Technol.* 266, 1-9.
- 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. *J. Food Sci. Agric.* 99, 2530-2540.
- Ferrero, F., Tabacco, E., Borreani, G., 2019a. Effects of a mixture of monopropionine and monobutyryl on the fermentation quality and aerobic stability of whole crop maize silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 258, 1-10.
- Gallo, A., Bernardes, T. F., Copani, G., Fortunati, P., Gianluca Giuberti, G., Bruschi, S., Bryan, K.A., Nielsen, N.G., Witt, K.L., Masoero, F., 2018. Effect of inoculation with *Lactobacillus buchneri* LB1819 and *Lactococcus lactis* O224 on fermentation and mycotoxin production in maize silage compacted at different densities. *Anim. Feed Sci. Technol.* 246, 36-45.
- Garofalo, C., Zannini, E., Aquilanti, L., Silvestri, G., Fierro, O., Picariello, G., Clementi, F., 2012. Selection of sourdough lactobacilli with antifungal activity for use as biopreservatives in bakery products. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 7719-7728.
- Gomes, A.L.M., Jacovaci, F.A., Bolson, L.G., Jobin, C.C., Daniel, J.L.P., 2019. Effects of light wilting and heterolactic inoculant on the formation of volatile organic compounds, fermentative losses and aerobic stability of oat silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 247, 194-198.
- 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. *J. Biotechnol.* 161, 153-166.
- Heinritz, S. N., Martens, S. D., Avila, P., Hoedtker, S., 2012. The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability. *Anim. Feed Sci. Tech.* 174, 201-210
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E.M.H., 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3233- 3241.
- Holden, L.A., 1999. Comparison of methods of *in vitro* dry matter digestibility for ten feeds. *J. Dairy Sci.* 82, 1791-1794.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th edn. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Johanningsmeier, S.D., McFeeters, R.F., 2015. Metabolic footprinting of *Lactobacillus buchneri* strain LA1147 during anaerobic spoilage of fermented cucumbers. *Int. J. Food Microbiol.* 215, 40-48.
- Junges, D., Schmidt, P., Novinski, C.O., Daniel, J.L.P., 2013. Additive containing homo and heterolactic bacteria on the fermentation quality of maize silage. *Acta Sci. Anim. Sci.* 35, 371-377.
- Kang, T.W., Adesogan, A.T., Kim, S.C., Lee, S.S., 2009. Effects of an esterase-producing inoculant on fermentation, aerobic stability and neutral detergent fiber digestibility of corn silage. *J. Dairy Sci.* 92, 732-738.
- Koehn, T., Versalovic, J., Lupski, J.R., 1995. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res.*, 5, 408-418.
- Kung, L.Jr., 1996. Preparation of Silage Water Extracts for Chemical Analyses. Standard Operating Procedure - 001 6.03.96, University of Delaware, Ruminant Nutrition Lab, Warrilow, 309.

- Kung, L.Jr., Shaver, R., Grant, R.J., Schmidt, R.J., 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 101, 4020-4033.
- Lynch, J.P., O'Kiely, P., Waters, S.M., Doyle, E.M., 2012. Conservation characteristics of corn ears and stover ensiled with the addition of *Lactobacillus plantarum* MTD-1, *Lactobacillus plantarum* 30114, or *Lactobacillus buchneri* 11A44. *J. Dairy Sci.* 95, 2070-2080.
- Mantovani, H.C., Kam, D.K., Ha, J.K., Russell, J.B., 2001. The antibacterial activity and sensitivity of *Streptococcus bovis* strains isolated from the rumen of cattle. *FEMS Microbiol Ecol.* 37:223-229.
- McDonald, P., Henderson, A.R., Heron, S.J.E., 1991. The biochemistry of silage. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, UK.
- Mertens, D.R., 2002. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 85, 1217-1240.
- Michel, P.H.F., Gonçalves, L.C., Rodrigues, J.A.S., Keller, K.M., Raposo, V.S., Lima, E.M., Santos, F.P.C., Jayme, D.G., 2017. Re-ensiling and inoculant application with *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium acidipropionic* on sorghum silages. *Grass Forage Sci.* 72, 432-440.
- Moon, N.J., 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *J. Appl. Bacteriol.* 55, 453-460.
- Muck, R.E., 2010. Silage microbiology and its control through additives. *Rev. Bras. Zootec.* 39,183-191.
- Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Biochemistry*, New York, 153, 375-380.
- Nishino, N., Wada, H., Yoshida, M., Shiota, H., 2004. Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *J. Dairy Sci.* 87, 2563-2570.
- Ni, K., Wang, Y., Li, D., Cai, Y., Pang, H., 2015. Characterization, identification and application of lactic acid bacteria isolated from forage paddy rice silage. *PLoS ONE.* 10, 1-14.
- Ogunade, I.M., Jiang, Y., Pech Cervantes, A.A., Kim, D.H., Oliveira, A.S., Vyas, D., Weinberg, Z.G., Jeong, K.C., Adesogan, A.T., 2018. Bacterial diversity and composition of alfalfa silage as analyzed by Illumina MiSeq sequencing: Effects of *Escherichia coli* O157:H7 and silage additives. *J. Dairy Sci.* 100, 1780-1794.
- Okuda, H., Fujii, S., Kawashima, Y., 1965. A direct colorimetric determination of blood ammonia. *Tokushima J. Exp. Med.* 12, 11-23.
- Oude Elferink, S.J.W.H., Krooneman, J., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F., Faber, F., Driehuis, F., 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 125-132.
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H., Spoelstra, S.F., 2003. Microbiology of ensiling. In: Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H. (eds) *Silage science and technology*, 31-93. Madison, WI, USA: Agronomy Publication N°. 42, American Society of Agronomy.
- Rabelo, C.H.S., Basso, F.C., Lara, E.C., Jorge, L.G.O., Härter, C.J., Mari, L.J., Reis, R.A., 2017. Effects of *Lactobacillus buchneri* as a silage inoculant or probiotic on *in vitro* organic matter digestibility, gas production and volatile fatty acids of low dry-matter whole-crop maize silage. *Grass Forage Sci.* 72, 534-544.

- Rabelo, C.H.S., Basso, F.C., McAllister, T.A., Lage, J.F., Gonçalves, G.S., Lara, E.C., Oliveira, A.A., Berchielle, T.T., Reis, R.A., 2016. Influence of *Lactobacillus buchneri* as silage additive and forage:concentrate ratio on the growth performance, fatty acid profile in longissimus muscle, and meat quality of beef cattle. *Can. J. of Anim. Sci.* 96, 550-562.
- Romeiro, R.S. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV, 2001. 279 p.
- Roth, A.P.T., Siqueira, G.R., Rabelo, C.H., Härter, C.J., Basso, F.C., Berchielli, T.T., Reis, R.A., 2016. Impact of days post-burning and lime as an additive to reduce fermentative losses of burned sugarcane silages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 216, 68-80.
- Sabir, F., Beyatli, Y., Cokmus, C., Onal-Darilmaz, D., 2010. Assessment of potential probiotic properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. strains isolated from kefir. *J. Food Sci.* 75, 568-573.
- SAS. Institute Inc. 2013. Versão 9.4. Procedures Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Schmidt, R.J., Emara, M.G., Kung, L.Jr., 2008. The use of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay for identification and enumeration of *Lactobacillus buchneri* in silage. *J. Appl. Microbiol.* 105, 920-929.
- Schmidt, R.J., Hu, W., Mills, J.A., Kung, L.Jr., 2009. The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 92, 5005-5010.
- Siegfried, V.R., Ruckemann, H., Stumpf, G., 1984. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. *Landwirtsch. Forsch.* 37, 298-304.
- Silva, L.D., Pereira, O.G., Silva, T.C., Leandro, E.S., Paula, R.A., Santos, S.A., Ribeiro, K.G., Valadares Filho, S.C., 2018. Effects of *Lactobacillus buchneri* isolated from tropical maize silage on fermentation and aerobic stability of maize and sugarcane silages. *Grass Forage Sci.* 73, 660-670, 2018.
- Tabacco, E., Piano, S., Revello-Chion, A., Boreanni, G., 2011. Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. *J. Dairy Sci.* 94, 5589-5598.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W., 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria, *Microbiol. Rev.* 40, 722-756.
- Tanizawa, Y., Kobayashi, H., Nomura, M., Sakamoto, M., Arita, M., Nakamura, Y., Ohkuma, M., Tohno, M., 2020. *Lactobacillus buchneri* subsp. *silagei* subsp. nov., isolated from rice grain silage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 1-6.
- Tilley, J.M.A., Terry, R.A., 1963. A two-stage method for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18, 104-111.
- Tran, T.M.T., Nguyen, M.T., Nguyen, H.V., Nishino, N., 2018. Effects of wilting and lactic acid bacteria inoculation on fermentation and microbial community of elephant grass silage produced in Vietnam. *Grassl. Sci.* 64, 151-155.
- Versalovic, J., Schneider, M., DeBruijn, F.J., Lupski, J.R., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell Biol.* 5, 25-40.
- Weinberg, Z.G., Khanal, P., Yildiz, C., Chen, Y., Arieli, A., 2011. Ensiling fermentation products and aerobic stability of corn and sorghum silages. *Grassl. Sci.* 57, 46-50.
- Weinberg, Z.G., Shatz, O., Chen, Y., Yosef, E., Nikbahat, M., Ben-Ghedalia, D., Miron, J., 2007. Effect of lactic acid bacteria inoculants on *in vitro* digestibility of wheat and corn silages. *J. Dairy Sci.* 90, 4754-4762.

- Woolford, M.K., 1984. The silage fermentation. New York: Marcel Dekker, 350p.
- Xu, S., Yang, J., Qi, M., Smiley, B., Rutherford, W., Wang, Y., McAllister, T.A., 2019. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus buchneri* on microbial communities during ensiling and aerobic spoilage of corn silage. *J. Anim. Sci.* 97, 1273-1285.
- Young, K. M., Lim, J.M., Der Bedrosian, M.C., Kung, L.Jr., 2012. Effect of exogenous protease enzymes on the fermentation and nutritive value of corn silage. *J. Dairy Sci.* 95, 6687-6694.
- Zielińska, K., Fabiszewska, A., Stecka, K., Świątek, M., 2014. A new strain of *Lactobacillus buchneri*, composition, a multi-component preparation for starch-rich plant preservation, their use and a method for plant preservation. Patent N°. EP 2785826.
- Zielińska, K., Fabiszewska, A., Swiatek, M., Szymanowska-Powalowska, D., 2017. Evaluation of the ability to metabolize 1,2-propanediol by heterofermentative bacteria of the genus *Lactobacillus*. *Electron. J. Biotechnol.* 26, 60-83.

CAPÍTULO 2

Efeitos da adição de protease exógena na fermentação e valor nutritivo de grãos de milho e sorgo reidratados

Resumo - Objetivou-se avaliar os efeitos da adição de protease exógena na fermentação e valor nutritivo de silagens de grão de milho e sorgo reidratados em diferentes períodos de armazenamento. Os grãos de milho e sorgo foram moídos em tamanho de partícula de 3 mm e a umidade reconstituída para 35%. Foi utilizado um esquema fatorial $2 \times 6 \times 3$, sendo dois grãos (milho e sorgo), seis doses da enzima (0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 e 1,5% com base na MN) e três períodos de fermentação (0, 60 e 90 dias) no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Foi utilizada a protease, aspergillopepsina I (FoodPro[®] PAL, DANISCO) de origem fúngica, produzida por *Aspergillus niger*. Houve efeito ($P < 0,05$) da interação $G \times E \times P$ sobre AL, N-NH₃, P-Sol, CHO, amido, DISAM, FDN, FDA e leveduras. A concentração AL aumentou linearmente ($P < 0,05$), com o incremento da dose de enzima nas silagens de GM e GS, aos 60 e 90 dias de fermentação. Silagens de GM e GS apresentaram concentrações de ETA semelhantes ($P > 0,05$), exceto nas doses de enzima 1,2 e 1,5%, nas quais silagens de GS apresentaram maiores concentrações ($P < 0,05$) comparada a GM. Aos 60 e 90 dias de fermentação foi verificada população de BAL semelhante ($P > 0,05$) entre silagens de GM e GS. Silagens de GS apresentaram populações de LEV superiores ($P < 0,05$) às silagens de GM aos 60 e 90 dias de fermentação, nas doses de enzima avaliadas. Os dados observados para concentração de N-NH₃, P-Sol, FDN e DISAM nas silagens de GM e GS foram ajustados à modelo polinomial quadrático com resposta platô. Verificaram-se aumentos ($P < 0,05$) nas concentrações de N-NH₃ e P-Sol nas silagens de GM e GS reidratados, comparado ao tratamento sem adição da protease, assim com verificou-se incremento na DISAM das silagens. A adição de 0,3% de protease exógena no momento da ensilagem de GM e 0,5% em GS reidratados aumentou a atividade proteolítica durante a fermentação, proporcionando aumento da digestibilidade *in situ* do amido em menor tempo de armazenamento.

Palavras chave: amônia, digestibilidade do amido, protease, proteína solúvel

Effects of exogenous protease addition on fermentation and nutritive value of rehydrated corn and sorghum grains

Abstract- The objective was to evaluate the effects of adding exogenous protease (E) on the fermentation and nutritive value of rehydrated corn and sorghum grain silages (G) at different storage periods. Corn and sorghum grains were ground through a mill retrofitted with a 3-mm screen. Prior to ensiling, ground grains were rehydrated up to 35% of moisture. A 2 × 6 × 3 factorial scheme was used, two grains (corn and sorghum), six doses of enzyme (0; 0.3; 0.6; 0.9; 1.2 and 1.5% on fresh matter basis) and three fermentation periods (0, 60 and 90 d), in a completely randomized design, with four replicates. The enzyme was a protease, aspergillopepsin I, which is produced by the *Aspergillus niger* (FoodPro[®] PAL, DANISCO). There was an effect (P<0.05) of G × E × P interaction on the concentrations of LA, ammonia nitrogen (N-NH₃), soluble protein (P-Sol), water-soluble carbohydrate (WSC), starch, ISSD, NDF and ADF, and on yeast count. There was a positive linear increase (P<0.05) on LA concentrations with increasing doses of enzyme in corn (CG) and sorghum (SG) grain silages at 60 and 90 d of fermentation. CG and SG silages showed similar ETA concentrations (P>0.05), except for enzyme doses 1.2 and 1.5%, in which SG silages showed higher concentrations (P<0.05) compared to CG. It was found similar (P>0.05) LAB count between CG and SG silages at 60 and 90 d of fermentation. Sorghum grain silages showed greater yeast population (P<0.05) compared to CG silages at 60 and 90 d of fermentation, in all evaluated enzyme doses. The data of N-NH₃, P-Sol, NDF and *in situ* starch digestibility (ISSD) of CG and SG silages were adjusted to a quadratic polynomial model with plateau response. Ammonia nitrogen, ISSD and P-Sol increased (P<0.05) in silages treated with enzyme in relation to untreated silages. The addition of 0.3 and 0.5% of exogenous protease at ensiling of rehydrated CG and SG, respectively, increased the proteolytic activity and *in situ* starch digestibility during silage fermentation in a shorter storage time.

Keywords: ammonia, starch digestibility, protease, soluble protein

Introdução

A silagem de grãos reidratados é o produto resultante da fermentação anaeróbia de grãos maduros moídos, com umidade reconstituída, em que os micro-organismos consomem carboidratos solúveis em água e produzem ácidos orgânicos de cadeia curta. É uma tecnologia de abordagem antiga (McLaren e Matsushima, 1968) que vem sendo resgatada nos últimos anos (Ferrareto et al., 2018; da Silva et al., 2018; Santos et al., 2019).

Durante o processo de fermentação proteases microbianas, bem como os ácidos orgânicos produzidos, promovem solubilização da matriz proteica que envolve os grânulos de amido tornando-o mais digestível para os micro-organismos ruminais (Junges et al., 2017; da Silva et al., 2018). No entanto, silagem de grãos reidratados e grãos de alta umidade, necessitam de tempos mais prolongados de armazenamento para maiores incrementos na digestibilidade da matéria seca e do amido (Benton et al., 2005; Carvalho et al., 2017).

O uso de proteases exógenas são apontados como aditivos promissores que promovem melhorias nutricionais em silagem da planta de milho (Windle et al., 2014), grãos de milho de alta umidade (Kung Jr. et al., 2014) e grãos de milho reidratados (Ferrareto et al., 2015) em menores tempos de armazenamento.

Proteases são enzimas que hidrolisam cadeias peptídicas sob condição de pH e temperatura adequados. Produtos gerados durante a fermentação como amônia e proteína solúvel são parâmetros mensuráveis nas silagens que apresentam correlação positiva com a digestibilidade do amido (Ferrareto et al., 2014, Kung et al., 2014). Ferrareto et al. (2014) avaliaram amostras de silagem de grãos de milho com alta umidade e observaram correlação positiva para amônia ($R^2= 0,61$, $P<0,001$) e para proteína solúvel ($R^2= 0,55$, $P<0,001$).

Até o momento não há relatos na literatura da utilização de proteases exógena na ensilagem de grãos de sorgo reidratados, e, no Brasil, com grãos de milho reidratados. A hipótese do nosso estudo é que a adição de protease exógena na ensilagem de grãos de milho e sorgo reidratados favorece a solubilização da fração protéica e melhora a digestibilidade do amido das silagens em menor tempo de ensilagem. Portanto, objetivou-se avaliar os efeitos da adição de protease exógena na fermentação e valor nutritivo de silagens de grão de milho e sorgo reidratados em diferentes períodos de armazenamento.

Material e Métodos

Local e preparo da silagem

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, UFV, entre Fevereiro e Abril de 2018. Viçosa está localizada no estado de Minas Gerais, a 657 m de altitude, a 20°45' de latitude sul e 42°51' de longitude oeste. O clima é do tipo Cwa, segundo a classificação proposta por KÖPPEN, com precipitação média anual de 1341 mm.

Cinquenta quilos de grãos de milho (GM) e sorgo (GS) foram obtidos na Universidade Federal de Viçosa, UFV e submetidos à moagem em moinho de martelos (DMP-2, Nogueiras, São João da Boa Vista, São Paulo, Brasil) com peneira de 3 mm. Em seguida, foi realizada a reconstituição da umidade dos grãos para 35%, com o auxílio de um misturador de ração para homogeneização. Os grãos de milho (GM) e sorgo (GS) reidratados foram distribuídos em 24 montes, contendo 2,5 kg de grãos em cada monte. Foram coletadas amostras dos grãos secos e reidratados para caracterização do material antes da ensilagem (Tabela 1).

Tabela 1- Composição química (g kg⁻¹ de MS), pH e população microbiana (log ufc g⁻¹) dos grãos de milho e sorgo secos e reidratados antes da ensilagem

Itens ¹	Seco		Reidratado	
	Milho	Sorgo	Milho	Sorgo
MS (g kg ⁻¹ de MN)	882,4	889,2	634,7	642,5
PB	92,0	107,1	92,3	106,4
P-Sol (% PB)	24,2	18,78	24,74	14,3
FDN	145,2	158,1	165,7	153,9
FDA	34,2	39,9	33,6	39,6
Amido	698,9	673,7	737,5	589,0
CHO	17,1	12,1	15,8	11,1
N-NH ₃ (% NT)	-	-	0,43	0,14
pH	-	-	6,18	6,47
BAL	-	-	4,82	5,12
ENT	-	-	4,67	5,17
LEV	-	-	4,49	4,97
MOFO	-	-	5,11	4,19

¹MS= matéria seca; PB= proteína bruta; P-Sol= proteína solúvel total em TBF; FDN= fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; CHO= carboidratos solúveis em água; N-NH₃= nitrogênio amoniacal; BAL= bactérias do ácido lático; ENT= enterobactérias; LEV= leveduras.

O produto comercial (FoodPro[®] PAL – PD 263063-2.0EN, DANISCO), fonte da protease exógena apresenta em sua composição (p/p): 50% de glicerina; 32-40% de água; 10-12% de aspergillopepsina I e 0-2,8% de sulfato de sódio. A aspergillopepsina é

uma protease de origem fúngica produzida por *Aspergillus niger* que apresenta atividade ótima em pH 2,5 a 3,0 e temperatura de 55 a 60°C, conforme especificação do fabricante.

O produto comercial foi diluído em 50 mL de água destilada e aplicado aleatoriamente nos montes. A mesma quantidade de água foi pulverizada no tratamento sem adição de enzima (0%). O material foi homogeneizado e 1 kg dos grãos de milho e sorgo foram ensilados em *bags* (25 cm x 35 cm, Doug Care Equipament, Springville, CA) e a condição de anaerobiose no interior do mini-silo foi estabelecida utilizando seladora a vácuo (Eco vacuum 1040, Orved, Italy). Foram preparados dois *bags* em cada monte, referente aos dias 60 e 90 dias de fermentação. Os *bags* foram armazenados em laboratório à temperatura ambiente. O restante do material, (500 g) do período zero foi armazenado em sacos de polietileno para posteriores análises.

Foi utilizado um esquema fatorial $2 \times 6 \times 3$, sendo dois grãos (milho e sorgo), seis doses da enzima (0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 e 1,5% com base na MN) e três períodos de fermentação (0, 60 e 90 dias) no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Perfil fermentativo

Um extrato aquoso foi preparado com 25 g de amostra dos grãos (dia 0) ou silagens e 225 mL de solução salina estéril (Ringer Solution, Oxoid[®], Hampshire) e homogeneizados por um minuto em liquidificador industrial. Em seguida o extrato foi filtrado em dupla camada de gaze estéril e mensurado o pH com auxílio de um potenciômetro (Tecnal, SP, Brasil) (Kung Jr., 1996).

Uma alíquota de 15 mL do extrato foi filtrada em papel de filtro Whatman 54 (Whatman, Florham, NJ) e acondicionada em tubos contendo 100 µL de H₂SO₄ 50%, para posteriores análises de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) (Okuda et al., 1965), carboidratos solúveis em água (Nelson, 1944), ácido lático (AL), ácido acético (AA), ácido butírico (AB) e etanol (ETA) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) (Siegfried et al., 1984). O HPLC foi equipado com um detector de índice de refração Shodex R1-101 (Showa Denko America, Inc., NY, USA) e uma coluna Rezex ROA-Organic Acid H⁺, 300mm x 7,8mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) com fase móvel contendo ácido sulfúrico 5 mmol l⁻¹ a uma vazão de 0,7 ml min⁻¹ a 45°C.

Populações microbianas

Foram quantificadas as populações de bactérias do ácido lático (BAL), enterobactérias, mofos e leveduras dos grãos antes da ensilagem (dia 0) e das respectivas silagens. Uma alíquota (10 mL) do extrato aquoso (25 g de grão/225 mL de solução salina estéril) foi submetida às diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}). O cultivo dos micro-organismos foi realizado em placas de Petri estéreis, em meio de cultura MRS Ágar (Man, Rogosa e Sharpe) para BAL; VRB (Violet Red Bile) para enterobactérias e PDA (Potato Dextrose Ágar), acrescido com 1,5% de ácido tartárico a 10%, para mofos e leveduras, utilizando a técnica de plaqueamento *Pour-plate*. As placas foram incubadas em estufa BOD, com temperatura e período determinado para cada grupo de micro-organismo: enterobactérias, 37°C/24 h; BAL, 37°C/48 h; leveduras e mofos, 25°C/72 e 120 h, respectivamente. Ao final do tempo de incubação, a contagem foi realizada com auxílio de um contador de colônia manual (Phoenix, Modelo CP 608). Foram passíveis de contagem as placas que apresentaram entre 30 e 300 unidades formadoras de colônias (UFC). Para avaliação e interpretação dos dados, os resultados obtidos foram convertidos para base logarítmica (\log_{10} ufc).

Composição química e digestibilidade ruminal *in situ*

Amostras dos grãos antes da ensilagem e das silagens foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 h, em seguida moídas em moinho tipo Willey com peneira de crivo 1 mm. Os teores de MS (método 934.01) e proteína bruta, PB (método 984.13), foram analisados conforme AOAC (1990), fibra em detergente neutro (FDN) conforme Mertens (2002), amido conforme Hall (2015) e proteína solúvel total (P-Sol) obtida após tratar as amostras com tampão borato fosfato (TBF), onde os valores de P-Sol correspondem às frações A e B₁, obtida pela diferença entre o N total e o N insolúvel em TBF conforme Licitra et al. (1996).

Para o ensaio de digestibilidade ruminal *in situ*, aproximadamente, 5,0 g de amostra (tamanho de partícula de 3 mm) de cada tratamento foram pesadas individualmente em sacos de náilon (Sefar Nitex, Suíça; porosidade de 50 μ m, 400 cm² de superfície) e incubados em quatro bovinos Nelore, com peso médio de 300 \pm 18 kg, providos de cânula no rúmen. Após 7 horas de incubação os sacos foram retirados do rúmen e lavados em água corrente até o clareamento da mesma. Em seguida, foram mantidos durante 72 h em estufa ventilada, a 55°C, na sequência em estufa a 105°C por 2 h e pesados. O resíduo de cada saco de náilon foi removido e moído em moinho de

facas (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil) com peneira de 1 mm e acondicionado em sacos de polietileno para posterior análise do amido residual conforme Hall (2015).

Os animais utilizados no ensaio, quinze dias antes da incubação receberam dieta contendo 50% de silagem de milho e 50% de concentrado, base seca.

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da UFV (CEUAP/UFV, protocolo nº 037/2018).

Análise estatística

Os dados de ácidos orgânicos e etanol foram analisados em esquema fatorial $2 \times 6 \times 2$, no qual não foi considerado o período 0 de fermentação, as demais variáveis foram analisadas em esquema fatorial $2 \times 6 \times 3$, em delineamento inteiramente casualizado. O tipo de grão, as doses de enzima, os períodos de fermentação, bem como, a interação entre os fatores, foram considerados efeitos fixos conforme o modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + E_j + P_k + (GE)_{ij} + (GP)_{ik} + (EP)_{jk} + (GEP)_{ijk} + e_{ijkl} \quad (1)$$

onde, Y_{ijk} = variável resposta; μ = constante geral; G_i = efeito do grão i ; E_j = efeito da enzima j ; $(GE)_{ij}$ = interação do grão i e a enzima j ; $(GP)_{ik}$ = interação do grão i e o período k ; $(EP)_{jk}$ = interação da enzima j e do período k ; $(GEP)_{ijk}$ = interação do grão i , enzima j e período k ; e e_{ijkl} = erro aleatório assumindo uma distribuição normal independente, NID $(0, \sigma^2)$. Após análise de variância, as interações significativas foram desdobradas e as médias comparadas pelo teste Tukey. O fator enzima foi analisado por meio de análise de regressão e as equações foram escolhidas com base nos seus coeficientes de determinação e na significância dos coeficientes de regressão. Adotou-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I, por intermédio do PROC MIXED do SAS versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Para as variáveis P-SOL, N-NH₃, DISAM e FDN as médias estimadas pelo modelo (1) foram ajustadas para modelo polinomial quadrático com resposta platô por meio do procedimento NLIN (PROC NLIN) do SAS versão 9.4, conforme as equações:

$$Y = a + bx + cx^2, \text{ se } x < x_0 \text{ (quadrático)}$$

$$Y = p, \text{ se } x \geq x_0 \text{ (platô)}$$

onde, Y = teor da variável em função da dose x de enzima; p = platô; a , b e c = parâmetros estimados do modelo. Deste modo, valores de x menores que x_0 , o modelo que descreve a resposta Y é uma função quadrática, e para valores de x maiores ou iguais a x_0 , a equação é uma constante ou platô.

Resultados

Perfil fermentativo e população microbiana

Houve efeito ($P < 0,05$) da interação $G \times E \times P$ sobre AL, $N-NH_3$ e LEV. As variáveis pH, ETA e BAL foram afetadas ($P < 0,05$) pela interação $G \times E$, $G \times P$ e $E \times P$, enquanto que o AA foi afetado ($P < 0,05$) apenas por E (Tabela 2).

Tabela 2- Efeitos dos fatores grão (G), enzima (E), período (P) e interações para as variáveis do perfil fermentativo e populações microbianas das silagens de grãos de milho e sorgo reidratados

Item ¹	P-valor							EPM ²
	G	E	P	G × E	G × P	E × P	G × E × P	
pH	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,15	0,092
AL	<0,01	<0,01	<0,01	0,29	0,19	0,11	0,008	0,705
AA	0,27	0,02	0,23	0,09	0,96	0,18	0,88	0,271
ETA	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,025	<0,01	0,25	0,269
$N-NH_3$	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,381
BAL	0,01	0,37	<0,01	0,003	0,009	0,004	0,10	0,048
LEV	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,02	<0,01	<0,01	0,058

¹AL= ácido lático; AA= ácido acético; ETA= etanol; $N-NH_3$ = nitrogênio amoniacal; BAL= bactérias do ácido lático; LEV= leveduras.

²EPM= erro padrão da média

Os maiores ($P < 0,05$) valores de pH foram registrados no material antes da ensilagem, nas diferentes doses de enzima avaliadas (Figura 1).

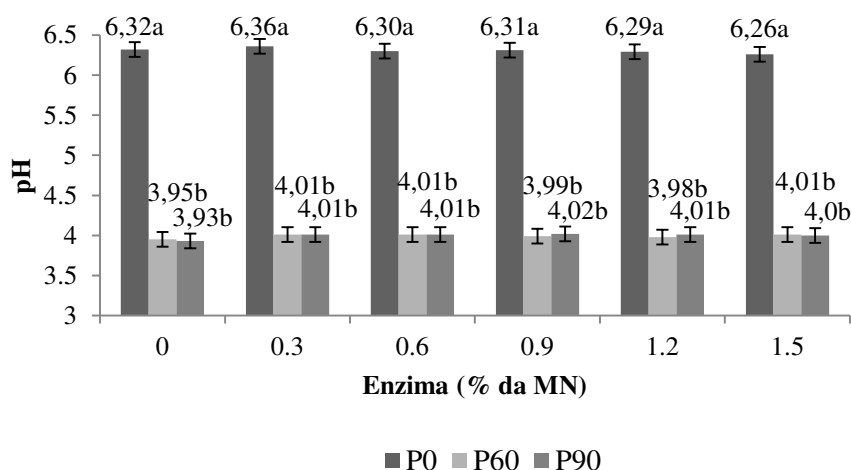


Figura 1- Médias dos quadrados mínimos para interação $E \times P$ para valores de pH ($P < 0,0001$, EPM= 0,0919) das silagens de grãos de milho e sorgo reidratados, tratados ou não, com enzima em diferentes períodos de fermentação. Barras indicam EPM. Médias seguidas de mesma letra^{a-b}, desdobramento do período em cada dose de enzima não diferem ($P > 0,05$) entre si pelo teste Tukey.

Verificou-se aumento linear nas concentrações de AL ($P < 0,05$), com o aumento da dose de enzima nas silagens de GM e GS, aos 60 e 90 dias de fermentação (Figura 2A), enquanto que independente do tipo de grão e período de fermentação, a concentração de AA ajustou-se a um modelo quadrático ($P < 0,05$) estimando-se valor mínimo de $0,79 \text{ g kg}^{-1}$ de MS, na dose de $0,9\%$ da enzima (Figura 2B).

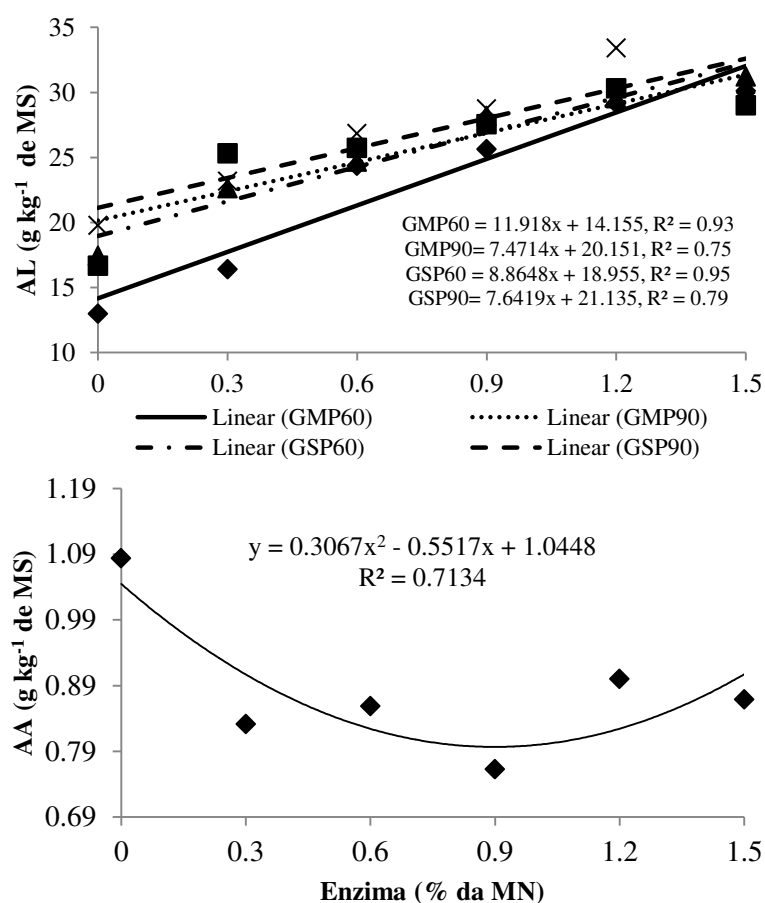


Figura 2- Análise de regressão para as concentrações do ácido láctico (AL) afetada pela interação $G \times E \times P$ (A, $P=0,0008$, $EPM= 0,705$) e efeito da enzima para concentrações de ácido acético (AA) (B, $P=0,019$, $EPM= 0,271$) em silagem de grãos de milho e sorgo reidratados, tratados ou não, com enzima em diferentes períodos de fermentação. GM: grão de milho; GS: grão de sorgo; P: período (60 e 90 dias)

Silagens de GM e GS apresentaram concentrações de ETA semelhantes ($P > 0,05$), exceto nas doses de $1,2$ e $1,5\%$, nas quais as silagens de GS apresentaram maiores concentrações ($P < 0,05$) comparada a GM (Figura 3). Não foi detectado presença de ácido butírico nas silagens avaliadas no presente estudo.

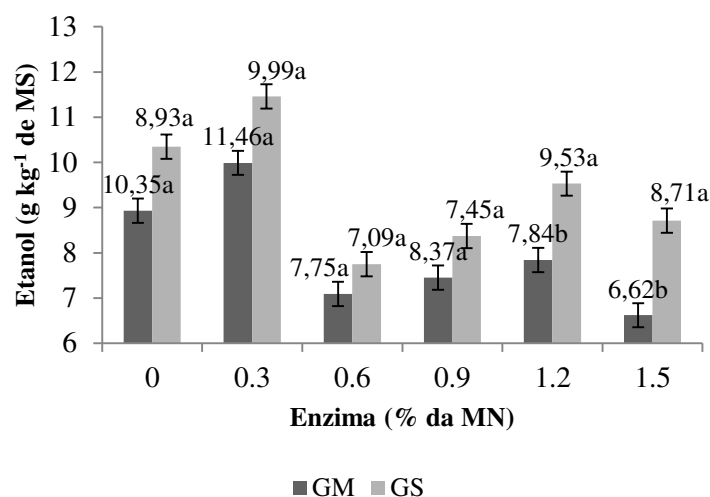


Figura 3- Média dos quadrados mínimos da interação G × E para concentrações de etanol ($P=0,0002$, EPM= 0,269) em silagem de grãos de milho e sorgo reidratados, tratados ou não, com enzima em diferentes períodos de fermentação. GM: grão de milho. Barras indicam EPM. Médias seguidas de mesma letra^{a-b}, desdobramento dos grãos em cada dose de enzima, não diferem entre si ($P>0,05$) pelo teste F.

Os dados observados para a concentração de N-NH₃ nas silagens de GM (Figura 4A) e GS (Figura 4B) foram ajustados a um modelo polinomial quadrático com resposta platô. Verificaram-se aumentos ($P<0,05$) nas concentrações de N-NH₃ até as doses de 0,75 e 0,5% de enzima em silagens de GM e 0,8 e 0,59% em silagens de GS aos 60 e 90 dias de fermentação, respectivamente, com posterior estabilização das concentrações N-NH₃ nas silagens (Figura 4).

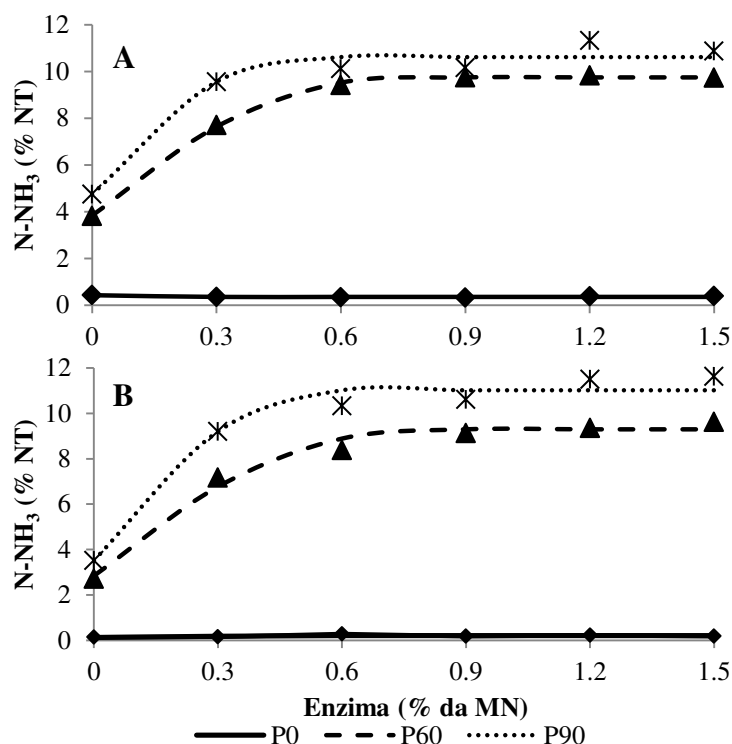


Figura 4- Concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) das silagens de grãos de milho (A) e sorgo (B) reidratados, tratados ou não, com enzima em diferentes períodos de fermentação. Grãos de milho (A) P0: $Y=0,428-0,55x+1,02x^2$, se $x<0,27$ e $Y=0,36$, se $x\geq0,27$, $R^2=0,64$; P60: $Y= 3,84+15,86x-10,63x^2$, se $x<0,75$ e $Y=9,75$, se $x\geq0,75$, $R^2= 0,99$; P90: $Y= 4,75+22,52x-21,57x^2$, se $x<0,52$ e $Y= 10,62$, se $x\geq0,52$, $R^2= 0,96$. Grãos de sorgo (B) P0: $Y=0,13+0,24x-0,17x^2$, se $x<0,70$ e $Y=0,21$, se $x\geq0,70$, $R^2=0,41$; P60: $Y= 2,84+16,10x-10,03x^2$, se $x<0,80$ e $Y=9,30$, se $x\geq0,80$, $R^2= 0,98$; P90: $Y= 3,52+25,38x-21,47x^2$, se $x<0,59$ e $Y= 11,02$, se $x\geq0,59$, $R^2= 0,97$.

No momento da ensilagem, o GS apresentou maior ($P<0,05$) população de BAL, enquanto que aos 60 e 90 dias de fermentação não foi verificado ($P>0,05$) diferença comparado a silagens de GM (Figura 5A). Em ambas as silagens, as maiores ($P<0,05$) populações de BAL foram registradas aos 60 dias de fermentação comparado aos períodos 0 (zero) e 90 dias (Figura 5A). Silagens de GS apresentaram populações de LEV superiores ($P<0,05$) às silagens de GM aos 60 e 90 dias de fermentação, nas diferentes doses de enzima (Figura 5B). Não foram detectadas populações de enterobactérias e mofos nas silagens avaliadas no presente estudo.

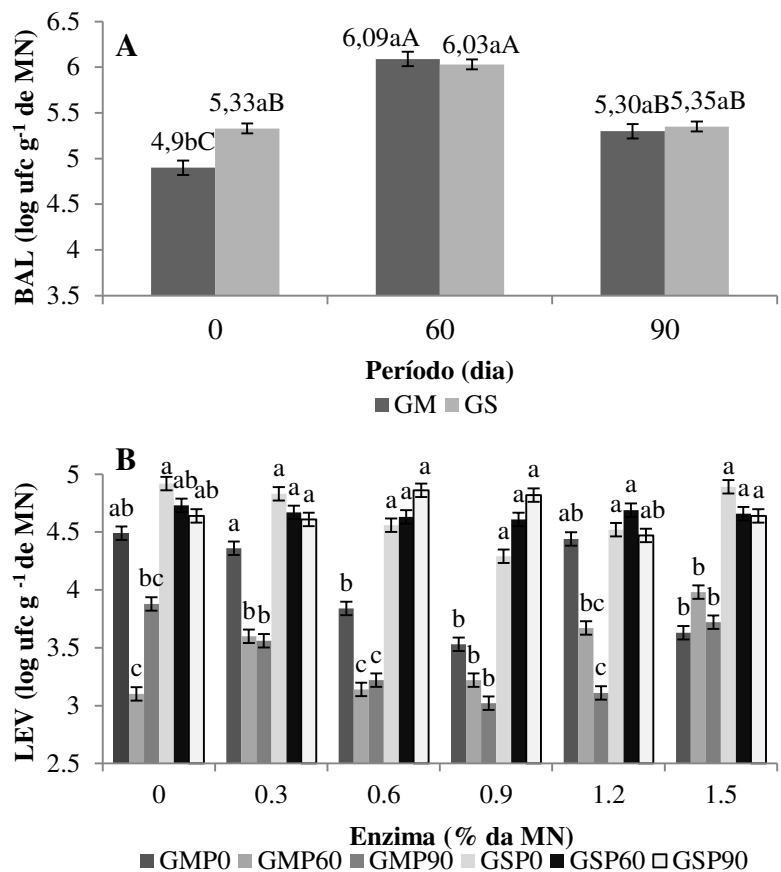


Figura 5- Média dos quadrados mínimos da interação G × P para população de bactérias do ácido lático (BAL) (A, $P < 0,0009$, EPM= 0,048) e interação G × E × P para população de leveduras (LEV) (B, $P = 0,0015$, EPM= 0,058) em silagem de grãos de milho e sorgo reidratados, tratados ou não, com enzima em diferentes períodos de fermentação. GM: grão de milho; GS: grão de sorgo, P: período (0, 60 e 90 dias). Barras indicam EPM. Figura A: Médias seguidas de mesma letra minúscula^{a-b}, desdobramento dos grãos em cada período não diferem entre si ($P > 0,05$) pelo teste F e médias seguidas de mesma letra maiúscula^{A-B}, desdobramento do período em cada grão, não diferem entre si ($P > 0,05$) pelo teste Tukey. Figura B: Médias seguidas de mesma letra^{a-c}, desdobramento dos grãos e período em cada dose de enzima, não diferem ($P > 0,05$) entre si pelo teste Tukey.

Composição química e digestibilidade *in situ* do amido

Houve efeito da interação $G \times E \times P$ ($P < 0,05$) para todas as variáveis do valor nutritivo das silagens, exceto para MS que foi afetada pelas interações $G \times P$ e $E \times P$, enquanto que a PB foi afetada pelos fatores G e P (Tabela 3).

Tabela 3- Efeitos dos fatores grão (G), enzima (E), período (P) e interações para as variáveis da composição química e digestibilidade *in situ* do amido das silagens de grãos de milho e sorgo reidratados

Item ¹	P-valor							EPM ²
	G	E	P	G × E	G × P	E × P	G × E × P	
MS	<0,01	0,08	<0,01	0,07	0,01	<0,01	0,07	0,740
CHO	<0,01	<0,01	<0,01	0,03	<0,01	<0,01	<0,01	0,338
PB	<0,01	0,35	<0,01	0,45	0,75	0,24	0,39	0,974
P-Sol	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	2,522
Amido	<0,01	<0,01	0,007	<0,01	<0,01	<0,01	0,04	5,873
FDN	0,01	<0,01	<0,01	0,002	0,003	<0,01	<0,01	2,490
FDA	<0,01	<0,01	<0,01	0,03	<0,01	0,08	<0,01	0,457
DISAM	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	19,914

¹MS= matéria seca; CHO= carboidratos solúveis em água; PB= proteína bruta; P-Sol= proteína solúvel em tampão borato fosfato; FDN= fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; DISAM= digestibilidade *in situ* do amido.

²EPM= erro padrão da média

Silagens aos 90 dias de fermentação apresentaram menor ($P < 0,05$) teor de MS comparado aos 60 dias de fermentação, exceto na dose 0,3% da enzima, na qual não foi verificado efeito do período de fermentação sobre a MS (Figura 6).

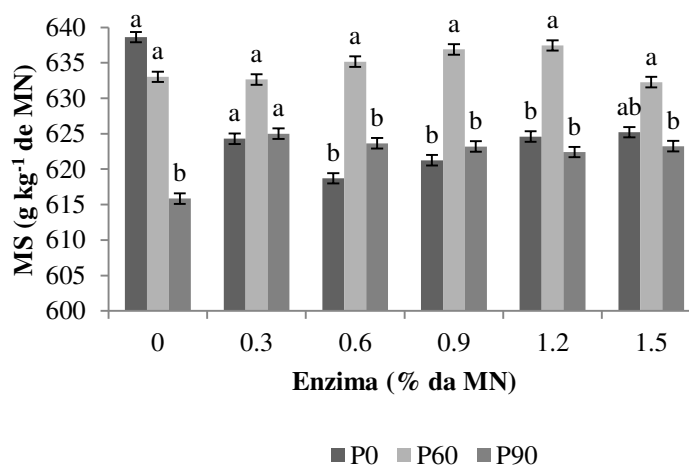


Figura 6- Média dos quadrados mínimos da interação $E \times P$ para o teor de MS ($P < 0,01$, EPM= 0,740) em silagem de grãos de milho e sorgo reidratados, tratados ou não, com enzima em diferentes períodos de fermentação. GM: grão de milho; GS: grão de sorgo; P: período (60 e 90 dias). Barras indicam EPM. Médias seguidas de mesma letra^{a-b}, desdobramento de período em cada enzima, não diferem ($P > 0,05$) entre si pelo teste Tukey.

As concentrações de CHO observadas para GM, no momento da ensilagem (P0) e na silagem aos 60 dias de fermentação, foram superiores ($P<0,05$) ao GS em todas as doses de enzima (Figura 7A). Resultado semelhante foi observado para as concentrações de amido, em que no momento da ensilagem o GM apresentou valores superiores ($P<0,05$) ao GS. Aos 60 e 90 dias de fermentação a concentração de amido no GM também foi maior ($P<0,05$), exceto nas doses 0 e 1,5% de enzima (Figura 7B).

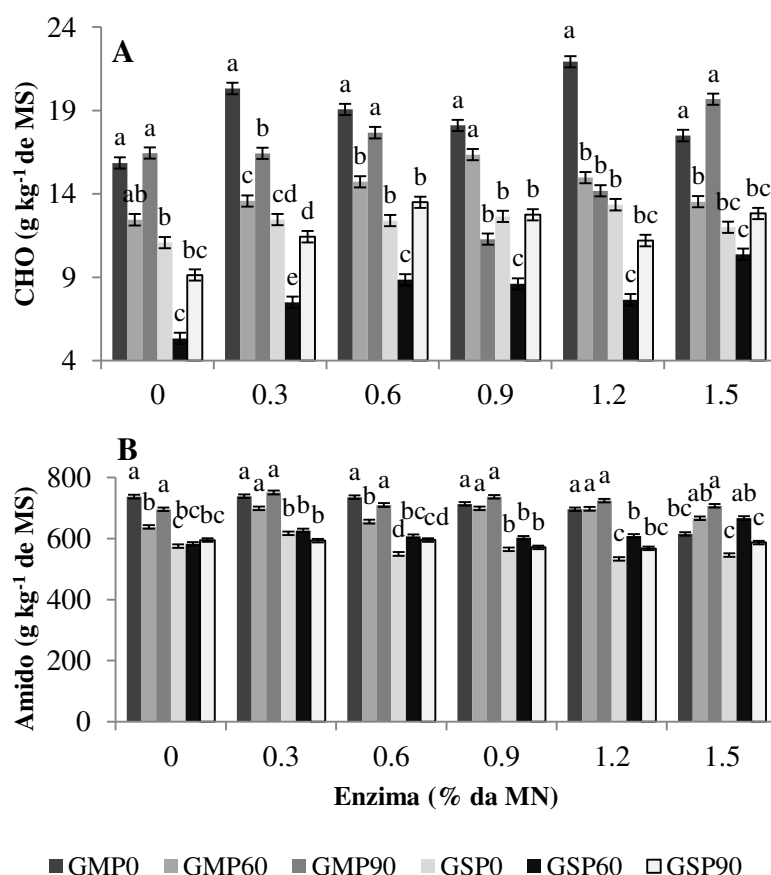


Figura 7- Média dos quadrados mínimos da interação $G \times E \times P$ para concentrações de carboidratos solúveis em água (CHO) (A, $P<0,0001$, EPM= 0,338) e amido (B, $P=0,044$, EPM= 5,873) em silagem de grãos de milho e sorgo reidratados, tratados ou não, com enzima em diferentes períodos de fermentação. GM: grão de milho; GS: grão de sorgo, P: período (0, 60 e 90 dias). Barras indicam EPM. Médias seguidas de mesma letra^{a-d}, desdobramento dos grãos e período em cada dose de enzima, não diferem entre si ($P>0,05$) pelo teste Tukey.

A variável PB foi afetada pelos fatores G ($P<0,05$) e P ($P<0,05$) (Tabela 3). Silagens de GS apresentaram valores superiores às silagens GM, com valores de 100,9 e 86,1 g kg⁻¹ de MS, respectivamente. Aos 60 e 90 dias de fermentação foi observado menor valor ($P<0,05$) para esta variável comparado ao período 0 (zero), com valores de 90,1; 90,2 e 100,1, respectivamente.

Foi observado efeito da interação $G \times E \times P$ ($P < 0,05$) sobre FDN e FDA (Tabela 3). A concentração de FDA ($P < 0,05$) decresceu linearmente com o aumento da dose de enzima nas silagens de ambos os grãos. Os dados de FDN foram ajustados a modelos polinomiais quadráticos com resposta platô. Observou-se, que a silagem de GS requer menores doses de enzima aos 60 e 90 dias de fermentação para obter uma resposta platô, comparado à silagem de GM (Figura 9).

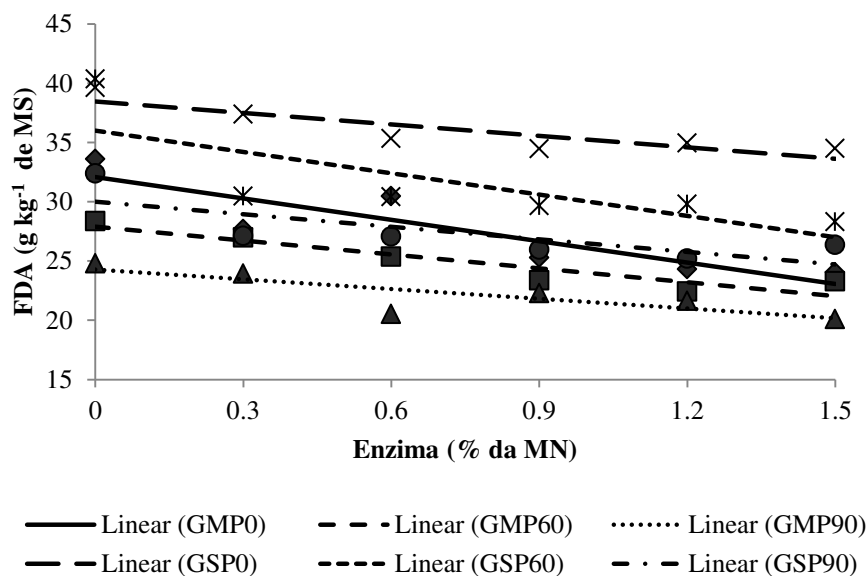


Figura 8- Equações de regressão para os teores de fibra em detergente ácido (FDA) afetada pela interação $G \times E \times P$ ($P = < 0,001$, $EPM = 0,457$) para silagem de grãos de milho e sorgo reidratados, tratados ou não, com enzima em diferentes períodos de fermentação. GM: grão de milho; GS: grão de sorgo; P: período (0, 60 e 90 dias). $GMP_0 = -1,8017x + 33,876$, $R^2 = 0,78$; $GMP_{60} = -1,1734x + 29,079$, $R^2 = 0,87$; $GMP_{90} = -0,818x + 25,085$, $R^2 = 0,68$; $GSP_0 = -0,9663x + 39,432$, $R^2 = 0,77$; $GSP_{60} = -1,7991x + 37,802$, $R^2 = 0,58$; $GSP_{90} = -1,0586x + 31,06$, $R^2 = 0,59$.

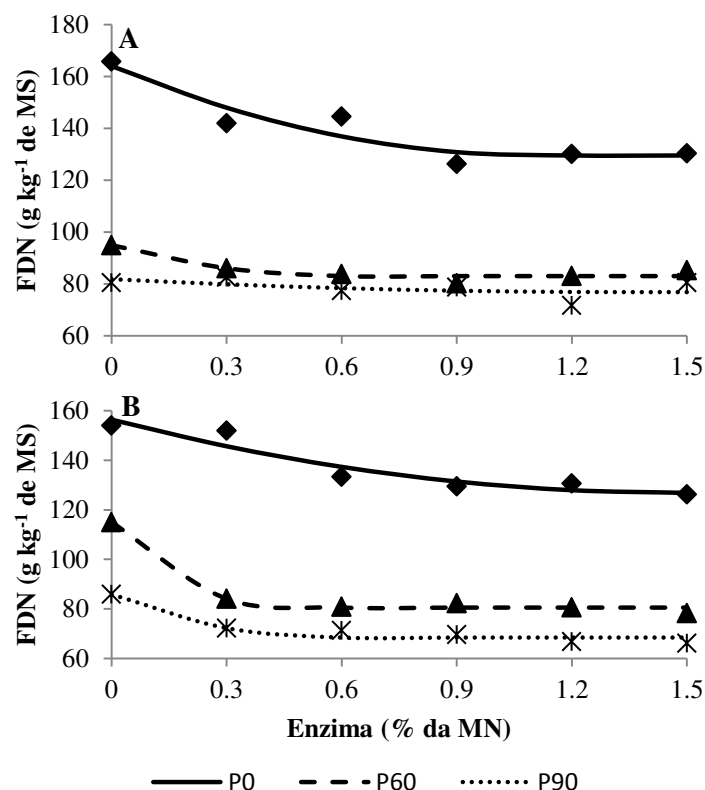


Figura 9- Concentrações de fibra em detergente neutro (FDN) das silagens de grãos de milho (A) e sorgo (B) reidratados, não tratados e tratados com protease exógena em diferentes períodos de fermentação. Grãos de milho (A) P0: $Y=163,97-61,82x+27,71x^2$, se $x < 1,12$ e $Y=129,49$, se $x \geq 1,12$, $R^2=0,88$; P60: $Y=94,89-39,2x+32,35x^2$, se $x < 0,61$ e $Y=82,99$, se $x \geq 0,61$, $R^2= 0,89$; P90: $Y=81,81-7,44+2,77x^2$, se $x < 1,34$ e $Y=76,81$, se $x \geq 1,34$, $R^2= 0,27$. Grãos de sorgo (B) P0: $Y=156,33-39,76x+13,39x^2$, se $x < 1,48$ e $Y=126,82$, se $x \geq 1,48$, $R^2=0,90$; P60: $Y=114,95-155,69x+176,19x^2$, se $x < 0,44$ e $Y=80,56$, se $x \geq 0,44$, $R^2= 0,99$; P90: $Y=85,86-61,79x+54,86x^2$, se $x < 0,56$ e $Y=68,47$, se $x \geq 0,56$, $R^2= 0,93$.

Houve efeito da interação $G \times E \times P$ ($P < 0,05$) sobre P-sol (Tabela 3). Os dados obtidos foram ajustados ao modelo polinomial quadrático com resposta platô (Figura 10), exceto para GSP0, que aumentou linearmente com as doses de enzima (Figura 10B). Verificaram-se aumentos nas concentrações de P-sol até as doses de 0,45 e 0,37% de enzima em silagens de GM (Figura 10A) com resposta platô de 88,29 e 93,94% da PB; e 0,50 e 0,53% em silagens de GS (Figura 10B) com resposta platô de 83,83 e 87,81% da PB aos 60 e 90 dias de fermentação, respectivamente. A partir da equação $UPB = [PB (\% MS) \times (P\text{-sol do período de fermentação} - P\text{-sol do dia } 0)/100]$ proposta Kung Jr. et al. (2014), onde UPB= unidades de PB, estimou-se a quantidade de PB solubilizada. Aos 60 dias de fermentação, com a adição de 0,45% de enzima (resposta platô) em GM, foi solubilizado 5,5 unidades de PB, enquanto que no tratamento sem adição de protease esse valor foi de 1,4 unidades de PB com base na MS. Na silagem de GS, foram solubilizados 7,0 e 1,8 unidades de PB, na dose de 0,5% e na ausência de

enzima, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado aos 90 dias de fermentação, com valores de 5,9 e 2,4 unidades em silagem de GM, e 7,4 e 2,4 unidades de PB em silagem de GS, ao tratar com enzima e não tratar, respectivamente.

Houve efeito da interação $G \times E \times P$ ($P < 0,05$) sobre DISAM (Tabela 3). Os dados obtidos foram ajustados ao modelo polinomial quadrático com resposta platô nas doses de 0,29 e 0,30% de enzima em silagens de GM (Figura 11A) e 0,50 e 0,44% em silagens de GS (Figura 11B), as quais proporcionaram incrementos na digestibilidade do amido de aproximadamente 44,9 (648,39 vs 939,62 g kg⁻¹ de amido) e 43% (676,81 vs 967,42 g kg⁻¹ de amido) em silagens de GM e 69,6 (346,53 vs 587,88 g kg⁻¹ de amido) e 66,7% (376,99 vs 628,57 g kg⁻¹ de amido) em silagens de GS, aos 60 e 90 dias de fermentação, respectivamente (Figura 11). Apesar dos maiores incrementos serem observados nas silagens de GS, a silagem de GM apresentou valores de DISAM numericamente superiores (Figura 11).

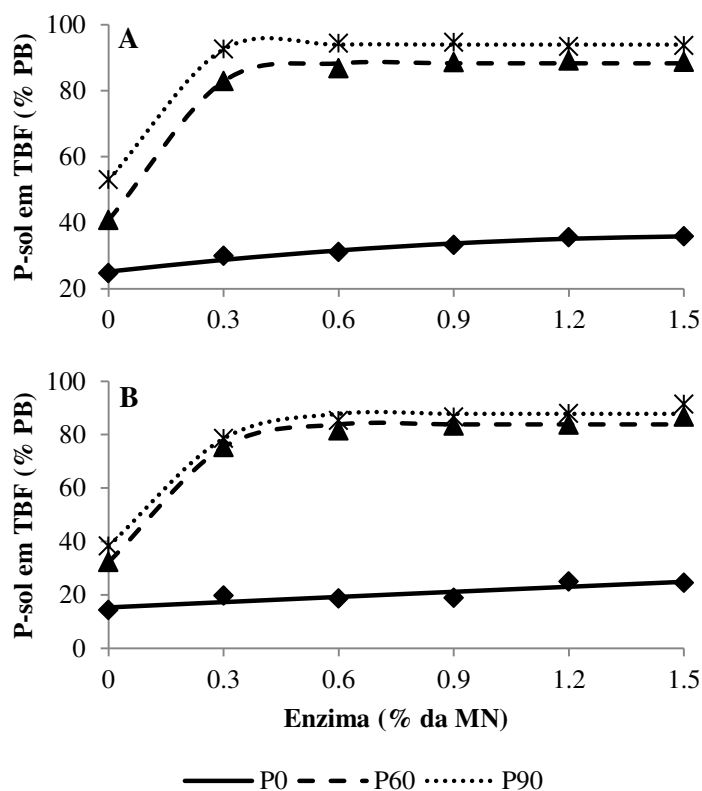


Figura 10- Concentrações de proteína solúvel (P-Sol) em tampão borato fosfato das silagens de grãos de milho (A) e sorgo (B) reidratados, não tratados e tratados com enzima em diferentes períodos de fermentação. Grãos de milho (A) P0: $Y=25,22+13,04x-3,96x^2$, se $x < 1,65$ e $Y=35,96$, se $x \geq 1,65$, $R^2=0,97$; P60: $Y=40,83+209,39x-230,95x^2$, se $x < 0,45$ e $Y=88,29$, se $x \geq 0,45$, $R^2=0,99$; P90: $Y=52,99+222,32x-301,75x^2$, se $x < 0,37$ e $Y=93,94$, se $x \geq 0,37$, $R^2=0,99$. Grão de sorgo (B) P0: $Y=6,3915x+15,36$, $R^2=0,80$; P60: $Y=33,25+204,48x-202,67x^2$, se $x < 0,50$ e $Y=83,83$, se $x \geq 0,50$, $R^2=0,99$; P90: $Y=38,29+187,27x-177,04x^2$, se $x < 0,53$ e $Y=87,81$, se $x \geq 0,53$, $R^2=0,99$.

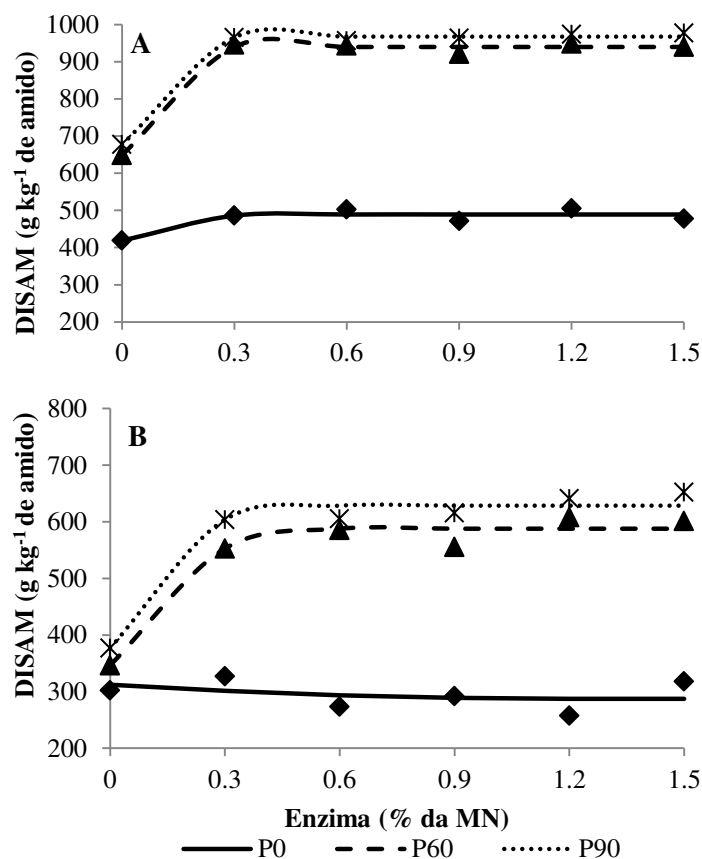


Figura 11- Digestibilidade *in situ* do amido (DISAM) das silagens de grãos de milho (A) e sorgo (B) reidratados, não tratados e tratados com enzima em diferentes períodos de fermentação. Grãos de milho (A) P0: $Y=418,53+371,14x-488,7x^2$, se $x<0,38$ e $Y=489,001$, se $x\geq0,38$, $R^2=0,83$; P60: $Y= 648,39+2003,25x-3444,9x^2$, se $x< 0,29$ e $Y=939,62$, se $x\geq0,290$, $R^2= 0,99$; P90: $Y= 676,81+1767,55x-2687,7x^2$, se $x<0,30$ e $Y= 967,424$, se $x\geq0,328$, $R^2= 0,99$. Grãos de sorgo (B) P0: $Y=312,05-40,67x+16,80x^2$, se $x<1,21$ e $Y=287,43$, se $x\geq1,21$, $R^2=0,14$; P60: $Y= 346,53+994,91x-1025,4x^2$, se $x<0,49$ e $Y=587,88$, se $x\geq0,49$, $R^2= 0,97$; P90: $Y= 376,99+1150,81x-1316,1x^2$, se $x<0,44$ e $Y= 628,57$, se $x\geq0,44$, $R^2= 0,97$.

No presente estudo as concentrações de P-sol e N-NH₃ apresentaram correlação linear positiva com a digestibilidade *in situ* do amido (DISAM) com $R^2= 0,71$ vs $0,62$ para P-sol e N-NH₃, respectivamente (Figura 12).

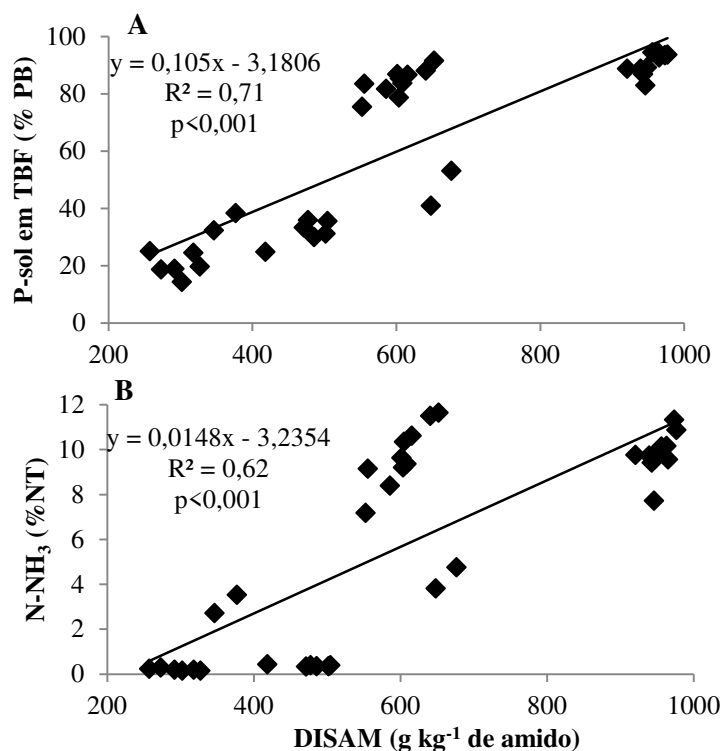


Figura 12- Correlação entre a proteína solúvel em TBF (P-sol) (A), nitrogênio amoniacal (N-NH₃) (B) e a digestibilidade *in situ* do amido (DISAM) de silagens de grãos de milho e sorgo reidratados, tratados ou não com enzima, em diferentes períodos de fermentação.

Discussão

Perfil fermentativo e população microbiana

Os nutrientes dos grãos de milho e sorgo, após reidratação, apresentaram valores próximos aos observados quando secos. No entanto, verificou-se numericamente, uma redução de 84,7 g kg⁻¹ de amido após reidratação do GS, o que não era esperado, pois não há mecanismos que justifiquem a redução na concentração do amido após o processo de reidratação de grãos (Tabela 1).

As baixas concentrações de CHO dos grãos antes da ensilagem (Tabela 1), não limitaram o crescimento das BAL (Figura 5A) e o processo de fermentação, pois os valores de pH observados nas silagens aos dias 60 e 90 de fermentação, que variaram de 3,93 a 4,02, podem ser considerados adequados para as silagens avaliadas (Figura 1). Valores de pH mais elevados (4,12 vs 4,20) foram registrados por Kung Jr. et al. (2014) em silagens de grãos de alta umidade tratados com protease exógena, aos 70 e 140 dias de fermentação, respectivamente. O pH é afetado diretamente pela concentração de ácidos orgânicos produzidos pelas BAL, sendo o AL considerado o mais efetivo na

redução do pH durante a fermentação (Kung Jr. et al., 2018). O aumento linear nas concentrações de AL ($P < 0,05$), no nosso estudo, com o aumento das doses de enzima nas silagens de GM e GS, aos 60 e 90 dias de fermentação (Figura 2A), provavelmente se deve ao fato de que a adição da protease exógena aumentou a proteólise, e, conseqüentemente, houve maior liberação de peptídeos e aminoácidos livres, que favorecem o crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico (Pahlow et al., 2003; Hoffman et al., 2011, Young et al., 2012). Ferrareto et al. (2015) em estudo com grãos de milho de alta umidade, também registraram aumento ($P < 0,001$) nas concentrações de AL das silagens com adição de protease exógena. As concentrações de AL, nos tratamentos sem adição de enzima, do nosso estudo foram semelhantes às concentrações observadas em silagens de GM reidratado aos 60 e 90 dias de fermentação (Carvalho et al., 2017) e GS reidratado aos 90 dias de fermentação (Santos et al., 2019).

As variações nas concentrações de CHO ao longo da fermentação em silagens de GM e GS nas diferentes doses de enzimas avaliadas podem ser explicadas pela redução ($P < 0,05$) na concentração de constituintes da parede celular (FDN e FDA) ao longo da fermentação (Figuras 8 e 9). Ribeiro et al. (2008) ressaltam que somente a análises de CHO no momento da ensilagem, poderá subestimar a quantidade de substratos fermentescíveis disponível, pois assim que o material é ensilado, as hemicelulases presente na massa, associado a hidrólise ácida, disponibilizam xilose e arabinose no meio, os quais são utilizados pelas BAL, o que não é quantificado quando o teor de CHO é mensurado no momento da ensilagem. Contudo, Carvalho et al. (2017) em silagens de GM reidratados reportaram que ao longo da fermentação, com o crescimento microbiano na massa ensilada, ocorre redução e estabilização da concentração de CHO.

A concentração mínima de AA de $0,79 \text{ g kg}^{-1}$ de MS estimada na dose de 0,9%, pode ser considerada adequada com base nas concentrações recomendadas para este ácido, em silagem de grão de milho de alta umidade reportadas por Kung Jr. et al. (2018). Contudo, Kung Jr. et al. (2014) e Ferrareto et al. (2015) não verificaram efeito na adição de protease em silagem de grão de milho de alta umidade ou silagem de grãos de milho reidratados, respectivamente. Entretanto, aumento na concentração de AA foi reportado em silagem de milho (Young et al., 2012).

Apesar de não haver diferença estatística nas concentrações de ETA nas doses de 0 a 0,9% de enzima, numericamente silages de GS apresentaram maiores valores, o que pode ser explicado pelas maiores ($P < 0,05$) populações de leveduras presentes

nessas silagens aos 60 e 90 dias de fermentação nas diferentes doses de enzimas avaliadas (Figura 5B). As leveduras são os principais micro-organismos responsáveis pela produção de etanol durante a fermentação (Pahlow et al., 2003). É importante destacar, que independente da dose e do período de fermentação, ambas as silagens apresentaram concentrações de ETA dentro daquela faixa (2-20 g kg⁻¹ de MS) proposta por Kung Jr. et al. (2018) para silagens de grãos de milho de alta umidade. No nosso estudo, as concentrações de ETA em silagem de GS reidratado, sem adição de enzima, foram semelhantes aos valores observados por Santos et al. (2019a) e superiores aos de silagem GM reidratado, tratado ou não com enzima após 30 dias de ensilagem, reportados por Ferrareto et al. (2015).

A não detecção de enterobactérias aos 60 e 90 dias fermentação, provavelmente se deve ao pH da massa ensilada, uma vez que esse grupo microbiano é sensível ao baixo pH conforme sugeriram Pahlow et al. (2003).

Durante a ensilagem, os mofos se desenvolvem no início do processo quando ainda há oxigênio remanescente no interior do silo. Contudo, no decorrer da fermentação a ausência de oxigênio associado à presença de ácidos orgânicos inibem o crescimento desses micro-organismos (Woolford, 1984; McDonald et al., 1991) conforme observado no presente estudo. Isto sugere a efetividade das BAL epifíticas no processo de fermentação, que produzem ácidos orgânicos responsáveis pela redução do pH (Kung Jr. et al., 2018) e controle de micro-organismos indesejáveis durante a fermentação, a exemplo de enterobactérias e mofo.

Quando forragem e grãos são ensilados, naturalmente, as proteínas são degradadas em peptídeos e aminoácidos livres e a desaminação de aminoácidos pode levar ao aumento de N-NH₃ na massa ensilada devido à ação de enzimas microbianas e vegetais (Rooke e Hatfield, 2003, Junges et al., 2017). Isto pode explicar o aumento de aproximadamente 8,88 e 11,05 vezes nas concentrações de N-NH₃ em silagem de GM (Figura 4A); e 19,43 e 25,14 vezes em silagem de GS (Figura 4B) aos 60 e 90 dias fermentação, respectivamente. Kung Jr. et al. (2014) sugeriram a inclusão de protease exógena na ensilagem de grão de milho de alta umidade, para aumentar a proteólise, o que anteriormente era visto como indesejável no processo de fermentação (Young et al., 2012). Os aumentos substanciais nas concentrações de N-NH₃ nas silagens de GM (Figura 4A) e GS (Figura 4B) confirmam a efetividade da protease exógena utilizada no presente estudo na degradação das prolaminas que envolvem os grânulos de amido, tornando o amido mais digestível pelos micro-organismos ruminais (Hoffman et al.,

2011). Resultados semelhantes foram observados por Young et al. (2012) em silagem de planta inteira de milho e Kung Jr. et al. (2014) em silagem de grão de alta umidade tratados com protease exógena. Desde modo, as concentrações de N-NH₃ é um parâmetro indicativo de proteólise, que permite inferir uma possível melhoria na digestibilidade do amido, pois apresenta correlação linear positiva com a digestibilidade conforme observado anteriormente (Kung Jr. et al., 2014; Ferrareto et al., 2014) e confirmado no presente estudo (Figura 12B).

Composição química e digestibilidade *in situ* do amido

O processo de reidratação dos GM e GS apresentaram valores de MS próximos ao previamente desejado, 65% (Tabela 1). No entanto, após a aplicação da enzima, período 0, verificou-se teores de MS numericamente inferiores ao previsto, cuja razão não se conhece, uma vez que foi considerado previamente a quantidade de água (50 ml) utilizada para diluição da enzima. O menor conteúdo de MS aos 90 dias de fermentação comparado aos 60 dias, exceto na dose 0,3% da enzima (Figura 6), provavelmente se deve a atividade microbiana durante o processo de fermentação, que naturalmente promovem reduções nos teores de MS com o avançar do tempo de ensilagem como verificado por Carvalho et al. (2017) e Da Silva et al. (2018) em silagens de GM reidratados e Santos et al. (2019) em silagem de GS reidratados.

Embora o tratamento com protease exógena não tenha afetado a concentração de PB das silagens de GM e GS reidratados, as concentrações de P-Sol foram numericamente superiores aos 60 e 90 dias de fermentação comparado ao período 0 (zero) em todas as doses de enzimas (Figura 10). A quantidade de PB solubilizada, observada no nosso estudo indica que ocorre naturalmente atividade proteolítica em GM e GS durante a fermentação, conforme reportado por Hoffman et al. (2011) e Junges et al. (2017). No entanto, essa atividade é aumentada com adição da protease exógena (Figura 10), conforme observado por Kung Jr. et al. (2014) em silagem de grão de milho de alta umidade e Ferrareto et al. (2015) em silagens de GM reidratados. Portanto, com base nos resultados do nosso estudo pode-se inferir que P-Sol é um parâmetro indicativo de atividade proteolítica, pois proporciona melhoria na digestibilidade do amido, apresentando correlação linear positiva com a digestibilidade (Figura 12A).

Um achado interessante no nosso estudo foi à redução das concentrações de FDN e FDA aos 60 e 90 dias de fermentação comparado ao período 0 (zero) com o

aumento das doses da enzima em silagens de ambos grãos (Figuras 8 e 9). Uma possível explicação para essa redução seria a solubilização de componentes da parede celular pela atividade de enzimas ácido tolerantes presente nos grãos ensilados (Der Bedrosian et al., 2012). Young et al. (2012) também observaram reduções nas concentrações de FDN e FDA em silagem de planta inteira de milho tratadas com protease, em função do tempo de armazenamento. As proteases podem remover proteínas estruturais na parede celular vegetal, resultando no acesso mais rápido a celulose e hemicelulose pelos microrganismos ruminais (Colombatto e Beauchemin, 2009), o que provavelmente, também contribui para o aumento nas concentrações de P-Sol das silagens tratadas em nosso estudo. Estes autores observaram que a adição de protease na ração antes do fornecimento aos animais proporcionou melhoria na digestibilidade da FDN.

As proteínas que envolvem os grânulos de amido nos grãos representam uma barreira físico-química aos micro-organismos amilolíticos do rúmen, o que limita a digestão do amido (Hoffman et al., 2011). Os dados apresentados em estudos anteriores (Hoffman et al., 2011, Kung Jr. et al., 2014, Ferrareto et al., 2018) e no presente estudo apoiam a sugestão de Kung Jr. et al. (2014) que destacaram a proteólise como o principal mecanismo para aumentar a digestão do amido ruminal em silagens com fonte de amido, pois durante o a fermentação ocorre solubilização da matriz protéica, o que aumenta a superfície de contato para a ação dos micro-organismos ruminais. Windle et al. (2014) e Ferrareto et al. (2015) relataram que a adição de proteases exógenas em plantas de milho e GM reidratados durante a ensilagem, aceleraram o processo proteolítico durante a fermentação, resultando em um rápido aumento na degradação *in vitro* do amido com tempo de ensilagem, respectivamente. Independente do período de fermentação, com base no modelo quadrático de reposta platô, a dose de 0,3% de enzima proporcionou máxima digestibilidade do amido da silagem de GM, enquanto que para a silagem de GS a digestibilidade do amido atingiu valor máximo nas doses de 0,5 e 0,44%, quando armazenadas por 60 e 90 dias, respectivamente (Figura 11). Essa maior dose para silagem GS, provavelmente se justifica pelo fato do grão de sorgo apresentar no endosperma periférico maior proporção de proteínas comparado ao grão de milho, o que ocasiona maior resistência a penetração de água, tornando-o mais resistente à degradação enzimática (Rooney e Pflugfelder, 1986), proporcionando assim menor P-Sol comparado ao GM, tanto antes quanto após a fermentação.

Vale ressaltar, que a estabilidade das enzimas e a sua capacidade de interagir adequadamente com o substrato alvo é um fator que pode proporcionar respostas

inconsistentes quando se utiliza esse aditivo na ensilagem. Cada enzima possui uma faixa ótima de temperatura e pH, atuando com mais eficiência quando a condição encontra-se próximo ao ideal (Lehninger et al., 1993, Adesogan, 2014; Muck et al., 2018). Diante disso, as respostas obtidas com a utilização da enzima em silagens de GM e GS, nas condições do presente, apoiam nossa hipótese, que a adição da protease proporciona aumento na digestibilidade do amido.

Conclusão

A adição de 0,3% de protease exógena no momento da ensilagem de GM e 0,5% em GS reidratados favoreceu a atividade proteolítica durante a fermentação e proporcionou aumento da digestibilidade *in situ* do amido em menor tempo de armazenamento. Uma implicação prática, é que apesar do sorgo ser uma opção interessante frente ao milho, considerando seu menor preço histórico de comercialização, o sorgo requer uma dose de 66,6% superior aquela do milho para maximização da digestibilidade do amido, aos sessenta dias de fermentação, fato este que deve ser levado em consideração no momento da escolha do tipo de grãos a ser reidratado e ensilado. Contudo, destaca-se, que as silagens de GM apresentaram valores de DISAM superiores à silagem de GS, indicando a necessidade da realização de estudos para avaliar o desempenho de ruminantes alimentados com essas silagens, e o custo benefício da adição de protease exógena, no momento da ensilagem.

Literatura citada

- Association of Official Analytical Chemists. In: Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Methods Inc., Arlington, VA, USA770, 15th ed, 1990.
- Benton, J.R., Klopfenstein, T., Erickson, G.E., 2005. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. Nebraska Beef Cattle Reports: 31-33. University of Nebraska, Lincoln.
- Carvalho, B.F., Ávila, C.L.S., Bernardes, T.F., Pereira, M.N., Santos, C., Schwan, R.F., 2017. Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of rehydrated corn kernel silage. J. Appl. Microbiol. 122, 589-600.
- Colombatto, D., Beauchemin, K.A., 2009. A protease additive increases fermentation of alfalfa diets by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. J. Anim. Sci. 87, 1097-1105.
- Da Silva, N.C., Nascimento, C.F., Nascimento, F.A., de Resende, F.D, Daniel, J.L.P., Siqueira, G.R., 2018. Fermentation and aerobic stability of rehydrated corn grain silage treated with different doses of *Lactobacillus buchneri* or a combination of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*. J. Dairy Sci. 101, 4158-4167.

- Der Bedrosian, M.C., Nestor, K.E., Kung, L. Jr.. 2012. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. *J. Dairy Sci.* 95,5115-5126.
- Ferrareto, L.F., Fredin, S.M., Shaver, R.D., 2015. Influence of ensiling, exogenous protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 98, 7318-7327.
- Ferrareto, L.F., Silva Filho, W.I., Fernandes, T., Kim, D.H., Sultana, H., 2018. Effect of ensiling time on fermentation profile and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated corn with or without varied concentrations of wet brewers grains. *J. Dairy Sci.* 101, 4643-4649.
- Ferraretto, L.F., Taysom, K., Taysom, D., Shaver, R.D., Hoffman, P.C., 2014. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples. *J. Dairy Sci.* 97, 3221-3227.
- Hall, M.B., 2015. Determination of dietary starch in animal feeds and pet food by an enzymatic-colorimetric method: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 98, 397-409, 2015.
- Hoffman, P.C., Esser, N.M., Shaver, R.D., Coblenz, W.K., Scott, M.P., Bodnar, A.L., Schmidt, R.J., Charley, C.R., 2011. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch protein matrix in high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 94, 2465-2474.
- 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. *J. Dairy Sci.* 100, 9048-9051.
- Kung, L.Jr., Shaver, R., Grant, R.J., Schmidt, R.J., 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 101, 4020-4033.
- Kung, L.Jr., Windle, M.C., Walker, N., 2014. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high moisture corn. *J. Dairy Sci.* 97, 1707-1712.
- Licitra, G, Hernandez, T.M., Van Soest, P.J., 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 57, 347-358.
- McDonald, P., Henderson, A.R., Heron, S.J.E., 1991. *The biochemistry of silage.* 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, UK.
- Mclaren, R.J., Matsushima, K., 1968. Digestion of ensiled reconstituted corn. *J. Dairy Sci.* 27, 1171-1968.
- Mertens, D.R., 2002. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 85, 1217-1240.
- Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Biochemistry*, New York, 153, 375-380.
- Okuda, H., Fujii, S., Kawashima, Y., 1965. A direct colorimetric determination of blood ammonia. *Tokushima J. Exp. Med.* 12, 11-23.
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H., Spoelstra, S.F., 2003. Microbiology of ensiling. In: Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H. (eds) *Silage science and technology*, 31-93. Madison, WI, USA: Agronomy Publication N°. 42, American Society of Agronomy.

- Ribeiro, J.L., Nussio, L.G., Mourão, G.B., Mari, L.J., Zopollato, M. Paziani, S.F., 2008. Valor nutritivo de silagens de capim-marandu submetidas aos efeitos de umidade, inoculação bacteriana e estação do ano. R. Bras. Zootec. 37, 1176-1184.
- Rooke, J.A., Hatfield, R.D., 2003. Biochemistry of ensiling. Silage Science and Technology. 42nd ed. Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H. ed. Am. Soc. Agron., Madison, WI, 95-139.
- Santos, W.P., Salvati, G.G.S., Arthur, B.A.V., Daniel, J.L.P., Nussio, L.G., 2019a. Short communication: The effect of sodium benzoate on the nutritive value of rehydrated sorghum grain silage for dairy cows. Anim. Feed Sci. Technol. 256, 1-6.
- Santos, W.P., Salvati, G.G.S., Silveira, J.M., Salvo, P.A.R., Arthur, B.A.V., Gritti, C.V., Oliveira, K.S., Ferraz, Jr., M.V., Daniel, J.L.P., Nussio, L.G., 2019. The effect of length of storage and sodium benzoate on the nutritive value of reconstituted sorghum grain silages for dairy cows. J. Dairy Sci. 102, 9028-9038.
- SAS. Institute Inc. 2013. Versão 9.4. Procedures Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Siegfried, V.R., Ruckemann, H., Stumpf, G., 1984. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. Landwirtsch. Forsch. 37, 298-304.
- Windle, M.C., Walker, N., Kung, L.Jr., 2014. Effects of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of corn silage harvested at different dry matter contents and ensiled for various lengths of time. J. Dairy Sci. 97, 3053-3060.
- Woolford, M.K., 1984. The silage fermentation. New York: Marcel Dekker, 350p.
- Young, K. M., Lim, J.M., Der Bedrosian, M.C., Kung, L. Jr., 2012. Effect of exogenous protease enzymes on the fermentation and nutritive value of corn silage. J. Dairy Sci. 95, 6687-6694.

Conclusões gerais

O *L. buchneri* foi à espécie epifítica predominante em silagens de sorgo aos 45 e 90 dias de fermentação. A inoculação com o *L. buchneri* resultou em silagens com maior conteúdo de ácido acético e menores populações de leveduras a partir dos 14 dias de fermentação, o que pode resultar em silagem com maior estabilidade aeróbia. A inoculação proporciona maior DIVMS, aos 90 dias de fermentação. As cepas autóctones LB.1 e LB.4 apresentam potencial para serem utilizados como inoculantes para produção de silagem com efeitos na fermentação aos 45 dias de armazenamento.

A adição de 0,3% de protease exógena no momento da ensilagem de GM e 0,5% em GS reidratados favoreceu a atividade proteolítica durante a fermentação e proporcionou aumento da digestibilidade *in situ* do amido em menor tempo de fermentação.