

THIAGO NEVES TEIXEIRA

**USO DE *Lentilactobacillus buchneri* E ENZIMAS FIBROLÍTICAS EM SILAGEM
DE SORGO**

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

Orientador: Odilon Gomes Pereira

Coorientadora: Karina Guimarães Ribeiro

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

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

T

T266u
2023
Teixeira, Thiago Neves, 1996-
Uso de *Lentilactobacillus buchneri* e enzimas em silagem
de sorgo / Thiago Neves Teixeira. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (31 f.): il.

Orientador: Odilon Gomes Pereira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Zootecnia, 2023.
Referências bibliográficas: f. 26-31.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.726>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Sorgo - Silagem. 2. Ativação enzimática. 3. Inoculantes
microbianos. I. Pereira, Odilon Gomes, 1960-. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 633.1746


THIAGO NEVES TEIXEIRA

USO DE *Lentilactobacillus buchneri* E ENZIMAS FIBROLÍTICAS EM SILAGEM DE SORGO


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

APROVADA: 12 de maio de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 THIAGO NEVES TEIXEIRA
Data: 26/11/2023 14:39:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Thiago Neves Teixeira
Autor

Documento assinado digitalmente
 ODILON GOMES PEREIRA
Data: 19/12/2023 10:27:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Odilon Gomes Pereira
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Cesar e Simone, pelos valores transmitidos, pelo amor e por todo apoio prestado.

A minha esposa, Ana Caroline, por sempre estar ao meu lado tornando os meus dias leves, pelo auxílio nas decisões importantes e por me ajudar a transpor os desafios pessoais e profissionais.

A todos os meus familiares que sempre torceram por mim e me apoiaram.

Ao professor Dr. Odilon Gomes Pereira pela oportunidade, orientação e pelos ensinamentos transmitidos.

A professora Dr. Karina Guimarães Ribeiro, pela coorientação, por aceitar participar da minha banca e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao professor Dr. João Paulo Sampaio Rigueira e à Dra. Vanessa Paula da Silva por terem aceitado o convite de participar da banca.

A todas as pessoas envolvidas com o Laboratório de Forragicultura da UFV, por toda ajuda na condução deste trabalho e pela amizade.

Aos funcionários do departamento de Zootecnia da UFV, pelo suporte prestado.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por conceder a minha bolsa de estudos.

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

Ao INCT-CA pelo apoio.

RESUMO

TEIXEIRA, Thiago Neves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2023. **Uso de *Lentilactobacillus buchneri* e enzimas fibrolíticas na silagem de sorgo.** Orientador: Odilon Gomes Pereira. Coorientadora: Karina Guimarães Ribeiro.

Objetivou-se avaliar os efeitos da inoculação com *Lentilactobacillus buchneri* associada à aplicação de enzimas fibrolíticas sobre o perfil fermentativo, composição química, perdas, estabilidade aeróbia e digestibilidade *in-vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra insolúvel em detergente neutro (DIVFDN) de silagem de sorgo, em dois cortes distintos. O experimento foi conduzido em um esquema fatorial 2x4 (dois cortes e quatro aditivos), em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os aditivos avaliados foram: Controle (sem inoculante e sem enzimas); Enzimas fibrolíticas; Inoculante microbiano comercial; e Combo (enzimas + inoculante). O inoculante usado foi o Lalsil AS, que possui em sua composição a cepa *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323. O aditivo enzimático foi constituído de um complexo enzimático à base de Celulase, β -glucanase e Xilanase. Os silos foram abertos após 90 dias de fermentação. Foi observado efeito da interação Corte x aditivo (CxA) ($P \leq 0,05$) sobre os teores de MS, MM, PB, CHOs, pH, BAL e RMS. Independente do aditivo usado, observou-se menor teor de PB e BAL no segundo corte, comparado ao primeiro. Em ambos os cortes as silagens que receberam inoculante e combo apresentaram maior população de BAL. As silagens apresentaram menor população de leveduras no corte 1, comparado ao 2 ($4,01 \times 4,47 \log$ UFC/g). Comportamento semelhante foi observado para a concentração de amônia ($5,66 \times 8,46$ % NT). Os teores de FDNcp, FDAcp e lignina foram superiores nas silagens produzidas no primeiro corte. A hemicelulose não foi afetada ($P > 0,05$) pelos fatores em estudo, nem pela interação destes, apresentando valor médio de 28,52%. No primeiro corte foi registrado maior estabilidade aeróbia na silagem tratada com inoculante em relação ao controle, enquanto no segundo corte, as silagens tratadas com inoculante e combo apresentaram maior estabilidade aeróbia em relação às silagens controle e tratadas com enzimas. Conclui-se, que o uso de *Lentilactobacillus buchneri* na ensilagem de sorgo melhorou a estabilidade aeróbia da silagem. No entanto, o complexo enzimático exclusivo ou associado com inoculante não promoveu melhorias na DIVMS e DIVFDN.

Palavras-chave: Aditivos enzimáticos, inoculantes microbianos, conservação.

ABSTRACT

Teixeira, Thiago Neves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2023. **Use of *Lentilactobacillus buchneri* and fibrolytic enzymes in sorghum silages.** Adviser: Odilon Gomes Pereira. Co-Adviser: Karina Guimarães Ribeiro.

This study aimed to evaluate the effects of inoculation with *Lentilactobacillus buchneri* associated with fibrolytic enzymes addition on fermentative profile, chemical composition, losses, aerobic stability and *in-vitro* dry matter (IVDMD) and neutral detergent fiber (IVNDFD) digestibility of sorghum silage, in two different cuts. The study was conducted in a 2×4 factorial scheme of treatments (two cuts and four additives), according to the completely randomized design, with five replicates. The additives were: Control (no inoculant and enzymes); Fibrolytic enzymes; Commercial inoculant and Combo (enzymes + inoculant). The inoculant used was Lalsil AS, which contains the *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323 strain. The enzymes were constituted of an enzymatic complex based on Cellulase, β-glucanase and Xylanase. Experimental silos were opened after 90 days of fermentation. The effect of Cut × Additive Interaction (C×A) ($P \leq 0.05$) was observed on DM, MM, CP, WSC, pH, LAB and DMR. Regardless of the additive used, a lower CP and LAB content was observed in the second cut, compared to the first. In both cuts, silages that received inoculant and combo had a higher population of LAB. Silages of the cut 1 showed a lower population of yeasts compared to the cut 2 ($4.01 \times 4.47 \log \text{CFU/g}$). A similar behavior was observed for ammonia concentration ($5.66 \times 8.46 \text{ \% TN}$). Contents of NDFap, ADFap and lignin were higher in silages produced in the first cut. Hemicellulose was not affected by factors under study, nor by their interaction, with a average value of 28.52%. In de first cut, greater aerobic stability was registered in the silage treated with inoculant compared to the control, while in the second cut, silages treated with inoculant and combo presented greater aerobic stability in relation to the control and enzyme silage. Thus, it is concluded that *Lentilactobacillus buchneri* inoculation increased the aerobic stability of sorghum silage. However, the exclusive enzymatic complex or its association with the inoculant did not promote improvements in IVDMD and IVNDFD.

Keywords: Enzymatic additives, microbial inoculant, preservation.

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO.....	7
2.	MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1.	Local do experimento	9
2.2.	Delineamento experimental.....	10
2.3.	Cultivo, e colheita do sorgo volumax.....	10
2.4.	Ensilagem e abertura dos silos	11
2.5.	Perda de matéria seca total e recuperação de matéria seca	11
2.6.	Perfil fermentativo e microbiologia	12
2.7.	Estabilidade Aeróbia	13
2.8.	Análises químicas e bromatológicas e digestibilidade <i>in vitro</i>	13
3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	15
4.	RESULTADOS	15
4.1.	Composição da forragem antes da ensilagem	15
4.2.	Composição químico-bromatológica, perfil fermentativo e populações microbianas das silagens.....	16
4.3.	Estabilidade aeróbia.....	20
5.	DISCUSSÃO.....	23
6.	CONCLUSÕES.....	26
7.	REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a estacionalidade de produção forrageira pressiona os pecuaristas a buscarem estratégias de conservação de forragens para o período seco. A ensilagem é a principal estratégia de conservação de forragens em todo o mundo, cuja técnica vem sendo praticada a pelo menos 3000 anos (MCDONALD et al. 1991; WILKINSON et al., 2003). Diversos alimentos podem ser ensilados, no entanto para garantir a produção de uma silagem de qualidade, o material deve apresentar adequado teor de carboidratos solúveis em água (CHOs), baixo poder tampão e adequado teor de matéria seca (MS) (MUCK et al., 2020). O milho (*Zea mays*), tem sido a principal forrageira destinada à ensilagem no Brasil e no mundo (DANIEL et al., 2019), mas em regiões com escassez hídrica o custo da irrigação pode inviabilizar o seu cultivo.

A cultura do sorgo destaca-se como boa opção para regiões que apresentam pluviosidade insuficiente para o cultivo do milho, ou como lavoura de segunda safra “safrinha”, uma vez que apresenta alta produção de forragem com um consumo de água inferior (EMILE et al., 2006). Após a colheita, em condições adequadas de umidade, temperatura e fertilidade do solo, a planta de sorgo apresenta a capacidade de rebrotar, proporcionando um segundo corte, sem a necessidade de replantio. Além disso, o custo de produção da silagem de sorgo (SS) é inferior ao da silagem de milho, uma vez que esta requer menor investimento em sementes, fertilizantes e irrigação (MCCORKLE et al., 2007).

Quando colhido no momento adequado, o sorgo apresenta características ideais para uma boa fermentação, possibilitando a produção de silagens de excelente qualidade, entretanto tendem a ser aerobiamente instáveis após a abertura do silo (WILKINSON & DAVIES, 2012). A reduzida estabilidade aeróbia da SS se deve principalmente à sua rota fermentativa predominantemente homolática (produção predominante de ácido láctico), devido a alta concentração de CHOs, reduzindo a produção de ácido acético e propiônico, que possuem ação antifúngica mais eficiente do que o ácido láctico (MOON, 1983; WORFOOLD, 1990; WILKINSON & DAVIES, 2012).

A abertura do silo e a perda das condições de anaerobiose, promovem alterações na população microbiana da silagem, ocorrendo inicialmente a proliferação de leveduras, sucedida pelo aparecimento de fungos filamentosos e bactérias aeróbias (BRÜNING, et al., 2018). Alguns gêneros de leveduras que se desenvolvem

em meio ácido possuem a capacidade de utilizar CHOs residuais e ácido láctico como fontes de carbono para o seu metabolismo, promovendo o aumento do pH do meio, criando condições favoráveis ao surgimento de fungos filamentosos e outros microrganismos deteriorantes, aumentando a temperatura do meio, culminando na quebra da estabilidade aeróbia (KUNG et al., 2018). A deterioração aeróbia da silagem promove perda de MS, diminuição da qualidade nutricional e sanitária, redução da aceitabilidade e do desempenho dos animais (AUERBACH & NADEAU, 2020; BORREANI et al., 2018; PAHLOW et al., 2003)

Visando diminuir as perdas após a abertura do silo, pode-se realizar a inoculação da forragem com a bactéria do ácido láctico (BAL) heterofermentativa *Lentilactobacillus buchneri* (DRIEHUIS et al., 1999; KLEINSCHMIT & KUNG, 2006; MUCK et al., 2018; ARRIOLA et al., 2021; KUNG et al., 2021), que é capaz de converter os CHOs a ácido láctico, acético e etanol (HEINL et al., 2012), além de degradar o ácido láctico em ácido acético e 1,2-propanodiol e traços de etanol na ausência de oxigênio (OUDE ELFERINK et al., 2001). O ácido acético apresenta características antifúngicas inibindo a proliferação de leveduras e fungos filamentosos, melhorando assim a estabilidade aeróbia da silagem e preservando sua qualidade nutricional (DANNER et al., 2003). Além disso, melhora a qualidade sanitária devido à criação de condições desfavoráveis para a proliferação de microrganismos patogênicos e produção de micotoxinas.

Outra estratégia que pode ser utilizada com o intuito de promover melhorias na fermentação e na qualidade nutricional da silagem é a adição de enzimas fibrolíticas durante a ensilagem (MUCK et al., 2018). Essas enzimas degradam componentes da parede celular em açúcares de cadeia menor, disponibilizando dessa forma substrato fermentescível às bactérias produtoras de ácidos orgânicos (MCDONALD et al., 1991; MUCK et al., 2020). Além disso, podem diminuir os teores de FDN e FDA das silagens (KHOTA et al., 2016), possibilitando aumento da eficiência alimentar (ZAHIRODDINI et al., 2004).

O sorgo apresenta algumas desvantagens nutricionais em relação ao milho, como maior teor de FDN, que resulta em menor digestibilidade da matéria seca (MS) e limitação do consumo, afetando negativamente o desempenho animal (AYDIN et al., 1999; BOLSEN et al., 2003). Portanto, a aplicação de enzimas que degradam componentes da parede celular pode promover melhorias na digestibilidade da silagem de sorgo, além de disponibilizar substratos para o processo fermentativo.

Dessa forma, hipotetizamos que a inoculação com *Lentilactobacillus buchneri* associada à aplicação de enzimas fibrolíticas aumenta a estabilidade aeróbia e a digestibilidade de silagem de sorgo. Portanto, objetivou-se avaliar o efeito da inoculação com *Lentilactobacillus buchneri* associada à aplicação de enzimas fibrolíticas sobre o perfil fermentativo, composição química, perdas, estabilidade aeróbia e valor nutritivo de silagens de sorgo forrageiro Volumax colhido em dois cortes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido em área da UEPE-Forrageicultura e no Laboratório de Forrageicultura e Microbiologia da Silagem do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil. A cidade de viçosa está localizada na latitude Sul de 20°45' e longitude Oeste de 42° 51', com altitude média de 657 m. O clima é classificado como Cwa, segundo a classificação de KÖPPEN, com precipitação média anual de 1251 mm (CLIMATE, 2022).

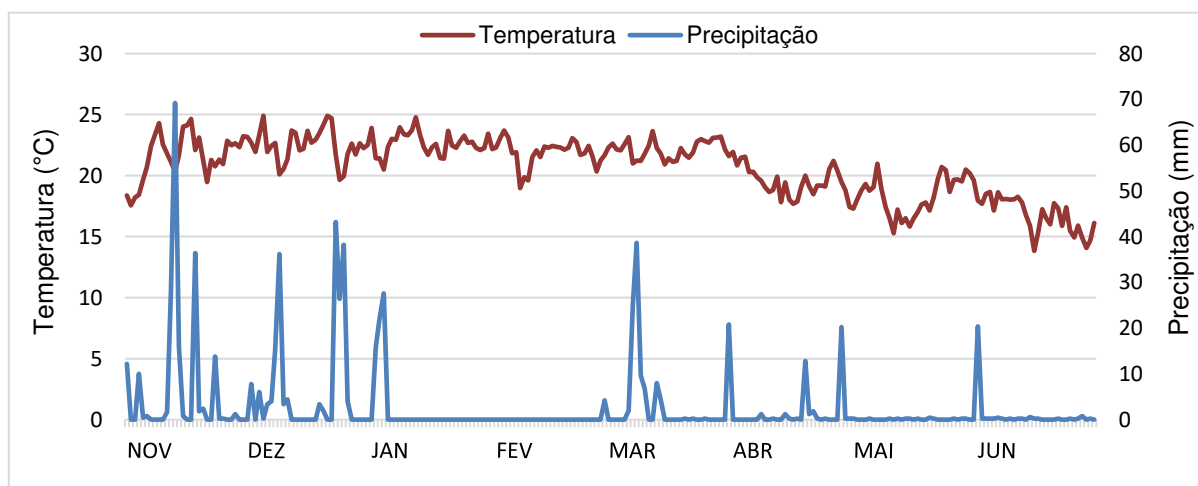


Figura 1 - Precipitação pluvial e temperaturas médias durante o período de cultivo do sorgo (INMet, 2022).

2.2 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em um esquema fatorial 2×4 (primeiro e segundo corte) x [sem aditivos (CONTROLE); com enzimas (ENZIMAS); com inoculante (INOCULANTE); com inoculante e enzimas (COMBO)], no delineamento experimental inteiramente casualizado, com oito tratamentos e cinco repetições.

2.3 Cultivo, e colheita do sorgo volumax

O sorgo volumax (Agroceres®, Santa Cruz das Palmeiras-SP, Brasil) foi cultivado em uma área de aproximadamente 800 m², em solo de textura argilosa, no setor de Agrostologia da UFV. Antes do plantio, realizou-se uma amostragem do solo (camada de 0-20 cm de profundidade) com uso de trado do tipo sonda para a realização da análise de solo (Tabela 1).

Tabela 1. Atributos químicos do solo da área experimental

pH	P	K ⁺	H ⁺ +Al ³⁺	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SB	t	T	V	P-rem
H ₂ O	mg/dm ³		-----cmol _c /dm ³ -----							%	mg/L
5,4	2,2	123	4,29	0,1	1,94	0,79	3,04	3,14	7,33	41,5	26,1

pH, Potencial hidrogeniônico; P, Fósforo; K⁺, Potássio; H⁺+Al³⁺, Acidez potencial; Al³⁺, Alumínio; Ca²⁺, Cálcio; Mg²⁺, Magnésio; SB, Soma de bases; t, Capacidade de troca catiônica efetiva; T, Capacidade de troca catiônica a pH 7,0. V, Índice de Saturação de bases; P-rem, Fósforo remanescente.

A calagem e a adubação foram calculadas a partir dos resultados da análise de solo visando atender as exigências da cultura descritas no Manual de cultivo agrícola (5ª Aproximação) para o estado de Minas Gerais, Brasil (Ribeiro et al., 1999). O solo foi corrigido com 1,8 t/ha de calcário dolomítico (75% PRNT) (Minasol®, Arcos-MG, Brasil). O plantio foi realizado em um espaçamento de 0,7 m entre linhas, colocando-se 11 sementes por metro linear, com objetivo de formar um estande aproximado de 125 mil plantas/ha. No plantio, foram aplicados 285 kg/ha do adubo 08:28:16 no sulco de plantio, e 100 kg de N na forma de ureia em cobertura 20 dias após a semeadura.

A colheita foi realizada de forma manual, a 10 cm do nível do solo, após 89 dias de cultivo para o 1º Corte e 88 dias de rebrota para o 2º Corte, com auxílio de facão. Posteriormente, o material foi triturado, em partículas entre 1 e 2 cm em máquina forrageira estacionária (JF-60, JF-Máquinas®, Itapira-SP, Brasil) acoplada na tomada de potência do trator (Valtra, Valmet 785®, Mogi das Cruzes-SP, Brasil).

2.4 Ensilagem e abertura dos silos

O material triturado foi dividido em pilhas individuais de 10kg para a aplicação do inoculante e das enzimas de acordo com os tratamentos, simultaneamente, por ordem de repetição. O inoculante contendo *Lentilactobacillus buchneri* CNCM I-4323 (Lalsil AS, Lallemand Animal Nutrition®, Brasil) foi diluído em 100 ml de água destilada e pulverizado sobre a forragem, respeitando-se a recomendação do fabricante de 1 grama por tonelada de forragem (taxa de aplicação 1×10^5 ufc/g de forragem). O mesmo volume de água foi aplicado no tratamento controle.

As enzimas fibrolíticas celulase, β -glucanase e xilanase (SMIZYME MULTI-Enzyme for Ruminants) foram distribuídas sobre a forragem e homogeneizadas manualmente, respeitando a recomendação do fabricante de 200g por tonelada de forragem.

O material tratado foi ensilado em baldes plásticos de 12 L de capacidade, previamente pesados (peso vazio). A compactação foi realizada manualmente, empregando-se uma densidade mínima de 550 kg MN/m³. Os baldes foram vedados com as suas respectivas tampas e tiveram a vedação reforçada com fita adesiva. Posteriormente, os baldes foram pesados (peso cheio inicial) e armazenados em temperatura ambiente, em local protegido de raios solares até o momento da abertura.

Após 90 dias de fermentação, os baldes foram pesados novamente (peso cheio final) e abertos. O material foi homogeneizado e foram coletadas amostras de 200g de cada balde para a realização da pré-secagem em estufa de circulação forçada de ar a 55°C por 72 horas ou até atingir peso constante. As amostras secas ao ar (ASA) foram moídas em moinho de facas tipo “Willey” (RTE-650/1, Tecnal®, Piracicaba-SP, Brasil) com peneira de crivos de 1 mm para a realização das análises químico-bromatológicas.

2.5 Perda de matéria seca total e recuperação de matéria seca

As perdas de MS no armazenamento após 90 dias de fermentação foram expressas como perda total de matéria seca (PMS). Os dados foram calculados por diferença entre o peso inicial e final em matéria seca (MS) dos silos, relativo à quantidade de material ensilado, de acordo com a equação descrita por Jobim (2007).

$$\text{PMS (\%MS)} = \left[\frac{(\text{MSi} - \text{MSf})}{\text{MSi}} \right] \times 100$$

PMS = Perda total de MS;

MSi = Quantidade de matéria seca inicial. Peso do silo após o enchimento – peso do balde com a tampa, sem forragem (tara seca) x teor de MS da forragem na ensilagem;

MSf= Quantidade de MS final. Peso do silo cheio antes da abertura – peso do balde com a tampa, sem a silagem, após a abertura do silo (tara úmida) x teor de MS da silagem no momento da abertura.

$$\text{RMS (\%MS)} = \left[\frac{(\text{MFab} \times \text{MSab})}{(\text{MFfe} \times \text{MSfe})} \right] \times 100$$

RMS = índice de recuperação de matéria seca;

MFab = massa de forragem na abertura;

MSab = teor de matéria seca na abertura;

MFfe = massa de forragem no fechamento;

MSfe = teor de matéria seca da forragem no fechamento.

2.6 Perfil fermentativo e microbiologia

As análises referentes ao perfil fermentativo e à contagem das populações microbianas foram realizadas na forragem *in natura* e nas silagens. Para isso, foi obtido um extrato aquoso a partir de 25g de amostra homogeneizada em 225 ml de solução estéril (Ring Solution®, Oxoid Reino Unido) por 1 min em liquidificador industrial. O extrato aquoso obtido foi filtrado em camada dupla de gaze estéril e, imediatamente após, foi mensurado o pH com o auxílio de um potenciômetro digital (W38/Tecnal®, São Paulo, -SP, Brasil).

Uma alíquota de 10 mL do extrato aquoso foi acondicionada em tubos contendo 1 mL de ácido sulfúrico 1:1 (v/v), que foram congeladas em freezer a -20°C para as análises de ácidos orgânicos (Siegfried et al., 1984), carboidratos solúveis (Nelson, 1944) e nitrogênio amoniacal (N-NH₃) (Okuda et al., 1965).

Uma segunda alíquota do extrato aquoso foi submetida a diluições seriadas variando de 10⁻¹ a 10⁻⁷ para quantificação da população microbiana. O plaqueamento foi realizado pela técnica *pour plate* em placas de Petri estéreis. A população de bactérias do ácido láctico (BAL) foi determinada em meio De Man, Rogosa & Sharpe ágar (Difco™ Lactobacilli MRS Agar) e as placas foram incubadas a 37°C por 48 h. A população de enterobactérias foi determinada em meio Violet Red Bile Agar (Oxoid CM0107, Wade Road, Basingstoke, Hants, RG24 8PW, UK) e as placas foram

incubadas a 37°C por 24 h. As leveduras e os fungos filamentosos foram cultivados em meio Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol ágar (Oxoid CM1148, Wade Road, Basingstoke, Hants, RG24 8PW, UK) a 25 °C por 72 h e 120 h, respectivamente. As placas contendo entre 30 e 300 UFC foram consideradas passíveis de quantificação. Para avaliação e interpretação dos dados referentes à quantificação das populações microbianas, os resultados obtidos foram convertidos para unidade logarítmica na base dez.

2.7 Estabilidade Aeróbia

Para avaliação da estabilidade aeróbia das silagens, o material foi homogeneizado logo após a abertura dos baldes e uma amostra de 2 kg de silagem retornou aos baldes sem compactação. Sobre cada balde foi colocada uma camada de tecido de nylon que permitia a passagem de ar, mas impedia a entrada de insetos. No centro da massa de silagem foi inserido um datalogger (Cryopark iMINI™, Cryopark Company Inc., VA, USA), que media a temperatura a cada 20 min. Dois dataloggers foram distribuídos em diferentes pontos da sala para medição da temperatura ambiente. Os baldes foram armazenados em sala com temperatura controlada ($\pm 24^{\circ}\text{C}$) por sete dias. A estabilidade aeróbia foi definida como o número de horas que a silagem permaneceu estável antes da temperatura subir 2°C acima da temperatura ambiente (KUNG et al., 2003).

Ao final dos sete dias de exposição aeróbia, os baldes foram novamente pesados para a determinação da RMS. A silagem foi homogeneizada e amostrada para obtenção dos teores de MS, CHOs, contagem de fungos filamentosos e leveduras.

2.8 Análises químicas e bromatológicas e digestibilidade *in vitro*

As amostras processadas a 1 mm foram analisadas quanto aos seus teores de MS (método 934.01), matéria mineral (MM método 942.05), proteína bruta (PB = N \times 6,25, método 984.13) e fibra insolúvel em detergente ácido (FDA método 973.18), conforme AOAC (1990). As análises de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) foram realizadas com a adição de α -amilase termoestável, sem a utilização de sulfito de sódio. Os teores de FDN e FDA foram corrigidos após as análises de compostos nitrogenados (LICITRA et al., 1996) e cinzas (MERTENS, 2002). O teor de lignina foi

obtido conforme Gomes et al. (2011). O teor de matéria orgânica (MO) foi obtido pela diferença (100 - MM = MO).

Os teores de CHOs em água da forragem fresca e da silagem foram determinados segundo Nelson (1944), e as concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₃/N-Total) da silagem conforme Okuda et al. (1965).

A análise da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da FDN (DIVFDN) foram realizadas no equipamento Daisy Incubator (Ankom, ® Technology Corporation, Fairport, NY), conforme metodologia proposta por Tilley e Terry (1963), adaptada por Holden (1999). Foram acondicionados 500 mg de amostra em sacos F57 (ANKOM F57®) previamente limpos e pesados. O inóculo ruminal foi coletado de dois machos Nelore (peso corporal médio 350±20 kg), fistulados no rúmen, adaptados a uma dieta com relação volumoso: concentrado 80:20 (base na MS) e 12% de PB. Os procedimentos que envolvem a utilização de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFV (CEUAP/UFV, protocolo nº 07/2023).

Vinte e cinco sacos contendo as amostras foram distribuídos de forma aleatória em cada jarra da incubadora. Em seguida, foram adicionados 1600 mL de uma solução tampão com pH 6,8 e 400 mL de digesta ruminal filtrada, mantendo o sistema a 39 °C. Posteriormente, foi infundido CO₂ nas jarras de digestão por 30 segundos para a completa expulsão do oxigênio. As amostras permaneceram na incubadora por 48 horas. Após a incubação, o líquido contido nas jarras foi drenado e os sacos foram lavados em água corrente e submetidos a análise de FDN. Posteriormente, os sacos foram secos em estufa a 55°C por 24 horas, seguida pela estufa 105°C por 2 horas. Após esse processo, os sacos foram pesados.

A DIVMS e DIVFDN foram calculadas conforme as seguintes equações:

$$DIVMS \% MS: 100 \times \left[\frac{(MS \text{ silagem sorgo} - MS \text{ resíduo})}{MS \text{ silagem sorgo}} \right]$$

DIVMS = Digestibilidade *in vitro* da matéria seca; MS silagem sorgo = Matéria seca da silagem de sorgo; MS resíduo = Matéria seca do resíduo após incubação.

$$DIVFDN \% MS: 100 \times \left[\frac{(FDN \text{ silagem sorgo} - FDN \text{ resíduo})}{FDN \text{ silagem sorgo}} \right]$$

DIVFDN = Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro; FDN = Fibra em detergente neutro da silagem de sorgo; FDN resíduo = Fibra em detergente neutro do resíduo após incubação.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados de acordo com o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4. Os aditivos, os cortes, bem como, a interação entre os fatores, foram considerados efeitos fixos.

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

Onde, Y_{ijk} = variável dependente; μ = média geral; L_i = efeito do aditivo i ; I_j = efeito do corte j ; $(L \times I)_{ij}$ = interação entre os fatores i e j ; e_{ijk} = erro aleatório, assumindo uma distribuição normal independente (NID), $(0; \sigma^2\epsilon)$.

Após análise de variância, as interações significativas entre os fatores foram desdobradas e comparadas pelo teste Tukey, por intermédio do procedimento GLM do SAS 9.4 (SAS System Inc., Cary, NC, USA). Adotou-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I,

4 RESULTADOS

4.1 Composição da forragem antes da ensilagem

A caracterização das plantas de Sorgo Volumax no momento da colheita nos dois cortes, é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Composição químico-bromatológica e populações microbianas da planta de sorgo no primeiro e segundo corte.

Itens ^a	Corte ^b	
	Primeiro	Segundo
pH	5,62	5,85
Matéria seca (%)	25,71	25,52
Matéria mineral (% MS)	4,70	4,90
Proteína bruta (% MS)	7,57	6,61
FDN _{CP} (% MS)	59,87	56,36
FDA _{CP} (% MS)	29,04	27,95
Celulose (% MS)	21,57	22,28
Hemicelulose (% MS)	30,83	28,41
Lignina (% MS)	7,47	5,67
Digestibilidade <i>in vitro</i> da MS (% MS)	65,10	68,86
Digestibilidade <i>in vitro</i> da FDN (% MS)	45,14	47,44
Carboidratos solúveis em água (% MS)	7,63	11,04

Enterobactérias (Log ufc/g forragem)	6,59	5,42
Bactérias ácido láticas (Log ufc/g forragem)	6,08	5,97
Leveduras (Log ufc/g forragem)	6,45	6,80
Fungos filamentosos (Log ufc/g forragem)	5,13	4,39

^aFDN_{CP}, Fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; FDA_{CP}, Fibra insolúvel em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína; Digestibilidade *in vitro* da MS, Digestibilidade *in vitro* da matéria seca; Digestibilidade *in vitro* da FDN, Digestibilidade *in vitro* da fibra insolúvel em detergente neutro; ufc, unidade formadora de colônia.

4.2 Composição químico-bromatológica, perfil fermentativo e populações microbianas das silagens.

O erro padrão da média (EPM) e o *P*-Valor das variáveis avaliadas nas silagens encontram-se na Tabela 3. Foi observado efeito da interação Corte × aditivo (C×A) ($P \leq 0,05$) sobre MS, MM, PB, CHOs, pH, BAL e PMS. As variáveis FDN_{cp}, FDA_{cp}, celulose, lignina, DIVMS, DIVFDN, leveduras, fungos filamentosos e N-NH₃, foram afetadas pelo fator corte (Tabela 3).

Tabela 3. *P*-Valor e erro padrão da média (EPM) da composição químico-bromatológica, perfil fermentativo e populações microbianas de silagens de sorgo em função de cortes e aditivos.

Itens ^a	<i>P</i> -Valor ^b			EPM ^c
	Corte	Aditivos	C×A	
Matéria seca	0,0006	0,4404	0,0221	0,11
Matéria mineral	<0,0001	0,0022	<0,0001	0,03
Proteína bruta	<0,0001	0,2616	0,0045	0,09
FDN _{CP}	<0,0001	0,3255	0,778	0,17
FDA _{CP}	<0,0001	0,1864	0,4395	0,13
Celulose	0,0065	0,7013	0,8489	0,09
Hemicelulose	0,8712	0,6424	0,9584	0,10
Lignina	<0,0001	0,6599	0,5389	0,16
DIVMS	<0,0001	0,8885	0,9585	0,38
DIVFDN	<0,0001	0,9477	0,9827	0,49
CHOs	<0,0001	0,0785	0,0004	0,19
pH	0,3732	0,5333	0,0137	0,01
BAL	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,16
Leveduras	0,0224	0,1014	0,6763	0,10
Fungos filamentosos	<0,0001	0,1361	0,1087	0,08

N-NH ₃	<0,0001	0,8877	0,5655	0,32
PMS	0,0053	0,4664	0,0364	0,37

^aFDN_{CP}, fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; FDA_{CP}, fibra insolúvel em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína; DIVMS, digestibilidade *in vitro* da matéria seca; DIVFDN, digestibilidade *in vitro* da fibra insolúvel em detergente neutro; CHOs, carboidratos solúveis em água; BAL, bactérias do ácido lático; N-NH₃, nitrogênio amoniacal; PMS, Perda de matéria seca; ^bProbabilidade de efeito do corte, intervenções e de interação C×I; ^cEPM, erro padrão da média.

Foi realizado o estudo do desdobramento do efeito de aditivos em cada corte quando a interação C×A foi significativa ($P \leq 0,05$). Foi observado menor teor de MS no segundo corte para as silagens tratadas com inoculante e o combo em comparação ao primeiro corte (Tabela 4). Com relação à matéria mineral, no primeiro corte, a silagem combo apresentou maior teor de MM comparada aos demais aditivos. No entanto, no corte 2, a silagem inoculada foi a que apresentou menor MM em relação ao controle e enzimas. Ao se avaliar o efeito de corte dentro de aditivo, verifica-se maior valor de MM nas silagens controle, enzimas e inoculante do corte 2 em relação ao 1 (Tabela 4).

Independente do aditivo usado foi observado menor teor de PB no segundo corte, comparado ao primeiro. No entanto, ao se avaliar o efeito de aditivo dentro de ambos, verificou-se valores semelhantes de PB (Tabela 4).

Tabela 4. Teores médios de matéria seca, matéria mineral e proteína bruta de silagens de sorgo em função de cortes e aditivos

Corte ^a	Aditivos ^b				Média
	Controle	Enzimas	Inoculante	Combo	
Matéria Seca (% MN)					
1	25,26 Aa	25,42 Aa	26,09 Aa	25,94 Aa	25,68
2	25,13 Aa	25,34 Aa	25,04 Ba	24,48 Ba	25
Média	25,2	25,38	25,56	25,21	
Matéria Mineral (% MS)					
1	4,80 Bb	4,77 Bb	4,78 Bb	4,97 Aa	4,83
2	5,18 Aa	5,19 Aa	4,88 Ab	5,01 Aab	5,06
Média	4,99	4,98	4,83	4,99	
Proteína Bruta (% MS)					
1	7,60 Aa	7,66 Aa	7,73 Aa	7,82 Aa	7,7
2	7,00 Ba	6,96 Ba	6,52 Ba	6,57 Ba	6,76
Média	7,3	7,31	7,12	7,19	

^aCORTE 1, silagens confeccionadas a partir do primeiro corte do sorgo; CORTE 2, silagens confeccionadas a partir do segundo corte do sorgo. ^bAditivos, CONTROLE, silagens que não

foram inoculadas e não receberam a aplicação de enzimas; ENZIMAS, silagens que não foram inoculadas e receberam a aplicação de enzimas; INOCULANTE, silagens que foram inoculadas e não receberam a aplicação de enzimas; COMBO, silagens que foram inoculadas e receberam a aplicação de enzimas. Letras minúsculas diferem entre si nas linhas, letras maiúsculas diferem entre si nas colunas.

Os teores de FDN_{cp}, FDA_{cp} e lignina foram superiores ($P<0,0001$) nas silagens produzidas no primeiro corte, enquanto o teor de celulose dessas silagens foi menor ($P<0,0065$) em relação ao segundo corte. A hemicelulose não foi afetada pelos fatores em estudo, nem pela interação destes, apresentando valor médio de 28,52%. As DIVMS e DIVFDN foram menores ($P<0,0001$) nas silagens produzidas no primeiro corte (Tabela 5).

Tabela 5. Componentes da fração fibrosa e digestibilidades in vitro da matéria seca e da fibra em detergente neutro de silagens de sorgo em função de cortes e aditivos.

Corte ^a	Aditivos ^b				Média
	Controle	Enzimas	Inoculante	Combo	
FDN _{cp} (% MS)					
1	57,32	58,01	57,46	57,84	57,66A
2	56,03	56,22	56,16	56,86	56,32B
Média	56,68	57,12	56,81	57,35	
FDA _{cp} (% MS)					
1	28,97	29,33	28,97	29,37	29,16A
2	27,72	27,52	27,74	28,16	27,78B
Média	28,35	28,42	28,35	28,76	
Celulose (% MS)					
1	21,73	21,9	21,6	22,01	21,81B
2	22,27	22,2	22,28	22,4	22,29A
Média	22	22,05	21,94	22,21	
Hemicelulose (% MS)					
1	28,35	28,68	28,49	28,48	28,5
2	28,31	28,7	28,43	28,71	28,54
Média	28,33	28,69	28,46	28,59	
Lignina (% MS)					
1	7,24	7,43	7,37	7,36	7,35A
2	5,45	5,32	5,46	5,76	5,49B
Média	6,34	6,38	6,41	6,56	
DIVMS (% MS)					
1	66,11	65,7	65,51	65,61	65,73B
2	69,69	69,72	69,64	69,16	69,55A
Média	67,9	67,71	67,58	67,39	
DIVFDN (% MS)					

1	43,88	43,7	42,98	43,38	43,49B
2	47,86	48,2	47,81	47,73	47,9A
Média	45,87	45,95	45,39	45,56	

^aCORTE 1, silagens confeccionadas a partir do primeiro corte do sorgo; CORTE 2, silagens confeccionadas a partir do segundo corte do sorgo. ^aAditivos, CONTROLE, silagens que não foram inoculadas e não receberam a aplicação de enzimas; ENZIMAS, silagens que não foram inoculadas e receberam a aplicação de enzimas; INOCULANTE, silagens que foram inoculadas e não receberam a aplicação de enzimas; COMBO, silagens que foram inoculadas e receberam a aplicação de enzimas; FDN_{cp}, fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; FDA_{cp}, fibra insolúvel em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína; DIVMS, digestibilidade *in vitro* da matéria seca; DIVFDN, digestibilidade *in vitro* da fibra insolúvel em detergente neutro; Letras minúsculas diferem entre si nas linhas, letras maiúsculas diferem entre si nas colunas.

Os valores de pH foram semelhantes entre as silagens produzidas no primeiro e no segundo corte, independente do aditivo usado. Contudo, ao se avaliar o efeito de aditivo entre os cortes, verificou-se menor pH na silagem controle no primeiro corte e, na silagem combo, no segundo corte (Tabela 6).

Independente do aditivo usado, foi registrado menor população de BAL no segundo corte. A silagem controle e aquela tratada com enzimas apresentaram menor população desse grupo microbiano tanto no corte 1, como no 2 (Tabela 6). As silagens apresentaram menor população de leveduras no corte 1, comparado ao 2 (4,01 x 4,47 log UFC/g). Comportamento semelhante foi observado para a concentração de amônia (5,66 x 8,46 %). Por outro lado, registrou-se maior população de fungos nas silagens produzidas no corte 1 (3,29 x 2,66 log UFC/g) (Tabela 6).

No primeiro corte foi observado maior teor de CHOs na silagem controle e naquela tratada com enzimas, em comparação a silagem com inoculante (Tabela 6). Contudo, não houve efeito de aditivos no corte 2. Além disso, independente do aditivo usado, foi registrado menor conteúdo de carboidratos solúveis no primeiro corte (Tabela 6). Foi observado menor perda de MS na silagem tratada com o combo no primeiro corte em relação ao segundo (Tabela 6).

Tabela 6. pH, populações microbianas, concentrações de amônia e de carboidratos solúveis e perda de matéria seca de silagens de sorgo em função de cortes e aditivos.

Corte ^a	Aditivos ^b				Média
	Controle	Enzimas	Inoculante	Combo	
	pH				
1	3,55 Ba	3,57 Aa	3,59 Aa	3,63 Aa	3,58
2	3,59 Aa	3,59 Aa	3,57 Aa	3,56 Ba	3,58
Média	3,57	5,58	3,58	3,59	

Bactérias do ácido Lático (Log ufc/g)					
1	8,02 Ab	8,18 Ab	8,97 Aa	9,00 Aa	8,54
2	6,23 Bb	6,74 Bb	8,65 Ba	8,53 Ba	7,54
Média	7,13	7,46	8,81	8,76	
Leveduras (Log ufc/g)					
1	4,52	4,17	3,58	3,76	4,01B
2	4,68	4,52	4,39	4,28	4,47A
Média	4,6	4,34	3,99	4,02	
Fungos filamentosos (Log ufc/g)					
1	3,8	3,19	2,97	3,2	3,29A
2	2,67	2,64	2,73	2,6	2,66B
Média	3,23	2,91	2,85	2,9	
Nitrogênio amoniacal (% N total)					
1	6,6	5,28	5,28	5,5	5,66B
2	8,21	8,66	8,59	8,37	8,46A
Média	7,4	6,97	6,93	6,93	
Carboidratos solúveis em água (% MS)					
1	2,16 Ba	1,91 Ba	1,10 Bb	1,62 Bab	1,7
2	3,75 Aa	4,04 Aa	4,18 Aa	3,79 Aa	3,94
Média	2,96	2,98	2,64	2,71	
Perdas de matéria seca (% MS)					
1	2,62Aa	2,05Aa	0,54Aa	0,74Ba	1,49
2	2,81Aa	2,03Aa	3,18Aa	5,53Aa	3,39
Média	2,71	2,04	1,86	3,14	

^aCORTE 1, silagens confeccionadas a partir do primeiro corte do sorgo; CORTE 2, silagens confeccionadas a partir da rebrota do sorgo. ^bAditivos, CONTROLE, silagens que não foram inoculadas e não receberam a aplicação de enzimas; ENZIMAS, silagens que não foram inoculadas e receberam a aplicação de enzimas; INOCULANTE, silagens que foram inoculadas e não receberam a aplicação de enzimas; COMBO, silagens que foram inoculadas e receberam a aplicação de enzimas. Letras minúsculas diferem entre si nas linhas, letras maiúsculas diferem entre si nas colunas.

4.3 Estabilidade aeróbia

O *P*-Valor e o erro padrão da média (EPM) das características avaliadas na estabilidade aeróbia das silagens encontram-se na Tabela 7. Houve efeito da interação C×A ($P \leq 0,05$) sobre a estabilidade aeróbia, pH, MS e contagem de leveduras. Foi observado efeito de corte e de aditivo sobre a população de fungos filamentosos e sobre o teor de CHOs.

Tabela 7. *P*-Valor e erro padrão da média (EPM) da estabilidade aeróbia, pH, MS,, populações microbianas e CHOs das silagens.

Itens ^a	<i>P</i> =Valor ^b			EPM ^c
	Corte	Aditivos	C×A	
E.A. (horas)	<0,0001	<0,0001	0,0029	7,92
pH	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,15
Matéria seca	0,8681	0,8179	0,0067	0,2
CHOs	0,0002	0,0261	0,2016	0,04
Leveduras	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,34
Fungos filamentosos	0,0005	0,0008	0,4763	0,1

^aE.A., horas de estabilidade aeróbia; RMS, recuperação da matéria seca; CHOs, carboidratos solúveis em água; ^bProbabilidade de efeito do corte, aditivos e de interação C×A; ^cEPM, erro padrão da média.

No primeiro corte, foi registrado maior estabilidade aeróbia na silagem tratada com inoculante em relação à controle ($P=0,0018$), enquanto no segundo corte, as silagens tratadas com inoculante e combo apresentaram maior estabilidade aeróbia em relação às silagens controle e enzimas (Tabela 8). No entanto, independente do aditivo usado foi registrado maior estabilidade nas silagens produzidas no primeiro corte.

No primeiro corte, foi observado maior pH da silagem controle após a exposição aeróbia. No entanto, não houve efeito de aditivos sobre o pH nas silagens do segundo corte. As silagens tratadas com os diferentes aditivos apresentaram menor pH no primeiro corte (Tabela 8).

Foi observado maior teor de MS para o primeiro corte nas silagens tratadas com inoculante e com o combo quando comparadas às silagens controle e tratada com enzimas. As silagens do segundo corte não apresentaram diferenças no teor de MS. A silagem tratada com inoculante apresentou maior teor de MS no primeiro corte, comparado ao segundo.

Foi registrado maior teor de CHOs (1,21 x 0,99 % MS) nas silagens produzidas no primeiro corte comparado ao segundo. Em ambos os cortes as silagens aditivadas com enzimas apresentaram maior concentração de CHOs em relação ao controle, enquanto as silagens inoculadas e combo não diferiram das demais.

A população de fungos foi menor (3,2 x 3,79 log UFC/g) na silagem produzida no primeiro corte comparada ao segundo. Em ambos os cortes, as silagens aditivadas

com inoculante e combo apresentaram menor população de fungos filamentosos em relação ao controle.

Quanto à população de leveduras, observou-se menor contagem destes microrganismos nas silagens tratadas com inoculante e combo, produzidas no primeiro corte. A população de leveduras das silagens do segundo corte não foi afetada pelos aditivos. Ao se avaliar o efeito de corte dentro de cada aditivo, verificou-se menor população de leveduras nas silagens tratadas com aditivos comerciais no primeiro corte, quando comparadas ao segundo corte (Tabela 8).

Tabela 8. Estabilidade aeróbia (h), pH, teores de matéria seca, recuperação de MS e contagem de fungos filamentosos e leveduras de silagens de sorgo, em função de corte e aditivo, após a exposição aeróbia.

Corte ^a	Aditivos ^b				Média
	Controle	Enzimas	Inoculante	Combo	
Estabilidade aeróbia (horas)					
1	83,6Ab	123Aab	166Aa	135Aab	126,9
2	42Bb	43,8Bb	58,4Ba	53,25Ba	49,36
Média	62,8	83,4	112,2	94,13	
pH					
1	5,41Aa	4,17Bb	3,56Bb	3,68Bb	4,21
2	5,51Aa	5,85Aa	5,4Aa	5,57Aa	5,58
Média	5,46	5,01	4,48	4,62	
Matéria seca (% MN)					
1	25,29Ab	25,64Ab	26,85Aa	26,37Aa	26,04
2	26,69Aa	26,89Aa	25,16Ba	25,17Aa	25,98
Média	25,99	26,27	26	25,77	
CHOs (% MS)					
1	0,93	1,43	1,19	1,27	1,21A
2	0,85	0,93	0,93	0,99	0,92B
Média	0,89b	1,18a	1,06ab	1,13ab	
Leveduras (Log ufc/g)					
1	8,8Aa	7,3Ba	3,85Bb	4,79Bb	6,19
2	9,02Aa	9,16Aa	9,13Aa	9,03Aa	9,08
Média	8,91	8,23	6,69	6,91	
Fungos filamentosos (Log ufc/g)					
1	3,93	3,14	2,91	2,80	3,2 B
2	4,17	3,95	3,42	3,64	3,79 A
Média	4,05a	3,55ab	3,16b	3,22b	

^aCORTE 1, silagens confeccionadas a partir do primeiro corte do sorgo; CORTE 2, silagens confeccionadas a partir da rebrota do sorgo. ^bINTERVENÇÕES, CONTROLE, silagens que não foram inoculadas e não receberam a aplicação de enzimas; ENZIMAS, silagens que não

foram inoculadas e receberam a aplicação de enzimas; INOCULANTE, silagens que foram inoculadas e não receberam a aplicação de enzimas; COMBO, silagens que foram inoculadas e receberam a aplicação de enzimas; CHOs, carboidratos solúveis em água. Letras minúsculas diferem entre si nas linhas, letras maiúsculas diferem entre si nas colunas.

5 DISCUSSÃO

O teor médio de MS de 25,7 e 25,5%, obtido nos cortes 1 e 2 para as plantas de sorgo antes da ensilagem, assemelham-se aos 25% preconizados por McDONALD et al. (1991) para uma boa fermentação e redução das perdas por efluentes na silagem. Portanto, uma decisão importante a ser tomada por ocasião da ensilagem é o conhecimento do teor de MS da cultura a ser ensilada, uma vez que este pode afetar adversamente a fermentação. É importante registrar que a colheita em ambos os cortes foi antecipada, devido ao alto ataque de pássaros na área experimental. No entanto, apesar do teor de MS relativamente baixo, destacamos que os teores de carboidratos solúveis em água da cultura, em ambos os cortes, podem ser considerados adequados para uma boa fermentação (McDONALD et al., 1991). Esses autores estabeleceram teores acima de 8% na MS como desejáveis para uma fermentação adequada da massa ensilada.

Apesar do maior teor de proteína bruta das silagens de plantas colhidas no primeiro corte em relação ao segundo, biologicamente os valores são pouco expressivos. Possivelmente, essa diferença se deva às alterações na disponibilidade hídrica, térmica e luminosa, que podem ter afetado a proporção de folhas, colmos e panículas entre os cortes (características não avaliadas).

Diversos fatores podem ter afetado o desenvolvimento das plantas no segundo corte do sorgo. Devido ao maior perfilhamento, ocorre aumento do estande final de plantas, diminuindo a captação de luz, afetando negativamente na capacidade fotossintética, comprometendo assim o porte das plantas e a produtividade (BOTELHO et al., 2010). Ademais, a falta de reposição de nutrientes via adubação, aliada a diminuição da temperatura média diária, pluviosidade e luminosidade, provavelmente resultaram na redução da altura e produtividade das plantas do segundo corte. Plantas mais baixas exigem menor deposição de componentes estruturais para sustentação, o que explica os menores teores de FDN_{cp} , FDA_{cp} e lignina das silagens produzidas no segundo corte, comparadas ao primeiro. Essa menor concentração de componentes fibrosos no segundo corte, explica a maior DIVMS e DIVFDN das silagens deste corte, comparadas às do corte 1.

A aplicação de enzimas fibrolíticas não alterou as concentrações dos componentes da parede celular, assim como a DIVMS e DIVFDN das silagens de sorgo, independente do corte. Resultado semelhante foi observado por SALVO et al. (2022), ao aplicarem um mix contendo celulase e xilanase na ensilagem de planta de milho. A aplicação de enzimas fibrolíticas em forragens com alto teor de CHOs pode não promover melhorias na fermentação e na composição química da silagem, devido a rápida redução do pH após o fechamento do silo, criando condições desfavoráveis a atividade enzimática, que depende de pH e temperatura específicos para adequado funcionamento (BUREENOK et al., 2019). SINGH et al. (2019), ao avaliarem dados de 54 xilanases, demonstraram que apenas 14 apresentaram pH ótimo igual ou inferior a 4,5, valor este rapidamente atingido durante a fermentação em silagem de sorgo, conforme verificado em nosso estudo.

Apesar da colheita precoce, com baixo teor de MS comparado ao encontrado na literatura para sorgo Volumax (SANTOS et al., 2021; SANTANA et al., 2022), o adequado conteúdo de carboidratos solúveis em água forneceu substrato suficiente para a proliferação das BAL, resultando em rápida redução do pH da silagem (KUNG Jr. et al., 2018), cujos valores foram inferiores a 4 em todas as silagens avaliadas. Portanto, o pH das silagens foi adequado para controlar microrganismos indesejáveis como fungos filamentosos e enterobactérias durante a fermentação (MUCK et al., 2020). Apesar de ter sido registrado menor pH na silagem combo no segundo corte, a amplitude de variação registrada ($3,63 \times 3,56$) tem pouca relevância biológica.

A população de BAL na planta de sorgo em ambos os cortes foi superior aos $5 \log \text{ UFC g}^{-1}$ preconizados por MUCK (1996) como mínimo necessário para assegurar uma boa fermentação. A menor população desse grupo microbiano nas silagens controle e naquela com enzima se deve à ausência de BAL fornecidas via inoculante. A não detecção de enterobactérias em nosso estudo é um bom indicativo, uma vez que devido a sua natureza anaeróbia facultativa, elas competem com as BAL por nutrientes antes e após a ensilagem, bem como são responsáveis pela maior parte da amônia formada da degradação da proteína, o que pode favorecer ao aumento da capacidade tamponante da massa ensilada (MCDONALD et al., 1991). Tal fato, pode também contribuir para explicar a baixa concentração de nitrogênio amoniacal nas silagens avaliadas em nosso estudo, apesar de ter sido registrado maior valor nas silagens produzidas no segundo corte ($8,46\% \times 5,66\%$). No entanto, esses valores

são indicativos de uma boa fermentação, conforme critérios estabelecidos por KUNG et al. (2018), para diferentes silagens produzidas nos Estados Unidos.

Diversos estudos demonstram que a inoculação de silagens com cepas heterofermentativas, como o *Lentilactobacillus buchneri*, promovem aumento da produção de ácido acético, um poderoso composto antifúngico, diminuindo a proliferação de leveduras e fungos filamentosos após a abertura do silo e aumentando o tempo de estabilidade aeróbia (DRIEHUIS et al., 1999; DANNER et al., 2003; KLEINSCHMIT & KUNG, 2006; MUCK et al., 2018; KUNG et al., 2021; ARRIOLA et al., 2021). No presente estudo, as silagens inoculadas com *Lentilactobacillus buchneri* apresentaram maior concentração de BAL em relação às não inoculadas.

A maior estabilidade aeróbia registrada nas silagens que receberam apenas inoculante no primeiro corte e naquelas que receberam inoculante e combo no segundo corte, provavelmente está associada à maior produção de ácido acético, uma vez que esse ácido se encontra em sua maior parte na forma não dissociada em pH inferior a neutralidade, podendo difundir-se para o interior das células da levedura e sofrer dissociação, liberando prótons no meio. Assim, a homeostase celular fica comprometida, retardando a proliferação de leveduras após a abertura do silo (STRATFORD, et al., 2013). Tal fato provavelmente refletiu na menor concentração de leveduras após 7 dias de exposição ao ar nas silagens que receberam inoculante e combo no 1º corte, o que retardou a elevação do pH após a abertura do silo em ambos os cortes, resultando na menor população de fungos filamentosos após 7 dias de exposição ao ar nas silagens inoculadas em relação ao controle nos dois cortes (Tabela 8).

A maior estabilidade aeróbia das silagens do primeiro corte comparada as do segundo corte pode estar associada ao menor conteúdo de carboidratos solúveis em água registrado nas silagens produzidas no corte 1, visto que os CHOs são uma das fontes de energia utilizada pelos microrganismos deteriorantes após a abertura do silo. O menor pH e a menor contagem de leveduras das silagens aditivadas do primeiro corte em relação às do segundo também poderiam estar relacionados a menor quantidade de substrato para microrganismos deterioradores, o que refletiu também em menor concentração de fungos filamentosos nas silagens do corte 1 comparadas

ao corte 2 (3,2 × 3,79 Log ufc/g) (WOOLFORD, 1990; McDONALD, et al., 1991; RANJIT & KUNG Jr, 2000; MUCK, 2013).

6 CONCLUSÕES

A inoculação com *Lentilactobacillus buchneri* melhora a estabilidade aeróbia de silagem de sorgo. Contudo, a aplicação de enzimas fibrolíticas não promove melhorias na qualidade nutricional da silagem de sorgo. No entanto, silagens produzidas no segundo corte apresentaram DIVMS e DIVFDN superiores, independente do uso de aditivo.

7 REFERÊNCIAS

ARRIOLA, K. G., OLIVEIRA, A. S., JIANG, Y., KIM, D., SILVA, H. M., KIM, S. C., AMARO, F. X., OGUNADE, I. B., SULTANA, H., CERVANTES, A. A. P., FERRARETTO, L. F., VYAS, D., ADESOGAN, A. T. Meta-analysis of effects of inoculation with *Lactobacillus buchneri*, with or without other bacteria, on silage fermentation, aerobic stability, and performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 7, p. 7653-7670, 2021

Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). Official Methods of Analysis, **AOAC International, Arlington**. 15th ed. 1990.

AUERBACH, H., NADEAU, E. Effects of additive type on fermentation and aerobic stability and its interaction with air exposure on silage nutritive value. **Agronomy**, v. 10, n. 9, p. 1229, 2020.

AYDIN, G., GRANT, R. J., O'REAR, J. Brown midrib sorghum in diets for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 10, p. 2127–2135, 1999.

BOLSEN, K. K., MOORE, K. J., COBLENTZ, W. K., SIEFERS, M. K., WHITE, J. S. Sorghum silage. In: Buxton, D. R.; Muck, R. E.; Harrison, J. H. (eds) **Silage science and technology**. 1 ed. Madison, USA: Agronomy Publication, American Society of Agronomy, p. 609-632, 2003.

BORREANI, G., TABACCO, E., SCHMIDT, R.J., HOLMES, B.J., MUCK, R.E., 2018. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**. v. 101, n. 5, p. 3952-3979, 2018.

BOTELHO, P. R. F., PIRES, D. A. D. A., DE SALES, E. C. J., JÚNIOR, V. R. R., JAYME, D. G., & DOS REIS, S. T. Avaliação de genótipos de sorgo em primeiro corte e rebrota para produção de silagem. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 9, n. 3, p. 287-297, 2010.

BRÜNING, D., GERLACH, K., WEIß, K., & SÜDEKUM, K. H. Effect of compaction, delayed sealing and aerobic exposure on maize silage quality and on formation of volatile organic compounds. **Grass and Forage Science**, v. 73, n. 1, p. 53-66, 2018.

BUREENOK, S., LANGSOUMECHAI, S., PITIWITTAYAKUL, N., YUANGKLANG, C., VASUPEN, K., SAENMAHAYAK, B., SCHONEWILLE, J. T. Effects of fibrolytic enzymes and lactic acid bacteria on fermentation quality and in vitro digestibility of Napier grass silage. **Italian Journal of Animal Science**, v. 18, n. 1, p. 1438-1444, 2019.

CLIMATE-DATA.ORG. Clima: Viçosa. Disponível em: < <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/minas-gerais/vicosa-25021/> > Acesso em: 19 de fevereiro de 2022.

DANIEL, J. L. P., BERNARDES, T. F., JOBIM, C.C., SCHMIDT, P., NUSSIO, L.G. Production and utilization of silages in tropical areas with focus on Brazil. **Grass and Forage Science**, v. 74, n. 2, p. 188–200, 2019.

DANNER, H., HOLZER, M., MAYRHUBER, E., & BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 1, p. 562-567, 2003.

DRIEHUIS, F., OUDE ELFERINK, S.J.W.H., SPOELSTRA, S.F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 4, p. 583-594, 1999.

EMILE, J. C., AL RIFAÏ, M., CHARRIER, X., LEROY, P., BARRIERE, Y. Grain sorghum silages as an alternative to irrigated maize silage. In: **Proceedings of the 21st general meeting of the European Grassland Federation, April 3-6, Badajoz, Spain**. p. 80-82, 2006.

GOMES, D. I., DETMANN, E., VALADARES FILHO, S. DE C., FUKUSHIMA, R. S., DE SOUZA, M. A., VALENTE, T. N. P., PAULINO, M. F., DE QUEIROZ, A. C.

Evaluation of lignin contents in tropical forages using different analytical methods and their correlations with degradation of insoluble fiber. **Animal Feed Science and Technology**, v. 168, n. 3-4, p. 206-222, 2011.

HEINL, S., WIBBERG, D., EIKMEYER, F., SZCZEPANOWSKI, R., BLOM, J., LINKE, B., GOESMANN, A., GRABHERR, R., SCHWAB, H., PÜHLER, A., SCHLÜTER, A., 2012. Insights into the completely annotated genome of *Lactobacillus buchneri* CD034, a strain isolated from stable grass silage. **Journal of Biotechnology**. v. 161, n. 2, p. 153-166, 2012.

HOLDEN, L.A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.8, p.1791-1794, 1999.

JOBIM, C. C., NUSSIO, L. G., REIS, R. A., SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 101-119, 2007.

KHOTA, W., PHOLSEN, S., HIGGS, D., CAI, Y. Natural lactic acid bacteria population of tropical grasses and their fermentation factor analysis of silage prepared with cellulase and inoculant. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 12, p. 9768-9781, 2016.

KLEINSCHMIT, D.H., KUNG, L. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. **Journal of Dairy Science**. v. 89, n. 10, p. 4005-4013, 2006.

KUNG JR, L., SAVAGE, R.M., SILVA, E.B., POLUKIS, S.A., SMITH, M.L., JOHNSON, A.C.B., MILLER, M.A. The effects of air stress during storage and low packing density on the fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* 40788. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 4, p. 4206-4222, 2021.

KUNG JR, L., SHAVER, R. D., GRANT, R. J., & SCHMIDT, R. J. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4020-4033, 2018.

KUNG JR, L., STOKES, M. R., LIN, C. J. Silage additives. In: Buxton, D. R.; Muck, R. E.; Harrison, J. H. (eds) **Silage science and technology**. 1 ed. Madison, USA: Agronomy Publication, American Society of Agronomy, p. 305-360, 2003.

LICITRA, G., HERNANDEZ, T.M., VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 57, n. 4, p. 347-358, 1996.

MCCORKLE, D. A., HANSELKA, D., BEAN, B., MCCOLLUM, T., AMOSSON, S., KLOSE, S., WALLER, M. The economic benefits of forage sorghum silage as an alternative crop. **Texas Cooperative Extension**, Texas A & M University System, 2007.

MCDONALD, P., HENDERSON, A. R., HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2 ed. Marlow: Chalcombe Publications, 1991.

MOON, N., J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of applied Bacteriology**, v. 55, n. 3, p. 453-460, 1983.

MUCK, R. E. A lactic acid bacteria strain to improve aerobic stability of silages. **US Dairy Forage Research Center**, p. 42-43, 1996.

MUCK, R. E. Recent advances in silage microbiology. **Agricultural and Food Science**, 22(1), 3-15, 2013.

MUCK, R. E., NADEAU, E. M. G., MCALLISTER, T. A., CONTRERAS-GOVEA, F. E., SANTOS, M. C., & KUNG Jr, L. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, pág. 3980-4000, 2018.

MUCK, R. E., KUNG Jr, L., COLLINS, M. Silage Production. **Forages: The Science of Grassland Agriculture**, V. 2, Seventh Edition, p. 767–787, 2020.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**. v. 153, n. 2, pág. 375-380, 1944.

OKUDA, H., FUGI, S., KAWASHIMA, Y. A direct colorimetric determination of blood ammonia. **Journal of Experimental Medicine**. v.12, p.11-23, 1965.

OUDE ELFERINK, S. J., KROONEMAN, J., GOTTSCHAL, J. C., SPOELSTRA, S.F., FABER, F., DRIEHUIS, F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 125-132, 2001.

PAHLOW, G., MUCK, R. E., DRIEHUIS, F., ELFERINK, S. J. O., SPOELSTRA, S. F. Microbiology of ensiling. In: Buxton, D. R.; Muck, R. E.; Harrison, J. H. (Eds.) **Silage science and technology**. 1.ed. Madison: American Society of Agronomy, p.31-94, 2003.

RANJIT, N. K., KUNG Jr, L. I. M. I. N. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 3, p. 526-535, 2000.

RIBEIRO, A. C., GUIMARÃES, P. T. G., VIANA, V. H. A. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais - 5ª Aproximação. Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais. 1999.

SALVO, P., GRITTI, V., SILVA, É. D., NADEAU, E., DANIEL, J., SPINDOLA, M., NUSSIO, L. Exogenous Fibrolytic Enzymes and Length of Storage Affect the Nutritive Value and Fermentation Profile of Maize Silage. **Agriculture**, v. 12, n. 9, p. 1358, 2022

SANTANA, I. A., ALBUQUERQUE, C. J. B., MONÇÃO, F. P., RIGUEIRA, J. P. S., ROCHA JUNIOR, V. R., PARRELLA, R. D. C., VIEIRA, E. M., GOMES, M. L. R., LEAL, D. B., LIMA, R. P. Yield and nutritional value of sorghum genotype silages using *Azospirillum brasilense* in the northern region of the state of Minas Gerais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 43, n. 4, p. 1721-1736, 2022.

SANTOS, A. C. P., SANTOS, E. M., CARVALHO, G. G., PERAZZO, A. F., ARAÚJO, M. L., OLIVEIRA, J. S., PEREIRA G. A., MACEDO, A. J. S., SÁ, W. C. C. S., PEREIRA, D. M. (2021). Fermentation profile, microbial populations and aerobic stability of sorghum silages enriched with urea and *Lactobacillus buchneri*. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, p. 1-17, 2021.

SIEGFRIED, V. R., RUCKEMANN, H., & STUMPF, G. Eine HPLC-Methode zur Bestimmung organischer Säuren in Silage. **Landwirtsch forsch**, v. 37, p. 298-304, 1984.

SINGH, S., SIDHU, G. K., KUMAR, V., DHANJAL, D. S., DATTA, S., SINGH, J. Fungal xylanases: sources, types, and biotechnological applications. In: **Recent advancement in white biotechnology through fungi**. Springer, chapter 12, p. 405-428, 2019.

STRATFORD, M., NEBE-VON-CARON, G., STEELS, H., NOVODVORSKA, M., UECKERT, J., ARCHER, D. B. Weak-acid preservatives: pH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **International journal of food microbiology**, 161(3), 164-171, 2013.

TILLEY, J. M. A., TERRY, R. A. A Two-Stage Technique for the in Vitro Digestion of Forage Crops. **Grass and forage science**, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.

WILKINSON, J. M., BOLSEN, K. K., LIN, C. J. History of silage. In: Buxton, D. R.; Muck, R. E.; Harrison, J. H. (Eds.) **Silage science and technology**. 1.ed. Madison: American Society of Agronomy, p. 1-30, 2003.

WILKINSON, J. M., DAVIES, D. R. The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. **Grass and Forage Science**, v. 68, n. 1, p. 1-19, 2012

WOOLFORD, M. K. The detrimental effects of air on silage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 101-116, 1990.

ZAHIRODDINI, H., BAAH, J., ABSALOM, W., MCALLISTER, T. A. Effect of an inoculant and hydrolytic enzymes on fermentation and nutritive value of whole crop barley silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 117, n. 3-4, p. 317-330, 2004.