

ALBERTO JEFFERSON DA SILVA MACÊDO

**PERFIL FERMENTATIVO E DIVERSIDADE MICROBIANA EM SILAGENS DE
LEGUMINOSAS E AVALIAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR ENSILADA COMO
RAÇÃO EM MISTURA TOTAL NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS DE CORTE**

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

Orientador: Odilon Gomes Pereira

Coorientadores: Sebastião C. Valadares Filho
Karina Guimarães Ribeiro

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

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

T

M141p
2022

Macêdo, Alberto Jefferson da Silva, 1994-
Perfil fermentativo e diversidade microbiana em silagens de
leguminosas e avaliação de cana-de-açúcar ensilada como ração
em mistura total na alimentação de bovinos de corte / Alberto
Jefferson da Silva Macêdo. – Viçosa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (174 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Odilon Gomes Pereira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Zootecnia, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.206>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bovinos - Alimentação e rações. 2. Soja - Silagem.
3. Soja como ração. 4. Amendoim - Silagem. 5. Cana-de-açúcar -
Silagem. 6. Cana-de-açúcar como ração. 7. Inoculação.
8. Glycine max. 9. Arachis pintoi. I. Pereira, Odilon Gomes,
1960-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.
III. Título.

CDD 22. ed. 636.085

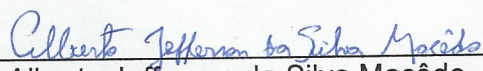
ALBERTO JEFFERSON DA SILVA MACÊDO

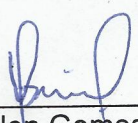
PERFIL FERMENTATIVO E DIVERSIDADE MICROBIANA EM SILAGENS DE
LEGUMINOSAS E AVALIAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR ENSILADA COMO
RAÇÃO EM MISTURA TOTAL NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS DE CORTE

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

APROVADA: 16 de março de 2022.

Assentimento:


Alberto Jefferson da Silva Macêdo
Autor


Odilon Gomes Pereira
Orientador

Ao grande criador do universo “Deus”

A minha família, por sempre me apoiarem, em especial aos meus pais Alberto Carlos e Edilene Fernandes, exemplos de perseverança e dedicação aos filhos.

Aos meus avós, Antônio Pereira e Maria Fernandes (*in memoriam*).

A minha avó Estelina Macêdo e ao meu avô Eduardo Fernandes.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom “Deus” pela dádiva da vida, por tudo que me proporcionou e por chegar até aqui com saúde, sabedoria e por sempre iluminar meus caminhos.

À minha querida família, especialmente aos meus pais “Edilene e Alberto”, que tanto admiro e que me deram as bases para me tornar a pessoa que sou hoje, amo vocês, bem como as minhas irmãs Stely Raylla e Olívia Maisa, e a minha tia Erizalva por todo o apoio e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Odilon Gomes Pereira, por ter acreditado no meu potencial, pela confiança, pelo respeito, pelos conselhos e ensinamentos ao longo desse tempo.

Ao Prof. Dr. Sebastião de Campos Valadares Filho e a Profa. Dra. Karina Guimarães Ribeiro, pelos ensinamentos e por sempre estarem dispostos a ajudar em todas as etapas do meu doutoramento. Ao Prof. Dr. Thiago Carvalho da Silva e ao Prof. Dr. Sidnei Antônio Lopes pelo apoio durante a idealização do projeto.

Aos professores Eliana dos Santos Leandro e Joaquín Castro-Montoya pelas contribuições e participação na banca de defesa.

Ao meu amigo e grande mestre Prof. Edson Mauro pelos ensinamentos e conselhos, bem como por ter me incentivado desde o início da minha graduação e ao longo desses anos, meu muito obrigado.

Aos amigos do Laboratório de Forragicultura e Microbiologia da Silagem da UFV em que tive a oportunidade de conhecer e de conviver ao longo desses anos, e que contribuíram significativamente para a realização desta tese: Felipe Pimentel, Wagner Sousa, Gabriela Duarte, Renan Santos, Danielle Coutinho, Albert Anjos, Priscila Valote, Cássia Soares, Vanessa Paula, Jaina Oliveira, Iana Otoni, Mariele Agarussi, Vinicius Santos, Carla Chaves, João Paulo, Tâmara Chagas, Aureana Lisboa, Daiana Lelis, Igor Brêtas, Gabriel Ferreira, Patrícia Siqueira, Heralda Siteo, Néia Aparecida, Felipe Almeida, Thiago Neves e Eloy Rezende. Agradeço de coração

a todos vocês, por todo empenho, e ajuda nos experimentos (principalmente durante os plantios e capinas do *Arachis*, bem como nas coletas totais...).

Aos meus amigos dos Laboratórios adjacentes que também me ajudaram durante essa jornada: Gutierrez, Gilyard, Nathália Trópia, Luiz, Gabriel David, Adailton, Bárbara, Pauliane e Júlia.

Aos estagiários que sempre estavam dispostos a ajudar e a aprender: Lilian, Cecília, Nathália, Gabriella, Eduardo, Rafael, Haviner, Carol, Lara, Jonathan, Luciano e tantos outros que contribuíram para essa tese.

A todos os amigos da República 203, em que tive a oportunidade de conviver durante esses quatro anos em Viçosa-MG: Herlon Meneguelli, Ranyeri Oliveira, Arthur Soares, Lucas Fonseca, Renan Santos, Eloy Rezende, João Pivotto, Lucas Vieira, Rebert Dias e Willian Stefanello, pela amizade e bom convívio.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia da UFV por todo o apoio e por sempre estarem dispostos a ajudar: Mauro, Pinguim, Fernanda, Gabriel, Edson Agostinho, Zezé, Mário, Bernadette, Matheus, Monteiro, Joélcio, José Flávio e Venâncio.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia por tornarem possível a realização desta tese e pela oportunidade de realizar o meu doutorado.

À todos os professores que transmitiram seus conhecimentos e aos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da UFV.

À UEPE – Agrostologia, ao Prof. Dilermando Fonseca e aos funcionários, Vilmar e Divino pela ajuda, respeito e amizade.

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

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

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),
pela concessão da bolsa de estudos.

Aos bois do meu experimento, que serviram ao propósito da ciência para
geração de conhecimento e pela experiência que tive durante esse período. Agradeço
de coração a todos que me ajudaram e que torceram por mim durante esta jornada.
Além dos bons momentos e das amizades que construí neste lugar (UFV/DZO).

Obrigado por tudo!

“A persistência é o caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

BIOGRAFIA

Alberto Jefferson da Silva Macêdo, filho de Alberto Carlos Henrique de Macêdo e de Edilene Fernandes da Silva Macêdo, nasceu em 04 de julho de 1994.

Em março de 2012 ingressou no ensino superior no curso de Zootecnia, na Universidade Federal da Paraíba, concluindo seus estudos em fevereiro de 2017, obtendo o grau de bacharel em Zootecnia.

Em março de 2017 ingressou no curso de Mestrado em Ciência Animal pela Universidade Federal de Campina Grande, submetendo-se a defesa da dissertação em fevereiro de 2018, obtendo título de Mestre em Zootecnia.

Em março de 2018 iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa, nas áreas de Forragicultura e Pastagens / Nutrição de Ruminantes, submetendo-se à defesa da tese em 16 de março de 2022, obtendo o título de Doutor em Zootecnia.

RESUMO

MACÊDO, Alberto Jefferson da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2022. **Perfil fermentativo e diversidade microbiana em silagens de leguminosas e avaliação de cana-de-açúcar ensilada como ração em mistura total na alimentação de bovinos de corte.** Orientador: Odilon Gomes Pereira. Coorientadores: Sebastião de Campos Valadares Filho e Karina Guimarães Ribeiro.

Esta tese foi dividida em três capítulos. **Capítulo 1** – Foi usado o delineamento em blocos casualizados, com duas idades de rebrotação (R), três inoculantes microbianos (I), quatro períodos de fermentação (P), arranjado em esquema fatorial $2 \times 3 \times 4$, com quatro repetições. As duas idades de rebrotação (R) foram: 40 e 80 d. Os inoculantes microbianos (I) foram: controle (CONT, sem inoculante); cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus* (ISO); e inoculante comercial (IC). Os períodos de fermentação (P) foram: 3, 14, 30 e 60 d após fechamento do silo. Houve efeito de interação $R \times I \times P$ ($P \leq 0,05$) para N-NH₃ e para leveduras. Houve efeito de interação $I \times P$ ($P \leq 0,05$) para pH, carboidratos solúveis em água, N-NH₃, bactérias ácido lácticas, leveduras e para fungos filamentosos. O uso de inoculante microbiano melhora a qualidade da silagem de amendoim forrageiro. **Capítulo 2** – Foi usado o delineamento em blocos casualizados, com dois estágios de colheita (C), três inoculantes microbianos (I), quatro períodos de fermentação (P), arranjado em esquema fatorial $2 \times 3 \times 4$, com quatro repetições. Os inoculantes microbianos avaliados foram: controle (CONT, sem inoculante); cepa AV14.17 - *Lactiplantibacillus pentosus* (ISO); e inoculante comercial (IC). Os períodos de fermentação (P) corresponderam a 3, 14, 30 e 60 d após a ensilagem. Houve efeito ($P \leq 0,05$) da interação $I \times C \times P$ sobre o conteúdo de carboidratos solúveis em água e populações de enterobactérias. Foi observado efeito ($P \leq 0,05$) da interação $C \times P$ sobre as populações de bactérias do ácido láctico, leveduras e de fungos filamentosos. As silagens de soja colhidas no estágio R6 apresentaram maior α -diversidade, seguido de maiores valores para índice de Shannon e índice de Chao1, respectivamente. Recomenda-se colheita de soja para ensilagem no estágio R6, com uso de inoculante microbiano, por proporcionar melhor perfil de fermentação e valor nutritivo, além de elevado rendimento de matéria seca. **Capítulo 3** – Foram avaliados os efeitos da ensilagem da cana-de-açúcar exclusiva (SC) ou ração em mistura total (RMT), com ou sem *Lentilactobacillus buchneri* (LB), sobre composição química, perfil fermentativo e estabilidade aeróbia (Experimento 1), e sobre consumo, digestibilidade, parâmetros ruminais, balanço de nitrogênio e

síntese de proteína microbiana (PMic), em bovinos de corte (Experimento 2). A cana-de-açúcar foi processada e aditivada com LB 40788 LaSil Cana (Lallemand®, Brasil) [3×10^5 unidades formadoras de colônia (ufc) g^{-1} ; LB] ou água destilada [5 mL kg^{-1} ; (controle, CTRL)] e ensilada. Foram observadas menores ($P < 0,05$) populações de leveduras e bactérias ácido lácticas, bem como perdas de matéria seca nas silagens RMT, tanto na ausência como na presença do inoculante. Silagens tratadas com LB apresentaram valores mais baixos de pH do que silagem exclusiva de cana ou na forma de RMT. No experimento 2, foi observado efeito ($P < 0,05$) de inoculante sobre o consumo de matéria seca e de nutrientes digestíveis totais. Foi observada maior digestibilidade aparente ($P < 0,05$) de matéria seca, matéria orgânica, amido e de carboidratos não-fibrosos, assim como de PMic ($P < 0,05$) em dietas à base de RMT ensilada. Portanto, recomenda-se a ensilagem da cana-de-açúcar na forma RMT, com uso de inoculante microbiano.

Palavras-chave: *Arachis pintoi*. Digestibilidade. *Glycine max*. Inoculante. 16S rDNA.

ABSTRACT

MACÊDO, Alberto Jefferson da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2022. **Fermentation profile and microbial diversity in legume silages and evaluation of ensiled sugarcane as a total mixed ration for beef cattle.** Adviser: Odilon Gomes Pereira. Co-advisors: Sebastião de Campos Valadares Filho and Karina Guimarães Ribeiro.

This thesis was divided into three chapters. **Chapter 1** – A randomized block design was used, arranged in a $2 \times 3 \times 4$ factorial arrangement, with two regrowth ages (R), three microbial inoculants (I), and four fermentation periods (FP), with four replications. The two regrowth ages (R) were: 40 and 80 d. The inoculants (I) were: control (CTRL, without inoculant); strain AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus* (ISO); and commercial inoculant (CI). Fermentation periods (FP) were: 3, 14, 30, and 60 d after ensiling. There was an interaction effect $R \times I \times FP$ ($P \leq 0.05$) for $\text{NH}_3\text{-N}$ and yeasts. There was an $I \times FP$ interaction effect ($P \leq 0.05$) for pH, water-soluble carbohydrates, $\text{NH}_3\text{-N}$, lactic acid bacteria, yeasts, and molds. The use of microbial inoculants improves the quality of peanut silage. **Chapter 2** – A randomized block design was used, arranged in a $2 \times 3 \times 4$ factorial scheme, with two harvest stages (H), three microbial inoculants (I), four fermentation periods (FP), and four replications per treatment. The microbial inoculants evaluated were: control (CTRL, without inoculant); strain AV14.17 - *Lactiplantibacillus pentosus* (ISO); and commercial inoculant (CI). Fermentation periods (FP) corresponded to 3, 14, 30, and 60 d after ensiling. There was an effect ($P \leq 0.05$) of the $I \times H \times FP$ interaction on the content of water-soluble carbohydrates and enterobacteria. An effect ($P \leq 0.05$) of the $H \times FP$ interaction was observed on the populations of lactic acid bacteria, yeast, and molds. Soybean silages harvested at stage R6 showed higher α -diversity, followed by higher values for the Shannon index and Chao1 index, respectively. It is recommended to harvest soybeans at stage R6 and use a microbial inoculant for better fermentation profile and nutritional value, in addition to high dry matter yield. **Chapter 3** – It was evaluated the effects of silage of sugarcane exclusively (SC) or in the form of total mixed ration (TMR), with or without *Lentilactobacillus buchneri* (LB), on chemical composition, fermentative profile, aerobic stability (Experiment 1), intake, digestibility, rumen parameters, nitrogen balance and microbial protein synthesis (Mic) in beef cattle (Experiment 2). Sugarcane was processed and treated with LB 40788 LalSil Cana (Lallemand®, Brazil) [3×10^5 colony forming units (cfu) g^{-1} ; LB] or distilled water [5 mL kg^{-1} ; (control, CTRL)] and

ensiled. Lower ($P<0.05$) yeasts and lactic acid bacteria counts, as well as dry matter losses were observed in TMR silages, both in the absence and in the presence of the inoculant. Silages treated with LB showed lower pH values than silage exclusively made from sugarcane or in the form of TMR. In experiment 2, an effect ($P<0.05$) of inoculant on dry matter and total digestible nutrients intake was observed. There was an effect ($P<0.05$) of silage on the consumption of dry matter, organic matter, insoluble neutral detergent fiber corrected for ash and protein, starch, ether extract, and non-fibrous carbohydrates, with higher values in diets based on ensiled TMR. Higher ($P<0.05$) Mic was observed in diets based on ensiled TMR. Therefore, it is recommended the ensiling of sugarcane in the RMT form, using a microbial inoculant.

Keywords: *Arachis pintoi*. Digestibility. *Glycine max*. Inoculant. 16S rDNA.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO I - DIVERSIDADE MICROBIANA E CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS DE SILAGENS DE AMENDOIM FORRAGEIRO COLHIDO EM DUAS IDADES DE REBROTAÇÃO, TRATADAS COM INOCULANTE MICROBIANO	23
INTRODUÇÃO.....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS.....	33
DISCUSSÃO.....	54
CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
CAPÍTULO II - PERFIL FERMENTATIVO E DIVERSIDADE MICROBIANA DE SILAGEM DE SOJA, COLHIDA EM DOIS ESTÁGIOS DE MATURIDADE, TRATADAS COM INOCULANTES MICROBIANOS	71
Introdução	73
Material e Métodos.....	75
Resultados	87
Discussão	110
Conclusões	117
Referências.....	118
CAPÍTULO III – EFEITO DE <i>Lentilactobacillus buchneri</i> EM CANA-DE-AÇÚCAR ENSILADA COMO RAÇÃO EM MISTURA TOTAL SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS, ESTABILIDADE AERÓBIA, CONSUMO E PARÂMETROS RUMINAIS DE BOVINOS DE CORTE	125
Introdução	127
Material e Métodos.....	129
Resultados	142
Discussão	155
Conclusões	165
Referências.....	166
CONCLUSÕES GERAIS	173

INTRODUÇÃO GERAL

A pecuária bovina é um dos setores de destaque do agronegócio brasileiro e da economia nacional. O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo (\pm 213,68 milhões de animais), com exportações de carne bovina de 1.866 milhão de toneladas, movimentando US\$ 7,65 bilhões, compondo 8,5% do Produto Interno Bruto (PIB) em 2019 (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne, 2020). Além disso, o país foi o terceiro maior produtor mundial de leite, com 33,840 bilhões de litros produzidos em 2018 (Rocha et al., 2020).

Devido à crescente demanda por grãos como milho e soja na alimentação humana e animal, associado ao alto preço desses ingredientes, isto pode inviabilizar seu uso na alimentação animal (Copani et al., 2016; Ruiz et al., 2020). As culturas de milho e sorgo são as principais culturas utilizadas para confecção de silagem, devido à facilidade de cultivo, altos rendimentos de biomassa e pela qualidade da silagem produzida. Porém, essas culturas apresentam baixo teor proteico. Assim, a utilização de silagens de leguminosas é uma alternativa para aumentar o teor de proteína das dietas, além de ser fonte de cálcio e fósforo (Gandra et al., 2018; Rosa et al., 2018).

A ensilagem de culturas forrageiras consiste em um processo de conservação de alimentos em meio ácido, devido a conversão de carboidratos solúveis em água (CHOs) em ácidos orgânicos, os quais promovem a redução do pH e conservação do material. Assim, o principal objetivo no processo de ensilagem é conservar a forragem, com menores perdas possíveis, e que o produto final se assemelhe ao material de origem (Kung Junior et al., 2018).

A silagem de leguminosa apresenta-se como alimento de alto valor nutritivo, devido principalmente aos teores elevados de proteínas e minerais quando comparado com a silagem de gramíneas. Apesar dessas vantagens, para se produzir silagem de leguminosas de qualidade é preciso atentar-se para algumas limitações que podem ocorrer devido as características intrínsecas que às leguminosas possuem como baixos teores de matéria seca (MS), de CHOs, bem como elevada capacidade tampão (Purwin et al., 2015).

Visando melhorar a qualidade da fermentação em silagens de leguminosas, recomenda-se o uso de inoculantes microbianos, compostos por cepas de bactérias do ácido láctico, com taxas mínimas de inoculação de 1×10^5 unidades formadoras de colônia por grama de forragem, que desempenham o papel de dominar a massa

ensilada, produzir altas quantidades de ácidos orgânicos, promover rápida redução do pH e conservação do material (Muck et al., 2018).

A soja é uma cultura de ciclo anual, originária da Ásia, introduzida no início do século XVIII na América do Norte, posteriormente se disseminou por todo o globo como fonte de forragem. No decorrer do tempo houve melhoramento genético da cultura, permitindo o cultivo da soja em climas distintos. O cultivo da soja na atualidade possui alto grau de tecnificação, com destaque para a produção de grãos, como fonte de óleo e proteína na alimentação humana e animal (Ruiz et al., 2020).

Atualmente, a soja *Glycine max* (L) Merrill é uma das leguminosas mais cultivadas no mundo, o Brasil é o maior produtor mundial da cultura, movimentando mais de US\$ 30 bilhões em 2020, fazendo parte do grupo EUA, China e Índia. O Brasil apresenta recordes em produtividade, atingindo na safra 2020 / 2021 135 ± 5 milhões de toneladas de grãos de soja, deste montante 85 ± 3 milhões de toneladas foram exportadas (USDA, 2020).

Castro-Montoya e Dickhoefer (2018) constataram que as silagens de leguminosas têm potencial de manter ou aumentar a produtividade de bovinos, mesmo sob condições em que a ingestão de matéria seca e a digestibilidade da matéria orgânica diminuem. Os mecanismos para esses fenômenos, no entanto, ainda são incertos e só podem ser levantadas hipóteses de que fatores relacionados a um melhor fornecimento de nutrientes dietéticos ao duodeno, um aumento na síntese de proteína microbiana, uma reciclagem mais eficiente do nitrogênio disponível no rúmen e uma maior digestibilidade de nutrientes pós-rúmen.

Rosa et al. (2020) avaliaram a composição química em silagens de soja colhidas no estágio R6, com (I) ou sem (C) inoculante microbiano, com (M) ou sem melaço e interação (I + M) em 1, 3, 14, 28 e 56 dias após ensilagem. Os autores recomendam a adição de inoculante associado ou não ao melaço, por melhorar a composição química das silagens. Por outro lado, Rigueira et al. (2015) em ensaio com bovinos de corte alimentados com silagem de soja verificaram que silagens aditivadas com melaço ou aditivo microbiano e promoveram maiores consumos voluntários de MS e maior digestibilidade dos nutrientes, sem alterar o desempenho.

Estudos envolvendo a inclusão de silagens de leguminosas sobre o desempenho animal indicam que a inclusão de silagens de leguminosas não deve exceder 50% da MS total da dieta (Felton e Kerley, 2004; Vargas-Bello-Pérez et al., 2008; Touno et al., 2014). No entanto, para silagem de soja, devido ao alto teor de

gordura, a recomendação de inclusão varia entre 30 a 40% da MS total da dieta (Undersander et al., 2007).

O amendoim forrageiro da espécie *Arachis pintoii* Krapov. & W.C. Gregory é uma leguminosa, originário da América do Sul, possui elevada persistência, resistente ao pastejo, tolerante ao sombreamento e possui elevado valor nutritivo, com produção de MS entre 5 a 10 t ha⁻¹ ano⁻¹ (Paulino et al., 2009). Devido as características que o amendoim forrageiro possui, seu uso destaca-se em consórcio com gramíneas forrageiras, contribuindo para menor dependência no uso de fertilizantes nitrogenados, podendo diminuir também o uso de cereais proteicos na dieta animal, com finalidade de pastejo animal ou uso individual como banco de proteína (Baptista et al., 2007). Além do pastejo, seu uso tem despertado interesse como silagem, sendo necessário a realização de estudos que gerem informações técnico-científicas.

Possentti et al. (2010) estudaram os efeitos do emurchecimento (4 horas exposição) e uso de inoculante microbiano sobre as características fermentativas, composição química e valor nutritivo de silagens de amendoim forrageiro cv. Belmonte, verificaram que houve efeito do emurchecimento com redução das concentrações de nitrogênio amoniacal, sem alterar seu valor nutritivo.

Objetivando caracterizar as comunidades microbianas através de técnicas moleculares em silagens de amendoim forrageiro após 1, 3, 7, 14, 28 e 56 dias após ensilagem, Leandro et al. (2019) verificaram alterações dos grupos microbianos em função dos períodos de fermentação, com predominância do gênero *Weissella* em todos os períodos, seguindo de bactérias pertencentes a outros gêneros (*Bacillus*, *Enterococcus* e *Pediococcus*), com predominância do gênero *Lactoplantibacillus* aos 56 dias de fermentação.

O avanço das tecnologias de biologia molecular possibilitou o uso de técnicas para o estudo de microrganismos não cultiváveis que estão presentes em um dado ecossistema. Através da identificação genômica (material genético), utilizando-se o DNA (ácido desoxirribonucleico), é possível obter com maior acurácia os microrganismos presentes em um determinado ambiente (Gallagher et al., 2018; McAllister et al., 2018).

Dessa forma, conhecer o microbioma de silagens pode contribuir para um melhor entendimento de como as comunidades microbianas se desenvolvem e seus efeitos na fermentação da silagem e ruminal. Com uma melhor compreensão destes processos, pode-se melhorar a qualidade, a estabilidade das silagens, como também

obter maior eficiência de fermentação ruminal (McCann et al., 2017; Tennant et al., 2017).

Com o intuito de melhorar a qualidade de silagens, o uso de inoculante microbiano é recomendado, seja em silagens de leguminosas ou em silagens de gramíneas, como exemplo da cana-de-açúcar, que se caracteriza como volumoso interessante de ser utilizado na alimentação de ruminantes em condições tropicais, pois a cana-de-açúcar possui elevado potencial de produção de forragem (Voltolini et al., 2012). O alto desempenho de produção e energia por unidade de área desperta o interesse dos produtores em usar a cana-de-açúcar, com crescente valorização do cultivo, em especial para a região Sudeste do Brasil (Dos Santos et al., 2018). No entanto, o uso da forragem *in natura* tem um custo operacional elevado devido à necessidade de mão-de-obra diária para o corte, processamento, transporte e fornecimento aos animais, que apresenta dificuldades em ser utilizada para grandes rebanhos (Sá Neto et al., 2013).

A cana-de-açúcar possui características favoráveis para a ensilagem, como adequado teor de MS (26,1 a 33%) ao atingir o ponto de colheita, CHOs de $20,5 \pm 4\%$ e baixo poder tamponante (Da Cruz et al., 2014). No entanto, a rota fermentativa da cana-de-açúcar ensilada é caracterizada por produzir considerável concentração de etanol por leveduras, o que limita o consumo animal e ainda leva a uma significativa perda do valor nutritivo da forragem, durante a conversão de sacarose para álcool, ocasionando elevadas perdas de matéria seca e energia (Ávila et al., 2014).

Mesmo com o benefício da logística e operacionalidade, o uso exclusivo da cana-de-açúcar, sem aditivos no processo de ensilagem não se justifica, uma vez que se comporta como fonte pouco interessante de volumoso suplementar, com valor nutritivo muito inferior à cana *in natura* (Schmidt et al., 2007). Portanto, deve-se considerar a possibilidade de usar aditivos durante a ensilagem que possibilitem melhor padrão fermentativo, minimizem as perdas de valor nutritivo e permitam maior estabilidade aeróbia após a abertura.

Para conseguir eficiência produtiva, seja para produção de leite, carne ou lã, a dieta dos animais deve ser equilibrada, de forma que atendam às exigências nutricionais dos animais para que estes possam expressar seu máximo potencial produtivo. Assim, a utilização de alimentos na alimentação animal merece destaque, pois a maior proporção das despesas totais oriundas de um sistema de produção animal são advindas com a alimentação (Gusmão et al., 2018).

Visando mitigar a fermentação alcoólica e as perdas que ocorrem naturalmente na ensilagem de cana-de-açúcar tem-se como alternativa ensilar a cana na forma de ração em mistura total (RMT). O conceito básico dessa técnica consiste em selecionar previamente os ingredientes (forragens, subprodutos, concentrados, minerais, vitaminas e aditivos) a serem utilizados para se confeccionar a ração, ter conhecimento da composição química de cada ingrediente, e, com essas informações, deve-se realizar a formulação da dieta e a mistura dos ingredientes que atenda as exigências nutricionais de uma determinada espécie ou categoria animal (Bueno et al., 2020).

A mistura dos ingredientes na forma de RMT, pode também ser ensilada, como uma alternativa de aproveitar forrageiras e resíduos agroindustriais com elevado teor de umidade, reduzir perdas e melhorar a estabilidade aeróbia destas misturas. A confecção de RMT *in natura* ou ensilada tem sido uma prática estudada em vários países da Ásia, como Japão, China e Tailândia, recentemente, pesquisas com silagem de RMT tem sido iniciadas no Brasil (Gusmão et al., 2018; Macêdo et al., 2018; Fang et al., 2020; Dong et al., 2021; Lazzari et al., 2021).

A silagem de RMT é uma tecnologia utilizada no intuito de diminuir os custos com mão-de-obra, diminuir dependência de maquinários, bem como permitir a terceirização do serviço, aumentar o valor agregado e possibilitar a comercialização (Bueno et al., 2020). Pode-se ainda melhorar a eficiência produtiva, devido ao aumento da digestibilidade do amido. Ao utilizar grãos de cereais (milho fubá) que serão fermentados de forma contínua no rúmen, os nutrientes podem ser mais bem aproveitados no trato gastrointestinal, principalmente no rúmen, com aumentos na população de bactérias, de ácidos orgânicos e aumento da produção animal (Miyaji e Nonaka, 2018; Restelatto et al., 2019; Lazzari et al., 2021).

A cana-de-açúcar é um volumoso que pode ser usado na forma *in natura* ou de silagem. Porém, elevadas perdas ocorrem durante o processo de fermentação da cana-de-açúcar, devido à fermentação alcoólica, resultando em silagens com baixa estabilidade aeróbia (Daniel et al., 2013; Silva et al., 2018). Acredita-se, que a ensilagem oriunda da mistura da cana-de-açúcar com concentrado, possa resultar em uma silagem de RMT de qualidade, capaz de reduzir as perdas fermentativas e melhorar a estabilidade aeróbia.

Chen et al. (2016) avaliaram as características fermentativas, químicas e estabilidade aeróbia de silagens de RMT a base de aveia e ervilhaca tratadas com

diferentes aditivos químicos ou microbianos, verificaram que todas as silagens de RMT fermentaram adequadamente, apresentando estabilidade aeróbia superior a 280 h.

Estudos que avaliaram o perfil fermentativo e a qualidade da silagem de leguminosas, considerando o uso combinado de inoculantes microbianos e estratégias de colheita são inexistentes. Logo, tais investigações podem resultar em recomendações práticas do ponto de colheita e uso de inoculante na confecção de silagens de leguminosas, visando elevar a qualidade da silagem produzida.

Bem como estudos sobre o perfil fermentativo e qualidade da silagem de cana-de-açúcar ensilada como RMT, e seus efeitos sobre o uso de inoculante microbiano, o consumo e a digestibilidade dos nutrientes em bovinos de corte, são inexistentes, indicando a necessidade de desenvolvimento de trabalhos nessa área.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE, 2020. Perfil da pecuária no Brasil. BeefREPORT 49.
- Ávila, C.L.S., Carvalho, B.F., Pinto, J.C., Duarte, W.F., Schwan, R.F., 2014. The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. *J. Dairy Sci.* 97, 940–951. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6987>
- Baptista, C.R.W., Moretini, C.A., Martinez, J.L., 2007. *Arachis pintoi*, palatabilidade, crescimento e valor nutricional frente ao pastoreio de equinos adultos. *Rev. Acadêmica* 5, 353–357.
- Bueno, A.V.I., Lazzari, G., Jobim, C.C., Daniel, J.L.P., 2020. Ensiling total mixed ration for ruminants: A review. *Agronomy* 10, 1–18. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060879>
- Castro-Montoya, J., Dickhoefer, U., 2018. Effects of tropical legume silages on intake, digestibility and performance in large and small ruminants: A review. *Grass Forage Sci.* 73, 26–39. <https://doi.org/10.1111/gfs.12324>
- Chen, L., Guo, G., Yuan, X., Zhang, J., Li, J., Shao, T., 2016. Effects of applying molasses, lactic acid bacteria and propionic acid on fermentation quality, aerobic stability and in vitro gas production of total mixed ration silage prepared with oat-common vetch intercrop on the Tibetan Plateau. *J. Sci. Food Agric.* 96, 1678–1685. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7271>
- Copani, G., Niderkorn, V., Anglard, F., Quereuil, A., Ginane, C., 2016. Silages containing bioactive forage legumes: a promising protein-rich feed source for growing lambs. *Grass Forage Sci.* 71, 622–631. <https://doi.org/10.1111/gfs.12225>
- Da Cruz, L.R., Geraseev, L.C., Do Carmo, T.D., Santos, L.D.T., Barbosa, E.A.,

- Costa, G.A., Dos Santos Junior, A., 2014. Características agronômicas e composição bromatológica de variedades de cana-de-açúcar. *Biosci. J.* 30, 1779–1786.
- Daniel, J.L.P., Weiß, K., Custódio, L., Neto, A.S., Santos, M.C., Zopollatto, M., Nussio, L.G., 2013. Occurrence of volatile organic compounds in sugarcane silages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 185, 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.06.011>
- Dong, Z., Wang, S., Zhao, J., Li, J., Liu, Q., Bao, Y., Shao, T., 2021. Evaluating fermentation quality, in vitro digestibility and aerobic stability of a total mixed ration ensiled with different additives on Tibet plateau. *Anim. Biosci.* 34, 223–232. <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0972>
- Dos Santos, K.C., Magalhães, A.L.R., da Conceição, M.G., de Carvalho, F.F.R., Ferreira, G.D.G., 2018. Common bean residue as additive in sugarcane silage. *Rev. Cienc. Agron.* 49, 159–166. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20180018>
- Fang, J., Xia, G., Cao, Y., 2020. Effects of replacing commercial material with apple pomace on the fermentation quality of total mixed ration silage and its digestibility, nitrogen balance and rumen fermentation in wethers. *Grassl. Sci.* 66, 124–131. <https://doi.org/10.1111/grs.12258>
- Felton, E.E.D., Kerley, M.S., 2004. Performance and carcass quality of steers fed whole raw soybeans at increasing inclusion levels¹. *J. Anim. Sci.* 82, 725–732. <https://doi.org/10.2527/2004.823725x>
- Gallagher, D., Parker, D., Allen, D.J., Tsesmetzis, N., 2018. Dynamic bacterial and fungal microbiomes during sweet sorghum ensiling impact bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 264, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.053>
- Gandra, J.R., Takiya, C.S., Del Valle, T.A., Oliveira, E.R., de Goes, R.H.T.B., Gandra, E.R.S., Batista, J.D.O., Araki, H.M.C., 2018. Soybean whole-plant ensiled with chitosan and lactic acid bacteria: Microorganism counts, fermentative profile, and total losses. *J. Dairy Sci.* 101, 7871–7880. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14268>
- Gusmão, J.O., Danés, M.A.C., Casagrande, D.R., Bernardes, T.F., 2018. Total mixed ration silage containing elephant grass for small-scale dairy farms. *Grass Forage Sci.* 73, 717–726. <https://doi.org/10.1111/gfs.12357>
- Kung Junior, L., Shaver, R.D., Grant, R.J., Schmidt, R.J., 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 101, 4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
- Lazzari, G., Poppi, A.C.O., Machado, J., Bueno, A.V.I., Gomes, A.L.M., Jobim, C.C., Daniel, J.L.P., 2021. Effects of protein source and lipid supplementation on conservation and feed value of total mixed ration silages for finishing beef cattle. *J. Anim. Sci.* 99, 1–13. <https://doi.org/10.1093/jas/skab032>
- Leandro, E. dos S., de Oliveira, M.N.V., Rufino, L.D., Ribeiro, K.G., Pereira, O.G., 2019. Microbial characterization of *Arachis pintoi* and its silages at different fermentation periods. *Mol. Biol. Rep.* 46, 5019–5024. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04952-y>

- Macêdo, A.J. da S., Santos, E.M., de Araújo, G.G.L., Edvan, R.L., de Oliveira, J.S., Perazzo, A.F., Sá, W.C.C. dos S., Pereira, D.M., 2018. Silages in the form of diet based on spineless cactus and buffelgrass. *African J. Range Forage Sci.* 35, 121–129. <https://doi.org/10.2989/10220119.2018.1473494>
- 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. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13704>
- McCann, J.C., Elolimy, A.A., Loo, J.J., 2017. Rumen Microbiome, Probiotics, and Fermentation Additives. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 33, 539–553. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.06.009>
- Miyaji, M., Nonaka, K., 2018. Effects of altering total mixed ration conservation method when feeding dry-rolled versus steam-flaked hulled rice on lactation and digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101, 5092–5101. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13802>
- Muck, R.E., Nadeau, E.M.G., McAllister, T.A., Contreras-Govea, F.E., Santos, M.C., Kung, L., 2018. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *J. Dairy Sci.* 101, 3980–4000. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>
- Paulino, V.T., Júnior, E.F., Possenti, R.A., Lucenas, T.L. de, 2009. Silagem de amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) cv. Belmonte) com diferentes aditivos. *Bol. da Indústria Anim.* 66, 33–43.
- Possenti, R.A., Ferreira Júnior, E., Paulino, V.T., Otsuk, I.P., Brás, P., 2010. Efeito do emurhecimento e da adição de aditivo biológico na degradabilidade in situ e composição físico-química da silagem de *Arachis pintoi* cv Belmonte. *Bol. Indústria Anim.* 67, 45–56.
- Purwin, C., Fijałkowska, M., Lipiński, K., Wierzbowska, J., Kobzhassarov, T.Z., Michalski, J., 2015. Changes in the amino acid composition during the ensiling of lucerne and red clover in round bales. *J. Elem.* 20, 965–973. <https://doi.org/10.5601/jelem.2015.20.1.863>
- Restelatto, R., Novinski, C.O., Pereira, L.M., Silva, E.P.A., Volpi, D., Zopollatto, M., Schmidt, P., Faciola, A.P., 2019. Chemical composition, fermentative losses, and microbial counts of total mixed ration silages inoculated with different *Lactobacillus* species. *J. Anim. Sci.* 97, 1634–1644. <https://doi.org/10.1093/jas/skz030>
- Rigueira, J.P.S., Pereira, O.G., Valadares Filho, S. de C., Ribeiro, K.G., Garcia, R., Cezário, A.S., 2015. Silagem de soja na dieta de bovino de corte. *Acta Sci. - Anim. Sci.* 37, 61–65. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v37i1.25182>
- Rocha, D.T. da da, Carvalho, G.R., Resende, J.C. de, 2020. Cadeia produtiva do leite no Brasil : produção primária (Circular Técnica 123).
- Rosa, L.O., Pereira, O.G., Ribeiro, K.G., Valadares Filho, S. de C., Cecon, P.R., 2020. Chemical composition in soybean silages with inoculant and molasses. *Cienc. Anim. Bras.* 21, e582011. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v21e-58211>
- Rosa, L.O., Pereira, O.G., Ribeiro, K.G., Valadares Filho, S.C., Cecon, P.R., 2018. Fermentation profile and microbial population in soybean silages with inoculant

- and powdered molasses. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 70, 1586–1594.
<https://doi.org/10.1590/1678-4162-9500>
- Ruiz, N., Parsons, C.M., Stein, H.H., Coon, C.N., Eys, J.E. Van, Miles, R.D., 2020. A review : 100 years of soybean meal. *Feedstuffs* 3, 1–38.
<https://doi.org/https://www.feedstuffs.com/news/review-100-years-soybean-meal>
- Sá Neto, A. de, 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*. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 48, 528–535.
<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000500009>
- Schmidt, P., Mari, L.J., Nussio, L.G., Pedroso, A. de F., Paziani, S. de F., Wechsler, F.S., 2007. Aditivos químicos e biológicos na ensilagem de cana-de-açúcar: 1. composição química das silagens, ingestão, digestibilidade e comportamento ingestivo. *Rev. Bras. Zootec.* 36, 1666–1675. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982007000700027>
- 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.
<https://doi.org/10.1111/gfs.12360>
- Tennant, R.K., Sambles, C.M., Diffey, G.E., Moore, K.A., Love, J., 2017. Metagenomic analysis of silage. *J. Vis. Exp.* 119, 1–11.
<https://doi.org/10.3791/54936>
- Touno, E., Kaneko, M., Uozumi, S., Kawamoto, H., Deguchi, S., 2014. Evaluation of feeding value of forage soybean silage as a substitute for wheat bran in sheep. *Anim. Sci. J.* 85, 46–52. <https://doi.org/10.1111/asj.12091>
- Undersander, D., Jarek, K., Anderson, T., 2007. A Guide to Making Soybean Silage. *Plant Manag. Netw.* 1–4. <https://doi.org/10.1094/FG-2007-0119-01-MG.Adverse>
- USDA, 2020. United States Department of Agriculture Economic Research Service [WWW Document]. *Econ. Res. Serv. Mark. Outlook; Soybeans Oil Crop. Livestock, Dairy, Poultry Outlook.* URL <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/OCS/OCS-03-11-2011.pdf> (accessed 8.13.21).
- Vargas-Bello-Pérez, E., Mustafa, A.F., Seguin, P., 2008. Effects of feeding forage soybean silage on milk production, nutrient digestion, and ruminal fermentation of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91, 229–235.
<https://doi.org/10.3168/jds.2007-0484>
- Voltolini, T.V., Silva, J.G. da, Silva, W.E. de L., Nascimento, J.M.L. do, Queiroz, M.A.Á., Oliveira, A.R. de, 2012. Valor nutritivo de cultivares de cana-de-açúcar sob irrigação. *Rev. Bras. Saúde e Produção Anim.* 13, 894–901.
<https://doi.org/10.1590/s1519-99402012000400001>

CAPÍTULO I - DIVERSIDADE MICROBIANA E CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS DE SILAGENS DE AMENDOIM FORRAGEIRO COLHIDO EM DUAS IDADES DE REBROTAÇÃO, TRATADAS COM INOCULANTE MICROBIANO

Título resumido: Diversidade microbiana e características fermentativas de silagem de amendoim forrageiro

Capítulo formatado de acordo com o periódico científico: *Grass and Forage Science*, exceto a disposição de tabelas e figuras

Resumo

Foram avaliadas as características fermentativas, a diversidade microbiana e a composição química de silagens de amendoim forrageiro colhidos em duas idades de rebrotação, tratados com inoculantes microbianos, em diferentes períodos de fermentação. Foi usado o delineamento em blocos casualizados, com duas idades de rebrotação (R), três inoculantes microbianos (I), quatro períodos de fermentação (P), arranjado em esquema fatorial $2 \times 3 \times 4$, com quatro repetições. As duas idades de rebrotação (R) foram: 40 e 80 d. Os inoculantes (I) foram: controle (CONT, sem inoculante); cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus* (ISO); e inoculante comercial (IC). Os períodos de fermentação (P) foram: 3, 14, 30 e 60 d após a ensilagem. Houve efeito de interação $R \times I \times P$ ($P \leq 0,05$) para N-NH₃ e para leveduras. Houve efeito de interação $I \times P$ ($P \leq 0,05$) para pH, CHOs, N-NH₃, bactérias ácido lácticas, leveduras e para fungos filamentosos. As silagens inoculadas apresentaram menores valores de pH, N-NH₃, menores populações de enterobactérias, de leveduras e de fungos filamentosos comparadas ao CONT. As silagens inoculadas com ISO apresentaram maior abundância relativa para o gênero *Lactiplantibacillus* e menor do gênero *Enterobacter*. As silagens inoculadas com IC e ISO apresentaram predominância das famílias *Lactobacillaceae*. Em ambas as idades de rebrotação houve predomínio dos filos *Proteobacteria* e *Firmicutes*. O uso de inoculante microbiano melhora a qualidade da silagem de amendoim forrageiro. Recomenda-se o uso de inoculante microbiano na ensilagem de amendoim forrageiro aos 80 d de rebrota por promover melhorias das características fermentativas associado ao maior rendimento por área.

PALAVRAS-CHAVE

Arachis pintoii, bactéria ácido láctica, inoculante, valor nutritivo, 16S rDNA

INTRODUÇÃO

O amendoim forrageiro (*Arachis pintoii* Krapov. & W.C. Gregory) é uma leguminosa perene endêmica da América do Sul, adaptada à solos ácidos de baixa a média fertilidade, com produção anual de matéria seca (MS) entre 5 a 13 t/ha (WingChing-Jones & Rojas-Bourrillón, 2006), elevado valor nutritivo (Fernandes et al., 2017; Paulino et al., 2009) e alta capacidade de fixar nitrogênio (N) (120 a 280 kg N/ha/ano) (Dubeux Junior et al., 2017). Essa leguminosa pode ser usada para pastejo, produção de feno ou de silagem (WingChing-Jones & Rojas-Bourrillón, 2006).

WingChing-Jones & Rojas-Bourrillón (2006) recomendam a ensilagem de amendoim forrageiro em regiões tropicais, onde a produção de feno é limitada pelo clima úmido. A silagem pode ser fornecida para os animais em períodos de escassez ou de forma a intensificar o sistema pecuário, ao incluir na dieta uma forragem rica em proteína (Ferreira et al., 2012). Devido às características atrativas que o amendoim possui, sua incorporação na dieta animal poderia reduzir os custos com alimentos proteicos convencionais (Possenti et al., 2010).

As leguminosas forrageiras possuem fatores limitantes para ensilagem, como baixo teor de carboidratos solúveis em água (CHOs), baixo teor de MS e elevada capacidade tampão (Albrecht & Beauchemin, 2003). Contudo, essas limitações têm sido superadas com o uso de estratégias adequadas como a prática do emurhecimento e o uso de inoculantes, possibilitando a produção de silagens de leguminosas de qualidade (Agarussi et al., 2018; Đorđević et al., 2021).

A inoculação da forragem com bactérias ácido lácticas (BAL) no momento da ensilagem tem melhorado a fermentação, bem como reduzido as perdas e inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis em várias espécies forrageiras em condições de clima temperado e tropical (Muck et al., 2018; Agarussi et al., 2019; Đorđević et al., 2019; Silva et al., 2020). No entanto, estudos sobre inoculantes em silagens de amendoim forrageiro realizados em condições tropicais são escassos (Leandro et al., 2019).

A maioria dos inoculantes microbianos comerciais foram desenvolvidos em condições de clima temperado (Muck et al., 2018; Fabiszewska et al., 2019), existindo pouca evidência comparativa entre essas cepas microbianas e aquelas obtidas em

condições tropicais (Muck et al., 2018; Carvalho et al., 2021). Alguns estudos realizados no Brasil demonstraram que cepas de BAL obtidas em clima tropical melhoraram as características fermentativas de silagens de alfafa (Agarussi et al., 2019; Silva et al., 2020), indicando assim que o uso de cepas de BAL isoladas de plantas forrageiras tropicais pode ser uma alternativa para melhorar o perfil de fermentação da silagem produzida em regiões tropicais.

A avaliação de parâmetros fermentativos e da composição química da silagem são indicativos da qualidade final da silagem (Ren et al., 2020), enquanto que a avaliação da dinâmica microbiana usando técnicas moleculares de última geração por métodos independentes de cultivo, através do sequenciamento de genes específicos 16S / 18S rDNA poderá fornecer maiores detalhes sobre a ecologia microbiana durante o processo de ensilagem e como esta se modifica em função da inoculação (McAllister et al., 2018; Yang et al., 2019; Zhao et al., 2021). Assim, a combinação de técnicas convencionais com as técnicas moleculares recentes poderão contribuir para uma melhor compreensão da diversidade microbiana e como os efeitos da inoculação podem alterar a qualidade em silagens de leguminosas (Ali et al., 2020; Ren et al., 2020).

Portanto, considerando-se a escassez de estudos envolvendo a avaliação do perfil fermentativo e a diversidade microbiana em silagem de amendoim forrageiro, propõe-se o presente estudo. A nossa hipótese é que silagens de amendoim forrageiro de diferentes idades de rebrotação, tratadas com inoculantes bacterianos apresentam perfil fermentativo e diversidade microbiana distintos.

Objetivou-se avaliar o efeito da idade de rebrotação, adição de inoculantes microbianos e períodos de fermentação distintos sobre as características fermentativas, dinâmica das comunidades microbianas, composição química e digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) de silagens de amendoim forrageiro.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local experimental e manejo do amendoim forrageiro

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia, Laboratório de Forragicultura e Microbiologia da Silagem, situado em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. O município possui altitude de \cong 649 m, latitude Sul 20°45'14" e longitude Oeste 42°52'54". O clima é classificado como Cwa (clima

subtropical) (Köppen, 1918), com verões quentes e úmidos, invernos frios e secos, médias anuais de precipitação e temperatura de $\cong 1.200$ mm e $\cong 21$ °C, respectivamente (Universidade Federal de Viçosa, 2021). Os dados climáticos durante o manejo do amendoim forrageiro estão na Tabela 1.

Tabela 1. Precipitação pluvial (Prec), temperatura e umidade relativa do ar (UR) durante o crescimento do amendoim forrageiro em 2019.

Mês	Índices climáticos ¹				
	Prec. (mm)	T. média (°C)	T. mín. (°C)	T. máx. (°C)	UR (%)
Fevereiro	155,80	22,99	22,40	23,63	81,44
Março	130,80	22,49	21,89	23,19	82,43
Abril	114,80	21,82	21,21	22,47	84,41
Mai	0,80	20,66	20,19	21,18	87,23

Fonte: Boletim Meteorológico da Universidade Federal de Viçosa (2021).

¹T. média, Temperatura média (°C); T. mín., Temperatura mínima (°C); T. máx., Temperatura máxima (°C).

O amendoim forrageiro cv. Belmonte utilizado pertence a uma área já estabelecida de 1.500 m², em um solo classificado como Argiloso (Santos et al., 2013). Foi realizada a amostragem do solo (0-20 cm profundidade) da área experimental para análise química. As informações referentes às características químicas do solo são apresentadas na Tabela 2. As correções da acidez e da fertilidade do solo foram realizadas conforme a exigência da cultura do amendoim.

Tabela 2. Atributos químicos do solo da área experimental.

pH	P	K ⁺	Na	H ⁺ +Al ⁺³	Al ⁺³	Ca ⁺²	Mg ⁺²	SB	CTC	V	MO
H ₂ O	----mg/dm ³ ---	-----cmol _c /dm ³ -----							%	g/kg	
4,70	2,20	55	0,00	6,27	0,40	1,37	0,43	1,94	2,34	23,60	8,54

pH, Potencial hidrogeniônico; P, Fósforo; K⁺, Potássio; Na⁺, Sódio; H⁺+Al⁺³, Acidez potencial; Al⁺³, Alumínio; Ca⁺², Cálcio; Mg⁺², Magnésio; V%, Saturação de bases; CTC, Capacidade de troca catiônica; MO, Matéria orgânica; SB, Soma de bases.

A calagem e a adubação foram realizadas de acordo com os resultados da análise de solo. Na calagem foram aplicados 2,2 t/ha de calcário dolomítico (75% PRNT) (Minasol®, Arcos-MG, Brasil). Na adubação de manutenção, foram aplicados 30 kg/ha de P₂O₅ e 40 kg/ha de K₂O, utilizando-se os adubos Superfosfato simples e Cloreto de potássio, respectivamente (Fertilizantes Heringer®, Manhuaçu-MG, Brasil). A adubação e os tratos culturais foram realizados conforme as recomendações do Manual de cultivo agrícola (5ª Aproximação) para o estado de Minas Gerais, Brasil (Ribeiro et al., 1999).

2.2 Delineamento experimental, colheita e ensilagem

O experimento foi realizado em blocos casualizados, com duas idades de rebrotação (R), três inoculantes (I), quatro períodos de fermentação (P), arranjado em esquema fatorial 2 × 3 × 4, com quatro repetições. As duas idades de rebrotação foram: 40 e 80 d. Os inoculantes foram: controle, sem inoculante (CONT); cepa AV14.17 - *Lactiplantibacillus pentosus* (ISO); e inoculante comercial (IC). Os períodos de fermentação foram: 3, 14, 30 e 60 d após a ensilagem.

As parcelas experimentais no campo foram arranjadas conforme descrito por Gomes et al. (2019). Para proporcionar a colheita da forragem de ambas idades de rebrota no mesmo dia, foi realizado primeiro um corte de uniformização no material correspondente aos 80d de rebrota, em 08 de Fevereiro de 2019 e, na sequência naquele da idade mais precoce em 20 de Março de 2019. Os cortes de uniformização foram a 5 cm acima do nível do solo, sendo a colheita realizada em 02 de Maio de 2019.

A colheita do amendoim forrageiro nas duas idades de rebrotação (40 d e 80 d) foi realizada com roçadeira costal (FR-220, Stihl®, São Leopoldo-RS, Brasil). Após o corte, o material permaneceu no campo por 6 h para emurchecimento. Posteriormente, o material foi processado em máquina forrageira estacionária (PN Plus 2000, Nogueira®, São João da Boa Vista-SP, Brasil) em tamanhos de partículas de 1,5 cm.

Foi utilizado o inoculante comercial Sil-All 4 × 4 (Lallemand®, Patos de Minas-MG, Brasil), que é constituído por *Lactiplantibacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium*, *Lactiplantibacillus salivarius*, sacarose, dióxido de silício, amilase, celulase, hemicelulase e xilanase. A cepa AV14.17 - *Lactiplantibacillus pentosus*, foi isolada da silagem de alfafa em condições tropicais (Silva et al., 2020).

O inoculante comercial foi aplicado na dosagem recomendada pelo fabricante [1×10^5 unidade formadora de colônia (ufc)/g forragem (5 g/t de forragem)], e diluído em 50 mL de água destilada. A cepa AV14.17 também foi aplicada em 1 kg de forragem, na dosagem de 10^5 ufc/g forragem. O mesmo volume de água utilizado para aplicação dos inoculantes foi adicionado ao CONT. A aplicação dos inoculantes e da água sem inoculante foi realizada sequencialmente, por ordem de repetição, sobre as pilhas individuais de 1 kg, em função de cada tratamento.

O material foi ensilado em *bags* de náilon-polietileno (25,4 cm × 35,56 cm, Doug Care Equipment, Springville, CA, USA). Em cada *bag*, foram adicionados 500 g de forragem. Utilizou-se a seladora a vácuo (Eco Vacuum-1040, Orved®, Turin, Itália) para atingir a condição de anaerobiose no interior dos *bags*. Foram confeccionados 96 silos experimentais, armazenados em temperatura ambiente. As amostras da planta (momento da ensilagem) foram armazenadas em sacos plásticos e congeladas a -20 °C para posteriores análises.

2.3 Preparo da cepa AV14.17 para uso como inoculante

Os dados do sequenciamento da cepa AV14.17 estão disponíveis no GenBank (cepa AV14.17 - *Lactiplantibacillus pensotus* / MK713801). A cepa AV14.17 foi ativada duas vezes antes do uso. Primeiro, a cepa foi retirada do estoque “ultrafreezer” (-80 °C), descongelada, e ativada em 3 mL de caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) a 37 °C por 24 h. Posteriormente, realizou-se uma segunda ativação com 1% do inóculo em 5 mL de caldo MRS (37 °C/24 h). Em seguida, foi realizado o plaqueamento em MRS ágar obtendo-se o número de ufc/mL de caldo. A quantidade de caldo MRS utilizada no cultivo final foi baseada no plaqueamento prévio do inóculo após a segunda ativação, considerando-se o número de células presentes após o crescimento. O inóculo foi padronizado a uma densidade óptica de 0,05 em 10 mL de caldo MRS, utilizando-se espectrofotômetro (630 nm). Com base no número de ufc/mL, foi ajustada a quantidade de inóculo necessária para atingir a taxa de aplicação 1×10^5 ufc/g forragem, em seguida foram centrifugados a 1000 g × 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 50 mL de água destilada (Silva et al., 2020).

2.4 Análises da composição química, perfil fermentativo e digestibilidade *in vitro*

As amostras da planta e das silagens após 3, 14, 30 e 60 d de fermentação foram submetidas à secagem parcial em estufa de circulação forçada de ar (55 °C/72 h). Posteriormente, as amostras foram moídas em moinho de facas (R-TE-650/1, Tecnal®, Piracicaba-SP, Brasil), com peneira de crivo de 1 mm, para análises da composição química.

As amostras da planta e das silagens (3, 14, 30 e 60 d após ensilagem) foram submetidas às análises de matéria seca (MS, método 934,01) e proteína bruta (PB, N × 6,25, método 984,13). Apenas as silagens do último período de fermentação foram analisadas para matéria orgânica (MO, método 972,43), matéria mineral (MM, método 942,05) e extrato etéreo (EE, método 920,39) (AOAC, 1990). Nessas amostras também foram determinados os teores de fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína (FDNcp), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) (Licitra et al., 1996), lignina (LIG) (Gomes et al., 2011), hemicelulose (HEM) e celulose (CEL). A análise de FDNcp foi realizada utilizando-se α -amilase termoestável sem o uso de sulfito de sódio, e o resíduo foi corrigido para cinzas e proteína (Mertens, 2002). A hemicelulose foi obtida pela diferença entre o FDN e o FDA, enquanto a CEL foi obtida pela diferença entre o FDA e LIG.

As amostras de 25 g da planta e das silagens após 3, 14, 30 e 60 d de fermentação foram homogeneizadas em 225 mL de solução de Ringer's solution estéril (Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) em liquidificador industrial (1 min). O extrato aquoso foi filtrado em dupla camada de gaze estéril de algodão e dividido em três alíquotas: Uma alíquota foi usada para medição do pH, utilizando-se potenciômetro digital (W38/Tecnal®, São Paulo-SP, Brasil). Após, 20 mL do extrato aquoso foi filtrado e acidificado com H₂SO₄ 1:1 (armazenados a -20 °C) para análises das concentrações de carboidratos solúveis (CHOs) pelo método colorimétrico (Nelson, 1944) e nitrogênio amoniacal (N-NH₃) pelo método fenol-hipoclorito (Okuda et al., 1965). Os ácidos orgânicos (ácido lático, ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; SPD-10 AVP, Shimadzu®, Oregon, USA), com detector ultravioleta e comprimento de onda de 210 nm. A coluna utilizada foi C18 (fase reserva), e foi utilizado o H₂SO₄ como fase móvel, com fluxo de 1,5 mL/min, pressão da coluna de 168 kgf e volume injetado de 20 μ l (Siegfried et al., 1984).

A segunda alíquota do extrato aquoso foi destinada para quantificação das populações microbianas. Foram realizadas diluições seriadas (10^1 a 10^9). Em seguida, foi realizado o plaqueamento em placas de *Petri* estéreis (método *pour-plate*) em meios de cultura (Kung Junior et al., 2003). Foi utilizado MRS ágar (De Man, Rogosa & Sharpe, Merck®, Darmstadt, Alemanha) para o cultivo de bactérias ácido lácticas (BAL) (37 °C/48 h), VRB ágar (Violet Red Bile Agar, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) para o cultivo de enterobactérias (ENT) (37 °C/24 h) e DRBC ágar (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) para cultivo de leveduras (LEV) (25 °C/72 h) e fungos filamentosos (FUN) (25 °C/120 h). As placas contendo entre 25 a 250 ufc foram consideradas para a contagem de ufc (American Public Health Association, 2015).

As amostras das silagens do último período de fermentação, previamente secas e processadas a 1 mm, foram pesadas em duplicata (0,5 g/saco) em sacos F57 (Ankom®, Technology Corp.) para realização do ensaio da digestibilidade *in vitro*. O ensaio foi realizado em jarras rotativas DaisyII (Adesogan, 2005) durante 48 h (Tilley e Terry, 1963) com adaptações (Holden, 1999).

O inóculo ruminal foi obtido de duas vacas Nelore (peso corporal médio 595 ± 20 kg) fistuladas no rúmen. Os procedimentos para o uso de animais seguiram as diretrizes ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) (Kilkenny et al., 2014) e a Diretriz da União Europeia 2010/63 para experimentos com animais (European Union, 2010) e também aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUAP) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) (CEUAP-UFV: 059/2020).

Os animais doadores foram alocados em baias individuais dispostas de comedouro e bebedouro. Esses animais receberam uma dieta a base de cana-de-açúcar e concentrado (relação volumoso:concentrado de 70:30, base MS). O concentrado foi composto por farelo de milho, farelo de soja, núcleo mineral e ureia. A dieta foi corrigida com ureia para conter 15% de proteína bruta. Os animais foram adaptados à dieta padrão por 14 d antes da coleta de digesta ruminal (Machado et al., 2016). A digesta ruminal (frações líquida e sólida) foi obtida a partir de pontos aleatórios de coleta no ambiente ruminal. As digestibilidades *in vitro* da MS (DIVMS) e da FDN (DIVFDN) foram calculadas de acordo com as seguintes equações 1 e 2:

$$\text{Equação (1): } DIVMS \text{ g/kg MS: } 1000 \times \left[\frac{(MS \text{ silagem amendoim} - MS \text{ resíduo})}{MS \text{ silagem amendoim}} \right]$$

Onde: DIVMS, Digestibilidade *in vitro* da matéria seca; MS silagem de amendoim, Matéria seca da silagem de amendoim; MS resíduo, Matéria seca do resíduo após incubação.

$$\text{Equação (2): } DIVFDN \text{ g/kg MS: } 1000 \times \left[\frac{(FDN \text{ silagem amendoim} - FDN \text{ resíduo})}{FDN \text{ silagem amendoim}} \right]$$

Onde: DIVFDN, Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro; FDN, Fibra em detergente neutro da silagem de amendoim; FDN resíduo, Fibra em detergente neutro do resíduo após incubação.

2.5 Extração, purificação e sequenciamento de DNA

A terceira alíquota do extrato aquoso referente apenas às silagens com 60 d de fermentação foi utilizada para a extração do DNA para avaliação da diversidade microbiana. A extração do DNA seguiu um método manual, protocolo desenvolvido internamente pela Neoprospecta Microbiome Technologies® (Florianópolis-SC, Brasil), através de soluções tampões e *beads* magnéticas.

Para o processo de sequenciamento utilizando-se o MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA), com a amplificação de primers da região V3-V4 do gene rDNA 16S, 341F (5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3') (Wang & Qian, 2009) e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso et al., 2012), pelo sequenciamento paired-end, com kits V3 de 600 ciclos. As sequências foram analisadas por meio do pipeline Sentinel.

No pipeline Sentinel os arquivos fastQ foram avaliados quanto à qualidade Phred (QP) usando o programa FastQC v.0.11.8 (Andrews, 2010). As *reads* foram submetidas ao Cutadapt (REF) para a remoção de primers para região V3-V4 do gene rDNA 16S, 341F. Para a identificação de táxons e obtenção da tabela de "Amplicon Sequence Variant" (ASV), a pipeline do DADA2 foi empregada utilizando as *reads* com os primers de amplificação removidos. Também foram calculados os índices de α -diversidade e de β -diversidade. Para isso, a base de referência para procaríoto, de Silva 138.1, foi utilizada (McLaren & Callahan, 2021). As análises de abundância de táxons, de alfa e beta diversidade foram realizadas a nível de gênero com o módulo Marker-gene Data Profiling (MDP) do Microbiome Analyst (Dhariwal et al., 2017;

Chong et al., 2020). Para isso, foram empregadas as configurações padrão, exceto para a contagem mínima de utilizadas ASVs. Foi utilizado como valor mínimo de contagem, 50 *reads*. Isso significa que ASVs com menos que esse valor, não foram consideradas nas análises seguintes.

2.6 Análises estatísticas

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

Os dados referentes aos valores de pH, CHOs, N-NH₃ e populações microbianas (ENT, BAL, LEV e FUN) foram analisados seguindo o delineamento em blocos casualizados, com arranjo fatorial 2 × 3 × 4, considerando-se a idade de rebrotação, o tipo de inoculante, o período de fermentação, bem como suas interações como efeitos fixos no modelo matemático, o bloco e o erro experimental como efeitos aleatórios, de acordo com o modelo:

$$Y_{ijklm}, \mu + R_i + IN_j + P_k + (R \times IN \times P)_{ijk} + \beta_l + e_{ijklm}$$

Onde: Y_{ijklm} , variável resposta no bloco β_l submetido à rebrota R, no inoculante IN e no período P; μ , média geral; β_l , efeito de bloco, β_l , 1, 2, 3 e 4; R, efeito da rebrota, i , 1 e 2; IN, efeito do inoculante, j , 1, 2 e 3; P, efeito do período, k , 1, 2, 3 e 4; (R × IN × P), efeito das interações entre R, IN e P, ijk ; e_{ijklm} , erro residual aleatório associado com a unidade experimental no bloco β_l submetido a rebrota R_i , no inoculante IN_j e no período P_k .

As variáveis referentes aos 60 d após ensilagem: ácidos orgânicos, composição química e digestibilidade *in vitro* foram analisados seguindo o delineamento em blocos casualizados, com arranjo fatorial 2 × 3, no qual a idade de rebrotação, o tipo de inoculante e suas interações foram considerados efeitos fixos no modelo matemático, o bloco e o erro experimental foram considerados efeitos aleatórios, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijlm}, \mu + R_i + IN_j + (R \times IN)_{ij} + \beta_l + e_{ijlm}$$

Onde: Y_{ijlm} , variável resposta no bloco β_l submetido à rebrota R, no inoculante IN; μ , média geral; β_l , efeito de bloco, β_l , 1, 2, 3 e 4; R, efeito da rebrota, i, 1 e 2; IN, efeito do inoculante, j, 1, 2 e 3; $(R \times IN)_{ij}$, efeito das interações entre R e IN, ij ; e_{ijlm} , erro residual aleatório associado com a unidade experimental no bloco β_l submetido a rebrota R_i e no inoculante IN_j .

As médias dos efeitos individuais e suas interações foram comparadas utilizando-se os testes F de Fischer e de Tukey-Kramer. A matriz de covariância foi escolhida através do critério de Akaike corrigido (AICC). Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos utilizando-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

Para avaliação dos dados de diversidade microbiana as comparações que apresentaram significância estatística na ANOVA, foi usado o teste Tukey para realizar as comparações pareadas usando a função `glht {multcomp (Bretz et al., 2011)}` em ambiente R (R Core Team, 2018). Um estudo de abundância diferencial dos táxons foi realizado, usando o Microbiome Analyst no ambiente R, para a obtenção do objeto com formato adequado para o pacote *phyloseq*, seguido das análises de acordo com a pipeline (McMurdie & Holmes, 2013). Com isso, ASVs que tiveram $\log_2(\text{fator de correção}) > 1,5$ ou $\leq 1,5$ e P-valor $< 0,05$ foram consideradas com abundância diferencial entre as condições comparadas e destacadas no volcano plot. Nas comparações das idades de rebrotação um P-valor mais restrigente foi empregado (0,001).

RESULTADOS

As plantas de amendoim forrageiro apresentavam teor de MS antes do emurchecimento de $18,97\% \pm 0,21$ e $21,79\% \pm 0,34$, para as idades de rebrota 40 e 80 d, respectivamente. A caracterização do amendoim forrageiro nas duas idades de rebrota, antes da ensilagem é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3. Produtividade por área, composição química e populações microbianas de plantas de amendoim forrageiro colhidas aos 40 d e 80 d após rebrota (n = 4), submetidas ao emurchecimento, médias seguidas de desvio padrão (\pm DP).

Item ^a	Idade de rebrotação ^b	
	40 d	80 d
Produtividade MN (t/ha)	17,50 \pm 0,54	31,20 \pm 0,77
Produtividade MS (t/ha)	3,32 \pm 0,32	6,80 \pm 0,49
pH	6,37 \pm 0,13	6,08 \pm 0,04
Matéria seca (g/kg MN)	444,05 \pm 1,38	446,02 \pm 4,40
Matéria mineral (g/kg MS)	112,39 \pm 0,67	98,13 \pm 0,38
Matéria orgânica (g/kg MS)	887,62 \pm 0,67	901,87 \pm 0,38
Proteína bruta (g/kg MS)	247,69 \pm 0,85	207,98 \pm 0,51
Extrato etéreo (g/kg MS)	16,82 \pm 0,40	14,13 \pm 0,16
FDNcp (g/kg MS)	435,50 \pm 2,13	452,97 \pm 2,75
Fibra em detergente ácido (g/kg MS)	246,30 \pm 1,01	248,26 \pm 1,21
NIDA (g/kg MS)	8,0 \pm 0,12	6,5 \pm 0,35
Lignina (g/kg MS)	71,15 \pm 0,38	80,86 \pm 0,38
Carboidratos solúveis em água (g/kg MS)	31,2 \pm 0,55	27,4 \pm 0,32
Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (g/kg MS)	565,45 \pm 2,42	598,34 \pm 1,85
Digestibilidade <i>in vitro</i> da FDN (g/kg MS)	492,64 \pm 1,37	534,12 \pm 2,53
Enterobactérias (Log ufc/g forragem)	6,94 \pm 0,23	6,75 \pm 0,19
Bactérias ácido lácticas (Log ufc/g forragem)	5,40 \pm 0,49	4,94 \pm 0,44
Leveduras (Log ufc/g forragem)	5,64 \pm 0,25	5,54 \pm 0,25
Fungos filamentosos (Log ufc/g forragem)	6,01 \pm 0,33	5,00 \pm 0,33

^aProdutividade MN, Produtividade de matéria natural (antes do emurchecimento); Produtividade MS, Produtividade de matéria seca (antes do emurchecimento); FDNcp, Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; NIDA, Nitrogênio insolúvel em detergente ácido; Digestibilidade *in vitro* da FDN, Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro; ufc, Unidade formadora de colônia; ^b40 d, Amendoim colhido após 40 dias de rebrotação; 80 d, Amendoim colhido após 80 dias de rebrotação.

4.3 Perfil fermentativo

Houve efeito ($P \leq 0,05$) da interação $I \times R \times P$ sobre $N-NH_3$ e LEV. O pH e o teor de CHOs foram afetados pelas interações $R \times I$ ($P=0,009$) e $I \times P$ ($P=0,002$). Houve efeito de interação $I \times P$ sobre as populações de BAL ($P \leq 0,001$) e FUN ($P=0,042$). O teor de MS foi afetado apenas pelo fator inoculante ($P=0,022$). Houve efeito de rebrotação ($P=0,033$) e períodos de fermentação ($P \leq 0,001$) sobre o teor de PB das silagens, enquanto que a população de ENT foi afetada por inoculante ($P=0,001$) e por períodos de fermentação ($P \leq 0,001$) (Tabela 4).

Tabela 4. Significância (P-valores) dos efeitos testados e do erro padrão da média (EPM) para as variáveis do perfil fermentativo de silagens de amendoim forrageiro colhidos aos 40 e 80 d de rebrotação (R), tratados com inoculantes microbianos (I), em diferentes períodos de fermentação (P) (3, 14, 30 e 60 d).

Item ^a	P-valor							EPM
	Rebrotação	Inoculante	Período	R × I	R × P	I × P	R × I × P	
MS	0,356	0,022	0,065	0,929	0,967	0,999	0,999	3,405
PB	0,033	0,288	<0,001	0,496	0,249	0,446	0,440	2,393
pH	<0,001	<0,001	<0,001	0,009	0,134	<0,001	0,086	0,041
CHOs	<0,001	<0,001	<0,001	0,017	0,757	0,002	0,693	1,389
$N-NH_3$	0,063	0,754	<0,001	0,019	<0,001	<0,001	<0,001	1,438
ENT	0,201	0,002	<0,001	0,938	0,719	0,160	0,911	0,262
BAL	<0,001	<0,001	<0,001	0,059	0,168	<0,001	0,656	0,065
LEV	0,111	0,003	<0,001	0,087	0,458	<0,001	0,041	0,112
FUN	0,009	0,002	<0,001	0,196	0,445	0,042	0,094	0,169

^aMS, Matéria seca; PB, Proteína bruta; CHOs, Carboidratos solúveis em água; $N-NH_3$, Nitrogênio amoniacal; ENT, Enterobactérias; BAL, Bactérias ácido lácticas; LEV, Leveduras; FUN, Fungos filamentosos. Probabilidade de efeito de rebrotação (R), inoculante (I), período de fermentação (P) e de interação entre R com I ($R \times I$), R com P ($R \times P$), I com P ($I \times P$) e R com I com P ($R \times I \times P$).

Os desdobramentos das interações foram realizados para as variáveis que foram afetadas. A interação $R \times I \times P$ foi desdobrada fixando-se a interação $R \times P$. Dessa forma, para a rebrotação 40 d, observou-se menor teor de $N-NH_3$ para a

silagem inoculada com ISO aos 3 dias de fermentação, em relação ao CONT. No entanto, aos 14 dias de fermentação, as silagens inoculadas com IC e CONT apresentaram menor teor de N-NH₃. Aos 30 dias de fermentação as silagens não diferiram entre si, enquanto aos 60 dias, as silagens inoculadas apresentaram menor teor de N-NH₃ (Figura 1a). Para a rebrotação de 80 d, as silagens não diferiram quanto ao teor de N-NH₃ nos dias 3, 14 e 30 de fermentação, com médias de 13,38, 15,50 e 25,12 g de N-NH₃/kg nitrogênio total, respectivamente. Aos 60 dias de fermentação, a silagem inoculada com ISO apresentou menor teor de N-NH₃ em relação à silagem CONT e a silagem inoculada com IC (Figura 1b).

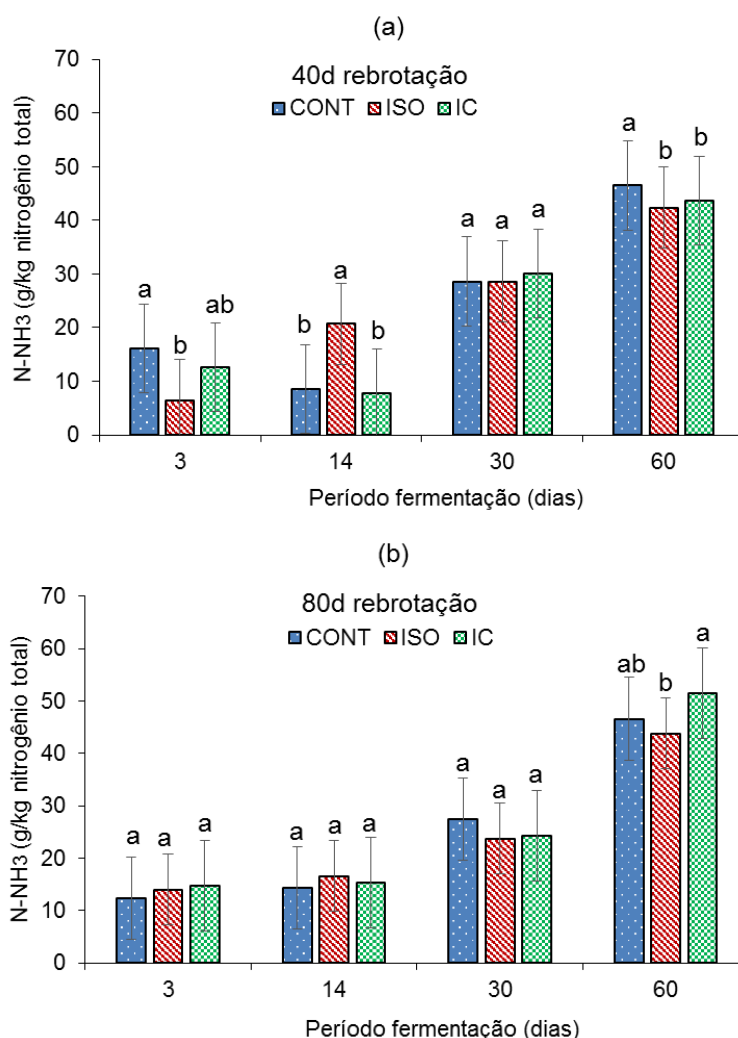


Figura 1. Concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) de silagens de amendoim forrageiro colhidos aos 40 d (a) e 80 d (b) de rebrotação em função de inoculante dentro de cada período de fermentação. CONT, Controle (sem inoculante); ISO, Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*; IC, Inoculante comercial, Sil-All 4 × 4

(Lallemand®, Brasil). Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

O pH das silagens inoculadas com ISO e IC apresentaram menores valores de pH em comparação ao CONT, em ambas as idades de rebrotação (Figura 2a). Aos 60 d de fermentação a silagem IC apresentou menor pH menor que o do controle (Figura 2b). Quanto aos CHOs residuais, foi observado menor valor na silagem inoculada com ISO em ambas as idades de rebrotação (Figura 2c). No último dia de fermentação, foram observados menores teores de CHOs residuais nas silagens ISO e IC comparados a silagem CONT (Figura 2d).

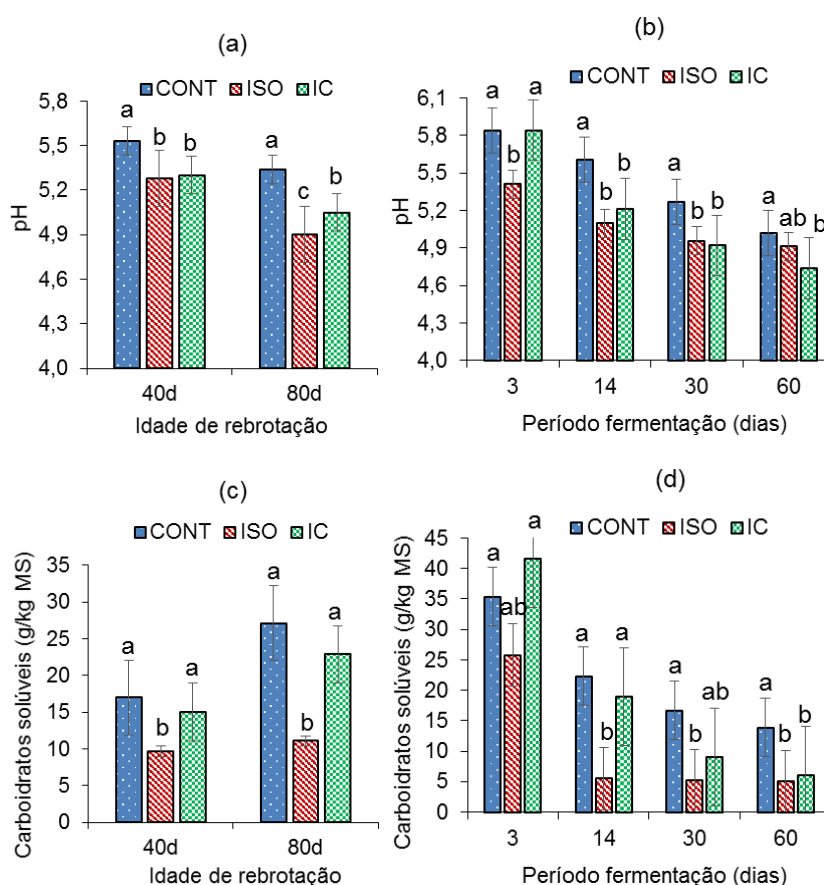


Figura 2. Valores de pH (a, b) e teores de carboidratos solúveis em água residuais (c, d) em função de inoculantes microbianos dentro de cada rebrotação e em função de inoculantes microbianos dentro de cada período de fermentação. MS, Matéria seca; CONT, Controle (sem inoculante); ISO, Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*; IC, Inoculante comercial, Sil-All 4 × 4 (Lallemand®, Brasil). Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

A silagem inoculada com ISO apresentou menor teor de MS em relação à controle (Figura 3a). Foi registrado maior teor de PB na silagem de amendoim forrageiro colhido aos 80 d rebrotação (Figura 3b), bem como menores valores de PB aos 30 e 60 dias de fermentação (Figura 3c).

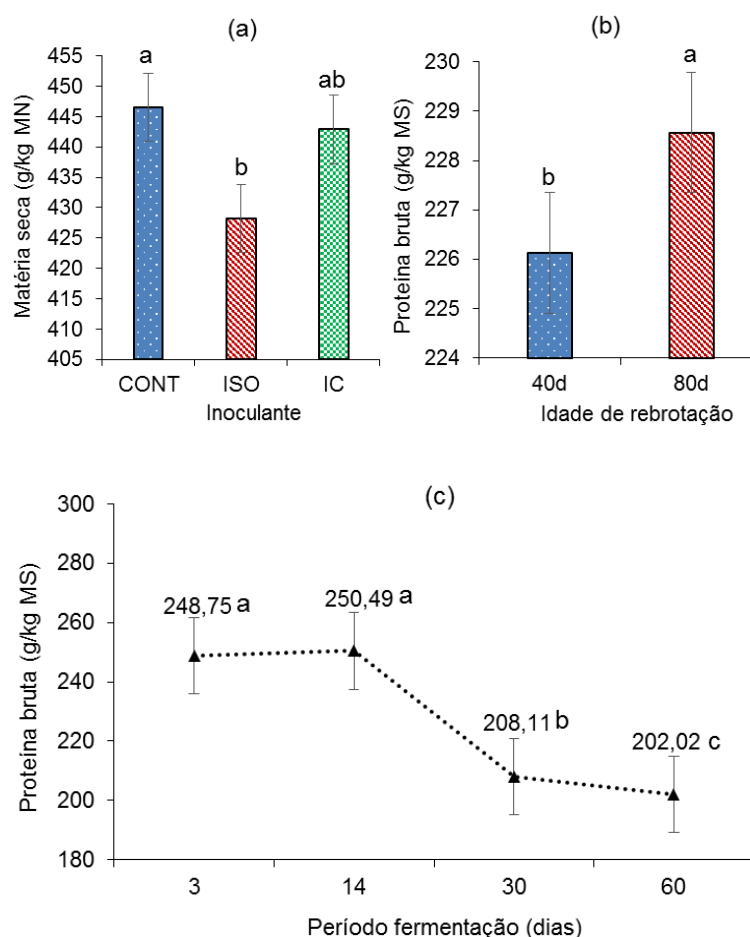


Figura 3. Teores de matéria seca em função do efeito de inoculante microbiano (a) e de proteína bruta em função de idade de rebrotação (b) e período de fermentação (c) de silagens de amendoim forrageiro. MN, Matéria natural; MS, Matéria seca; CONT, Controle (sem inoculante); ISO, Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*; IC, Inoculante comercial, Sil-All 4 x 4 (Lallemand®, Brasil). Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

A população de LEV variou de 3 a 5 log ufc/g forragem nas silagens colhidas aos 40 d de rebrotação. Aos 60 dias de fermentação, as silagens inoculadas apresentaram menores populações de LEV (< 4 log ufc/g forragem) em relação à silagem CONT (Figura 4a), enquanto que aos 80 d de rebrotação, verificou-se menor população desses microrganismos na silagem inoculada com ISO, aos 60 d de fermentação (Figura 4b).

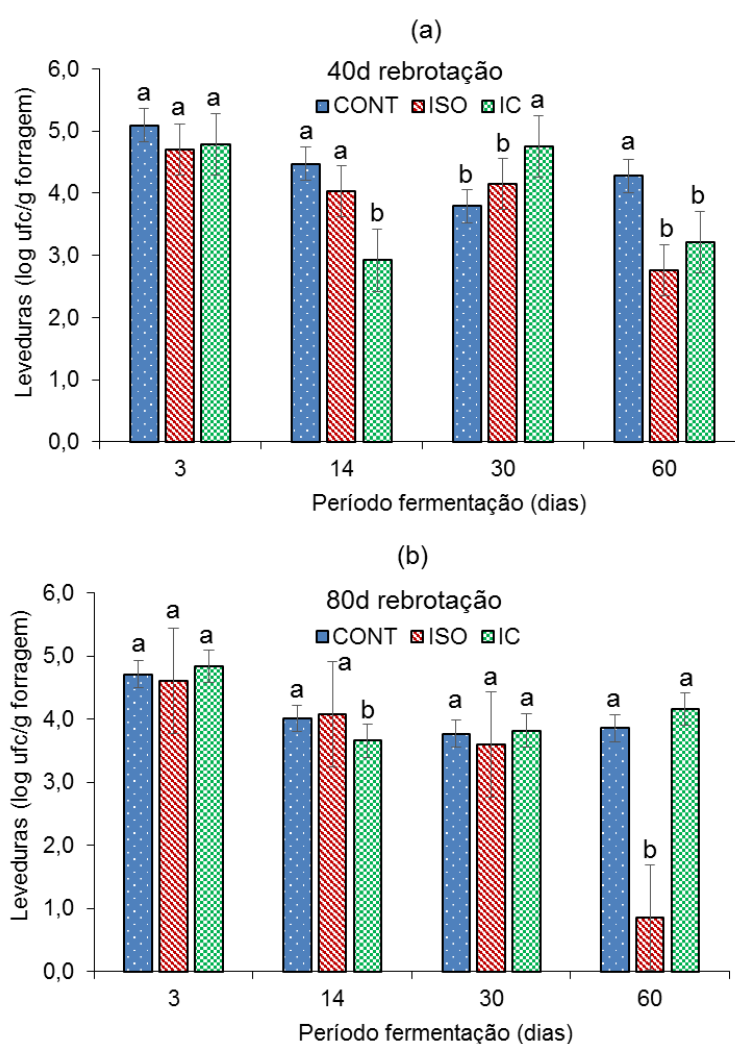


Figura 4. Populações de leveduras de silagens de amendoim forrageiro colhidos aos 40 d (a) e 80 d (b) de rebrotação em função de inoculantes dentro de cada período de fermentação. Log ufc, Unidade logarítmica na base 10; CONT, Controle (sem inoculante); ISO, Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*; IC, Inoculante comercial, Sil-All 4 × 4 (Lallemand®, Brasil). Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

O desdobramento da interação I × P para a contagem de BAL mostrou populações semelhantes entre as silagens avaliadas a partir de 30 d de fermentação (Figura 5a). Foi observado maior população de BAL (Figura 5b) e de FUN (Figura 6a) para a silagem de amendoim forrageiro colhido aos 40 d de rebrotação. Aos 60 dias de fermentação, foi registrado menor população de FUN na silagem IC, em relação a CONT, não tendo sido detectado FUN na silagem ISO, que reduziu acentuadamente sua população, do fechamento à abertura do silo (Figura 6b).

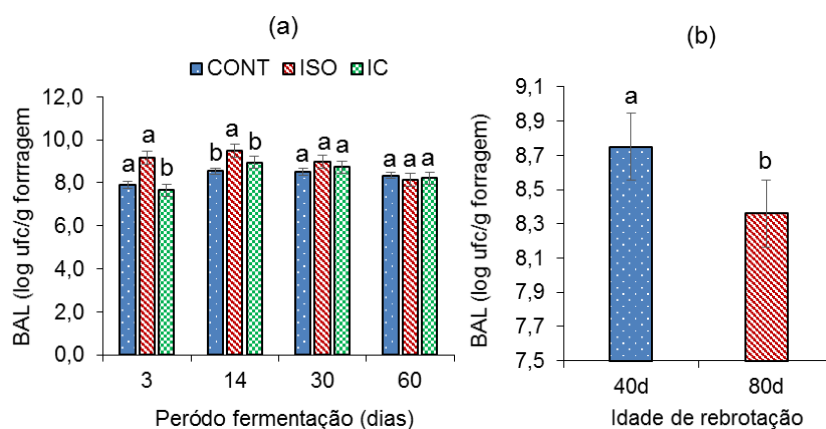


Figura 5. Populações de bactérias ácido lácticas (BAL) de silagens de amendoim forrageiro em função de inoculantes microbianos dentro de cada período de fermentação (a) e em função de idade de rebrotação (b). Log ufc, Unidade logarítmica na base 10; CONT, Controle (sem inoculante); ISO, Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*; IC, Inoculante comercial, Sil-All 4 × 4 (Lallemand®, Brasil). Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

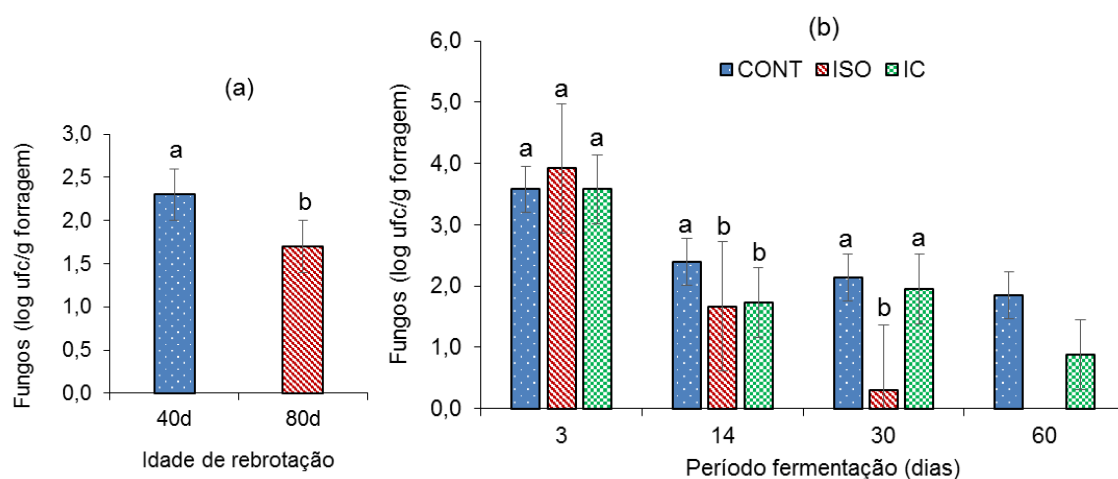


Figura 6. Populações de fungos filamentosos de silagens de amendoim forrageiro em função de idade de rebrotação (a), e em função de inoculantes microbianos dentro de cada período de fermentação (b). Log ufc, Unidade logarítmica na base 10; CONT, Controle (sem inoculante); ISO, Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*; IC, Inoculante comercial, Sil-All 4 × 4 (Lallemand®, Brasil). Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Observou-se menor população de ENT nas silagens inoculadas (Figura 7a), em relação ao CONT. Além disso, a população desses microrganismos foi reduzida acentuadamente até os 60 dias de fermentação (Figura 7b).

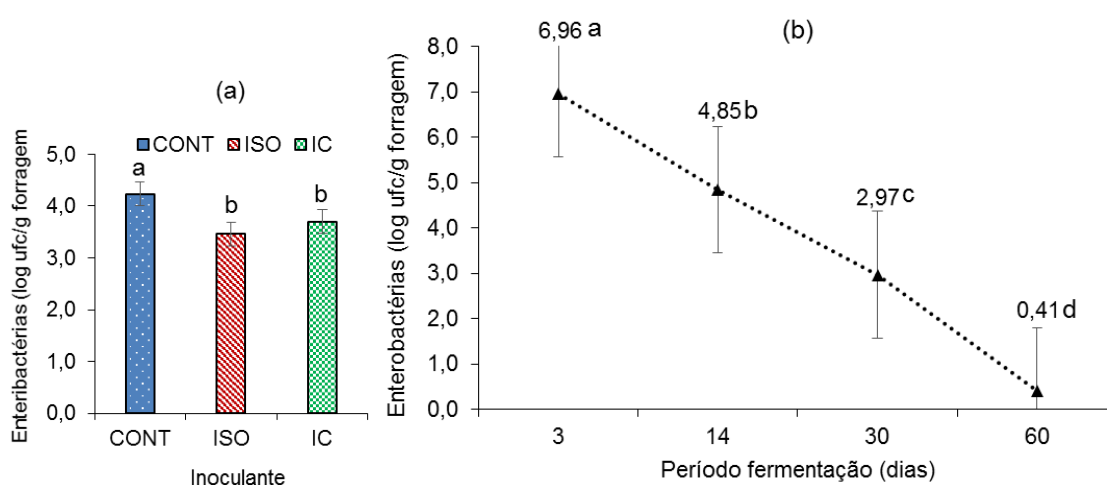


Figura 7. Populações de enterobactérias de silagens de amendoim forrageiro em função de inoculantes microbianos (a) e em função de períodos de fermentação (b). Log ufc, Unidade logarítmica na base 10; CONT, Controle (sem inoculante); ISO, Cepa

AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*; IC, Inoculante comercial, Sil-All 4 × 4 (Lallemand®, Brasil). Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

A concentração de ácido láctico das silagens aos 60 dias de fermentação ($P > 0,05$) não foi afetada por nenhum dos fatores estudados, cuja média foi de 40,12 g/kg MS. No entanto, observou-se efeito de inoculante microbiano sobre a concentração de ácido acético ($P = 0,005$) e sobre a relação ácido láctico/ácido acético ($P = 0,014$) (Tabela 5). A silagem ISO produziu mais alta concentração de ácido acético, em relação às silagens IC e controle. Não foi detectado a presença de ácido butírico nas silagens avaliadas.

Tabela 5. Teores de ácidos orgânicos da silagem de amendoim forrageiro colhido aos 40 e 80 dias após rebrotação, aditivado com inoculantes microbianos aos 60 dias após ensilagem.

Rebrotação ^a	Inoculante ^b			Média	EPM ^c	P-valor ^d		
	CONT	ISO	IC			I	R	I × R
Ácido láctico (g/kg MS ^e)								
40d	41,27	34,70	50,46	42,14	2,324	0,215	0,388	0,435
80d	33,43	39,17	41,67	38,09				
Média	37,35	36,94	46,06					
Ácido acético (g/kg MS)								
40d	13,64	25,86	15,66	18,39	1,640	0,005	0,101	0,879
80d	11,03	20,52	10,28	13,94				
Média	12,34b	23,19a	12,97b					
Relação láctico/acético								
40d	3,15	1,36	3,95	2,82	0,583	0,014	0,142	0,378
80d	3,58	1,97	7,59	4,38				
Média	3,36ab	1,66b	5,77a					

^a40 d, Amendoim colhido após 40 d de rebrotação; 80 d, Amendoim colhido após 80 d de rebrotação; ^bInoculante: CONT, controle (sem inoculante), ISO, Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*, IC, Inoculante comercial, Sil-All 4 × 4 (Lallemand®, Brasil); ^cEPM, Erro padrão da média; ^dP-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), rebrotação (R) e interação I com R (I × R); MS, Matéria seca; Médias

seguidas por letras minúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

4.4 Diversidade microbiana

Observou-se variação na abundância relativa da comunidade de microrganismos nas silagens e na forragem antes da ensilagem. Após a ensilagem, ocorreu diminuição do número de gêneros bacterianos, como também maior predominância de alguns gêneros como *Enterobacter* e *Lactiplantibacillus*. Em ambas as idades de rebrotação (40 d e 80 d), as silagens inoculadas com ISO apresentaram maior abundância relativa para o gênero *Lactiplantibacillus*, em comparação aos demais inoculantes avaliados (Figura 8a), seguido do gênero *Enterobacter*.

As silagens de amendoim forrageiro aos 40 d rebrotação controle e inoculadas com IC, apresentaram abundância relativa mais diversificada, com maior ocorrência dos gêneros *Lactiplantibacillus*, *Enterobacter*, *Sphingomonas*, *Allorhizobium*, *Pediococcus*, *Weissella* e *Lactococcus*, enquanto que as silagens de amendoim forrageiro aos 80 d rebrotação controle e inoculada com IC apresentaram maior predominância do gênero *Enterobacter*, seguido de menor predominância do gênero *Lactiplantibacillus* (Figura 8a).

Em relação ao efeito de inoculante, independente da idade de rebrotação, a maior abundância relativa do gênero *Lactiplantibacillus* também foi verificada para as silagens inoculadas com ISO, enquanto que nas silagens controle e inoculadas com IC houve predominância do gênero *Enterobacter* (Figura 8b). Ao se avaliar a abundância relativa em função da idade de rebrotação, verificou-se que nas silagens colhidas aos 80 d rebrotação, houve predominância do gênero *Enterobacter* (Figura 8c). Entretanto, a presença dos gêneros *Lactiplantibacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e de *Lacticaseibacillus* foram semelhantes em ambas as idade de rebrotação.

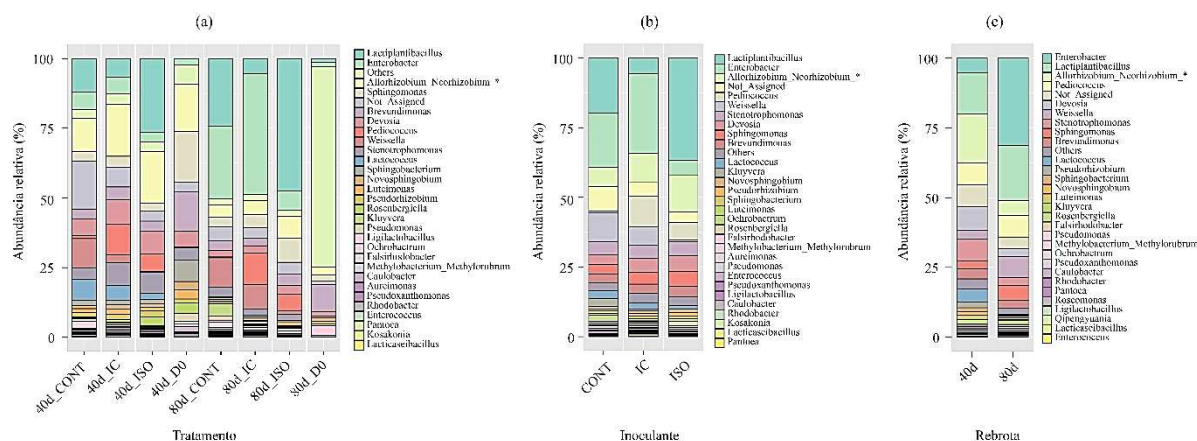


Figura 8. Abundância relativa da comunidade microbiana em nível de gênero revelada por amplificação do gene 16S rDNA de alto rendimento antes (D0, planta) e após ensilagem do amendoim forrageiro, em função de inoculantes microbianos dentro das idades de rebrotação 40 d e 80 d após ensilagem (a), em função do efeito de inoculante (b) e em função da idade de rebrotação (c). CONT, Controle (sem inoculante); ISO, Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*; IC, Inoculante comercial, Sil-All 4 × 4 (Lallemand®, Brasil).

Análises de alto rendimento pela amplificação das regiões V3-V4 do gene 16S rDNA das silagens de amendoim forrageiro foram usadas para detectar a diversidade bacteriana das silagens aos 60 dias de fermentação. Não houve efeito ($P > 0,05$) para as análises de α -diversidade com base nos índices de Shannon e de Chao1 (Figura 9). O índice de α -diversidade da comunidade bacteriana, índice de Shannon variou de 1,80 a 3,22. O estimador de riqueza da comunidade bacteriana, índice de Chao1, variou de 63,75 a 69,95. Também não houve efeito ($P > 0,05$) para as análises de β -diversidade com base nas coordenadas principais (PCoA), com variação em cada eixo de 29,30% e 34,20%, e variação total de 63,50% (Figura 10).

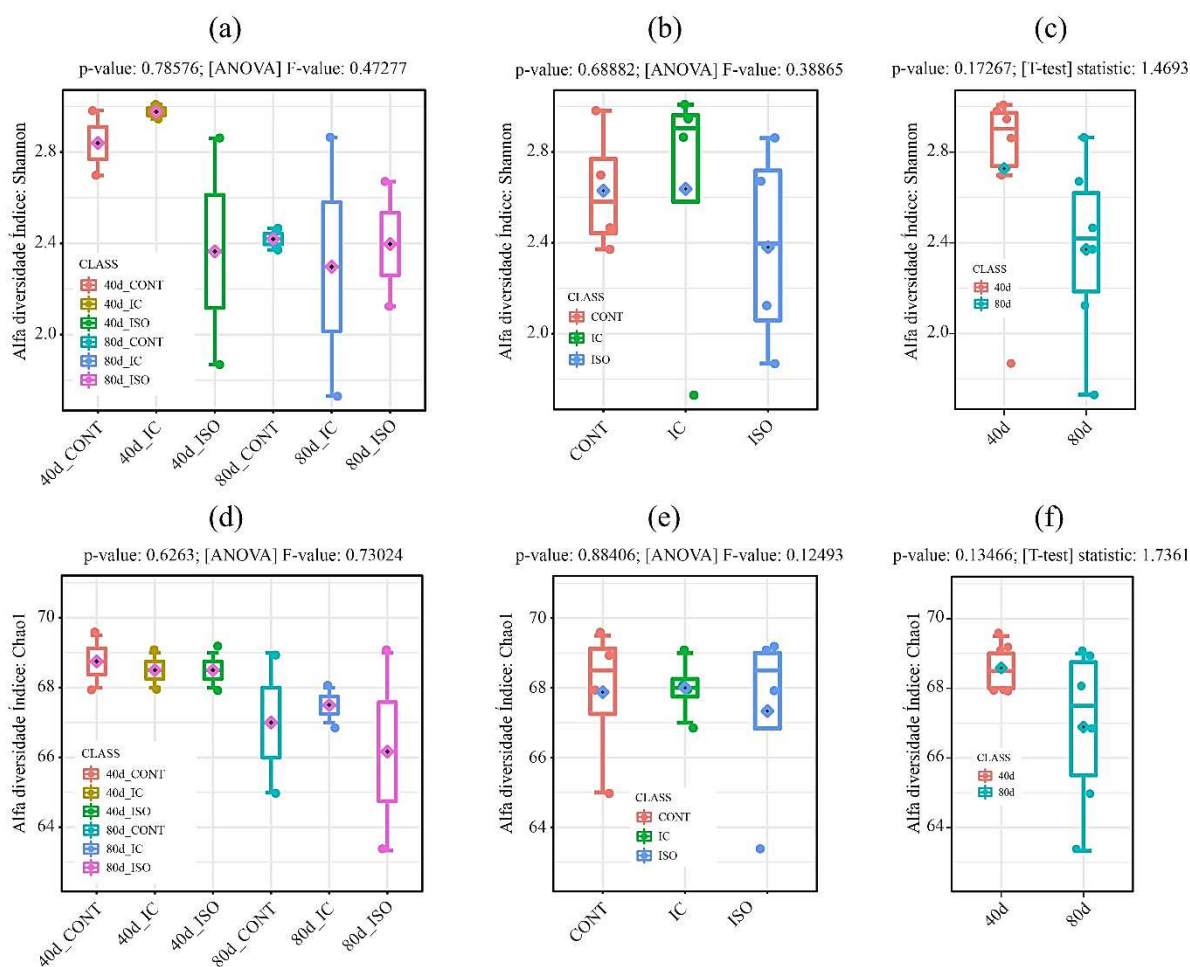


Figura 9. Análise de α -diversidade da comunidade bacteriana com base no índice de Shannon (a, b, c) e Chao1 (d, e, f) em nível de gênero revelada por amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA de alto rendimento em silagens de amendoim forrageiro, em função de inoculantes microbianos dentro das idades de rebrotação 40 d e 80 d após ensilagem (a, d), em função do efeito de inoculante (b, e) e em função da idade de rebrotação (c, f). CONT, Controle (sem inoculante); ISO, Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*; IC, Inoculante comercial, Sil-All 4 × 4 (Lallemand®, Brasil).

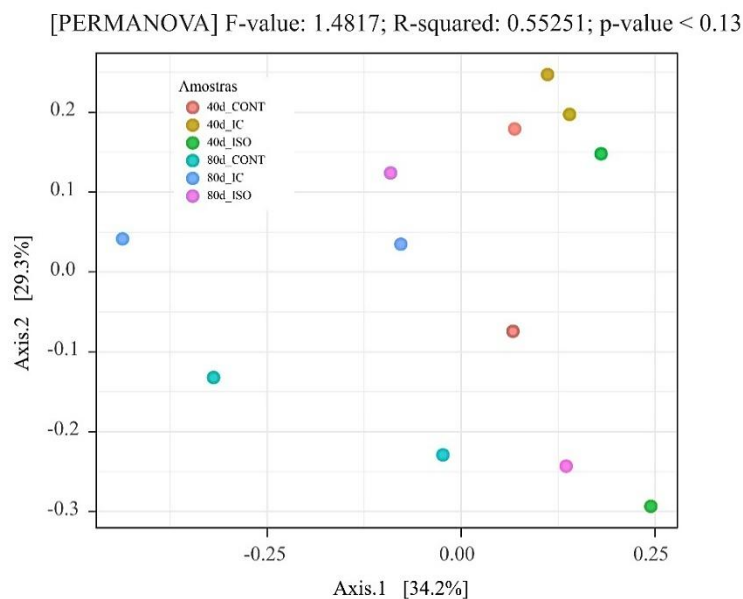


Figura 10. Análise de coordenadas principais (PCoA) da comunidade bacteriana a nível de gênero para silagem de amendoim forrageiro. Cores distintas conforme a legenda da figura indicam a dispersão dos tratamentos experimentais. 40d-CONT, silagem de amendoim controle aos 40 d rebrotação; 40d-IC, silagem de amendoim com inoculante comercial aos 40 d rebrotação; 40d-ISO, silagem de amendoim com isolado AV14.17- *Lactiplantibacillus pentosus*; 80d-CONT, silagem de amendoim controle aos 80 d rebrotação; 80d-IC, silagem de amendoim com inoculante comercial aos 80 d rebrotação; 80d-ISO, silagem de amendoim com isolado AV14.17- *Lactiplantibacillus pentosus*.

A abundância diferencial de táxons foi afetada ($P \leq 0,05$) pelos inoculantes avaliados em ambas as idades de rebrota (Figura 11). A silagem IC aos 40 d rebrota apresentou maior abundância diferencial de táxons para a família *Lactobacillaceae* com predomínio do gênero *Pediococcus* em comparação a silagem controle (Figura 10ab). Resultados semelhantes também foram observados nas silagens aos 40 d rebrota para os inoculantes ISO vs. CONT, que além de maior predominância do gênero *Pediococcus*, também ocorreu maior predominância do gênero *Lactiplantibacillus* (Figuras 11cd). A predominância de táxons da família *Lactobacillaceae* com maior ocorrência do gênero *Pediococcus* também foi verificada para as silagens de amendoim aos 80 d rebrota para os inoculantes ISO e IC comparado ao controle (Figuras 11).

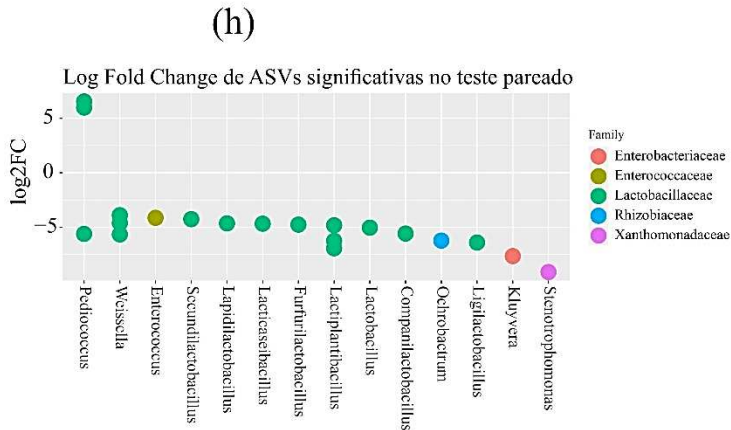
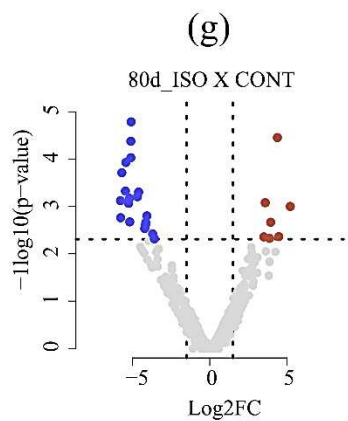
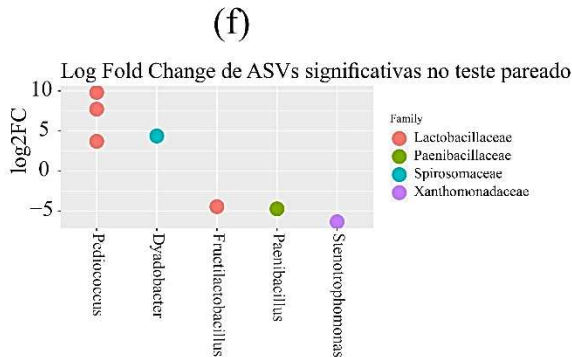
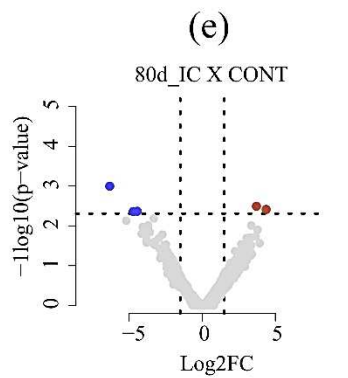
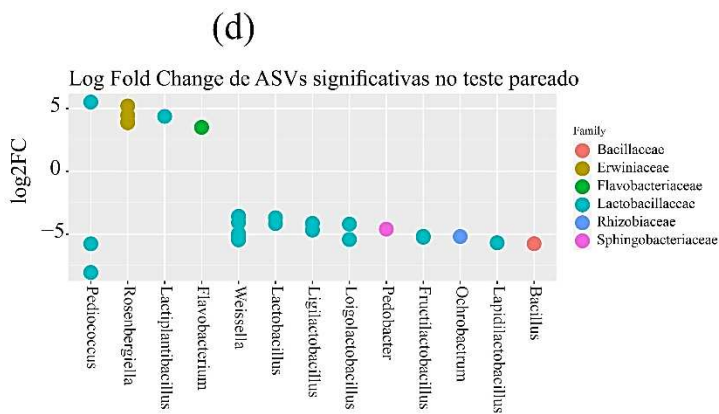
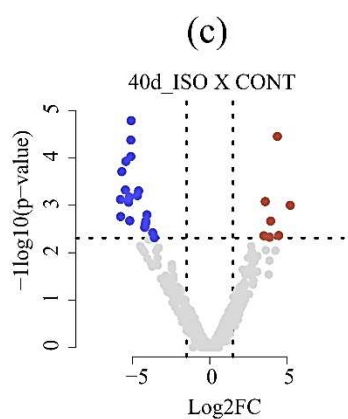
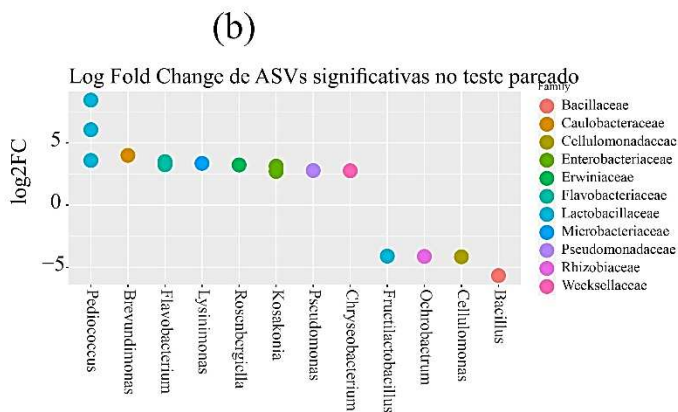
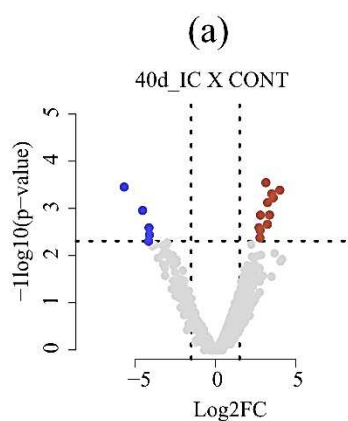


Figura 11. Estudo da abundância diferencial de táxons (ASVs) de silagens de amendoim forrageiro em função do efeito de inoculante dentro da idade de rebrotação. Volcano plot para junção das contagens das ASVs em função da comparação entre inoculante comercial (IC) vs controle (CONT, sem inoculante) (a, c) e comparação entre cepa AV14.17 *Lactiplantibacillus pentosus* (ISO) vs CONT (e, g) aos 40 d e aos 80 d rebrotação, respectivamente. Com pontos de corte superiores a ($\log_2(\text{FC}) \geq 1,5$ e P-valor < 0.001) e pontos de corte inferiores ($\log_2(\text{FC}) \leq -1,5$ e P-valor < 0.001). O destaque dos gêneros e famílias com diferença significativa (positiva ou negativa) em cada comparação, entre IC vs CONT (b, d) e entre ISO vs CONT (f, h) aos 40 d e 80 d rebrotação, respectivamente.

A predominância da abundância diferencial de táxons da família *Lactobacillaceae* com maior ocorrência do gênero *Pediococcus* também foi verificada ao se avaliar os efeitos de inoculantes, independente da idade de rebrota (Figura 12), seguido de menor predomínio da família *Enterobacteriaceae* e menor ocorrência do gênero *Kluyvera*. Ao se comparar a abundância diferencial de táxons entre as silagens 40 d e 80 d verificou-se que em ambas as idades de rebrota houve predomínio dos filos *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidota*, com maior ocorrência dos gêneros *Kluyvera*, *Lactiplantibacillus*, *Bartonella*, *Sphingomonas*, *Enterobacter* e *Secundilactobacillus* (Figura 13).

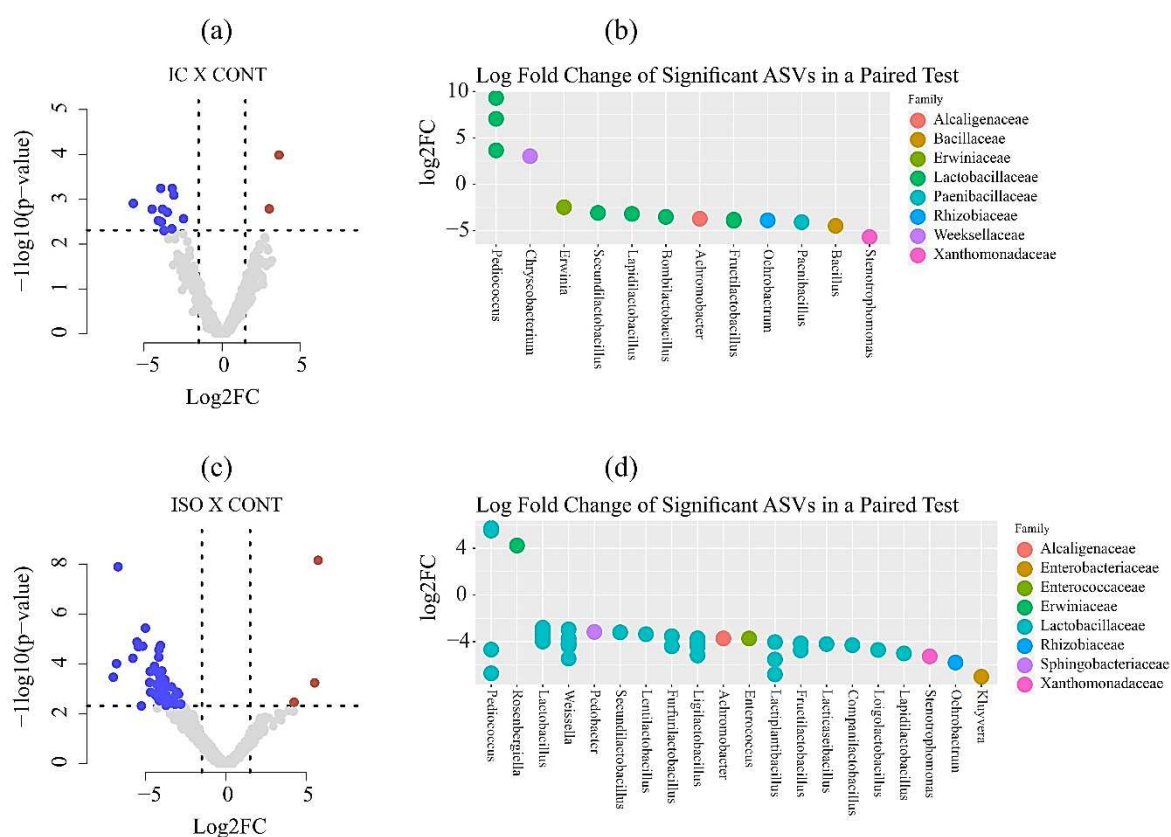


Figura 12. Estudo da abundância diferencial de táxons (ASVs) de silagens de amendoim forrageiro em função do efeito de inoculante. Volcano plot para junção das contagens das ASVs em função da comparação entre inoculante comercial (IC) vs controle (CONT, sem inoculante) (a) e comparação entre cepa AV14.17 *Lactiplantibacillus pentosus* (ISO) vs CONT (c). Com pontos de corte superiores a ($\log_2(\text{FC}) \geq 1,5$ e P-valor $< 0,001$) e pontos de corte inferiores ($\log_2(\text{FC}) \leq -1,5$ e P-valor $< 0,001$). O destaque dos gêneros e famílias com diferença significativa (positiva ou negativa) em cada comparação, entre IC vs CONT (b) e entre ISO vs CONT (d).

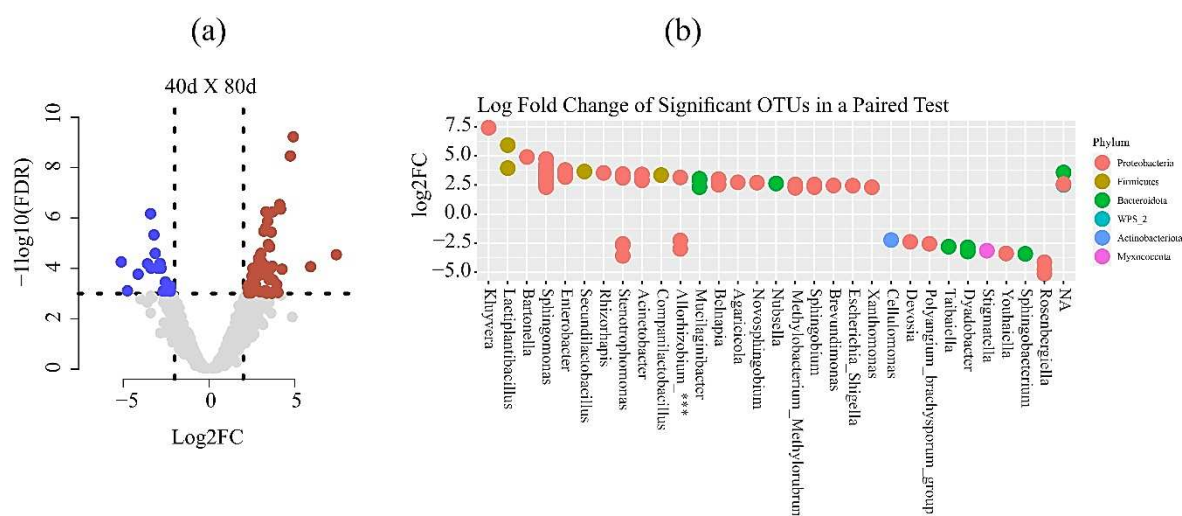


Figura 13. Estudo da abundância diferencial de táxons (ASVs) de silagens de amendoim forrageiro aos 40 d e 80 d após rebrotação. Volcano plot para junção das contagens das ASVs em diferentes tratamentos e controles aos 40 d comparados com a junção das contagens das ASVs em diferentes tratamentos e controles aos 80 d rebrotação (a). Com pontos de corte superiores a $(\log_2(FC) \geq 1,5$ e P-valor < 0.001) e pontos de corte inferiores $(\log_2(FC) \leq -1,5$ e P-valor < 0.001). O destaque dos gêneros e filós que tiveram sua abundância alterada (positiva ou negativa) com 40 d e 80 d rebrotação (b).

4.5 Composição química

Não houve efeito ($P > 0,05$) de interação $I \times R$ sobre as variáveis da composição química da silagem de amendoim forrageiro aos 60 dias de fermentação, bem como não houve efeito ($P > 0,05$) de inoculante e de idade de rebrotação sobre os teores de MS, PB, EE, FDNcp, hemicelulose e lignina, com médias de 436,60, 208,02, 12,84, 431,84, 166,65 e 73,27, respectivamente. Foi observado efeito de inoculante ($P = 0,01$) e de idade de rebrotação ($P < 0,001$) sobre o teor de FDA. A silagem CONT apresentou menor teor de FDA comparada à silagem inoculada com IC. Além disso, a silagem de amendoim forrageiro colhido aos 40 d rebrotação apresentou menor teor de FDA. Houve efeito de idade de rebrotação sobre os teores de MM ($P = 0,003$), MO ($P = 0,003$) e NIDA ($P < 0,001$). Maior teor de MM foi verificado na silagem de amendoim forrageiro aos 40 d rebrota e menor teor de MO na silagem aos 80 d rebrotação. A silagem de amendoim forrageiro aos 80 d rebrotação apresentou menor teor de NIDA. O teor de celulose foi afetado apenas pelo inoculante ($P < 0,001$), com maior teor para a silagem

inoculada com ISO, seguida pela silagem inoculada com IC e pela silagem CONT (Tabela 6).

Tabela 6. Composição química de silagens de amendoim forrageiro, colhidos aos 40 d e 80 d após rebrotação, aditivado com inoculantes microbianos e armazenados por 60 dias.

Rebrota ^a	Inoculante ^b			Média	EPM ^c	P-valor ^d		
	CONT	ISO	IC			I	R	I × R
Matéria seca (g/kg MN ^e)								
40d	439,18	438,01	417,64	431,61	7,006	0,282	0,426	0,986
80d	451,84	445,72	427,19	441,59				
Média	445,51	441,86	422,42					
Matéria mineral (g/kg MS ^f)								
40d	104,01	103,77	106,65	104,81A	1,073	0,524	0,003	0,777
80d	99,63	97,07	99,27	98,96B				
Média	101,82	100,42	102,96					
Matéria orgânica (g/kg MS)								
40d	895,99	896,23	893,35	895,19B	1,073	0,524	0,003	0,777
80d	900,37	902,93	900,73	901,34A				
Média	898,18	899,58	897,04					
Proteína bruta (g/kg MS)								
40d	204,38	201,65	211,67	205,90	1,589	0,099	0,103	0,436
80d	207,78	210,23	212,44	210,15				
Média	206,08	205,94	212,05					
Extrato etéreo (g/kg MS)								
40 d	13,37	13,06	12,12	12,85	0,270	0,559	0,986	0,522
80 d	12,68	13,02	12,82	12,84				
Média	13,03	13,04	12,47					
FDNcp ^g (g/kg MS)								
40d	421,51	431,38	439,67	430,85	5,614	0,710	0,993	0,572
80d	442,57	418,06	437,85	432,84				
Média	432,04	424,72	438,76					
Fibra em detergente ácido (g/kg MS)								

40d	233,91	243,17	250,02	242,37B	1,990	0,011	<0,001	0,274
80d	250,16	256,41	255,82	254,13A				
Média	242,04b	249,79ab	252,92a					
Celulose (g/kg MS)								
40d	156,52	175,26	167,75	166,51	2,853	<0,001	0,840	0,527
80d	171,51	191,51	187,31	183,44				
Média	164,01c	183,38a	177,53b					
Hemicelulose (g/kg MS)								
40d	170,13	171,76	170,82	170,90	0,600	0,485	0,588	0,571
80d	176,05	165,54	145,60	162,40				
Média	173,09	168,65	158,21					
NIDA ^h (g/kg MS)								
40d	9,02	8,56	8,94	8,84A	0,266	0,553	<0,001	0,924
80d	7,21	6,65	6,78	6,88B				
Média	8,11	7,60	7,86					
Lignina (g/kg MS)								
40d	77,39	75,42	74,76	75,86	1,673	0,088	0,101	0,289
80d	78,66	69,70	64,31	70,69				
Média	78,08	72,26	69,54					

^a40 d, Amendoim colhido após 40 d de rebrotação; 80 d, Amendoim colhido após 80 d de rebrotação; ^bInoculante: CONT, Controle (sem inoculante), ISO, Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*, IC, Inoculante comercial, Sil-All 4 × 4 (Lallemand®, Brasil); ^cEPM, Erro padrão da média; ^dP-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), rebrotação (R) e interação I com R (I × R); ^eMN, Matéria natural; ^fMS, Matéria seca; ^gFDN_{cp}, Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; ^hNIDA, Nitrogênio insolúvel em detergente ácido; Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste F de Fischer (P≤0,05). Médias seguidas por letras minúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05).

4.6 Digestibilidade *in vitro*

Verificou-se efeito apenas de idade de rebrotação ($P=0,015$) sobre a DIVMS da silagem de amendoim forrageiro, com maior valor para a silagem de amendoim forrageiro colhido aos 80 d rebrotação. Não houve efeito de rebrotação ($P=0,114$), inoculante ($P=0,849$) e de interação I \times R ($P=0,479$) para a DIVFDN, com valor médio de 502,41g/kg MS.

Tabela 7. Coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) de silagens de amendoim forrageiro, colhido aos 40 d e 80 d de rebrotação, tratadas com inoculantes microbianos, armazenadas por 60 dias.

Rebrotação ^a	Inoculante ^b			Média	EPM ^c	P-valor ^d		
	CONT	ISO	IC			I	R	I \times R
DIVMS (g/kg MS ^e)								
40d	545,81	546,10	558,59	550,17B	6,419	0,192	0,015	0,554
80d	593,77	569,36	603,84	588,99A				
Média	569,79	557,73	581,22					
DIVFDN (g/kg MS)								
40d	464,62	499,69	489,69	484,56	9,579	0,849	0,114	0,479
80d	537,33	521,71	501,76	520,27				
Média	500,98	510,54	495,73					

^a40 d, Amendoim colhido após 40 d rebrotação; 80 d, Amendoim colhido após 80 d rebrotação; ^bInoculante: CONT, Controle (sem inoculante), ISO, Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*, IC, Inoculante comercial, Sil-All 4 \times 4 (Lallemand®, Brasil); ^cEPM, Erro padrão da média; ^dP-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), rebrotação (R) e interação I com R (I \times R); ^eMS, Matéria seca; Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste F de Fischer ($P \leq 0,05$).

DISCUSSÃO

4.1 Perfil fermentativo

O teor de MS da silagem de amendoim forrageiro (436,60 g MS/kg MN) não foi afetado pela idade de rebrotação (40 d e 80 d), e está de acordo com a recomendação proposta por McDonald et al. (1991) (> 300 g MS/kg MN). O menor teor de PB na silagem de 40 d de rebrotação comparada aquela de 80 d, bem como o menor valor deste componente no último dia de fermentação, possivelmente se deve a uma maior atividade proteolítica nessas silagens (Li et al., 2017; Kung Junior et al., 2018). A maioria das transformações das frações de nitrogênio advinda da proteína verdadeira ocorre devido à atividade enzimática da planta e às atividades microbianas. A conversão de nitrogênio proteico em aminoácidos livres e peptídeos ocorre pela atuação enzimática das plantas, enquanto a produção de aminas biogênicas, ácido butírico e amônia são resultantes da atividade proteolítica de enzimas microbianas (Đorđević et al., 2019).

Condições adequadas de acidificação são essenciais para preservar a massa ensilada e inibir a atuação de microrganismos indesejáveis (Woolford & Sawczyc, 1984; McDonald et al., 1991). No entanto, à medida que a MS aumenta acima de 40 a 45%, o pH da silagem aumenta, devido a água metabólica disponível para o crescimento de bactérias do ácido lático se tornar limitante em decorrência do aumento de MS da silagem (Whiter & Kung, 2001). Destaca-se que a matéria seca da leguminosa usada no presente estudo encontra-se na faixa acima reportada. O valor de pH é um dos indicadores para o processo de ensilagem, sua interpretação não deve ser feita de forma isolada, mas sim considerando os outros fatores em conjunto e que influenciam o processo fermentativo. Em silagens de leguminosas, o pH normalmente se estabiliza com valores mais altos (pH > 4,5) quando comparado ao das silagens de gramíneas (pH < 4,5) (Kung Junior et al., 2018). No entanto, o menor pH da silagem ISO em ambas as idades de rebrota, bem como nas silagens inoculadas aos 60 dias de fermentação, poderia sugerir uma maior produção de ácido lático nessas silagens, e portanto, maior acidificação da massa, fato este não observado no nosso estudo.

Leguminosas forrageiras apresentam como uma das características limitantes para ensilagem, baixo teor de CHOs (< 80 g/kg MS), que é insuficiente para produzir silagens com pH próximo de 4,0, como ocorre para a silagem de milho (Heinritz et al., 2012). Além disso, leguminosas apresentam elevada capacidade tampão e baixo teor

de MS no momento da colheita (Ferreira et al., 2012). Mesmo ao realizar o emurchecimento do material e aumentar o teor de MS, o teor de CHOs e a capacidade tampão ainda são fatores limitantes para produzir silagem de qualidade ao comparar com silagens de milho ou de sorgo (Heinritz et al., 2012). Apesar das limitações que a ensilagem de leguminosas apresenta, o inoculante ISO foi mais eficiente em fermentar os CHOs em ácidos orgânicos. Esse resultado pode estar relacionado à elevada capacidade de crescimento que a cepa AV14.17 possui, o que resultou em rápida acidificação em ambas as idades de rebrota, inclusive com maior produção de ácido acético.

Conforme avanço dos dias após ensilagem o teor de CHOs diminuiu devido ao consumo pelas BAL. Ainda, durante todo o período de fermentação, a silagem inoculada com a cepa AV14.17 apresentou menor teor de CHOs residuais o que sugere sua capacidade de crescimento e eficiência em utilizar CHOs disponível. Resultados semelhantes também foram verificados por Li et al. (2020), ao avaliarem a dinâmica das comunidades microbianas e o perfil fermentativo em silagem de alfafa aos 7, 14, 28 e 56 dias após ensilagem. Os autores observaram que a redução mais acentuada de CHOs foi verificada aos 56 dias após ensilagem, com destaque para as silagens inoculadas com *Lactiplantibacillus plantarum*.

As concentrações de N-NH₃ encontradas no presente estudo estão abaixo de 120 g N-NH₃/kg nitrogênio total, registrado por Kung Junior et al. (2018), para silagens de leguminosas com 45-55% de MS, indicando que houve considerável atividade proteolítica nas silagens avaliadas. A atividade proteolítica, além de resultar em silagens de menor qualidade, também contribui para menor disponibilidade de nitrogênio proteico a nível de rúmen (Copani et al., 2016; He et al., 2020). Apesar de ter sido observado efeito de inoculante sobre esta variável, nas silagens de amendoim forrageiros de ambas idades, biologicamente, pode-se inferir que as diferenças são pouco expressivas, uma vez que os valores numéricos são muito próximos.

Carvalho et al. (2016) verificaram baixa atividade proteolítica (64,55 g N-NH₃/kg nitrogênio total) em silagem de amendoim forrageiro tratada com inoculante microbiano, colhido aos 100 dias de rebrota. Os autores justificaram a baixa proteólise devido à rápida acidificação da massa ensilada, adequado teor de MS, produção de ácidos orgânicos e inibição da atividade proteolítica da planta e de microrganismos indesejáveis.

A maior população de BAL nas silagens de 40 d em relação à de 80 d de rebrotação provavelmente decorre da maior população desse grupo microbiano na forragem no momento da ensilagem ($5,64 \times 4,94 \log \text{ufc/g}$), embora possa-se inferir que ambas forragens apresentaram populações de BAL da ordem de $5 \log \text{ufc/g}$, estabelecido por Muck (1996) como adequado para minimizar as perdas por fermentação no silo. Aos 30 e 60 dias de fermentação, silagens de ambas idades, independentemente do uso de inoculantes, apresentaram populações semelhantes desse grupo bacteriano, superiores a $8 \log \text{ufc/g}$ forragem. A população de BAL na planta forrageira encontra-se em baixo número, e aumento entre a colheita e a ensilagem. Devido à reativação de células dormentes e não cultiváveis de BAL durante o processamento (McDonald et al., 1991).

Muck et al. (2018) recomendam o uso de inoculantes microbianos compostos por BAL para reduzir perdas de MS e estabilizar o pH da massa ensilada, através da produção de ácido láctico. As BAL competem com a microbiota epifítica da forrageira ensilada e aumentam a eficiência de fermentação, o que resulta em uma silagem de melhor qualidade e com menores perdas de valor nutritivo. De acordo com Zielińska et al. (2015), esses aditivos são predominantes para uso na produção de silagem, pois, além de inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis (enterobactérias, clostrídios, leveduras e fungos filamentosos), também apresentam efeitos benéficos tanto na fermentação quanto na eficiência de armazenamento de alimentos conservados na forma de silagem.

A menor população de ENT nas silagens inoculadas com ISO e IC provavelmente se deve a rápida acidificação da massa ensilada nessas silagens, que também resultou em menor teor de N-NH_3 , conforme já reportado, pois as enterobactérias são intolerantes ao pH ácido, sendo praticamente inibidas em $\text{pH} < 4,5$ (Kung Junior et al., 2015). As ENT competem com BAL por substratos, como também são capazes de fermentar glicose e ácido láctico; além de produzir ácido acético, 2,3-butanodiol e etanol, também podem deaminar e descarboxilar aminoácidos (Pahlow et al., 2003; Fabiszewska et al., 2019). A redução desse grupo microbiano na silagem reflete a presença combinada de boas condições de ensilabilidade, incluindo disponibilidade de nutrientes e água, eficiente conversão destes nutrientes em produtos da fermentação e baixo pH pelas BAL e, também, temperaturas moderadas (Pahlow et al., 2003).

Os inoculantes foram efetivos na redução da população de leveduras nas silagens com 40 d de rebrotação e, apenas a silagem ISO apresentou menor população de LEV em silagem com 80 d de rebrotação, provavelmente pelas condições prevalecentes na massa ensilada. As LEV desempenham um papel importante na fermentação da silagem. Esses microrganismos são capazes de crescer em um amplo intervalo de pH, causam mais danos a qualidade da silagem durante a fase de abertura do silo; ao metabolizar ácido lático e gerar dióxido de carbono e água, promovem aumento do pH, diminuição da acidez e da estabilidade aeróbia da silagem e permitem a atuação de outros microrganismos deterioradores (Ávila & Carvalho, 2020).

A população de FUN abaixo de 2 log ufc/g silagem não compromete a qualidade da silagem (Borreani et al., 2018). No nosso estudo, aos 60 dias de fermentação, todas as silagens avaliadas apresentaram contagens abaixo deste valor. Porém, em contagens acima de 5 log ufc/g silagem, esses microrganismos promovem baixa estabilidade aeróbia da silagem, além da silagem pode apresentar micotoxinas, contaminando o leite e prejudiciais à saúde animal e humana (Fabiszewska et al., 2019).

O teor médio de ácido lático de 40,11 g/kg MS encontra-se na faixa (20-40 g/kg MS) proposta por Kung Junior et al. (2018) como adequada para silagem de leguminosas de alta matéria seca, na América do Norte. Isto pode explicar os baixos valores de pH, elevadas populações de BAL, baixa concentração de N-NH₃, baixas populações de ENT e de FUN, e ausência de fermentação clostrídica. Proporção lático/acético maior que 3:1 indica que ocorreu fermentação homolática, enquanto relação inferior a 3:1 indica que ocorreu fermentação heterolática (Zhang et al., 2020). Assim, pode-se inferir que ocorreu fermentação predominantemente homolática nas silagens CONT e inoculada com IC, e fermentação heterolática na silagem ISO, cujos valores médios dessa relação foram 3,36; 5,77 e 1,66, respectivamente.

A espécie *Lactiplantibacillus pentosus* é uma bactéria heterolática facultativa, capaz de fermentar hexoses e pentoses como fonte de substrato. Essa espécie de BAL pode fermentar glicose através da via Embden-Meyerhof-Parnas e fermentar xilose, ribose, desoxirribose e outras pentoses através da via da fosfocetolase (Pahlow et al., 2003; Cubas-Cano et al., 2018). A depender da disponibilidade de substratos, essa cepa produz além do ácido lático, ácido acético, ao utilizar a via da fosfocetolase, o que resulta em fermentação heterolática, e, conseqüentemente reduz a recuperação

de MS comparado com uma fermentação homolática (McDonald et al., 1991; Carvalho et al., 2021).

O maior conteúdo de ácido acético (23,19 g/kg MS) na silagem tratada com ISO, pode explicar a menor relação ácido lático:ácido acético dessas silagens, bem como proporcionar ganhos em estabilidade aeróbia dessas silagens, comparado a silagens que possuem maior relação ácido lático:ácido acético (Kung Junior et al., 2018). Para silagens de leguminosas de alta MS, Kung Junior et al. (2018) estabeleceram como referência valores de ácido acético de 5-20 g/kg MS. Devido a não detecção de ácido butírico nas silagens de amendoim forrageiro investigadas neste estudo, associado ao baixo teor de N-NH₃ verificado nas silagens de amendoim em ambas as idade de rebrota, sugere-se que não houve indícios de fermentação clostrídica. Clostrídios são bactérias anaeróbias obrigatórias com capacidade de esporular. Porém, em condições de baixa umidade (< 700 g H₂O/kg MN), ocorrida no presente estudo, devido ao emurchecimento, a atuação clostrídica é reduzida ou inexistente, permitindo que as BAL produzam ácido lático suficiente para estabilizar a fermentação da silagem (Muck, 2010; Zielińska et al., 2015).

A ocorrência de fermentação por clostrídios é indesejável, pois estes competem com as BAL por fontes de substrato, e são capazes de esporular e de produzir micotoxinas, que é o caso das espécies de clostrídios *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*. Além de consumir ácido lático, esse grupo microbiano degrada a fração proteica do alimento ao converter o nitrogênio da proteína verdadeira em ácido butírico, aminas, peptídeos, aminoácidos livres e amônia. Como consequência o pH da silagem aumenta, pois o ácido butírico é um ácido fraco, não contribui para a acidificação da massa ensilada, e produz gás na forma de dióxido de carbono, o que resulta na perda de carbono do material ensilado e reduz a recuperação de MS bem como o valor nutritivo da silagem (Ohshima & McDonald, 1978; Zheng et al., 2016).

4.2 Diversidade microbiana das comunidades bacterianas avaliadas

A técnica de sequenciamento de alto rendimento MiqSeq Illumina através da amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA fornece informações mais detalhadas das comunidades bacterianas quando comparado com as técnicas convencionais (Ni et al., 2018).

A variação da abundância relativa ao se comparar amostras antes da ensilagem com aquelas de suas respectivas silagens já era esperado. A microbiota

epifítica da planta no campo varia em função das características ambientais, como exemplo do clima, solo, temperatura, adubo e estágio de colheita; esses fatores atuam em conjunto e influenciam diretamente a população bacteriana epifítica da planta (Leandro et al., 2019; Ren et al., 2020). Porém, após a ensilagem, devido as condições do meio mudarem drasticamente, é normal que ocorra variação da abundância relativa, com predominância de gêneros bacterianos mais adaptados as condições de anaerobiose e meio ácido que o processo fermentativo proporciona (Muck et al., 2018; Ali et al., 2020).

A maior abundância relativa do gênero bacteriano *Lactiplantibacillus*, verificada nas silagens inoculadas com ISO em ambas as idades de rebrotação (40 d e 80 d), pode ser devido a capacidade da cepa AV14.17-*Lactiplantibacillus pentosus* predominar na massa ensilada e dominar as demais populações microbianas epifíticas, o que naturalmente elevou a abundância desse gênero bacteriano em particular. Apesar da análise de diversidade microbiana não ter sido realizada até o nível de espécie, com base nos resultados de perfil fermentativo e contagem de populações microbianas pode-se inferir que o aumento da abundância relativa do gênero *Lactiplantibacillus* nas silagens inoculadas com ISO seja devido a atuação efetiva da cepa AV14.17-*Lactiplantibacillus pentosus*, caracterizada como BAL heterofermentativa facultativa, capaz de fermentar uma gama de substratos, que além do ácido láctico, também produz ácido acético, fatores esses que contribuem efetivamente para que a cepa AV14.17 apresente maior capacidade de adaptação e predominância em condições distintas, o que pode ter contribuído para que outras espécies de BAL se desenvolvessem (Cubas-Cano et al., 2018; Silva et al., 2020).

Enquanto que a abundância relativa de *Lactiplantibacillus* aumentou nas silagens inoculadas com ISO, a abundância relativa de *Enterobacter* diminuiu. As enterobactérias são microrganismos anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, sua presença na silagem é indesejável, pois além de consumirem CHOs, competem diretamente com as BAL por fontes de substratos, produzem ácido acético e N-NH₃ e consomem o ácido láctico, o que dificulta ainda mais a acidificação da massa ensilada (Pahlow et al., 2003; Wang et al., 2019). Por outro lado, a abundância de *Enterobacter* nas silagens controle e inoculada com IC foram elevadas quando comparada com as silagens inoculadas com ISO, o que poderia indicar que mesmo com a inoculação de BAL, durante a ensilagem não há garantias de que o inoculante irá predominar sobre a microbiota epifítica do material ensilado (Tian et al., 2021).

Além da presença de BAL do gênero *Lactiplantibacillus*, também verificou-se a presença de outros gêneros de BAL como *Pediococcus*, *Weissella* e *Lactococcus*. A presença desses gêneros é desejável, principalmente no início do processo fermentativo pois esses microrganismos são capazes de se desenvolverem em condições microaerófilas, com faixa de pH mais elevada ($> 4,5$), e, na medida que aumenta a acidez do meio, esses gêneros são dominados por *Lactiplantibacillus*, que são mais ácido tolerantes e dominam os últimos estágios do processo fermentativo (Ni et al., 2018; Ogunade et al., 2018).

Resultados semelhantes também foram observados por Ogunade et al. (2018), que ao avaliarem a diversidade microbiana em silagens de alfafa, verificaram maior predominância dos gêneros *Pediococcus* e *Lactococcus* nos primeiros 15 dias após ensilagem e predominância de *Lactiplantibacillus* nas silagens avaliadas após 60 dias de fermentação. Eikmeyer et al. (2013) também constataram predominância dos gêneros de *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella* em silagens de gramíneas aos 14 dias após ensilagem, e maior predominância de *Lactiplantibacillus*, aos 56 dias após ensilagem. Assim, a maior abundância de *Lactiplantibacillus* nas silagens inoculadas com ISO poderia explicar sua qualidade fermentativa superior em relação aos outros tratamentos, em ambas as idades de rebrota do amendoim forrageiro nas silagens avaliadas neste estudo.

Apesar das análises de α -diversidade e β -diversidade não apresentarem diferenças significativas, as variações observadas nos índices de Shannon e de Chao1, como também a dispersão entre os tratamentos, em função de cada eixo da análise de PCoA, indicam que ocorreu variação da comunidade microbiana avaliada. Além disso, a variação da comunidade microbiana, mesmo sem a identificação de diferenças significativas, pode implicar em diferenças na qualidade da silagem (Ni et al., 2017, 2018; Tian et al., 2021). Geralmente, em condições de campo, as comunidades microbianas são variáveis na própria cultura e quando colhida, o ecossistema microbiano é perturbado, conforme bactérias mais adaptáveis começam a predominar (Ni et al., 2017). A ausência de diferenças significativas com base nos índices ecológicos descritos nas análises de α -diversidade e β -diversidade podem indicar que a aplicação de inoculantes não foi capaz de alterar a equabilidade da distribuição dos gêneros bacterianos de BAL nos tratamentos avaliados, ocorrendo apenas um maior predomínio de alguns gêneros de BAL em detrimento de outros, e

que a maioria desses gêneros bacterianos já estavam presentes na própria microbiota epifítica da planta de amendoim forrageiro (Leandro et al., 2019; Zhao et al., 2021).

O índice de Shannon mede a equabilidade de distribuição de abundâncias, ou seja, estima o grau de incerteza em prever que um dado gênero ou espécie pertencerá a um indivíduo (tratamento/inoculante) escolhido ao acaso, enquanto que o índice de Chao1 estima o número de gêneros ou espécies raras dentro de uma amostra (Tian et al., 2021). Logo, se a maioria dos gêneros amostrados pelos índices de Chao1 e de Shannon forem similares entre as amostras estudadas, não serão identificadas diferenças significativas entre os tratamentos avaliados (Li et al., 2018).

Apesar da análise de PCoA não mostrar diferença significativa, é evidente que a aplicação dos tratamentos promoveu variações na β -diversidade das estruturas da comunidade bacteriana em nível de gênero (Ali et al., 2020). Como a análise de β -diversidade é calculada em função de índices ecológicos não paramétricos, a depender da dispersão das amostras, a não identificação de diferenças significativas torna-se comum, pois a β -diversidade é a mudança ecológica de diversidade de espécies em um gradiente ambiental e compara a distância das amostras entre si, e para que ocorra uma mudança drástica das espécies de um dado ambiente, fatores determinantes na ecologia microbiana devem ser afetados, como exemplo da concentração de nutrientes, competição, presença de substâncias inibidoras (bacteriocinas), pH, atividade de água (A_w), dentre outros (Zhao et al., 2021).

Com base na análise de abundância diferencial entre táxons, é evidente que o inoculante ISO contribuiu efetivamente para melhorias das características fermentativas das silagens de amendoim forrageiro, devido a predominância de táxons de bactérias dos gêneros *Pediococcus* e *Lactiplantibacillus*, ambas pertencentes a família *Lactobacillaceae*, como também à medida que esses táxons aumentaram, houve redução significativa dos táxons de *Kluyvera*, pertencentes a família *Enterobacteriaceae*. Esses resultados corroboram com aqueles das contagens de populações microbianas e da abundância relativa. Durante o período de ensilagem, quando o meio aeróbio é alterado para anaeróbio, é normal a transição de filos de *Proteobacteria* para *Firmicutes*. Em ambiente anaeróbio, *Firmicutes* possuem a capacidade de sintetizar enzimas hidrolíticas ácidas, logo, condições anaeróbias e de meio ácido contribuem para o crescimento do filo *Firmicutes* (Yang et al., 2019). A transição do filo *Proteobacteria* para *Firmicutes* também foi observado por Yang et al. (2019) que demonstraram abundância elevada do filo *Proteobacteria* em capim-

elefante cv. Napier *in natura*, e, conforme o prolongamento da fermentação, houve aumento do filo *Firmicutes* e diminuição do filo *Proteobacteria*.

4.3 Composição química e digestibilidade *in vitro*

As alterações observadas nos teores de MM e MO nas silagens de amendoim forrageiro podem ser atribuídas à idade de rebrotação à colheita. O amendoim forrageiro colhido aos 40 d rebrotação apresentava menor altura e menor massa/volume comparado aquele colhido aos 80 d rebrotação, e isto possivelmente contribuiu para maior contaminação de solo no material colhidos aos 40 d rebrotação, contribuindo para diminuir a MO e aumentar a MM (Paulino et al., 2012).

O maior teor de FDA na silagem de amendoim colhido aos 80 d rebrotação, provavelmente se deve ao fato de que com o avanço da maturação, as relações entre folha/pecíolo/caule são modificadas, sendo natural o aumento da fração fibrosa (Paulino et al., 2012; Đorđević et al., 2021). O maior teor de NIDA verificado na silagem de amendoim colhido aos 40 d rebrotação possivelmente esteja relacionado com o maior teor proteico verificado nessa idade, por ocasião da colheita; o período de emurchecimento pode ter contribuído para o aumento do teor de NIDA aos 40 d rebrotação.

A redução no teor de CEL observada nas silagens CONT independentemente da idade de rebrotação pode ser atribuída à hidrólise ácida causada pelos ácidos orgânicos produzidos durante a fase fermentativa, o que também justifica o menor teor de FDA dessas silagens, ao reduzir a estrutura recalcitrante da fração lignocelulósica, como também pela ação de celulasas, provenientes de atividade microbiana (Possenti et al., 2010; Yang et al., 2019). Possenti et al. (2010) avaliaram as características fermentativas de silagem de amendoim forrageiro e também relataram redução da fração fibrosa. Os autores observaram redução significativa do teor da HEM e da CEL, e também diminuição do teor de FDA das silagens avaliadas.

A silagem de amendoim forrageiro colhido aos 80 d rebrotação apresentou maior DIVMS em comparação aos 40 d rebrota, provavelmente devido ao seu maior conteúdo celular e menor teor de NIDA comparado a silagem de amendoim forrageiro colhido aos 40 d rebrotação (Ferreira et al., 2012). Apesar de leguminosas forrageiras apresentarem maior lignificação dos componentes fibrosos do que gramíneas, há efeito de compensação por altas taxas de degradação por conterem maior conteúdo celular e mais fração fibrosa potencialmente digestível, e de forma contrária, aumento

no teor de NIDA pode contribuir para decréscimos em digestibilidade da silagem (Van Soest, 1994; Paulino et al., 2009; Fernandes et al., 2017).

CONCLUSÕES

A idade de rebrotação influencia a composição química da silagem de amendoim forrageiro e na abundância relativa de sua comunidade microbiana, sem comprometer seu valor nutritivo. Portanto, com base na MS produzida, recomenda-se a colheita desta leguminosa para ensilagem aos 80 d de rebrotação, associada ao uso de inoculante microbiano.

O uso de inoculante microbiano melhora a qualidade da silagem de amendoim forrageiro, reduzindo o pH, a atividade proteolítica e inibindo o crescimento de enterobactérias, leveduras e de fungos filamentosos. Além disso, a cepa AV14.17 contribuiu para aumentar a abundância relativa de bactérias do gênero *Lactiplantibacillus*, com redução do gênero *Enterobacter*, o que indica potencial de uso dessa cepa como inoculante microbiano, porém, faz-se necessária a avaliação com outras plantas forrageiras e ensilagem em larga escala, em condições de campo.

AGRADECIMENTOS

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

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

DECLARAÇÃO DE DISPONIBILIDADE DE DADOS

Os autores possuem acesso a todos os dados obtidos neste estudo e assumem a responsabilidade pela integridade e pela precisão das análises. Os dados que sustentam as conclusões deste estudo estão disponíveis via autor correspondente conforme solicitação.

REFERÊNCIAS

- Adesogan, A. T. (2005). Effect of bag type on the apparent digestibility of feeds in ANKOM DaisyII incubators. *Animal Feed Science and Technology*, *119*(3–4), 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.09.012>
- Agarussi, M. C. N., Pereira, O. G., da 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. *Molecular Biology Reports*, *46*(1), 451–460. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4494-z>
- Agarussi, M. C. N., Pereira, O. G., Paula, R. A. de, Silva, V. P. da, Roseira, J. P. S., & Fonseca e Silva, F. (2019). Novel lactic acid bacteria strains as inoculants on alfalfa silage fermentation. *Scientific Reports*, *9*(1), 8007. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44520-9>
- Albrecht, K. A., & Beauchemin, K. A. (2003). Alfalfa and Other Perennial Legume Silage. In D. R. Buxton, R. E. Muck, & J. H. Harrison (Eds.), *Silage Science and Technology* (Agronomy M, Issue 42, pp. 633–664). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c14>
- Ali, N., Wang, S., Zhao, J., Dong, Z., Li, J., Nazar, M., & Shao, T. (2020). Microbial diversity and fermentation profile of red clover silage inoculated with reconstituted indigenous and exogenous epiphytic microbiota. *Bioresource Technology*, *314*(2), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123606>
- American Public Health Association. (2015). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Y. Salfinger & M. Lou Tortorello (eds.); 5th ed.). American Public Health Association (APHA). <https://doi.org/10.2105/MBEF.0222>
- Andrews, S. (2010). *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. Babraham Bioinformatics. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. In *Association of Official Analytical Chemists* (15th ed., Issue Volume 1). <https://doi.org/10.7312/seir17116-004>
- Ávila, C. L. S., & Carvalho, B. F. (2020). Silage fermentation—updates focusing on the performance of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, *128*(4), 966–984. <https://doi.org/10.1111/jam.14450>
- Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R. J., Holmes, B. J., & Muck, R. E. (2018). Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal of Dairy Science*, *101*(5), 3952–3979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>
- Bretz, F., Hothorn, T., & Westfall, P. (2011). *Multiple Comparisons Using R* (Chapman & Hall/CRC (ed.); 1st ed.). Taylor & Francis Group. http://www.ievbras.ru/ecostat/Kiril/R/Biblio_N/R_Eng/Bretz2011.pdf
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. A., Smith, G., & Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, *6*(8), 1621–1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>

- Carvalho, B. F., Sales, G. F. C., Schwan, R. F., & Ávila, C. L. S. (2021). Criteria for lactic acid bacteria screening to enhance silage quality. *Journal of Applied Microbiology*, *130*(2), 341–355. <https://doi.org/10.1111/jam.14833>
- Carvalho, W. G., Costa, K. A. D. P., Epifanio, P. S., Perim, R. C., Teixeira, D. A. A., & Medeiros, L. T. (2016). Silage Quality of Corn and Sorghum Added With Forage Peanuts. *Revista Caatinga*, *29*(2), 465–472. <https://doi.org/10.1590/1983-21252016v29n224rc>
- Chong, J., Liu, P., Zhou, G., & Xia, J. (2020). Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nature Protocols*, *15*(3), 799–821. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0264-1>
- Copani, G., Niderkorn, V., Anglard, F., Quereuil, A., & Ginane, C. (2016). Silages containing bioactive forage legumes: a promising protein-rich feed source for growing lambs. *Grass and Forage Science*, *71*(4), 622–631. <https://doi.org/10.1111/gfs.12225>
- Cubas-Cano, E., González-Fernández, C., Ballesteros, M., & Tomás-Pejó, E. (2018). *Lactobacillus pentosus* CECT 4023 T co-utilizes glucose and xylose to produce lactic acid from wheat straw hydrolysate: Anaerobiosis as a key factor. *Biotechnology Progress*, *35*(1), 2739–2745. <https://doi.org/10.1002/btpr.2739>
- Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I. L., Agellon, L. B., & Xia, J. (2017). MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Research*, *45*(1), 180–188. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx295>
- Đorđević, S., Mandić, V., Djordjevic, N., & Pavlovic, B. (2019). Bacterial inoculant effect on quality of alfalfa silage and haylage. *Biotechnology in Animal Husbandry*, *35*(1), 85–96. <https://doi.org/10.2298/BAH1901085D>
- Đorđević, S., Mandić, V., & Đorđević, N. (2021). Effects of cutting stage and bacterial inoculant on quality of the red clover silage. *Biotechnology in Animal Husbandry*, *37*(1), 65–73. <https://doi.org/https://doi.org/10.2298/BAH2101065D>
- Dubeux Junior, J. C. B., Blount, A. R. S., Mackowiak, C., Santos, E. R. S., Pereira Neto, J. D., Riveros, U., Garcia, L., Jaramillo, D. M., & Ruiz-Moreno, M. (2017). Biological N₂ Fixation, Belowground Responses, and Forage Potential of Rhizoma Peanut Cultivars. *Crop Science*, *57*(2), 1027–1038. <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.09.0810>
- Eikmeyer, F. G., Köfinger, P., Poschenel, A., Jünemann, S., Zakrzewski, M., Heintz, S., Mayrhuber, E., Grabherr, R., Pühler, A., Schwab, H., & Schlüter, A. (2013). Metagenome analyses reveal the influence of the inoculant *Lactobacillus buchneri* CD034 on the microbial community involved in grass ensiling. *Journal of Biotechnology*, *167*(3), 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.07.021>
- European Union. (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*, *32010L0063*, 33–79. <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>
- Fabiszewska, A. U., Zielińska, K. J., & Wróbel, B. (2019). Trends in designing microbial silage quality by biotechnological methods using lactic acid bacteria

inoculants: a minireview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(5), 76–89. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2649-2>

- Fernandes, F. D., Ramos, A. K. B., Carvalho, M. A., Maciel, G. A., De Assis, G. M. L., & Braga, G. J. (2017). Forage yield and nutritive value of *Arachis* spp. genotypes in the Brazilian savanna. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, 5(1), 19–28. [https://doi.org/10.17138/TGFT\(5\)19-28](https://doi.org/10.17138/TGFT(5)19-28)
- Ferreira, A. L., Maurício, R. M., Fernandes, F. D., Carvalho, M. A., Ramos, A. K. B., & Junior, R. G. (2012). Ranking contrasting genotypes of forage peanut based on nutritive value and fermentation kinetics. *Animal Feed Science and Technology*, 175(1–2), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.03.024>
- Gomes, A. L. M., Jacovaci, F. A., Bolson, D. C., Nussio, L. G., Jobim, 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. *Animal Feed Science and Technology*, 247, 194–198. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.11.016>
- 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. (2011). Evaluation of lignin contents in tropical forages using different analytical methods and their correlations with degradation of insoluble fiber. *Animal Feed Science and Technology*, 168(3–4), 206–222. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.05.001>
- He, L., Wang, C., Xing, Y., Zhou, W., Pian, R., Chen, X., & Zhang, Q. (2020). Ensiling characteristics, proteolysis and bacterial community of high-moisture corn stalk and stylo silage prepared with *Bauhinia variegata* flower. *Bioresource Technology*, 296(54), 122336. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122336>
- 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. *Animal Feed Science and Technology*, 174(3–4), 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.03.017>
- Holden, L. A. (1999). Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of Dairy Science*, 82(8), 1791–1794. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75409-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75409-3)
- Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I., Emerson, M., & Altman, D. (2014). Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *Animals*, 4(1), 35–44. <https://doi.org/10.3390/ani4010035>
- Köppen, W. (1918). Klassifikation der Klimate nach Tempetarur, Niederschlag und Jahreslauf. *Petermanns Geographische Mitteilungen*, 64, 193–203.
- Kung Junior, L., Lim, J. M., Hudson, D. J., Smith, J. M., & Joerger, R. D. (2015). Chemical composition and nutritive value of corn silage harvested in the northeastern United States after Tropical Storm Irene. *Journal of Dairy Science*, 98(3), 2055–2062. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8621>
- Kung Junior, L., Shaver, R. D., Grant, R. J., & Schmidt, R. J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017->

13909

- Kung Junior, L., Taylor, C. C., Lynch, M. P., & Neylon, J. M. (2003). The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *86*(1), 336–343. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73611-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73611-X)
- Leandro, E. dos S., de Oliveira, M. N. V., Rufino, L. D., Ribeiro, K. G., & Pereira, O. G. (2019). Microbial characterization of *Arachis pintoi* and its silages at different fermentation periods. *Molecular Biology Reports*, *46*(5), 5019–5024. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04952-y>
- Li, D. X., Ni, K., Zhang, Y., Lin, Y., & Yang, F. (2018). Influence of lactic acid bacteria, cellulase, cellulase-producing *Bacillus pumilus* and their combinations on alfalfa silage quality. *Journal of Integrative Agriculture*, *17*(12), 2768–2782. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62060-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62060-X)
- Li, M., Zhou, H., Zi, X., & Cai, Y. (2017). Silage fermentation and ruminal degradation of stylo prepared with lactic acid bacteria and cellulase. *Animal Science Journal*, *88*(10), 1531–1537. <https://doi.org/10.1111/asj.12795>
- Li, R., Jiang, D., Zheng, M., Tian, P., Zheng, M., & Xu, C. (2020). Microbial community dynamics during alfalfa silage with or without clostridial fermentation. *Scientific Reports*, *10*(1), 17782–17799. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74958-1>
- Licitra, G., Hernandez, T. M., & Van Soest, P. J. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, *57*(4), 347–358. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00837-3](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00837-3)
- Machado, M. G., Detmann, E., Mantovani, H. C., Valadares Filho, S. C., Bento, C. B. P., Marcondes, M. I., & Assunção, A. S. (2016). Evaluation of the length of adaptation period for changeover and crossover nutritional experiments with cattle fed tropical forage-based diets. *Animal Feed Science and Technology*, *222*, 132–148. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.10.009>
- 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. *Journal of Dairy Science*, *101*(5), 4060–4074. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13704>
- McDonald, P., Henderson, A. R., & Heron, S. J. E. (1991). *The biochemistry of silage* (2nd ed.). Aberystwyth: Chalcombe Publications.
- McLaren, M. R., & Callahan, B. J. (2021). Silva 138.1 prokaryotic SSU taxonomic training data formatted for DADA2 [Data set]. *Zenodo*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4587955>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, *8*(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mertens, D. R. (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, *85*(6), 1217–1240.

<https://doi.org/10.1093/jaoac/85.6.1217>

- Muck, R. E; (1996). Inoculation of silage and its effects on silage quality. In I. conference with dairy and forage Industries (Ed.), *Informational conference with dairy and forage industries* (pp. 43–51). US Dairy Forage Res Center.
- Muck, R. E. (2010). Silage microbiology and its control through additives. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(suppl special), 183–191. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982010001300021>
- Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., McAllister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C., & Kung, L. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3980–4000. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>
- Nelson, N. (1944). A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 153(2), 375–380. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71980-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71980-7)
- Ni, K., Wang, F., Zhu, B., Yang, J., Zhou, G., Pan, Y., Tao, Y., & Zhong, J. (2017). Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on the microbial community and fermentation quality of soybean silage. *Bioresource Technology*, 238, 706–715. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.055>
- Ni, K., Zhao, J., Zhu, B., Su, R., Pan, Y., Ma, J., Zhou, G., Tao, Y., Liu, X., & Zhong, J. (2018). Assessing the fermentation quality and microbial community of the mixed silage of forage soybean with crop corn or sorghum. *Bioresource Technology*, 265, 563–567. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.097>
- 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. *Journal of Dairy Science*, 101(3), 2048–2059. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12876>
- Ohshima, M., & McDonald, P. (1978). A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(6), 497–505. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740290602>
- Okuda, H., Fujii, S., & Kawashima, Y. (1965). A direct colorimetric determination of blood ammonia. *Tokushima Journal of Experimental Medicine*, 12, 11–23. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19661405652>
- Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Oude-Elferink, S. J. W. H., & Spoelstra, S. F. (2003). Microbiology of Ensiling. In D. R. Buxton, R. E. Muck, & J. H. Harrison (Eds.), *Silage Science and Technology* (Agronomy M, Vol. 10, Issue 42, pp. 31–93). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c2>
- Paulino, V.T., Bueno, M. S., & Abdalla, A. L. (2012). Composição química e compostos fenólicos em Arachis pintoi “belmonte.” *Archivos de Zootecnia*, 61(236), 611–614. <https://doi.org/10.4321/S0004-05922012000400013>
- Paulino, Valdinei Tadeu, Júnior, E. F., Possenti, R. A., & Lucenas, T. L. de. (2009). Silagem de amendoim forrageiro (Arachis pintoi) cv. Belmonte) com diferentes

- aditivos. *Boletim Da Indústria Animal*, 66(1), 33–43.
- Possenti, R. A., Ferreira Júnior, E., Paulino, V. T., Otsuk, I. P., & Brás, P. (2010). Efeito do emurchecimento e da adição de aditivo biológico na degradabilidade in situ e composição físico-química da silagem de *Arachis pintoi* cv Belmonte. *Boletim de Indústria Animal*, 67(1), 45–56.
- R Core Team. (2018). R core team (2018). In *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>
- Ren, H., Feng, Y., Pei, J., Li, J., Wang, Z., Fu, S., Zheng, Y., Li, Z., & Peng, Z. (2020). Effects of *Lactobacillus plantarum* additive and temperature on the ensiling quality and microbial community dynamics of cauliflower leaf silages. *Bioresource Technology*, 307(20), 1232–1245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123238>
- Ribeiro, A. C., Guimarães, P. T. G., & Viana, V. H. A. (1999). Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais - 5ª Aproximação. In A. C. Ribeiro, P. T. G. Guimarães, & V. H. Alvarez (Eds.), *Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais - 5º Aproximação*. Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais. <http://www.labominas.com.br/userfilesfiles/5-aproximacao.pdf>
- Santos, H. G., Jacomine, P. K. T., Anjos, L. H. C., Oliveira, V. A., Oliveira, J. B., Coelho, M. R., Lumberras, J. F., & Cunha, T. J. F. (2013). *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos* (3rd ed.). Embrapa Solos.
- SAS Institute Inc., Cary, NC, U. (2010). *Statistical Analysis Systems User's Guide* (9.4). SAS Institute, Inc.
- Siegfried, V. R., Ruckemann, H., & Stumpf, G. (1984). Eine HPLC-methode zur bestimmung organischer säuren in silagen. *Landwirtsch Forsch*, 37(1), 298–304.
- Silva, V. P. da, Pereira, O. G., Leandro, E. S. de, Paula, R. A. de, Agarussi, M. C. N., & Ribeiro, K. G. (2020). Selection of Lactic Acid Bacteria from Alfalfa Silage and Its Effects as Inoculant on Silage Fermentation. *Agronomy Journal*, 10, 1–14. <https://doi.org/10.1002/agj2.20720>
- Tian, H., Wang, Y., Liu, Z., Hu, Z., Guo, Y., Deng, M., Liu, G., & Sun, B. (2021). Effects of Malic Acid and Sucrose on the Fermentation Parameters, CNCPS Nitrogen Fractions, and Bacterial Community of *Moringa oleifera* Leaves Silage. *Microorganisms*, 9(10), 2102–2115. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102102>
- Tilley, J. M. A., & Terry, R. A. (1963). A Two-Stage Technique for the in Vitro Digestion of Forage Crops. *Grass and Forage Science*, 18(2), 104–111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>
- Universidade Federal de Viçosa. (2021). *Boletim meteorológico 2021*. Estação Climatológica Principal de Viçosa. Departamento de Engenharia Agrícola. Viçosa, MG: UFV, 2021. https://www.posmet.ufv.br/?page_id=1253
- Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant* (Cornell university press (ed.); 2ed ed.). Ithaca.

- Wang, C., He, L., Xing, Y., Zhou, W., Yang, F., Chen, X., & Zhang, Q. (2019). Fermentation quality and microbial community of alfalfa and stylo silage mixed with *Moringa oleifera* leaves. *Bioresource Technology*, *284*(5), 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.129>
- Wang, Y., & Qian, P.-Y. (2009). Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *PLoS ONE*, *4*(10), e7401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>
- Whiter, A. G., & Kung, L. (2001). The Effect of a Dry or Liquid Application of *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the Fermentation of Alfalfa Silage. *Journal of Dairy Science*, *84*(10), 2195–2202. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74666-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74666-8)
- WingChing-Jones, R., & Rojas-Bourrillón, A. (2006). Composición nutricional y características fermentativas del ensilaje de maní forrajero. *Agronomía Costarricense*, *30*(1), 87–100. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/6834/6521>
- Woolford, M. K., & Sawczyc, M. K. (1984). An investigation into the effect of cultures of lactic acid bacteria on fermentation in silage. 1. Strain selection. *Grass and Forage Science*, *39*(2), 139–148. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1984.tb01675.x>
- Yang, L., Yuan, X., Li, J., Dong, Z., & Shao, T. (2019). Dynamics of microbial community and fermentation quality during ensiling of sterile and nonsterile alfalfa with or without *Lactobacillus plantarum* inoculant. *Bioresource Technology*, *275*(1), 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.067>
- Zhang, Y. C., Wang, X. K., Li, D. X., Lin, Y. L., Yang, F. Y., & Ni, K. K. (2020). Impact of wilting and additives on fermentation quality and carbohydrate composition of mulberry silage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *33*(2), 254–263. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0925>
- Zhao, S., Yang, F., Wang, Y., Fan, X., Feng, C., & Wang, Y. (2021). Dynamics of Fermentation Parameters and Bacterial Community in High-Moisture Alfalfa Silage with or without Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms*, *9*(6), 1225–1238. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061225>
- Zheng, M. L., Niu, D. Z., Jiang, D., Zuo, S. S., & Xu, C. C. (2016). Dynamics of microbial community during ensiling direct-cut alfalfa with and without LAB inoculant and sugar. *International Journal of Laboratory Hematology*, *38*(1), 42–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Zielińska, K., Fabiszewska, A., & Stefańska, I. (2015). Different aspects of lactobacillus inoculants on the improvement of quality and safety of alfalfa silage. *Chilean Journal of Agricultural Research*, *75*(3), 298–306. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392015000400005>

CAPÍTULO II - PERFIL FERMENTATIVO E DIVERSIDADE MICROBIANA DE SILAGEM DE SOJA, COLHIDA EM DOIS ESTÁGIOS DE MATURIDADE, TRATADAS COM INOCULANTES MICROBIANOS

Capítulo formatado de acordo com o periódico científico: *Animal Feed Science and Technology*, exceto a disposição de tabelas e figuras.

Destaques

- O inoculante reduziu a proteólise e a população de enterobactérias e de leveduras.
- A composição química e a digestibilidade foram alteradas pelo estágio de colheita.
- O valor energético da silagem foi alterado pelo teor de extrato etéreo presente no grão.
- As silagens de soja colhida no estágio R6 apresentaram maior α -diversidade.

Resumo

Foram avaliados as características fermentativas, a dinâmica das comunidades microbianas, a composição química e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (MS) e da fibra em detergente neutro (FDN) de silagens de soja colhidas nos estágios R5 e R6, tratadas com inoculantes microbianos. Foi usado o delineamento em blocos casualizados, com dois estágios de colheita (C), três inoculantes microbianos (I), quatro períodos de fermentação (P) e quatro repetições, arranjado em esquema fatorial $2 \times 3 \times 4$. Os inoculantes microbianos avaliados foram: controle (CONT, sem inoculante); cepa AV14.17 - *Lactiplantibacillus pentosus* (ISO); e inoculante comercial (IC). Os períodos de fermentação (P) corresponderam a 3, 14, 30 e 60 d após a ensilagem. Houve efeito ($P \leq 0,05$) da interação $I \times C \times P$ sobre o conteúdo de

carboidratos solúveis em água (CHOs) residuais e de enterobactérias (ENT). Foi observado efeito ($P \leq 0,05$) da interação C \times P sobre as populações de bactérias do ácido láctico (BAL), de leveduras (LEV) e fungos (FUN). O pH foi afetado ($P < 0,01$) apenas pelos efeitos isolados dos fatores inoculante, colheita e período de fermentação. As silagens inoculadas apresentaram menores valores de pH comparado ao CONT. O uso de inoculante reduziu os teores de N-NH₃, as populações de enterobactérias e de leveduras. A composição química e a digestibilidade *in vitro* das silagens foram influenciadas pelo estágio de colheita, registrando-se menor fração fibrosa, maior digestibilidade e maior valor energético, na silagem de soja colhida no estágio R6. A silagem de soja aditivada com ISO apresentou maior digestibilidade *in vitro* da matéria seca, independente do estágio de colheita. A diversidade microbiana foi afetada ($P < 0,05$) por inoculante e estágio de colheita. As silagens de soja colhidas no estágio R6 apresentaram maior α -diversidade, seguido de maiores valores para índice de Shannon e índice de Chao1, respectivamente. A presença do gênero *Clostridium* foi identificada em todas as silagens avaliadas. O uso de inoculante microbiano e o estágio de colheita influenciam o perfil fermentativo, a diversidade microbiana e a composição química de silagens de soja. Recomenda-se a colheita da soja no estágio R6 e o uso de inoculante microbiano por melhor perfil de fermentação e a digestibilidade *in vitro*, além de elevado rendimento de MS.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas; *Glycine max*; proteólise; 16S rDNA

Abreviações: pH, Potencial hidrogenionico; P, Fósforo; K⁺, Potássio; Na⁺, Sódio; H⁺+Al⁺³, Acidez potencial; Al⁺³, Alumínio; Ca⁺², Cálcio; Mg⁺², Magnésio; V%, Saturação de bases; CTC, Capacidade de troca catiônica; MO, Matéria orgânica; SB,

Soma de bases; C, estágio de colheita; I, inoculantes microbianos; P, períodos de fermentação; CONT, controle, sem inoculante; ISO, cepa *Lactiplantibacillus pentosus* - AV14.17; IC, inoculante comercial; ufc, unidade formadora de colônia; MRS, De Man, Rogosa e Sharpe; MS, matéria seca; PB, proteína bruta; EE, extrato etéreo; FDA, fibra em detergente ácido; FDNcp, fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; NIDA, nitrogênio insolúvel em detergente ácido; LIG, lignina;

HEM, hemicelulose; CEL, celulose; CHOs, carboidratos solúveis; N-NH₃, nitrogênio amoniacal; BAL, bactérias ácido lácticas; VRB, Violet Red Bile Agar; ENT, enterobactérias;

DRBC, Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol; LEV, leveduras; FUN, fungos filamentosos; CEUAP, Comitê de Ética em Experimentação Animal; UFV, Universidade Federal de Viçosa;

DIVMS, digestibilidade *in vitro* da matéria seca; DIVFDN, digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro; CNF, carboidratos não-fibrosos; CHO totais, carboidratos totais; NDT, nutrientes digestíveis totais; DNA, ácido desoxirribonucleico; MN, matéria natural; DP, desvio padrão; EPM, erro padrão da média.

Introdução

A cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é originária da Ásia, e com o processo de globalização foi disseminada para os demais continentes, sendo inicialmente cultivada para produção de volumoso (Asekova et al., 2014). Na atualidade, a soja é a leguminosa mais cultivada para produção de grãos, com destaque para o óleo, usado na alimentação humana, e o farelo de soja, principal ingrediente utilizado na alimentação animal (Nkosi et al., 2016a; Müller et al., 2018; De Moraes et al., 2021).

Na última década, houve a intensificação dos sistemas pecuários, com maior proporção de alimentos concentrados como farelo de milho, farelo de trigo e farelo de

soja em dietas de animais ruminantes (Asekova et al., 2014), o que eleva os custos de produção. Dessa forma, a busca pela redução da dependência de grãos, bem como dos custos de produção, o cultivo da soja planta-inteira para produção de silagem, destaca-se como alternativa. A soja apresenta rendimento satisfatório de matéria seca (9,3 a 11,3 t/ha) quando colhida nos estágios R5 ou R6 (Acikgoz et al., 2007), elevado teor proteico, alto valor energético, baixo teor de fibra e elevada digestibilidade da MS (Acikgoz et al., 2007; Rosa et al., 2020; De Moraes et al., 2021). Além disso, é capaz de fixar nitrogênio atmosférico no solo e melhorar sua qualidade em sistemas de rotação de culturas (Ghizzi et al., 2020).

Porém, para produzir silagem de soja planta-inteira de qualidade, determinar o ponto ideal de colheita é essencial pois, conforme a planta avança seu estágio de maturação a composição química e o valor nutritivo são alterados (Gobetti et al., 2011; Oliveira et al., 2016). O uso de inoculante microbiano é recomendado para favorecer a fermentação, reduzir o pH e inibir a atuação de microrganismos indesejáveis (Kung Junior et al., 2003a), pois a cultura da soja possui alta capacidade tampão (400 a 500 meq NaOH/MS) e baixo teor de carboidratos solúveis em água (CHOs) (< 80 g/kg MS), tendo como efeitos negativos a dificuldade da acidificação da massa ensilada, baixa produção de ácido lático, possibilitando a atuação de microrganismos indesejáveis (Mustafa et al., 2007; Gandra et al., 2018; Rosa et al., 2018).

A investigação da dinâmica microbiana através de técnicas moleculares de última geração, através do sequenciamento de genes específicos (16S / 18S rDNA) pode fornecer maiores detalhes sobre a ecologia microbiana durante o processo de ensilagem (McAllister et al., 2018; Yang et al., 2019; Zhao et al., 2021). Assim, a combinação de técnicas convencionais com técnicas moleculares recentes poderia contribuir para uma melhor compreensão da diversidade microbiana e como os efeitos

da inoculação podem alterar a qualidade da silagem de soja (Ali et al., 2020; Ren et al., 2020).

Ni et al. (2017) investigaram as características fermentativas e a diversidade microbiana em silagens de soja tratadas ou não com um combo de inoculante composto por *Lactiplantibacillus plantarum* + *Pediococcus pentosaceus*, com ou sem inclusão de melão, e verificaram melhorias na qualidade da fermentação das silagens tratadas, o que foi atribuído a maior e menor abundância dos gênero *Lactiplantibacillus* e *Clostridium*, respectivamente.

Estudos envolvendo o perfil fermentativo e a diversidade microbiana em silagem de soja planta-inteira são escassos. A nossa hipótese é que o estágio de colheita e o uso de inoculantes microbianos afetam o perfil fermentativo, a composição química e a diversidade microbiana de silagens de soja. Portanto, objetivou-se avaliar as características fermentativas, a dinâmica das comunidades microbianas, a composição química e a digestibilidade *in vitro* de silagens de soja, colhidas nos estágios fenológicos R5 e R6, tratadas com inoculantes microbianos.

Material e Métodos

2.1 Local experimental e cultivo da soja

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Viçosa (UFV), nas dependências do Departamento de Zootecnia, no Laboratório de Forragicultura e Microbiologia da Silagem. A UFV está situada no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, com altitude de $\cong 649$ m, latitude Sul $20^{\circ}45'14''$ e longitude Oeste $42^{\circ}52'54''$. O clima é classificado como Cwa (clima subtropical) (Köppen, 1918), caracterizado por verões quentes e úmidos, com invernos frios e secos, precipitação média anual de 1.200 mm e temperatura média anual de $\cong 21$ °C (Universidade Federal de Viçosa, 2021). Os dados climáticos durante o cultivo da soja estão dispostos na Figura 1.

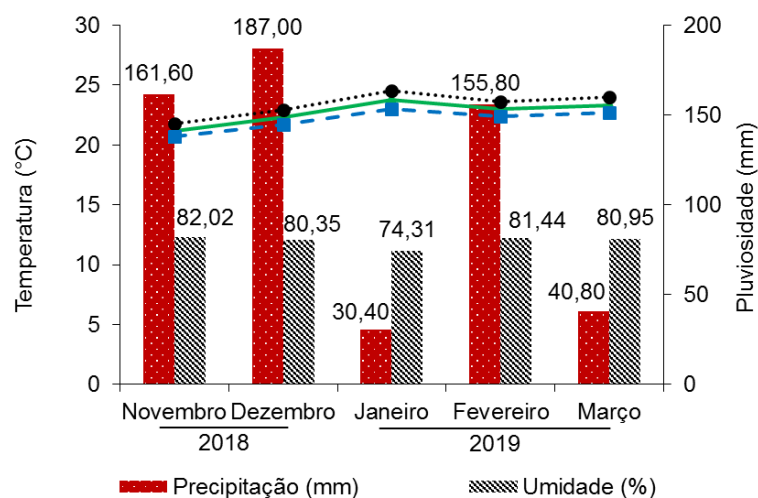


Figura 1. Dados climáticos durante o cultivo da soja de Novembro de 2018 a Março de 2019.

Fonte: Boletim Meteorológico da Universidade Federal de Viçosa (2021).

Antes do plantio foi realizada a amostragem do solo (0-20 cm profundidade) da área experimental, para a realização das análises químicas do mesmo. O solo foi classificado como Argiloso (Santos et al., 2013). A correção da acidez e da fertilidade do solo foi realizada conforme os resultados da análise de solo e a exigência da cultura da soja. As informações referentes às características químicas do solo são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Atributos químicos do solo da área experimental.

pH	P	K ⁺	Na	H ⁺ +Al ³⁺	Al ³⁺	Ca ⁺²	Mg ⁺²	SB	CTC	V	MO
H ₂ O	----mg/dm ³ ---			-----cmol _c /dm ³ -----						%	g/kg
5,70	4,90	105	0,00	3,96	0,00	4,74	1,08	1,94	6,09	60,60	1,88

pH = Potencial hidrogenionico;

P = Fósforo;

K^+ = Potássio;

Na^+ = Sódio;

$H^+ + Al^{+3}$ = Acidez potencial;

Al^{+3} = Alumínio;

Ca^{+2} = Cálcio;

Mg^{+2} = Magnésio;

V% = Saturação de bases;

CTC = Capacidade de troca catiônica;

MO = Matéria orgânica;

SB = Soma de bases.

A soja INTACTA RR2 PRO™ (Monsanto®, Goiânia-GO, Brasil) foi cultivada em uma área de 500 m². O preparo do solo foi realizado através de aração, seguido de gradagem. O plantio foi realizado de forma manual, em linhas, espaçadas de 0,5 m, com distribuição de 15 sementes/m linear, a 3 ± 5 cm de profundidade (população média de 300.000 plantas/ha; taxa de semeadura ± 40 kg sementes/ha). A adubação foi realizada no momento do plantio com aplicação de 20 kg N/ha, 120 kg P₂O₅/ha e 40 kg K₂O/ha, utilizando-se o adubo comercial N-P-K (8-28-16) (Fertilizantes Heringer®, Manhuaçu-MG, Brasil). A adubação e os tratos culturais foram realizados conforme recomendações do Manual de cultivo agrícola (5ª Aproximação) para o estado de Minas Gerais (Ribeiro et al., 1999).

2.2 *Delineamento experimental, colheita e ensilagem*

Foi usado o delineamento em blocos casualizados, com dois estágios de colheita (C), três inoculantes microbianos (I), quatro períodos de fermentação (P) e

quatro repetições por tratamento, arranjado em esquema fatorial 2 × 3 × 4. As colheitas (C) foram realizadas nos estágios fenológicos R5 e R6. Os inoculantes microbianos (I) foram compostos por: controle (CONT, sem inoculante); cepa AV14.17 - *Lactiplantibacillus pentosus* (ISO); e inoculante comercial (IC). Os períodos de fermentação (P) foram: 3, 14, 30 e 60 d após a ensilagem.

As parcelas experimentais no campo foram arranjadas conforme descrito por Gomes et al. (2019). A colheita da soja foi realizada nos estágios R5 e R6, após 90 e 110 d após plantio, respectivamente. A cultura foi colhida com auxílio de roçadeira costal (FR-220, Stihl®, São Leopoldo-RS, Brasil), a ±10 cm acima do nível do solo. Posteriormente, o material foi processado em máquina forrageira estacionária (PN Plus 2000, Nogueira®, São João da Boa Vista-SP, Brasil) em tamanhos de partículas ±1,5 cm.

Foi utilizado o inoculante comercial Sil-All 4 × 4 (Lallemand®, Patos de Minas-MG, Brasil), que é constituído por *Lactiplantibacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus salivarius* subesp. *Salivarius*, sacarose, dióxido de silício, amilase, celulase, enzima hemicelulolítica e xilanase. A cepa AV14.17 - *Lactiplantibacillus pentosus*, foi previamente isolada de silagem de alfafa (Silva et al., 2020).

O inoculante comercial foi aplicado na dosagem recomendada pelo fabricante [1×10^5 unidade formadora de colônia (ufc)/g forragem (5 g/t de forragem)], e diluído em 50 mL de água destilada. A cepa AV14.17 também foi aplicada em 1 kg de forragem, na dosagem de 10^5 ufc/g forragem. O mesmo volume de água utilizado para aplicação dos inoculantes foi adicionado ao CONT. A aplicação dos inoculantes e da água sem inoculante foi realizada sequencialmente, por ordem de repetição, sobre as pilhas individuais de 1 kg, em função de cada tratamento.

Após a aplicação dos inoculantes, 500 g do material foi ensilado em *bags* de náilon-poliétileno (25,4 cm × 35,56 cm, Doug Care Equipament, Springville, CA, USA). A condição de anaerobiose no interior dos *bags* foi obtida com auxílio de uma seladora a vácuo (Eco Vacuum-1040, Orved®, Turin, Itália). Dessa forma, foram confeccionados 96 silos experimentais, que foram armazenados à temperatura ambiente. As amostras de soja (planta, dia 0) antes da ensilagem foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos a -20 °C para posteriores análises.

2.3 Preparo da cepa AV14.17 para uso como inoculante

Foi utilizada a cepa AV14.17 - *Lactiplantibacillus pentosus*, que foi previamente isolada da silagem de alfafa (Silva et al., 2020). Esta cepa pertence ao banco de microrganismos do Laboratório de Forragicultura e Microbiologia da Silagem-UFV. Os dados de sequenciamento dessa cepa estão disponíveis no GenBank (AV14.17 - *Lactiplantibacillus pensotus* / MK713801). A cepa AV14.17 foi ativada duas vezes antes do cultivo final. Primeiro, a cepa foi retirada do estoque “ultrafreezer” (-80 °C), descongelada, e ativada em 3 mL (1% do inóculo) de caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) esterilizado (121 °C, 15 min) a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, uma segunda ativação foi realizada, com 1% do inóculo em 5 mL de caldo MRS (37 °C/16 h). Em seguida, foi realizado o plaqueamento em MRS ágar para a obtenção do número de ufc/mL.

A quantidade de caldo MRS utilizada no cultivo final foi baseada no plaqueamento prévio do inóculo após a segunda ativação, considerando o número de células após o crescimento por 16 h. Em seguida, o inóculo foi padronizado utilizando-se espectrofotômetro (630 nm) a uma densidade óptica de 0,05 em 10 mL de caldo MRS. Após, o inóculo foi mantido a 37 °C/16 h. Com base no número de ufc/mL, foi

ajustada a quantidade de inóculo necessária para atingir a taxa de aplicação 1×10^5 ufc/g forragem. O inóculo foi acondicionado em tubos de falcon de 15 mL e centrifugados a $1000 \text{ g} \times 10 \text{ min}$. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pelet foi ressuspenso em 50 mL de água destilada (Silva et al., 2020).

2.4 *Análises da composição química, perfil fermentativo e digestibilidade in vitro*

As amostras da planta e das silagens após 3, 14, 30 e 60 d de fermentação foram submetidas à secagem parcial em estufa de circulação forçada de ar ($55 \text{ }^\circ\text{C}/72 \text{ h}$). Posteriormente, as amostras foram moídas em moinho de facas (R-TE-650/1, Tecnal®, Piracicaba-SP, Brasil), com peneireira de crivo de 1 mm, para análises da composição química.

As amostras da planta e das silagens (3, 14, 30 e 60 d após ensilagem) foram submetidas às análises de quantificação dos teores de matéria seca (MS, método 934,01) e proteína bruta (PB, $\text{N} \times 6,25$, método 984,13). Apenas as silagens do último período de fermentação foram analisadas para quantificação da matéria orgânica (MO, método 972,43), matéria mineral (MM, método 942,05) e extrato etéreo (EE, método 920,39) (AOAC, 1990). Nessas amostras também foram determinados os teores de fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína (FDNcp), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) (Licitra et al., 1996), lignina (LIG) (Gomes et al., 2011), hemicelulose (HEM) e celulose (CEL). A análise de FDNcp foi realizada utilizando-se α -amilase termoestável sem o uso de sulfito de sódio, e o resíduo foi corrigido para cinzas e proteína (Mertens, 2002). A hemicelulose foi obtida pela diferença entre o FDN e o FDA, a CEL foi obtida pela diferença entre o FDA e LIG.

Para a realização das análises referentes ao perfil de fermentação, as amostras de 25 g da planta e das silagens após 3, 14, 30 e 60 d de fermentação foram homogeneizadas em 225 mL de solução de Ringer's solution estéril (Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) em liquidificador industrial (1 min). O extrato aquoso obtido foi filtrado em gaze estéril de algodão e dividido em três alíquotas: A primeira alíquota foi usada para medição do pH, utilizando-se potenciômetro digital (W38/Tecnal®, São Paulo-SP, Brasil). Em seguida, 20 mL do extrato aquoso foi acidificado com H₂SO₄ 1:1 (armazenados a -20 °C) para análises das concentrações de carboidratos solúveis (CHOs) pelo método colorimétrico (Nelson, 1944) e nitrogênio amoniacal (N-NH₃) pelo método fenol-hipoclorito (Okuda et al., 1965). Os ácidos orgânicos (ácido lático, ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; SPD-10 AVP, Shimadzu®, Oregon, USA), com detector ultravioleta e comprimento de onda de 210 nm. A coluna utilizada foi C18 (fase reserva), e utilizado o H₂SO₄ como fase móvel, com fluxo de 1,5 mL/min, pressão da coluna de 168 kgf e volume injetado de 20 µl (Siegfried et al., 1984).

A segunda alíquota do extrato aquoso foi destinada para quantificação das populações microbianas. Foram realizadas diluições seriadas de 10¹ a 10⁹. Em seguida, o plaqueamento foi realizado em placas de *Petri* estéreis (método *pour-plate*) em meios de cultura (Kung Junior et al., 2003b). Foi utilizado o MRS ágar (De Man, Rogosa & Sharpe, Merck®, Darmstadt, Alemanha) para o cultivo de bactérias ácido lácticas (BAL) (37 °C/48 h), VRB ágar (Violet Red Bile Agar, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) para o cultivo de enterobactérias (ENT) (37 °C/24 h) e DRBC ágar (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) para cultivo de leveduras (LEV) (25 °C/72 h) e de fungos filamentosos (FUN) (25 °C/120 h). Para a

contagem de ufc, as placas contendo entre 25 a 250 ufc (American Public Health Association, 2015).

As amostras previamente secas e processadas a 1 mm foram pesadas em duplicata (0,5 g/saco) em sacos F57 (Ankom®, Technology Corp.). O ensaio da digestibilidade *in vitro* foi realizado em jarras rotativas DaisyII em incubadora (Adesogan, 2005) durante 48 h de acordo com Tilley e Terry (1963), com adaptações (Holden, 1999).

O inóculo ruminal foi obtido de duas vacas Nelore (peso corporal médio 595±20 kg) fistuladas no rúmen. Os procedimentos para o uso de animais seguiram as diretrizes ARRIVE (Kilkenny et al., 2014) e a Diretriz da União Europeia 2010/63 para experimentos com animais (European Union, 2010), e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFV (Protocolo: 059/2020).

Foram avaliadas a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) das silagens de soja referente aos 60 d após ensilagem. As DIVMS e DIVFDN foram calculadas de acordo com as seguintes equações 1 e 2:

$$\text{Equação (1): } DIVMS \text{ g/kg MS: } 1000 \times \left[\frac{(MS \text{ silagem soja} - MS \text{ resíduo})}{MS \text{ silagem soja}} \right]$$

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

$$\text{Equação (2): } DIVFDN \text{ g/kg MS: } 1000 \times \left[\frac{(FDN \text{ silagem soja} - FDN \text{ resíduo})}{FDN \text{ silagem soja}} \right]$$

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

Também foram calculados com base na composição química da silagem de soja aos 60 d após ensilagem, os carboidratos não-fibrosos (CNF) (Hall, 2003), os carboidratos totais (CHO totais) (Sniffen et al., 1992) e os nutrientes digestíveis totais (NDT) (NRC, 2001), através das equações 3, 4 e 5, respectivamente:

$$\text{Equação (3): } \%CNF = 100 - (\%PB + \%FDN_{cp} + \%EE + \%MM)$$

Onde: %CNF = Percentual de carboidratos não-fibrosos com base na matéria seca; %PB = Percentual de proteína bruta; %FDN_{cp} = Percentual de fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; %EE = Percentual de extrato etéreo; %MM = Percentual de matéria mineral, todos os percentuais expressos com base na matéria seca.

$$\text{Equação (4): } \%CHO \text{ totais} = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$$

Onde: %CHO totais = Percentual de carboidratos totais com base na matéria seca; %PB = Percentual de proteína bruta; %EE = Percentual de extrato etéreo; %MM = Percentual de matéria mineral, todos os percentuais expressos com base na matéria seca.

$$\text{Equação (5): } \%NDT = 100 - [\%CNF_d + \%PB_d + (\%EE_d \times 2,25) + \%FDN_{cpd}] - 70$$

Onde: %NDT = Percentual dos nutrientes digestíveis totais; %CNF_d = Percentual dos carboidratos não-fibrosos digestíveis; %PB_d = Percentual de proteína bruta digestível; %EE_d = Percentual de extrato etéreo digestível; %FDN_{cpd} =

Percentual de fibra em detergente neutro digestível; 70 = Fator de correção metabólico fecal.

2.5 *Extração, purificação e sequenciamento de DNA*

A terceira alíquota do extrato aquoso referente apenas às silagens com 60 d de fermentação foi utilizada para a extração do DNA. A extração do DNA seguiu um método manual, protocolo desenvolvido internamente pela Neopropecta Microbiome Technologies® (Florianópolis-SC, Brasil), através de soluções tampões e *beads* magnéticas.

Para o processo de sequenciamento utilizando-se o MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA), com a amplificação de primers da região V3-V4 do gene rDNA 16S, 341F (5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3') (Wang & Qian, 2009) e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso et al., 2012). Pelo sequenciamento paired-end, com kits V3 de 600 ciclos. As sequências foram analisadas por meio do pipeline Sentinel.

No pipeline Sentinel os arquivos fastQ foram avaliados quanto à qualidade Phred (QP) usando o programa FastQC v.0.11.8 (Andrews, 2010). As *reads* foram submetidas ao Cutadapt (REF) para a remoção de primers para região V3-V4 do gene rDNA 16S, 341F. Para a identificação de táxons e obtenção da tabela de ASV, a pipeline do DADA2 foi empregada utilizando as *reads* com os primer de amplificação removidos. Para isso, a base de referência para procarioto, de Silva 138.1, foi utilizada (McLaren e Callahan, 2021). As análises de abundância de táxons, de alfa e beta diversidade foram realizadas a nível de gênero com o módulo Marker-gene Data Profiling (MDP) do Microbiome Analyst (Dhariwal et al., 2017; Chong et al., 2020). Para isso, foram empregadas as configurações padrão, exceto para a contagem mínima de

utilizadas ASVs que tiveram no mínimo. Foi utilizado como valor mínimo de contagem, 50 *reads*. Isso significa que ASVs com menos que esse valor, não foram consideradas nas análises seguintes.

2.6 Análises estatísticas

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

Os dados referentes aos valores de pH, CHOs, N-NH₃ e populações microbianas (ENT, BAL, LEV e FUN) foram analisados seguindo o delineamento em blocos casualizados, com arranjo fatorial 2 × 3 × 4, considerando-se o estágio de colheita, tipo de inoculante, período de fermentação, bem como suas interações como efeitos fixos no modelo matemático, e bloco e o erro experimental, como efeitos aleatórios, de acordo com o modelo:

$$Y_{ijklm}, \mu + C_i + IN_j + P_k + (C \times IN \times P)_{ijk} + \beta_l + e_{ijklm}$$

Onde: Y_{ijklm} , variável resposta no bloco β_l submetido à estágio de colheita C , no inoculante IN e no período P ; μ , média geral; β_l , efeito de bloco, β_l , 1, 2, 3 e 4; C , efeito do estágio de colheita, i , 1 e 2; IN , efeito do inoculante, j , 1, 2 e 3; P , efeito do período, k , 1, 2, 3 e 4; $(C \times IN \times P)_{ijk}$, efeito das interações entre C , IN e P , ijk ; e_{ijklm} , erro residual aleatório associado com a unidade experimental no bloco β_l submetido a estágio de colheita C_i , no inoculante IN_j e no período P_k .

As variáveis referentes aos 60 d após ensilagem (ácidos orgânicos, composição química e digestibilidade *in vitro*) foram analisados seguindo o delineamento em blocos casualizados, com arranjo fatorial 2 × 3, no qual estágio de colheita, tipo de inoculante e suas interações foram considerados efeitos fixos no modelo matemático, e bloco e erro experimental foram considerados efeitos aleatórios, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + C_i + IN_j + (C \times IN)_{ij} + \beta_l + e_{ijklm}$$

Onde: Y_{ijklm} , variável resposta no bloco β_l submetido à estágio de colheita C , no inoculante IN ; μ , média geral; β_l , efeito de bloco, β_l , 1, 2, 3 e 4; C , efeito do estágio de colheita, i , 1 e 2; IN , efeito do inoculante, j , 1, 2 e 3; $(C \times IN)$, efeito das interações entre C e IN , ij ; e_{ijklm} , erro residual aleatório associado com a unidade experimental no bloco β_l submetido a rebrota C_i e no inoculante IN_j .

As médias dos efeitos individuais e suas interações foram comparadas utilizando-se os testes F de Fischer e de Tukey-Kramer. A matriz de covariância foi escolhida através do critério de Akaike corrigido (AICC). Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos utilizando-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

Para avaliação dos dados de diversidade microbiana nas comparações que apresentaram significância estatística no teste ANOVA, foi empregado o teste Tukey para realizar as comparações pareadas, usando a função `glht {multcomp (Bretz et al., 2011)}` em ambiente R (R Core Team, 2018). Um estudo de abundância diferencial dos táxons foi realizado. Para isso, o Microbiome Analyst foi empregado no ambiente R para a obtenção do objeto com formato adequado para o pacote *phyloseq*, seguido das análises de acordo com a pipeline (McMurdie e Holmes, 2013). Com isso, ASVs

que tiveram $\log_2(\text{fator de correção}) > 1,5$ ou $\leq 1,5$ e P-valor $< 0,05$ foram consideradas com abundância diferencial entre as condições comparadas e destacadas no volcano plot. Nas comparações de estágios fenológicos um P-valor mais restrigente foi empregado (0,001).

Resultados

A composição química da soja antes da ensilagem, nos dois estágios de crescimento é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2. Produtividade e composição química e microbiológica da soja colhida nos estágios fenológicos R5 e R6, antes da ensilagem (médias seguidas de desvio padrão, \pm DP).

Item ¹	Estágio de colheita	
	R5	R6
Produtividade MN (t/ha)	21,65 \pm 0,54	28,17 \pm 0,97
Produtividade MS (t/ha)	5,74 \pm 0,22	7,52 \pm 0,31
pH	6,51 \pm 0,02	6,32 \pm 0,03
Matéria seca (g/kg MN)	265,23 \pm 0,57	267,06 \pm 0,66
Proteína bruta (g/kg MS)	171,74 \pm 1,03	190,70 \pm 1,88
Extrato etéreo (g/kg MS)	87,44 \pm 0,41	114,41 \pm 0,93
FDN _{cp} (g/kg MS)	439,05 \pm 1,18	422,31 \pm 3,24
Fibra em detergente ácido (g/kg MS)	278,57 \pm 1,28	292,91 \pm 1,40
Celulose (g/kg MS)	231,54 \pm 1,54	219,43 \pm 0,74
Hemicelulose (g/kg MS)	131,92 \pm 1,02	125,76 \pm 0,59
NIDA (g/kg MS)	3,23 \pm 0,42	2,74 \pm 0,65

Lignina (g/kg MS)	60,89 ± 0,32	72,94 ± 0,77
Carboidratos solúveis (g/kg MS)	44,23 ± 0,80	51,84 ± 1,05
Carboidratos totais (g/kg MS)	645,70 ± 2,34	610,35 ± 1,85
Carboidratos não-fibrosos (g/kg MS)	221,63 ± 0,75	202,56 ± 0,83
Nutrientes digestíveis totais (g/kg MS)	642,65 ± 0,43	700,42 ± 0,31
Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (g/kg MS)	438,43 ± 0,23	498,97 ± 0,62
Digestibilidade <i>in vitro</i> da FDN (g/kg MS)	270,31 ± 0,56	315,54 ± 0,24
Enterobactérias (Log ufc/g forragem)	5,88 ± 0,68	7,06 ± 0,23
Bactérias ácido lácticas (Log ufc/g forragem)	5,45 ± 0,32	5,54 ± 0,34
Leveduras (Log ufc/g forragem)	5,36 ± 0,34	5,47 ± 0,24
Fungos filamentosos (Log ufc/g forragem)	4,52 ± 0,44	4,04 ± 0,36

¹MN = Matéria natural;

MS = Matéria seca;

FDN_{ncp} = Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína;

NIDA = Nitrogênio insolúvel em detergente ácido;

FDN = Fibra em detergente neutro;

ufc = Unidade formadora de colônia expresso em unidade logarítmica na base 10.

3.1 Perfil fermentativo

A significância de P-valor e o erro padrão da média (EPM) para as variáveis de perfil fermentativo são mostradas na Tabela 3. Houve efeito ($P \leq 0,05$) da interação I × C × P sobre CHOs e ENT. O teor de N-NH₃ foi afetado pelas interações I × C, I × P e C × P. Houve efeito ($P \leq 0,05$) da interação C × P sobre BAL, LEV e FUN. O pH foi afetado ($P < 0,01$) apenas pelos efeitos isolados dos fatores inoculante, colheita e

período de fermentação, enquanto que a população de leveduras foi afetada ($P < 0,01$) por inoculantes.

Tabela 3. Significância (P-valores) dos efeitos testados e erro padrão da média (EPM) para as variáveis do perfil fermentativo de silagens de soja colhidas (C) nos estágios fenológicos R5 e R6, tratadas com inoculantes microbianos (I) e armazenadas por diferentes períodos de fermentação (P) (3, 14, 30 e 60 d após ensilagem).

Item ¹	P-valor							EPM
	Inoculante	Colheita	Período	I × C	I × P	C × P	I × C × P	
pH	<0,01	<0,01	<0,01	0,31	0,08	0,58	0,08	0,03
CHOs	0,26	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,04	0,26
N-NH ₃	<0,01	<0,01	<0,01	0,02	<0,01	<0,01	0,24	4,18
ENT	<0,01	<0,01	<0,01	0,78	0,05	<0,01	<0,01	0,22
BAL	0,25	<0,01	<0,01	0,68	0,37	0,01	0,58	0,04
LEV	<0,01	0,07	<0,01	0,85	0,31	<0,01	0,17	0,08
FUN	0,14	0,61	<0,01	0,36	0,55	<0,01	0,09	0,16

¹CHOs = Carboidratos solúveis em água;

N-NH₃ = Nitrogênio amoniacal;

ENT = Enterobactérias;

BAL = Bactérias ácido lácticas;

LEV = Leveduras;

FUN = Fungos filamentosos.

Na Figura 2 estão dispostos os desdobramentos da interação entre I \times C \times P para CHOs residuais, fixando-se a interação C \times P, e observando-se efeito de inoculante em cada período de fermentação dentro de cada estágio fenológico. O teor de CHOs residuais da silagem de soja colhida no estágio R5 diferiu entre os inoculantes, apenas aos 14 d de fermentação, observando-se maior teor de CHOs residuais na silagem tratada com IC (7,22 g/kg MS) comparado às demais (Figura 2a). No entanto, para a soja colhida no estágio R6, observou-se efeito de inoculante apenas aos 3 d de fermentação, com maior valor na silagem tratada com ISO (14,09 g/kg MS) (Figura 2b).

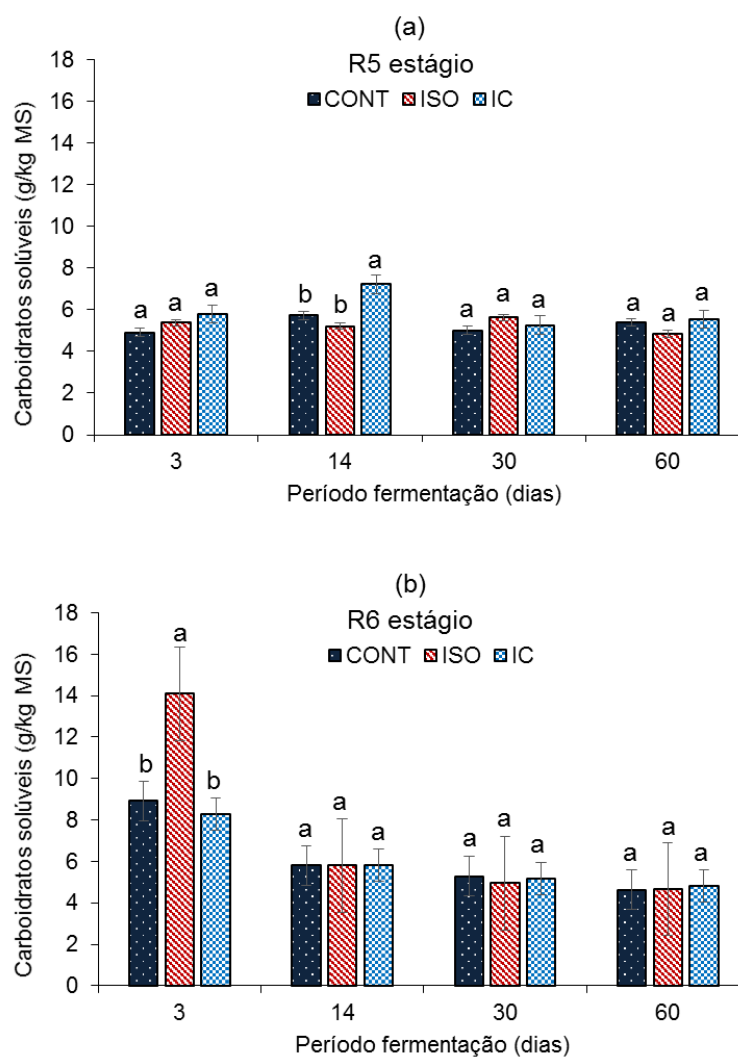


Figura 2. Concentrações de carboidratos solúveis em água (CHOs) residuais de silagens de soja em função de inoculantes microbianos dentro de cada período de fermentação para soja colhida nos estágios fenológicos R5 (a) e R6 (b). MS = Matéria seca; CONT = Controle (sem inoculante); ISO = Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*; IC = Inoculante comercial, Sil-All 4 x 4 (Lallemand®, Brasil). Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Verificou-se maior população de ENT ($P < 0,01$) ($> 6 \log \text{ ufc/g}$) no 3^a dia após fechamento do silo, em ambos os estágios de colheita (R5 e R6), cuja população foi mais baixa com ISO, aos 3 e 30 dias após fechamento do silo, não sendo detectada aos 60 dias de fermentação em silagem de plantas de soja no estágio R5 (Figura 3a). No entanto, para a soja colhida no estágio R6, a silagem tratada com ISO apresentou menor contagem de ENT em relação às demais apenas aos 60 d (Figura 3b).

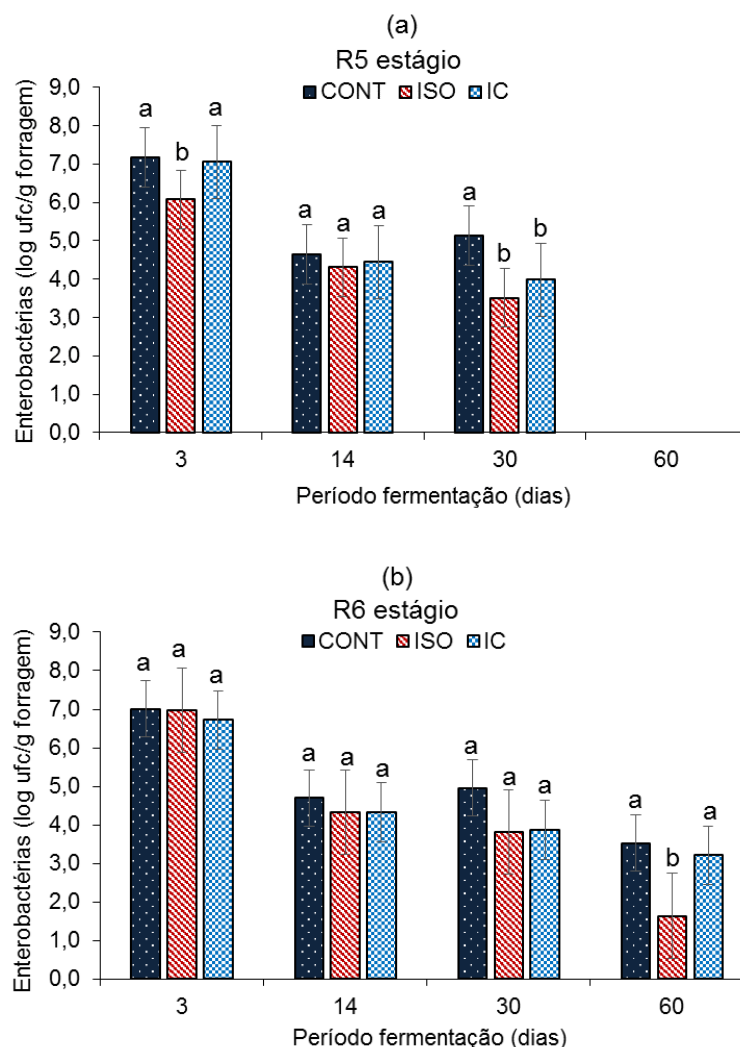


Figura 3. Populações de enterobactérias em silagem de soja em função de inoculantes microbianos dentro de cada período de fermentação para soja colhidas nos estágios fenológicos R5 (a) e R6 (b); CONT = Controle (sem inoculante); ISO = Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*; IC = Inoculante comercial, Sil-All 4 x 4 (Lallemand®, Brasil). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Para a variável $N-NH_3$, ao se estudar a interação $I \times C$, verificou-se menor concentração na silagem ISO em ambos estágios de colheita (Figura 4a). O teor de $N-NH_3$ ($P < 0,01$) variou entre os estágios de colheita durante o período de fermentação. Porém, aos 60 dias de fermentação verificou-se maior teor de $N-NH_3$ no estágio R5

(Figura 4b). No estudo da interação I × P, observou-se menor concentração de N-NH₃ para a silagem tratada com ISO, aos 30 e 60 d de fermentação.

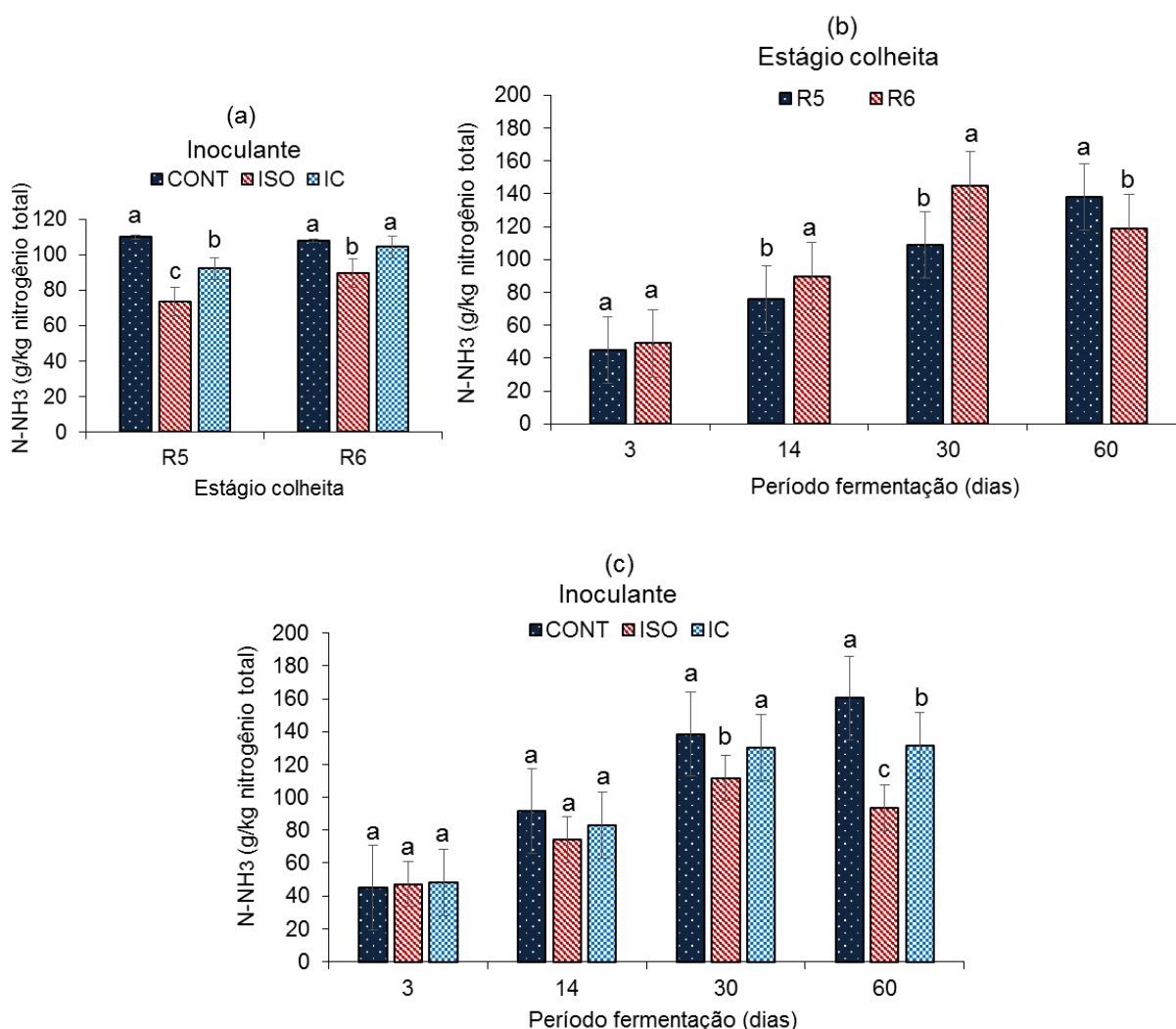


Figura 4. Concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) de silagens de soja em função de inoculantes microbianos dentro de cada estágio fenológico de colheita (R5 e R6) (a), em função de estágio fenológico de colheita dentro de cada período de fermentação (b) e em função de inoculantes microbianos dentro de cada período de fermentação (c). CONT = Controle (sem inoculante); ISO = Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*; IC = Inoculante comercial, Sil-All 4 × 4 (Lallemand®, Brasil). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05).

A silagem tratada com ISO apresentou menor pH comparada a silagem CONT (Figura 5a), que foi mais baixo na silagem de soja colhida no estágio R5 comparado ao obtido em R6 (Figura 5b). Além disso, o pH variou ao longo do período de fermentação (Figura 5c).

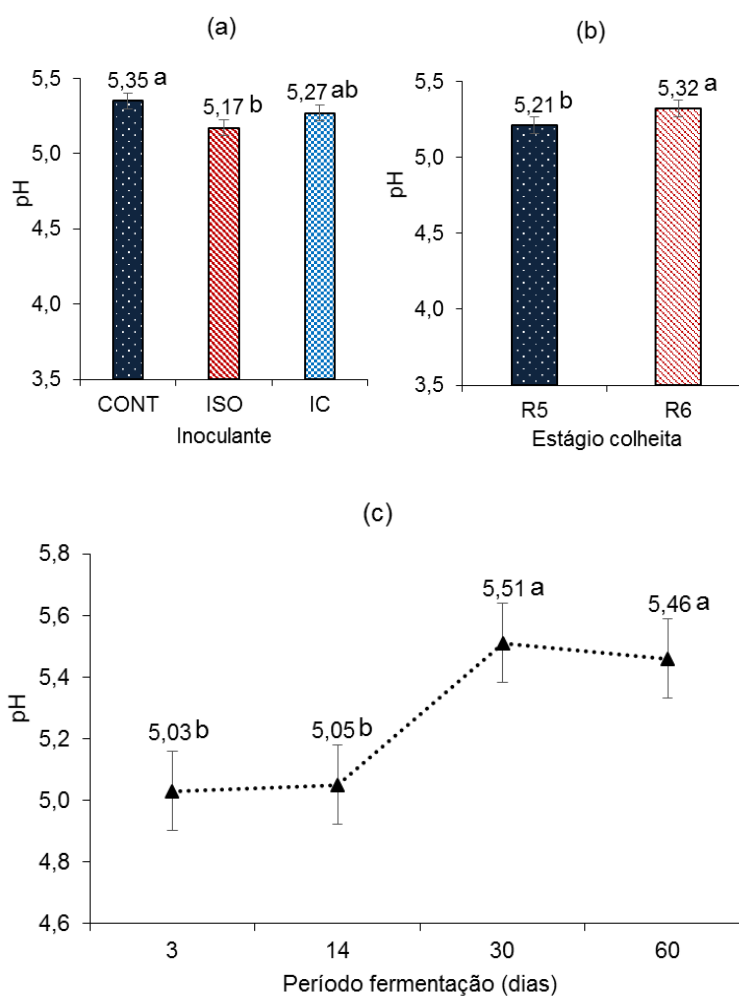


Figura 5. Valores de pH em função de inoculantes microbianos (a), estágio de colheita (b) e períodos de fermentação (c) de silagens de soja. CONT = Controle (sem inoculante); ISO = Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*; IC = Inoculante comercial, Sil-All 4 × 4 (Lallemand®, Brasil); R5 e R6 = estágios fenológicos na

colheita. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

As silagens inoculadas apresentaram menor população de LEV (Figura 6a). As populações de BAL, leveduras e de FUN, em ambos estágios de colheita foram menores aos 60 dias de fermentação (Figura 6 b, c e d).

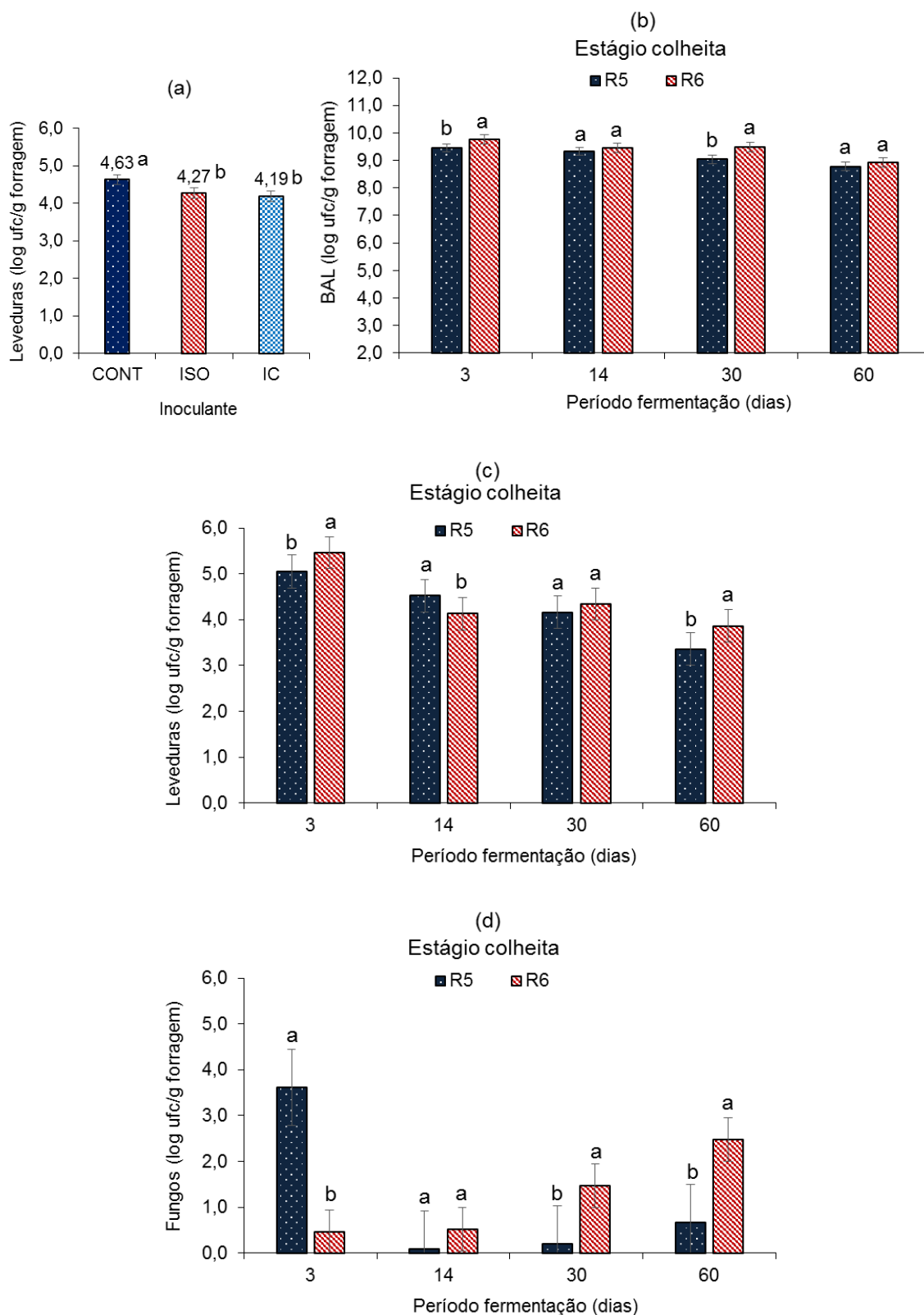


Figura 6. Populações microbianas em silagem de soja aditivada com inoculante microbiano em função do efeito de inoculante para leveduras (a), interação entre estágio de colheita × período de fermentação para bactérias ácido lácticas (b),

interação entre estágio de colheita × período de fermentação para leveduras (c) e estágio de colheita × período de fermentação para fungos (d). CONT = Controle (não inoculado); ISO = Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*; IC = Inoculante comercial, Sil-All 4 × 4 (Lallemand®, Brasil). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Os ácidos orgânicos das silagens aos 60 d de fermentação foram afetados apenas pelo estágio de colheita, com maiores concentrações de ácidos láctico ($P < 0,01$) e butírico ($P = 0,01$), para a silagem de soja colhida em R5, e maiores concentrações dos ácidos acético ($P = 0,02$) e propiônico ($P = 0,01$) no estágio R6 (Tabela 4).

Tabela 4. Efeitos de estágio de colheita e de inoculantes microbianos sobre a concentração de ácidos orgânicos de silagens de soja aos 60 d de armazenamento.

Colheita	Inoculante ¹			Média	EPM ²	P-valor ³		
	Controle	ISO	IC			I	C	I × C
Ácido láctico (g/kg MS ⁴)								
R5	4,50	8,48	5,25	6,07A	0,62	0,24	<0,01	0,18
R6	3,09	2,78	2,71	2,86B				
Média	3,79	5,63	3,98					
Ácido acético (g/kg MS)								
R5	40,35	18,66	38,92	32,64B	3,43	0,51	0,02	0,08
R6	41,79	52,87	48,68	47,78A				
Média	41,07	35,76	43,80					
Ácido propiônico (g/kg MS)								
R5	18,61	10,76	13,16	14,18B	1,73	0,06	<0,01	0,32

R6	24,09	20,84	22,60	22,52A				
Média	21,35	13,30	17,88					
Ácido butírico (g/kg MS)								
R5	28,45	25,82	29,76	28,01A	1,76	0,71	0,01	0,72
R6	21,92	18,64	17,94	19,50B				
Média	25,18	22,23	23,85					

¹Inoculante: Controle = Sem inoculante, ISO = cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*, IC = Inoculante comercial, Sil-All 4 x 4 (Lallemand®, Brasil); ²EPM = Erro padrão da média; ³P-valor = Probabilidade de efeitos para inoculante (I), colheita (C) e interação I com C (I x C); ⁴MS = Matéria seca. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas colunas diferem pelo teste F de Fischer ($P \leq 0,05$). Médias seguidas por letras minúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

3.2 Diversidade microbiana

A abundância relativa da diversidade bacteriana foi influenciada pelos estágios de colheita e inoculantes microbianos (Figura 7). Antes da ensilagem, nas plantas de ambas maturidades, houve predominância dos gêneros bacterianos *Escherichia* e *Sphigomonas* e *Escherichia*, *Sphigomonas*, *Aureimonas* e *Lactococcus*, nos estágios R5 e R6, respectivamente (Figura 7a). Nas silagens de soja, independentemente do estágio de colheita houve presença de bactérias do gênero *Clostridium* em todos os tratamentos, seguido de menor participação dos gêneros: *Weissella*, *Lactiplantibacillus*, *Ligilactobacillus*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Levilactobacillus* e *Lactococcus*.

Ao observar o efeito de inoculante, independentemente do estágio de colheita, também foi detectada a presença dos gêneros bacterianos: *Clostridium*, *Weissella*,

Lactiplantibacillus, *Ligilactobacillus*, *Aureimonas*, *Enterobacter* e *Lactobacillus*, com proporções semelhantes em cada um dos inoculantes avaliados (CONT, IC e ISO) (Figura 7b). Para a abundância relativa em função do estágio de colheita, também foi verificada elevada proporção de *Clostridium*, no estágio R5, constituindo aproximadamente 25% do total, seguido em menor proporção de *Weissella*, *Ligilactobacillus*, *Enterobacter*, *Levilactobacillus* e *Pediococcus*. Por outro lado, nas silagens de soja colhidas no estágio R6 foi observada menor participação do gênero *Clostridium*, seguido de maior proporção de *Weissella* e *Ligilactobacillus* (Figura 7c).

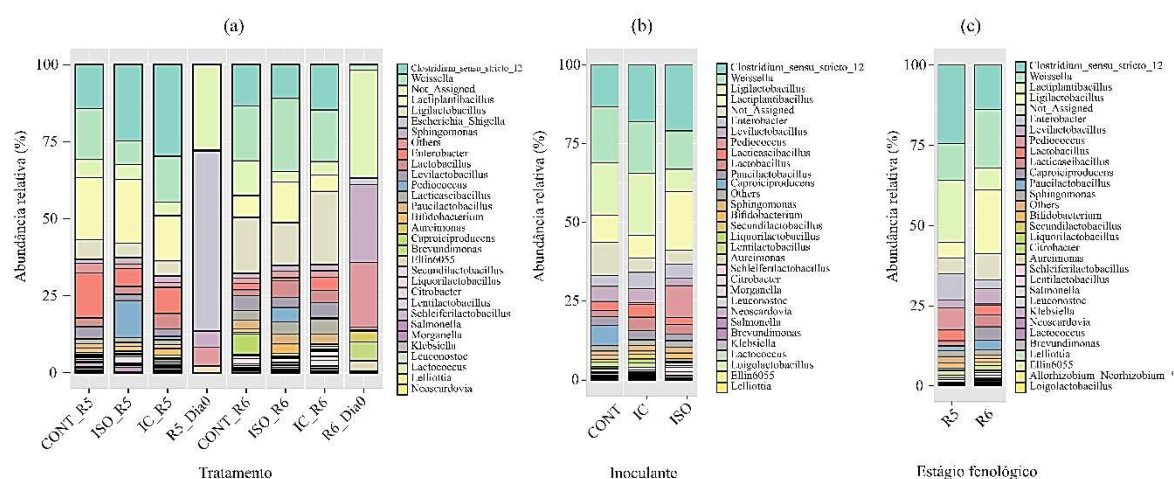


Figura 7. Abundância relativa da comunidade microbiana em nível de gênero revelada por amplificação do gene 16S rDNA de alto rendimento antes (Dia 0, planta) e após ensilagem da soja, em função de inoculantes microbianos dentro dos estágios fenológicos, R5 e R6, após ensilagem (a), em função do efeito de inoculante (b) e em função do estágio fenológico de colheita (c). CONT, Controle (sem inoculante); ISO, Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*; IC, Inoculante comercial, Sil-All 4 × 4 (Lallemand®, Brasil).

Com base nas análises de α -diversidade verificadas neste estudo, houve efeito ($P < 0,05$) para os índices de Shannon e de Chao1 em função dos tratamentos avaliados (Figura 8). As silagens de soja colhidas no estágio R6 apresentaram maior índice de Shannon comparadas com as do estágio R5 (Figura 8c). As silagens de soja colhidas no estágio R6 e inoculadas com ISO apresentaram maior índice de Chao1 (69 vs 52), enquanto que as silagens de soja controle, colhidas no estágio R5, apresentaram menor índice de Chao1 (Figura 8d). De forma semelhante, em relação ao efeito de estágio de maturidade, as silagens colhidas em R6 apresentaram maior índice de Chao1, comparadas às do estágio R5 (Figura 8f).

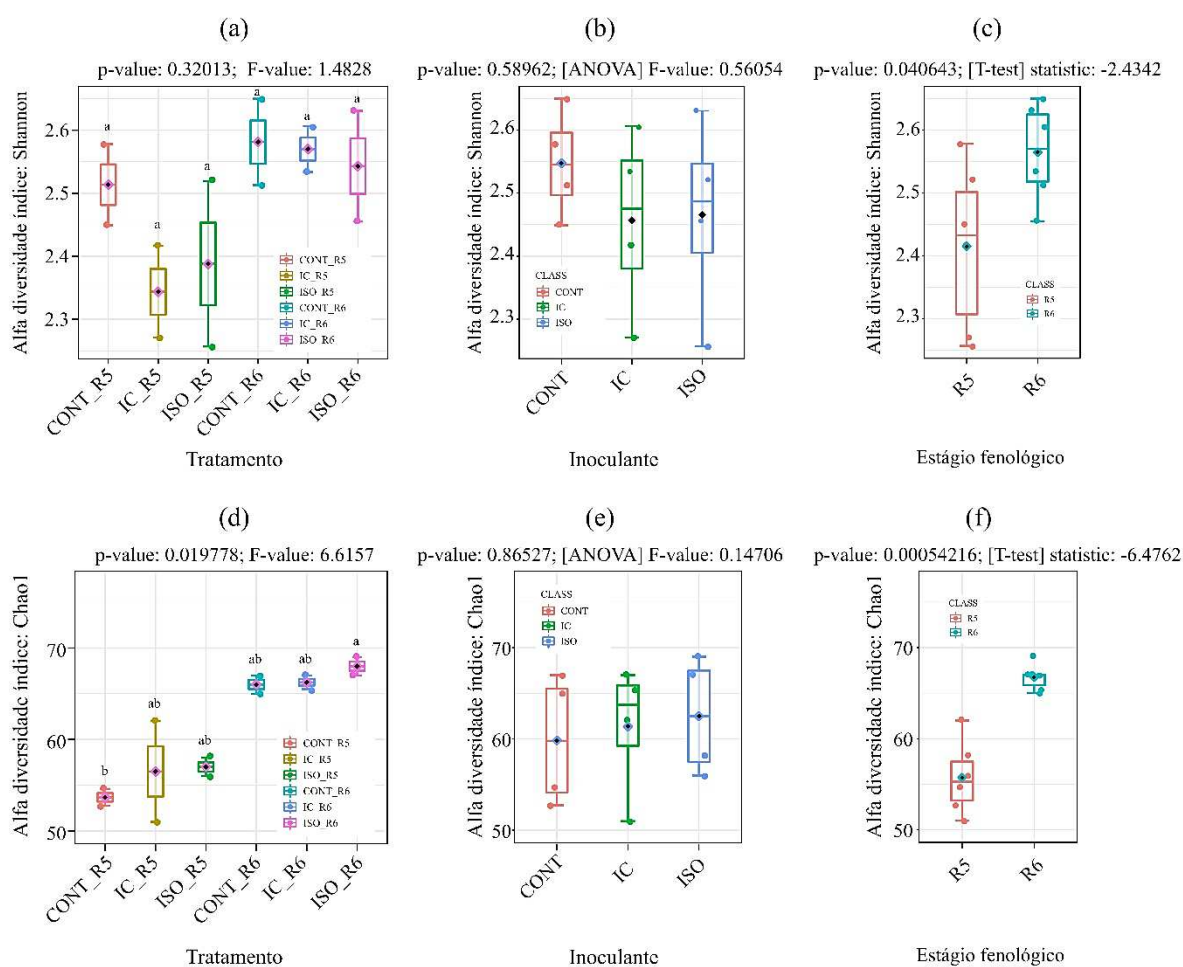


Figura 8. Análise de diversidade da comunidade bacteriana com base no índice de Shannon (a, b, c) e Chao1 (d, e, f) em nível de gênero revelada por amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA de alto rendimento em silagens de soja, em função de inoculantes microbianos dentro de dois estágios fenológicos de colheita, R5 e R6, aos 60 d após ensilagem (a, d), em função do efeito de inoculante (b, e) e em função da idade de rebrota (c, f). CONT, Controle (sem inoculante); ISO, Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*; IC, Inoculante comercial, Sil-All 4 × 4 (Lallemand®, Brasil). Médias seguidas por letras minúsculas distintas em cada coluna do boxplot diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Houve efeito ($P < 0,01$) para as análises de β -diversidade com base nas coordenadas de componentes principais (PCoA), com variação em cada eixo de 13,50% e 56,90%, e variação total de 70,40% (Figura 9). Pode-se observar a formação de grupos de tratamentos distintos, cada tratamento avaliado se distanciou dos demais, exceto para os tratamentos CONT-R6 e IC-R6 que estão próximos entre si.

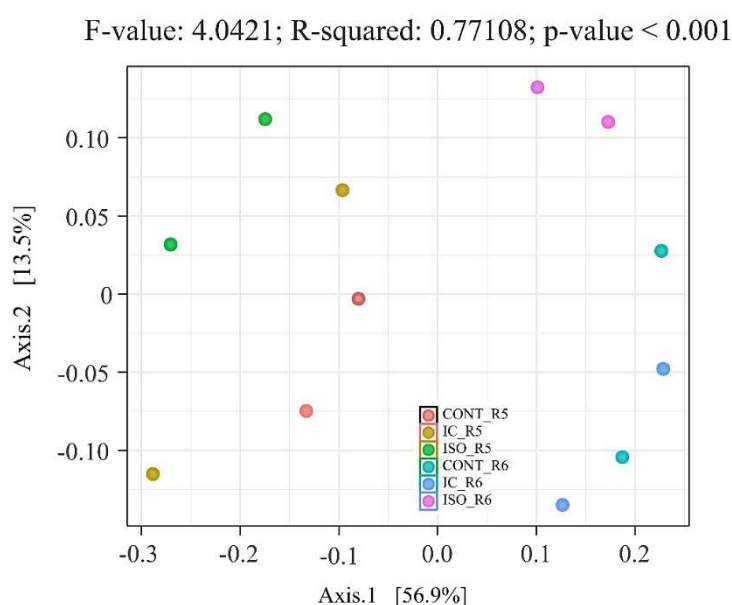


Figura 9. Análise de coordenadas de componentes principais (PCoA) da comunidade bacteriana a nível de gênero para silagem de soja. Cores distintas conforme a legenda da figura indicam a dispersão dos tratamentos experimentais. CONT-R5, silagem de soja controle, sem inoculante colhida no estágio R5; IC-R5, silagem de soja com Inoculante comercial, Sil-All 4 x 4 (Lallemand®, Brasil) colhida no estágio R5; ISO-R5, silagem de soja inoculada com isolado AV14.17- *Lactiplantibacillus pentosus* colhida no estágio R5; CONT-R6, silagem de soja controle, sem inoculante colhida no estágio R6; IC-R6, silagem de soja com Inoculante comercial, Sil-All 4 x 4 (Lallemand®, Brasil) colhida no estágio R6; ISO-R6, silagem de soja inoculada com isolado AV14.17- *Lactiplantibacillus pentosus* colhida no estágio R6.

A abundância diferencial de táxons foi alterada ($P < 0,01$) em função do efeito de inoculantes na soja colhida em R5 e R6 (Figura 10). Observou-se maior predominância do gênero *Pediococcus* na silagem de soja inoculada com IC, no estágio R5, seguido de diminuição dos gêneros *Lelliotia*, *Sphingomonas* e *Clostridium* (Figura 10b). Entretanto, ao comparar a abundância diferencial de táxons entre CONT vs ISO (Figura 10c), verificou-se maior abundância dos gêneros *Pediococcus*, *Lactiplantibacillus*, *Clostridium* e *Brevundimonas* para a silagem CONT (Figura 10d). Comportamento semelhante também foi verificado nas silagens de soja colhidas no estágio R6, ao se comparar CONT vs IC e CONT vs ISO, com predomínio do gênero *Pediococcus* para a silagem CONT (Figura 10efgh).

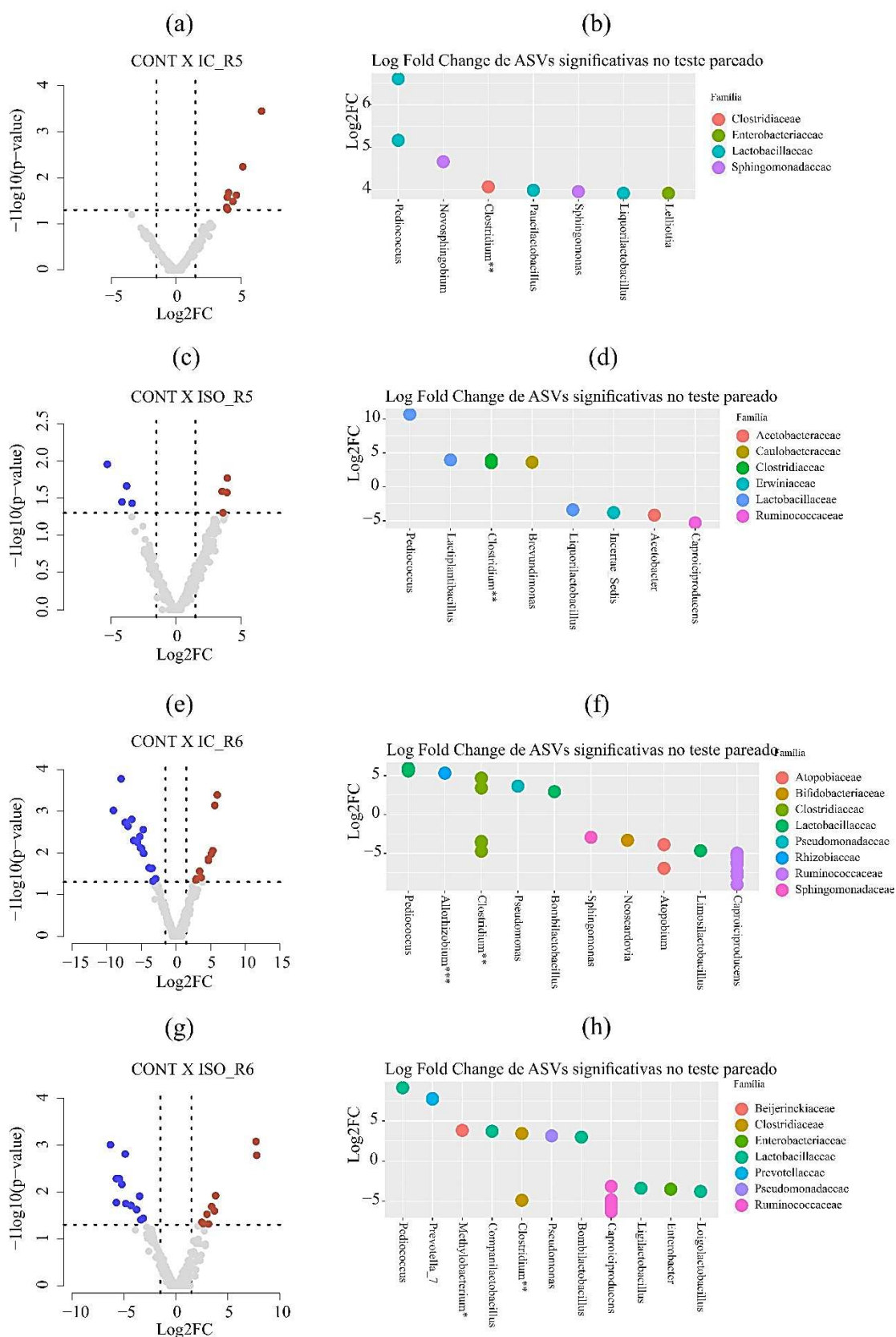


Figura 10. Estudo da abundância diferencial de táxons (ASVs) de silagens de soja em função do efeito de inoculante dentro de cada estágio fenológico. Volcano plot para

junção das contagens das ASVs em função da comparação entre inoculante comercial (IC) vs controle, sem inoculante (CONT) (a, c) e comparação entre cepa AV14.17 *Lactiplantibacillus pentosus* (ISO) vs CONT (e, g) nos estágios fenológicos R5 e R6, respectivamente. Com pontos de corte superiores a ($\log_2(\text{FC}) \geq 1,5$ e P-valor $< 0,001$) e pontos de corte inferiores ($\log_2(\text{FC}) \leq -1,5$ e P-valor $< 0,001$). O destaque dos gêneros e famílias com diferença significativa (positiva ou negativa) em cada comparação, entre IC vs CONT (b, d) e entre ISO vs CONT (f, h) nos estágios fenológicos R5 e R6, respectivamente.

Ao comparar a abundância diferencial de táxons em função do efeito de inoculante, foi verificada diferença ($P < 0,01$) entre os inoculantes estudados (Figura 11a). Ao comparar CONT vs IC, observou-se aumento dos gêneros *Pediococcus* e *Paucilactobacillus*, ambos pertencentes a família *Lactobacillaceae*, com diminuição dos gêneros *Acetobacter*, *Atopobium* e *Caproiciproducens* (Figura 11b). De forma semelhante, também houve efeito ($P < 0,01$) da abundância diferencial de táxons entre CONT vs ISO (Figura 11c), registrando-se aumento dos gêneros *Pediococcus*, *Prevotella*, *Paucilactobacillus* em detrimento da diminuição dos gêneros *Acetobacter*, *Raoutella*, *Caproiciproducens* e *Enterobacter* (Figura 11d).

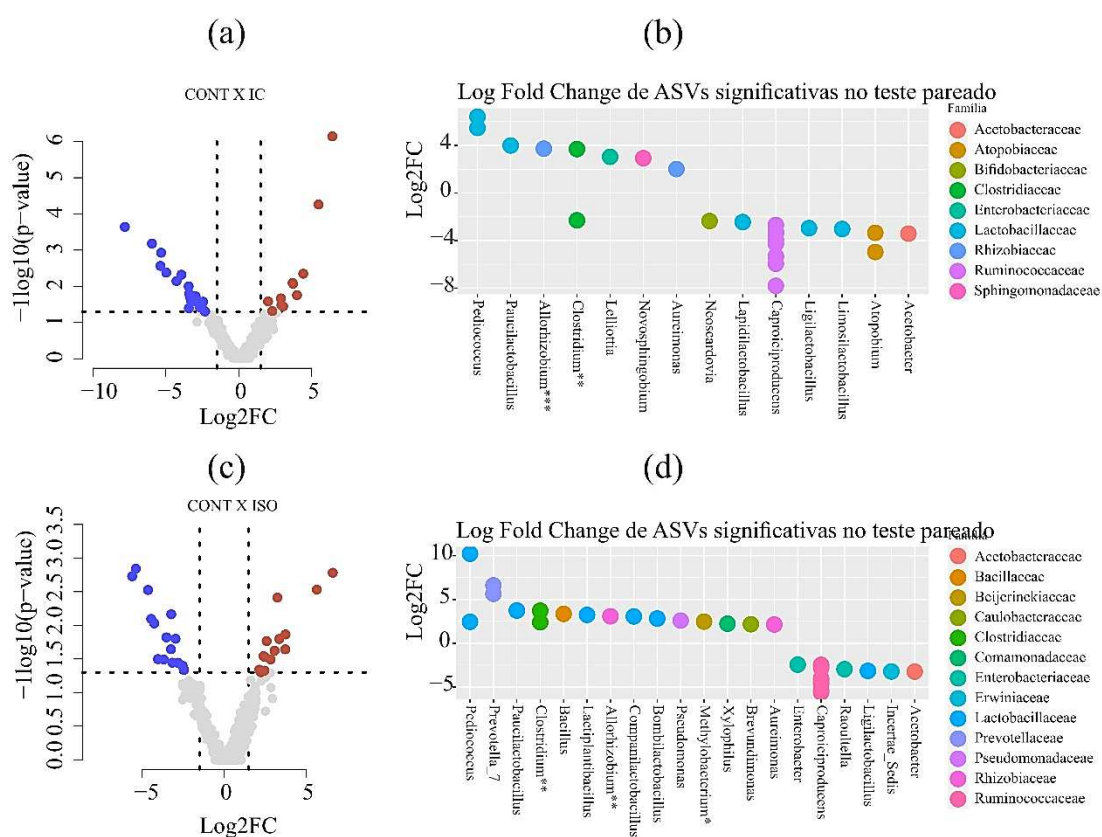


Figura 11. Estudo da abundância diferencial de táxons (ASVs) de silagens de soja em função do efeito de inoculante. Volcano plot para junção das contagens das ASVs em função da comparação entre inoculante comercial (IC) vs controle, sem inoculante (CONT) (a) e comparação entre cepa AV14.17 *Lactiplantibacillus pentosus* (ISO) vs CONT (c). Com pontos de corte superiores a $(\log_2(\text{FC}) \geq 1,5$ e P-valor $< 0,001$) e pontos de corte inferiores $(\log_2(\text{FC}) \leq 1,5$ e P-valor $< 0,001$). O destaque dos gêneros e famílias com diferença significativa (positiva ou negativa) em cada comparação, entre IC vs CONT (b) e entre ISO vs CONT (d).

A abundância diferencial de táxons diferiu ($P < 0,05$) entre os estágios R5 e R6 (Figura 12a), com maior prevalência dos gêneros bacterianos *Prevotella*, *Neoscardovia*, *Alopobium*, *Ligilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Lacticaseibacillus* e *Leuconostoc*, no estágio R5 (Figura 12b).

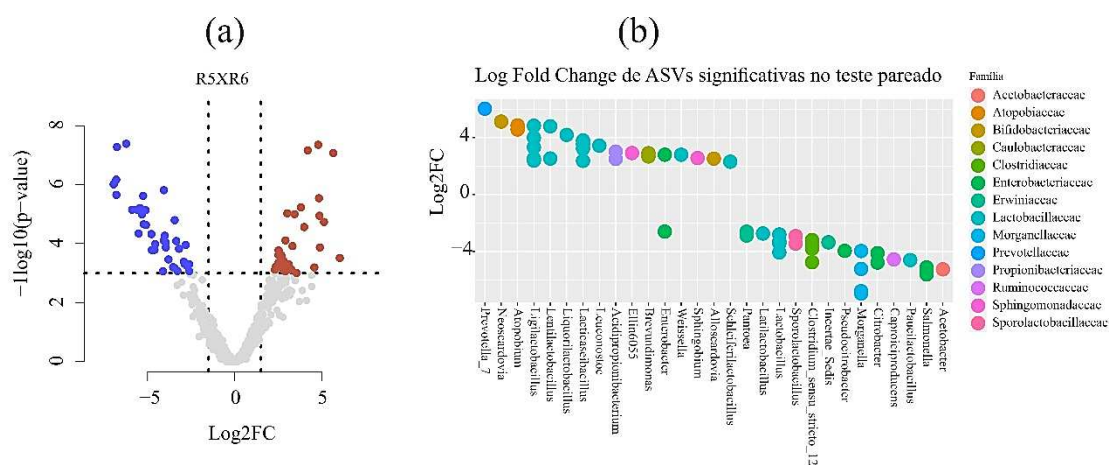


Figura 12. Estudo da abundância diferencial de táxons (ASVs) de silagens de soja em função cada estágio fenológico, R5 e R6. Volcano plot para junção das contagens das ASVs em diferentes tratamentos e controles no estágio R5 comparados com a junção das contagens das ASVs em diferentes tratamentos e controles no estágio R6 (a). Com pontos de corte superiores a $(\log_2(\text{FC}) \geq 1,5$ e $P\text{-valor} < 0,001$) e pontos de corte inferiores $(\log_2(\text{FC}) \leq 1,5$ e $P\text{-valor} < 0,001)$. O destaque dos gêneros e filós que tiveram sua abundância alterada (positiva ou negativa) nos estágios fenológicos R5 e R6 (b).

3.3 Composição química e digestibilidade *in vitro*

Na Tabela 5 são mostrados os dados da composição química da silagem de soja colhida em dois estágios de maturidade, em função de inoculantes microbianos, após 60 d de ensilagem. Houve efeito ($P=0,04$) de inoculante apenas para FDA. Foi observado efeito de estágio de colheita ($P \leq 0,05$) sobre as concentrações de MS, PB, EE, FDNcp, FDA, NIDA e CEL (Tabela 5), com mais altos valores para MS, PB e EE, e mais baixos valores para FDNcp, FDA, NIDA e celulose, em silagens de soja no estágio R6. Os conteúdos de HEM e LIG não foram afetados ($P > 0,05$) pelos fatores estudados, com valores médios de 130,63 e 72,23 g/kg MS, respectivamente.

Tabela 5. Composição química da silagem de soja colhida nos estágios fenológicos R5 e R6, aditivada com inoculantes microbianos aos 60 d de fermentação.

Colheita	Inoculante ¹			Média	EPM ²	P-valor ³		
	Controle	ISO	IC			I	C	I × C
Matéria seca (g/kg MN ⁴)								
R5	236,21	249,66	237,92	241,26B	3,08	0,08	<0,01	0,29
R6	264,03	267,22	265,44	265,56A				
Média	250,12	258,44	251,68					
Proteína bruta (g/kg MS ⁵)								
R5	177,48	172,89	181,72	177,37B	2,39	0,78	<0,01	0,09
R6	184,18	193,90	184,59	187,56A				
Média	180,83	183,40	183,16					
Extrato etéreo (g/kg MS)								
R5	83,95	75,40	84,99	81,45B	3,57	0,55	<0,01	0,17
R6	113,37	113,18	107,14	111,23A				
Média	98,66	94,29	96,06					
FDNcp ⁶ (g/kg MS)								
R5	445,19	424,26	448,97	439,47A	5,08	0,18	0,05	0,86
R6	426,85	411,05	423,93	420,61B				
Média	436,02	417,66	436,45					
Fibra em detergente ácido (g/kg MS)								
R5	309,35	298,75	312,75	306,95A	3,36	0,04	0,01	0,63
R6	301,59	279,29	303,74	291,87B				
Média	305,47a	289,02b	303,74a					

NIDA ⁷ (g/kg MS)									
R5	3,13	3,05	2,83	3,01A					
R6	2,77	2,32	2,62	2,57B	0,08	0,28	<0,01	0,33	
Média	2,95	2,68	2,72						
Hemicelulose (g/kg MS)									
R5	135,84	125,51	136,22	132,53					
R6	131,76	125,26	129,21	128,75	2,62	0,79	0,45	0,35	
Média	130,55	128,64	132,72						
Celulose (g/kg MS)									
R5	232,35	229,84	238,19	233,46A					
R6	226,39	212,85	223,46	220,90B	2,59	0,16	<0,01	0,53	
Média	229,37	221,34	230,83						
Lignina (g/kg MS)									
R5	76,99	68,91	74,57	73,49					
R6	75,20	66,45	71,26	70,97	1,42	0,06	0,36	0,98	
Média	76,10	67,68	72,91						

¹Inoculante: Controle = sem inoculante, ISO = Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*, IC = Inoculante comercial, Sil-All 4 x 4 (Lallemand®, Brasil); ²EPM = Erro padrão da média; ³P-valor = Probabilidade de efeitos para inoculante (I), colheita (C) e interação I com C (I x C); ⁴MN = Matéria natural; ⁵MS = Matéria seca; ⁶FDNcp = Fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; ⁷NIDA = Nitrogênio insolúvel em detergente ácido; Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste F de Fischer (P≤0,05). Médias seguidas por letras minúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05).

A Tabela 6 apresenta o valor nutritivo de silagens de soja e os efeitos de estágio de colheita (C = R5 e R6), de inoculante (I = CONT, ISO e IC) e da interação estágio de colheita × inoculante, aos 60 d após ensilagem. Verificou-se efeito de estágio de colheita ($P < 0,01$) sobre NDT, com maior valor (702,11) no estágio R6. Houve efeito da interação estágio de colheita × inoculante para CHO totais ($P = 0,05$) e para DIVMS ($P = 0,05$). Destaca-se mais elevada DIVMS com ISO, em silagens de soja R5, e mais altos valores de DIVMS de R6 em relação a R5, com uso de todos os inoculantes. Não houve efeito para CNF e DIVFDN, apresentando valores médios de 213,30 e 291,14 g/kg MS, respectivamente.

Tabela 6. Valor nutritivo da silagem de soja, colhida nos estágios fenológicos R5 e R6, tratada com inoculantes microbianos aos 60 d de fermentação.

Colheita	Inoculante ¹			Média	EPM ²	P-valor ³		
	Controle	ISO	IC			I	C	I × C
Carboidratos totais (g/kg MS ⁴)								
R5	645,98Ab	663,30Aa	642,82Ab	650,70A	5,16	0,77	<0,01	0,05
R6	614,51Ba	606,59Bb	620,74Ba	613,94B				
Média	630,25	634,94	631,78					
CNF ⁵ (g/kg MS)								
R5	211,93	249,65	205,07	222,21	6,07	0,18	0,10	0,23
R6	198,33	205,81	207,41	203,85				
Média	205,13	227,73	206,24					
NDT ⁶ (g/kg MS)								
R5	641,02	651,74	649,13	647,29B	7,43	0,36	<0,01	0,70
R6	694,86	716,83	694,64	702,11A				

Média	667,94	684,29	671,88						
DIVMS ⁷ (g/kg MS)									
R5	404,39Bc	467,55Ba	423,49Bb	431,81					
					8,16	0,02	<0,01	0,05	
R6	490,33Aa	493,60Aa	481,24Aa	488,38					
Média	447,36	480,58	452,36						
DIVFDN ⁸ (g/kg MS)									
R5	273,65	283,77	269,06	275,49					
					8,15	0,83	0,08	0,98	
R6	308,45	311,16	300,75	306,78					
Média	291,05	297,46	284,90						

¹Inoculante: Controle = sem inoculante; ISO = Cepa AV14.17 – *Lactiplantibacillus pentosus*; IC = Inoculante comercial, Sil-All 4 × 4 (Lallemand®, Brasil); ²EPM = Erro padrão da média; ³P-valor = Probabilidade de efeitos para inoculante (I), colheita (C) e interação I com C (I × C); ⁴MS = Matéria seca; ⁵CNF = Carboidratos não-fibrosos; ⁶NDT = Nutrientes digestíveis totais; ⁷DIVMS = Digestibilidade *in vitro* da matéria seca; ⁸DIVFDN = Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas colunas diferem pelo teste F (P≤0,05). Médias seguidas por letras minúsculas distintas nas linhas diferem pelo teste Tukey (P≤0,05).

Discussão

3.1 Perfil fermentativo

É reconhecido que o pH em silagens de leguminosas estabiliza com valores mais elevados, podendo atingir 4,3-4,5, quando ensiladas com 30-35% de MS (Kung Junior et al., 2018), o que pode ser atribuído ao alto teor proteico e elevada capacidade tampão dessas culturas. O pH das silagens avaliadas no presente estudo foi superior a 5,0 o que reflete uma fermentação inadequada, embora valores dessa magnitude não sejam incomuns em silagens de leguminosas. Lima-Orozco et al. (2013) em

trabalho de revisão, reportaram valores de pH maior que 5,0 para silagem de diferentes espécies de leguminosas em Cuba.

A acidificação é essencial para a preservação da massa ensilada, principalmente quando o teor de umidade é elevado, pois a acidez é capaz de prevenir o desenvolvimento de microrganismos deterioradores, os quais são menos tolerantes às condições ácidas do que as bactérias do ácido lático (McDonald et al., 1991). Além do alto teor proteico da soja planta-inteira e de sua elevada capacidade tampão é possível que teores de MS e de CHOs de aproximadamente 30 e 6%, respectivamente, abaixo daqueles valores considerados adequados para ensilagem, conforme McDonald et al. (1991), possam ter contribuído para uma fermentação láctica deficiente, no nosso estudo, não possibilitando a estabilização do pH em períodos anteriores a 60 d de fermentação, que aumentou nos dois últimos períodos de fermentação, atingindo o valor de 5,46, aos 60 d.

Valores de N-NH₃/N total de 10-15%, para silagens de leguminosas ensiladas com <30–35% MS, são considerados adequados (Kung Junior et al., 2018). Em nosso estudo, todas as silagens avaliadas apresentaram valores inferiores ao limite superior reportado por esses autores. Níveis de N-NH₃ mais altos do que o normal, em silagens de leguminosas úmidas, geralmente são resultado da atividade proteolítica de clostrídios (Kung Junior et al., 2018). É provável que a alta abundância do gênero *Clostridium*, principalmente na soja colhida no estágio R5 (Figura 7c), possa ter contribuído para uma proteólise mais intensa. Concentrações de N-NH₃ acima do limite recomendado em silagens reduz o valor nutritivo da mesma, aumenta as perdas de MS, bem como causa efeitos negativos sobre o consumo e desempenho animal (Copani et al., 2016; Borreani et al., 2018).

As silagens tratadas com ISO apresentaram menor concentração de N-NH₃, em ambos os estágios de colheita (R5 e R6), o que pode indicar efetiva atuação da cepa AV14.17 - *Lactiplantibacillus pentosus* na redução da proteólise (Figura 4a). Rosa et al. (2018) também verificaram menor concentração de N-NH₃ em silagem de soja tratada com inoculante microbiano.

Todas as silagens avaliadas apresentaram concentrações de ácido láctico inferiores aos valores usualmente encontrados para silagens de leguminosas (6-8% da MS), conforme Kung Junior et al. (2018), em decorrência das características prevaletentes da cultura, como alta capacidade tampão e baixos teores de MS (< 300 g/kg MS) e de CHOs (<80 g/kg MS), fatores estes que contribuem para o crescimento de microrganismos indesejáveis na massa ensilada (Mustafa et al.,2007, Nkosi et al.,2016b), o que pode explicar a mais alta concentração de ácido acético e butírico das silagens avaliadas no presente estudo, em comparação aos valores referências de Kung Junior et al. (2018). Produções altas de ácido acético (> 30 g/kg MS) provavelmente se devem a fermentações realizadas por BAL heterofermentativas e ENT, enquanto que a presença de ácido butírico é indicativo de fermentações clostrídicas (Pahlow et al., 2003). Nayigihugu et al. (2002) e Nkosi et al. (2016b) também verificaram altos teores de ácido acético em silagens de soja, enquanto que De Moraes et al. (2021) verificaram elevado teor de ácido butírico (> 40 g/kg MS) em silagens de soja colhidas no estágio R6, com ou sem inoculante microbiano.

Bactérias do gênero *Clostridium* podem fermentar uma gama de substratos e, dependendo do substrato utilizado, produzem ácido acético, ácido butírico, N-NH₃, gás carbônico e também substâncias que inibem o consumo de silagem, como as aminas biogênicas: cadaverina, putrescina, histamina e tiramina (McDonald et al., 1991; Kung Junior et al., 2018; Ogunade et al., 2018).

Espécies do gênero *Clostridium* são raras em culturas forrageiras e originam-se principalmente de contaminação do solo e esterco (Woolford e Sawczyc, 1984; Ogunade et al., 2018). Geralmente espécies deste gênero crescem em condições anaeróbias no silo e são restritas a forragens úmidas, isto é, aquelas com mais de 70% de umidade, embora o conteúdo de umidade acima deste valor não signifique que a fermentação clostrídica possa ocorrer (McDonald et al., 1991).

As enterobactérias são intolerantes ao pH ácido, sendo praticamente inibidas em $\text{pH} < 4,5$ (Kung Junior et al., 2015). O crescimento de ENT é suprimido e sua detecção é baixa ($< 2 \log \text{ufc/g}$) em condições de anaerobiose e pH abaixo de 4,5 (Pahlow et al., 2003). No presente estudo, apenas a população de ENT na silagem ISO, colhida no estágio R6, apresentou contagem abaixo deste valor, embora com pH superior a 5,0 o que pode sugerir que somente o pH não é capaz de inibir esse grupo microbiano. Além de produzirem ácido acético, esses microrganismos também podem utilizar compostos nitrogenados e produzirem N-NH_3 , ácido málico e cítrico, o que aumenta ainda mais a capacidade tampão da silagem, dificultando o abaixamento do pH (Pahlow et al., 2003; Muck, 2010).

A diminuição do crescimento de LEV em função do período de fermentação, provavelmente se deve à maior produção de ácido acético, que possui capacidade antifúngica (Kung Junior et al., 2018; Ávila e Carvalho, 2020). Gandra et al. (2018) avaliaram as características fermentativas de silagens de soja inoculadas com *Lactiplantibacillus plantarum* + *Propionibacterium acidipropionici* e verificaram redução significativa ($P=0,021$) na contagem de LEV da silagem tratada em relação ao controle.

Apesar da população de BAL, em plantas de soja colhidas nos dois estágios de colheita, ser superior àquela de 10^5ufc/g de forragem preconizada por Muck (1996),

como mínimo necessário visando minimizar as perdas ao longo da fermentação, em função da fermentação láctica na silagem, isto não se refletiu em eficiente fermentação láctica no nosso estudo, em decorrência dos fatores restritivos já reportados.

3.2 *Diversidade microbiana*

As condições ambientais em que a planta é cultivada influencia a composição da sua microbiota epifítica *in natura*, antes da ensilagem (Ni et al., 2017; 2018), o que pode explicar a influência de estágio de colheita e de inoculante microbiano sobre a abundância relativa da diversidade bacteriana da soja planta-inteira antes da ensilagem.

A abundância de bactérias do gênero *Escherichia* em plantas de ambos estágios de colheita, deve ser ressaltada. Bactérias desse gênero são deletérias à saúde humana e animal, e possuem distribuição endêmica, sendo encontradas nos mais diversos tipos de ambientes, como no solo, intestino de animais e humanos, sendo este gênero bacteriano considerado o mais comum como fonte de contaminação em alimentos de origem animal e vegetal (Ogunade et al., 2018). Por outro lado, o gênero *Lactococcus*, comumente encontrado em forragens *in natura*, é benéfico para o processo de ensilagem, pois além de produzir ácido láctico, que contribui para a acidificação e conservação da massa ensilada, tem atuação mais proeminente no início do processo fermentativo (Zeng et al., 2020).

Com base nos resultados observados para a abundância relativa nas silagens de soja, é evidente que o gênero *Lactiplantibacillus* não foi predominante, enquanto que outros gêneros bacterianos se sobressaíram. Esses resultados podem ser devido ao elevado pH (> 4,5) associado ao baixo teor de MS, e baixa produção de ácido láctico, o que contribuiu para que outros gêneros bacterianos se sobressaíssem sobre

a microbiota da silagem, independentemente do estágio de colheita e do uso de inoculante microbiano (Ni et al., 2017). Em silagens em que o pH se estabiliza mais alto ($> 4,5$), é comum a ocorrência dos gêneros bacterianos *Leuconostoc*, *Lactococcus*, e, quando as condições de acidez não são alcançadas, também observa-se a presença de enterobactérias e de clostrídios (Woolford e Pahlow, 1998).

Cabe destacar, também, a presença do gênero *Clostridium* em todas as silagens avaliadas, principalmente naquelas de plantas colhidas no estágio R5, com abundância de aproximadamente 25%. Espécies do gênero *Clostridium* são raras em culturas forrageiras e originam-se principalmente de contaminação do solo e esterco, conforme já reportado.

A planta em condições de campo possui uma população microbiana epifítica equilibrada, mas quando esse ecossistema é alterado, como na ensilagem, geralmente ocorre redução da diversidade, devido as condições do meio anaeróbico e ácido, o que limita o desenvolvimento dos gêneros anteriormente presentes na planta *in natura*, fazendo com que na silagem prevaleçam os gêneros bacterianos resistentes e adaptados a tais condições. No entanto, em silagens mal fermentadas, a diversidade microbiana é diversificada e com baixa abundância de BAL (Kraut-Cohen et al., 2016).

O maior valor para o índice de Chao1, nas silagens de soja inoculadas. Isso, sugere que o inoculante não foi efetivo em competir com a microbiota epifítica da soja, possibilitando a atuação de outros gêneros bacterianos e resultando em baixa abundância relativa do gênero *Lactiplantibacillus* (Kraut-Cohen et al., 2016).

A presença dos gêneros *Weissella*, *Ligilactobacillus* e *Levilactobacillus* no presente estudo, provavelmente explicam a alta concentração de ácido acético das silagens, uma vez que esses gêneros apresentam bactérias heterofermentativas facultativas, que além de produzirem ácido lático e acético, também podem

metabolizar o ácido láctico a ácido acético, em condições de deficiência de CHO's (He et al., 2019).

A abundância diferencial entre táxons comprova que mesmo o inoculante ISO tendo apresentado melhorias nas características fermentativas nas silagens de soja, em ambos os estágios de colheita, a sua capacidade de predominar sobre a microbiota epifítica não foi alcançada, devido a sua baixa participação na abundância relativa, em decorrência da participação de outros gêneros de BAL. A predominância do gênero *Pediococcus* nas silagens CONT, baseada na análise de abundância diferencial entre táxons, possivelmente se deve a atuação de espécies dominantes pertencentes a esse gênero, que constituem a microbiota epifítica da soja e se sobressaíram em relação demais gêneros durante fermentação espontânea da massa ensilada (Fabiszewska et al., 2019).

3.3 Composição química e digestibilidade in vitro

As alterações na composição química das silagens de soja, colhidas nos estágios R5 e R6, se devem às diferenças nas proporções de grãos e componentes vegetativos (folhas, hastes e caule). Em culturas como a soja, o avanço da maturação proporciona aumento do valor nutritivo, devido ao desenvolvimento das vagens e enchimento de grãos, que são ricos em proteína e energia (Asekova et al., 2014; Gobetti et al., 2011; Oliveira et al., 2016). Isto explica os maiores teores de PB e EE e os menores teores de FDN e FDA, em silagens de plantas colhidas no estágio R6.

O maior teor de NDT e o mais elevado coeficiente de DIVMS da silagem de soja colhida no estágio R6, independentemente do inoculante, se deve à maior participação de grãos, como também os maiores teores de PB e de EE. O aumento do teor de NDT está diretamente associado ao maior valor energético da silagem

colhida no estágio R6, devido ao seu maior teor de EE, que é 2,5 vezes mais energético do que carboidratos e proteínas (Vargas-Bello-Pérez et al., 2008; Gobetti et al., 2011; Asekova et al., 2014; Ghizzi et al., 2020).

Kawamoto et al. (2013) avaliaram a degradabilidade *in situ* de silagens de soja colhidas nos estágios R6 e R7, e não encontraram diferenças entre os estágios de colheita, que apresentaram valor médio de 600 g/kg, para degradabilidade efetiva da MS. Os autores justificaram essa ausência de efeito à presença dos grãos, que já estavam desenvolvidos em ambos os estágios.

Conclusões

O perfil fermentativo, a diversidade microbiana e o valor nutritivo de silagens de soja variam em função do estágio de colheita, bem como pelo uso de inoculante microbiano, embora a fermentação predominante tenha sido tipicamente acética, possivelmente devido à presença dos gêneros *Weissella*, *Ligilactobacillus* e *Levilactobacillus* nas silagens. Quanto à diversidade microbiana, destaca-se a presença do gênero *Clostridium* em todas as silagens avaliadas, o que pode também ter comprometido a fermentação da massa ensilada. Portanto, recomenda-se a colheita da soja para produção de silagem no estágio R6, associado à aplicação de inoculante microbiano, por promover melhorias nas características fermentativas, como redução na concentração de N-NH₃ e pH, melhorar a digestibilidade *in vitro* da matéria seca, bem como proporcionar maior rendimento de matéria seca por área.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Agradecimentos

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

Referências

- Acikgoz, E., Sincik, M., Oz, M., Albayrak, S., Wietgreffe, G., Turan, Z.M., Goksoy, A.T., Bilgili, U., Karasu, A., Tongel, O., Canbolat, O., 2007. Forage soybean performance in mediterranean environments. *F. Crop. Res.* 103, 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2007.06.006>
- Adesogan, A.T., 2005. Effect of bag type on the apparent digestibility of feeds in ANKOM DaisyII incubators. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119, 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.09.012>
- Ali, N., Wang, S., Zhao, J., Dong, Z., Li, J., Nazar, M., Shao, T., 2020. Microbial diversity and fermentation profile of red clover silage inoculated with reconstituted indigenous and exogenous epiphytic microbiota. *Bioresour. Technol.* 314, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123606>
- American Public Health Association, 2015. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 5th ed. ed. American Public Health Association (APHA), Washington, DC, USA. <https://doi.org/10.2105/MBEF.0222>
- Andrews, S., 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data [WWW Document]. Babraham Bioinforma. URL <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- AOAC, 1990. *Official Methods of Analysis*, 15th ed, Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia, USA. <https://doi.org/10.7312/seir17116-004>
- Asekova, S., Shannon, J.G., Lee, J.-D., 2014. The Current Status of Forage Soybean. *Plant Breed. Biotechnol.* 2, 334–341. <https://doi.org/10.9787/pbb.2014.2.4.334>
- Ávila, C.L.S., Carvalho, B.F., 2020. Silage fermentation—updates focusing on the performance of micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* 128, 966–984. <https://doi.org/10.1111/jam.14450>
- 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. *J. Dairy Sci.* 101, 3952–3979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>
- Bretz, F., Hothorn, T., Westfall, P., 2011. *Multiple Comparisons Using R*, 1st ed. Taylor & Francis Group, New York, NY.

- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G., Knight, R., 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6, 1621–1624.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Chong, J., Liu, P., Zhou, G., Xia, J., 2020. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nat. Protoc.* 15, 799–821. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0264-1>
- Copani, G., Niderkorn, V., Anglard, F., Quereuil, A., Ginane, C., 2016. Silages containing bioactive forage legumes: a promising protein-rich feed source for growing lambs. *Grass Forage Sci.* 71, 622–631.
<https://doi.org/10.1111/gfs.12225>
- De Moraes, J.P.G., Cantoia Júnior, R., Garcia, T.M., Capucho, E., Campana, M., Gandra, J.R., Ghizzi, L.G., Del Valle, T.A., 2021. Chitosan and microbial inoculants in whole-plant soybean silage. *J. Agric. Sci.* 1–9.
<https://doi.org/10.1017/S0021859621000447>
- Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I.L., Agellon, L.B., Xia, J., 2017. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res.* 45, 180–188.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx295>
- European Union, 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off. J. Eur. Union* 32010L0063, 33–79.
- Fabiszewska, A.U., Zielińska, K.J., Wróbel, B., 2019. Trends in designing microbial silage quality by biotechnological methods using lactic acid bacteria inoculants: a minireview. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35, 76–89.
<https://doi.org/10.1007/s11274-019-2649-2>
- Gandra, J.R., Takiya, C.S., Del Valle, T.A., Oliveira, E.R., de Goes, R.H.T.B., Gandra, E.R.S., Batista, J.D.O., Araki, H.M.C., 2018. Soybean whole-plant ensiled with chitosan and lactic acid bacteria: Microorganism counts, fermentative profile, and total losses. *J. Dairy Sci.* 101, 7871–7880.
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-14268>
- Ghizzi, L.G., Del Valle, T.A., Zilio, E.M.C., Sakamoto, L.Y., Marques, J.A., Dias, M.S.S., Nunes, A.T., Gheller, L.S., Tássia, T.B., Grigoletto, N.T.S., Takiya, C.S., da Silva, G.G., Rennó, F.P., 2020. Partial replacement of corn silage with soybean silage on nutrient digestibility, ruminal fermentation, and milk fatty acid profile of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 266, 114526.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114526>
- Gobetti, S.T.C., Neumann, M., Oliveira, M.R., Oliboni, R., 2011. Produção e utilização da silagem de planta inteira de soja (*Glicine max*) para ruminantes. *Rev. Ambiente* 7, 603–616. <https://doi.org/10.5777/ambiente.2011.03.02rb>
- Gomes, A.L.M., Jacovaci, F.A., Bolson, D.C., Nussio, L.G., Jobim, 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.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.11.016>
- 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., 2011. Evaluation of lignin contents in tropical forages using different analytical methods and their correlations with degradation of insoluble fiber. *Anim. Feed Sci. Technol.* 168, 206–222. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.05.001>
- Hall, M.B., 2003. Challenges with nonfiber carbohydrate methods1,2. *J. Anim. Sci.* 81, 3226–3232. <https://doi.org/10.2527/2003.81123226x>
- He, L., Wang, C., Xing, Y., Zhou, W., Pian, R., Yang, F., Chen, X., Zhang, Q., 2019. Dynamics of proteolysis, protease activity and bacterial community of *Neolamarckia cadamba* leaves silage and the effects of formic acid and *Lactobacillus farciminis*. *Bioresour. Technol.* 294, 1221–1237.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122127>
- Holden, L.A., 1999. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *J. Dairy Sci.* 82, 1791–1794. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75409-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75409-3)
- Kawamoto, H., Touno, E., Uchino, H., Uozumi, S., 2013. Comparison of fermentation quality and ruminal degradability between two different harvest timings of forage soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) ensiled with the corn-silage system. *Grassl. Sci.* 59, 120–123. <https://doi.org/10.1111/grs.12015>
- Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I., Emerson, M., Altman, D., 2014. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *Animals* 4, 35–44. <https://doi.org/10.3390/ani4010035>
- Köppen, W., 1918. Klassifikation der Klimate nach Tempetarur, Niederschlag und Jahreslauf. *Petermanns Geogr. Mitt.* 64, 193–203.
- Kraut-Cohen, J., Tripathi, V., Chen, Y., Gatica, J., Volchinski, V., Sela, S., Weinberg, Z., Cytryn, E., 2016. Temporal and spatial assessment of microbial communities in commercial silages from bunker silos. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 6827–6835. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7512-x>
- Kung Junior, L., Lim, J.M., Hudson, D.J., Smith, J.M., Joerger, R.D., 2015. Chemical composition and nutritive value of corn silage harvested in the northeastern United States after Tropical Storm Irene. *J. Dairy Sci.* 98, 2055–2062.
<https://doi.org/10.3168/jds.2014-8621>
- Kung Junior, L., Shaver, R.D., Grant, R.J., Schmidt, R.J., 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 101, 4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
- Kung Junior, L., Stokes, M.R., Lin, C.J., 2003a. Silage Additives, in: Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H. (Eds.), *Silage Science and Technology*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison. WI 53711, USA, pp. 305–360.
<https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c7>
- Kung Junior, L., Taylor, C.C., Lynch, M.P., Neylon, J.M., 2003b. The effect of treating

- alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86, 336–343. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73611-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73611-X)
- 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. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00837-3](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00837-3)
- Lima-Orozco, R., Castro-Alegría, A., Fievez, V., 2013. Ensiled sorghum and soybean as ruminant feed in the tropics, with emphasis on Cuba. *Grass Forage Sci.* 68, 20–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2012.00890.x>
- 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. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13704>
- McDonald, P., Henderson, A.R., Heron, S.J.E., 1991. *The biochemistry of silage*, 2nd ed. Aberystwyth: Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, UK.
- McLaren, M.R., Callahan, B.J., 2021. Silva 138.1 prokaryotic SSU taxonomic training data formatted for DADA2 [Data set]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4587955>
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mertens, D.R., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 85, 1217–1240. <https://doi.org/10.1093/jaoac/85.6.1217>
- Muck, R.E., 2010. Silage microbiology and its control through additives. *Rev. Bras. Zootec.* 39, 183–191. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982010001300021>
- Muck, R.E., 1996. Inoculation of silage and its effects on silage quality, in: *Industries, I. conference with dairy and forage (Ed.)*, Informational Conference with Dairy and Forage Industries. US Dairy Forage Res Center, pp. 43–51.
- Müller, L.R., Meirelles, P.R.L., Castilhos, A.M., Lala, B., Barros, J.S., 2018. Inclusion of crushed corn grains and citrus pulp improves the quality of soybean silage. *Bol. Indústria Anim.* 75, 1–10. <https://doi.org/10.17523/bia.2018.v75.e1431>
- Mustafa, A.F., García, J.C.F., Seguin, P., Marois-Mainguy, O., 2007. Chemical composition, ensiling characteristics and ruminal degradability of forage soybean cultivars. *Can. J. Anim. Sci.* 87, 623–629. <https://doi.org/10.4141/CJAS06030>
- Nayigihugu, V., Kellogg, D.W., Longer, D.E., Johnson, Z.B., Anschutz, K.A., Devine, T.E., 2002. Case Study: Performance and Ensiling Characteristics of Tall-Growing Soybean Lines Used for Silage. *Prof. Anim. Sci.* 18, 85–89. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)31489-3](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)31489-3)
- Nelson, N., 1944. A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375–380. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71980-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71980-7)
- Ni, K., Wang, F., Zhu, B., Yang, J., Zhou, G., Pan, Y., Tao, Y., Zhong, J., 2017.

- Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on the microbial community and fermentation quality of soybean silage. *Bioresour. Technol.* 238, 706–715. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.055>
- Ni, K., Zhao, J., Zhu, B., Su, R., Pan, Y., Ma, J., Zhou, G., Tao, Y., Liu, X., Zhong, J., 2018. Assessing the fermentation quality and microbial community of the mixed silage of forage soybean with crop corn or sorghum. *Bioresour. Technol.* 265, 563–567. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.097>
- Nkosi, B.D., Meeske, R., Langa, T., Motiang, M.D., Modiba, S., Mkhize, N.R., Groenewald, I.B., 2016a. Effects of ensiling forage soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) with or without bacterial inoculants on the fermentation characteristics, aerobic stability and nutrient digestion of the silage by Damara rams. *Small Rumin. Res.* 134, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.001>
- Nkosi, B.D., Meeske, R., Langa, T., Motiang, M.D., Modiba, S., Mutavhatsindi, T.F., Malebana, I.M.M., Groenewald, I.B., 2016b. Effects of bacterial inoculation on the fermentation characteristics and aerobic stability of ensiled whole plant soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.). *South African J. Anim. Sci.* 46, 129–138. <https://doi.org/10.4314/sajas.v46i2.3>
- NRC, 2001. Nutrient requirements of dairy cattle, 8th ed. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- 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.* 101, 2048–2059. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12876>
- Okuda, H., Fujii, S., Kawashima, Y., 1965. A direct colorimetric determination of blood ammonia. *Tokushima J. Exp. Med.* 12, 11–23.
- Oliveira, R.D., Silva, C.M. da, Mielezski, F., Lima, J.S.B., Edvan, R.L., 2016. Estádios fenológicos de colheita em cultivares de soja destinada à ensilagem. *Acta Sci. - Anim. Sci.* 38, 383–387. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v38i4.31837>
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude-Elferink, S.J.W.H., Spoelstra, S.F., 2003. Microbiology of Ensiling, in: Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H. (Eds.), *Silage Science and Technology*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI 53711, USA, pp. 31–93. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c2>
- R Core Team, 2018. R core team (2018). *R A Lang. Environ. Stat. Comput. R Found. Stat. Comput.* Vienna, Austria.
- Ren, H., Feng, Y., Pei, J., Li, J., Wang, Z., Fu, S., Zheng, Y., Li, Z., Peng, Z., 2020. Effects of *Lactobacillus plantarum* additive and temperature on the ensiling quality and microbial community dynamics of cauliflower leaf silages. *Bioresour. Technol.* 307, 1232–1245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123238>
- Ribeiro, A.C., Guimarães, P.T.G., Viana, V.H.A., 1999. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais - 5ª Aproximação, Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais - 5º Aproximação.

- Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, Viçosa-MG.
- Rosa, L.O., Pereira, O.G., Ribeiro, K.G., Valadares Filho, S. de C., Cecon, P.R., 2020. Chemical composition in soybean silages with inoculant and molasses. *Cienc. Anim. Bras.* 21, e582011. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v21e-58211>
- Rosa, L.O., Pereira, O.G., Ribeiro, K.G., Valadares Filho, S.C., Cecon, P.R., 2018. Fermentation profile and microbial population in soybean silages with inoculant and powdered molasses. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 70, 1586–1594. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9500>
- Santos, H.G., Jacomine, P.K.T., Anjos, L.H.C., Oliveira, V.A., Oliveira, J.B., Coelho, M.R., Lumbreiras, J.F., Cunha, T.J.F., 2013. *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos*, 3rd ed. Embrapa Solos, Rio de Janeiro.
- SAS Institute Inc., Cary, NC, U., 2010. *Statistical Analysis Systems User's Guide*.
- Siegfried, V.R., Ruckemann, H., Stumpf, G., 1984. Eine HPLC-methode zur bestimmung organischer säuren in silagen. *Landwirtsch Forsch* 37, 298–304.
- Silva, V.P. da, Pereira, O.G., Leandro, E.S. de, Paula, R.A. de, Agarussi, M.C.N., Ribeiro, K.G., 2020. Selection of Lactic Acid Bacteria from Alfalfa Silage and Its Effects as Inoculant on Silage Fermentation. *Agron. J.* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1002/agj2.20720>
- Sniffen, C.J., O'Connor, J.D., Van Soest, P.J., Fox, D.G., Russell, J.B., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* 70, 3562–3577. <https://doi.org/10.2527/1992.70113562x>
- Tilley, J.M.A., Terry, R.A., 1963. A Two-Stage Technique for the in Vitro Digestion of Forage Crops. *Grass Forage Sci.* 18, 104–111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA, 2021. Boletim meteorológico 2021 [WWW Document]. Estação Clim. Princ. Viçosa. Dep. Eng. Agrícola. Viçosa, MG UFV, 2021. URL https://www.posmet.ufv.br/?page_id=1253 (accessed 8.28.21).
- Vargas-Bello-Pérez, E., Mustafa, A.F., Seguin, P., 2008. Effects of feeding forage soybean silage on milk production, nutrient digestion, and ruminal fermentation of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91, 229–235. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0484>
- Wang, Y., Qian, P.-Y., 2009. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *PLoS One* 4, e7401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>
- Woolford, M.K., Pahlow, G., 1998. The silage fermentation. *Microbiol. Fermented Foods* 73–102. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0309-1_3
- Woolford, M.K., Sawczyk, M.K., 1984. An investigation into the effect of cultures of lactic acid bacteria on fermentation in silage. 1. Strain selection. *Grass Forage Sci.* 39, 139–148. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1984.tb01675.x>
- Yang, L., Yuan, X., Li, J., Dong, Z., Shao, T., 2019. Dynamics of microbial community and fermentation quality during ensiling of sterile and nonsterile alfalfa with or

without *Lactobacillus plantarum* inoculant. *Bioresour. Technol.* 275, 280–287.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.067>

Zeng, T., Li, Xiaoling, Guan, H., Yang, W., Liu, W., Liu, J., Du, Z., Li, Xiaomei, Xiao, Q., Wang, X., Zhang, X., Huang, L., Xiang, Q., Peng, Q., Yan, Y., 2020. Dynamic microbial diversity and fermentation quality of the mixed silage of corn and soybean grown in strip intercropping system. *Bioresour. Technol.* 313, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123655>

Zhao, S., Yang, F., Wang, Yuan, Fan, X., Feng, C., Wang, Yanping, 2021. Dynamics of Fermentation Parameters and Bacterial Community in High-Moisture Alfalfa Silage with or without Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms* 9, 1225–1238.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9061225>

CAPÍTULO III – EFEITO DE *Lentilactobacillus buchneri* EM CANA-DE-AÇÚCAR ENSILADA COMO RAÇÃO EM MISTURA TOTAL SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS, ESTABILIDADE AERÓBIA, CONSUMO E PARÂMETROS RUMINAIS DE BOVINOS DE CORTE

Capítulo formatado de acordo com o periódico científico: *Journal of Animal Science*, exceto a disposição de tabelas e figuras

Resumo

Foram avaliados os efeitos da ensilagem da cana-de-açúcar exclusiva (SC) ou na forma de ração em mistura total (RMT), com *Lentilactobacillus buchneri* (LB) ou sem (CTRL) sobre a composição química, perfil fermentativo e estabilidade aeróbia (EA) (Experimento 1), consumo, digestibilidade, parâmetros ruminais, balanço de nitrogênio (BN) e síntese de proteína microbiana (PMic) em bovinos de corte (Experimento 2). A cana-de-açúcar foi processada e aditivada com LB 40788 LaSil Cana (Lallemand®, Brasil) [3×10^5 unidades formadoras de colônia (ufc) g^{-1} ; LB] ou água destilada [5 mL kg^{-1} ; (controle, CTRL)] e ensilada. A RMT foi composta por farelo de milho, farelo de soja, ureia e núcleo vitamínico-mineral, com relação volumoso: concentrado de 30:70, base da matéria seca (MS), com ou sem LB. No experimento 1 foi usado um delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial, sendo o primeiro fator tipo de silagem (SC ou RMT) e segundo fator inoculante (CTRL ou LB), com cinco repetições por tratamento, enquanto que no experimento 2 foi adotado o delineamento em quadrado latino 4×4 , em esquema fatorial 2×2 , para tipo de silagem (SC ou RMT) e inoculante (CTRL ou LB). Houve efeito da interação silagem \times inoculante ($P < 0,05$) sobre carboidratos solúveis em água (CHOs), pH,

leveduras (LEV), bactérias ácido lácticas (BAL) e perdas de matéria seca (PMS). Foram observadas menores ($P < 0,05$) populações de LEV e de BAL, bem como PMS nas silagens RMT, tanto na ausência como na presença do inoculante. Silagens tratadas com LB apresentaram valores mais baixos de pH que silagem exclusiva de cana ou na forma de RMT. Verificou-se efeito ($P < 0,001$) de silagem e tendência ($P = 0,0582$) de inoculante sobre a EA. No experimento 2, foi observado efeito ($P < 0,05$) de inoculante sobre o consumo de MS e de nutrientes digestíveis totais (NDT). Observou-se efeito ($P < 0,05$) de silagem sobre os consumos de matéria orgânica (MO), fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), amido, extrato etéreo (EE) e carboidratos não-fibrosos (CNF), com maiores valores nas dietas a base de RMT ensilada. Foi observado maior digestibilidade aparente ($P < 0,05$) de MS, MO, amido e CNF em dietas à base de RMT ensilada, bem como menores valores de excreção de amido fecal ($P < 0,01$), pH ruminal ($P < 0,01$) e $N-NH_3$ ruminal ($P < 0,05$). Foi observada maior ($P < 0,05$) síntese de PMic em dietas a base de RMT ensilada. A ensilagem da cana-de-açúcar na forma de RMT proporciona maior digestibilidade de MS, MO, CNF e de amido, bem como maior eficiência microbiana e menor excreção de amido fecal. Portanto, baseado no exposto, conclui-se pela ensilagem da cana-de-açúcar na forma RMT, com uso de inoculante microbiano.

Palavras-chave: amido digestível, etanol, levedura, perdas, valor nutritivo

Abreviações: SC, silagem de cana-de-açúcar; SRMT, silagem de ração em mistura total; LB, *Lentilactobacillus buchneri*; CTRL, controle; EA, estabilidade aeróbia; BN, balanço de nitrogênio; PMic, síntese de proteína microbiana; ufc, unidades formadoras de colônia; CHOs, carboidratos solúveis; LEV, leveduras; BAL, bactérias ácido lácticas;

RMS, recuperação de matéria seca; FDNcp, fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; MS, matéria seca; MO, matéria orgânica; PMS, perdas de matéria seca; AL, ácido lático; AA, ácido acético; AP, ácido propiônico; UFV, Universidade Federal de Viçosa; DP, desvio padrão; MN, matéria natural; ENT, enterobactérias; FUN, fungos filamentosos; MRS ágar, De Man, Rogosa & Sharpe; VRB ágar, Violet Red Bile Agar; DRBC ágar, Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol Base Agar; PCm, peso corporal médio; peso vivo (PV); NDT, nutrientes digestíveis totais; CNF, carboidratos não-fibrosos; MM, matéria mineral; EE, extrato etéreo; FDA, fibra em detergente ácido; NIDA, nitrogênio insolúvel em detergente ácido; N, nitrogênio; PA, purinas absorvidas; DP, derivados de purina; EfMic, eficiência de síntese de proteína microbiana

Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma fonte de volumoso tradicional, utilizada na alimentação de ruminantes em condições tropicais devido a sua alta produtividade de MS por área (30-50 t MS ha⁻¹), com adequado valor nutritivo na época de colheita, o que desperta interesse entre os fazendeiros (Voltolini et al., 2012; De Carvalho et al., 2014; Silva et al., 2018). Para facilitar o manejo da cultura, tem sido recomendado sua ensilagem visando aumentar a eficiência de uso da área, evitar cortes diários, acamamento, diminuir riscos de incêndios, bem como facilitar a logística e operacionalidade da fazenda (Pedroso et al., 2005; Pedroso et al., 2008; Daniel et al., 2016).

Contudo, a ensilagem exclusiva da cana-de-açúcar proporciona elevada PMS (> 40% MS), devido ao seu alto teor de CHOs (> 400 g kg⁻¹ MS) e elevada população epifítica de LEV (Pedroso et al., 2008; Ávila et al., 2014), resultando em alta produção

de etanol, boa parte é volatilizado na fase aeróbia, após a abertura do silo (McDonald et al., 1991; Daniel et al., 2013).

Dessa forma, a fermentação alcoólica no processo de ensilagem da cana-de-açúcar além de ser indesejável deve ser mitigada. Vários aditivos químicos ou microbianos tem sido utilizados visando inibir fermentações indesejáveis e aumentar a EA de silagens dessa cultura (Pedroso et al., 2008; Ávila et al., 2014; Silva et al., 2018). Dentre os inoculantes microbianos, o *L. buchneri* destaca-se como um dos microrganismos mais pesquisados em todo mundo, em busca de reduzir a fermentação alcoólica e de aumentar a estabilidade aeróbia de silagens. Arriola et al. (2021) em estudo de meta-análise em silagens de diferentes culturas inoculadas com *L. buchneri* reportaram um dos menores incrementos na estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar (19 h). Isto, se deve provavelmente à maior preservação de carboidratos solúveis em água nas silagens tratadas com *L. buchneri* (Rabelo et al., 2019). No entanto, Gomes et al. (2021) verificaram que a cepa 40788 de *L. buchneri* foi eficaz em estender a estabilidade aeróbia de silagem de cana-de-açúcar, além de melhorar a preservação de nutrientes durante a fermentação.

Em busca de melhorar o valor nutritivo da cana-de-açúcar e reduzir as perdas durante a fermentação, sua ensilagem na forma de RMT pode ser uma alternativa interessante, cujo processo consiste na mistura prévia e ensilagem de todos os ingredientes que compõem a dieta (Cao et al., 2010; Chen et al., 2016; Clemmons et al., 2021). A confecção de silagem de RMT é comum em vários países (Japão, China, EUA, Itália e Tailândia) e recentemente seu uso vem crescendo no Brasil (Macêdo et al., 2018; Miyaji e Nonaka, 2018; Nair et al., 2020; Dong et al., 2021; Lazzari et al., 2021). Pesquisas demonstraram que na produção de silagem de RMT pode-se utilizar coprodutos da agroindústria e forragens de elevada umidade, contribuindo para

reduzir perdas e aumentar a EA (Cao et al., 2011; Dong et al., 2021), bem como melhorar a digestibilidade total dos nutrientes, principalmente do amido (Miyaji et al., 2017). Além disso, proporciona ganhos em eficiência alimentar, devido à menor emissão de CH₄, maior digestibilidade do amido e maior retenção de energia no animal (Miyaji e Nonaka, 2018; Subepang et al., 2019).

A nossa hipótese é que a cana-de-açúcar ensilada na forma de RMT proporciona ganhos em estabilidade aeróbia e maior eficiência alimentar. No Brasil, são incipientes estudos envolvendo a avaliação da cana-de-açúcar ensilada na forma de RMT, bem como seu uso na alimentação animal. Desta forma, objetivou-se com o presente estudo avaliar o consumo e a digestibilidade dos nutrientes em bovinos de corte alimentados com dietas contendo cana-de-açúcar ensilada ou não como RMT, tratadas com *L. buchneri*, bem como avaliar o perfil fermentativo e a estabilidade aeróbia dessas silagens.

Material e Métodos

Ambos os experimentos 1 e 2 foram realizados na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Nutrição e Produção de Ruminantes e as análises químicas no Laboratório de Forragicultura e Microbiologia da Silagem, ambos pertencentes ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Uso e manejo animal

Os procedimentos para o uso e manejo dos animais utilizados neste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFV (protocolo # 032 / 2021) e também seguiram as diretrizes internacionais para

experimentação animal ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) (Kilkenny et al., 2014).

Experimento 1: Perfil fermentativo, composição química e estabilidade aeróbia de cana-de-açúcar ensilada ou não na forma de RMT, inoculada com *Lentilactobacillus buchneri*

Colheita da cana-de-açúcar, preparo da RMT, ensilagem e delineamento experimental

A cana-de-açúcar foi colhida de forma manual em um canavial já estabelecido aos 18 meses após rebrota em Outubro de 2020. A cana apresentou teor médio de $280 \pm 4,84$ g MS kg matéria natural (MN)⁻¹; média \pm desvio padrão (DP) e $19,5 \pm 1,2^{\circ}$ Brix. Em seguida, o material foi processado em tamanhos de partículas de ± 10 mm em máquina forrageira estacionária (JF-60, JF-Máquinas®, Itapira-SP, Brasil) acoplada em tomada de potência do trator (Valtra / Valmet 785®, Mogi das Cruzes-SP, Brasil).

Foi usado um delineamento inteiramente casualizado arranjado em um esquema fatorial (2×2), sendo dois tipos de silagem [silagem de cana-de-açúcar (SC) e silagem de ração em mistura total (RMT)], com ou sem (CTRL) inoculante microbiano (LB), com cinco repetições por tratamento.

Utilizou-se o inoculante comercial LaSil Cana à base de *Lentilactobacillus buchneri* (LB; NCIMB 40788 Lallemand®, Aparecida de Goiânia-GO, Brasil) [3×10^5 ufc g⁻¹; LB]. O inoculante foi diluído em 50 mL de água destilada e aplicado em pilhas individuais de 10 kg MN com borrifadores manuais, sendo aplicado o mesmo volume de água destilada no tratamento controle. Para a confecção da RMT realizou-se a

mistura dos ingredientes, farelo de milho, farelo de soja, ureia/sulfato de amônio (9:1), núcleo mineral-vitamínico [(Agroceres®, Brasil) Confinatto-N210™, contendo: 200 g kg⁻¹ Ca; 24 g kg⁻¹ P; 59,3 g kg⁻¹ Na; 23 g kg⁻¹ S; 5 g kg⁻¹ Mg; 8,2 mg kg⁻¹ Co; 560 mg kg⁻¹ Cu; 240 mg kg⁻¹ F; 28 mg kg⁻¹ I; 1.120 mg kg⁻¹ Mn; 5,6 mg kg⁻¹ Se; 1.680 mg kg⁻¹ Zn; 5,6 mg kg⁻¹ Se; 59.140 UI kg⁻¹ Vit. A; 10.000 ufc kg⁻¹ *Saccharomyces cerevisiae*; 1.000 mg kg⁻¹ Monensina sódica] com a cana-de-açúcar *in natura*. O material foi ensilado em baldes plásticos (Jaguar Embalagens®, Jaguariúna-SP, Brasil) de 10 L (25 cm diâmetro × 25 cm altura) previamente pesados (peso vazio) e compactado manualmente, adotando-se uma densidade ± 700 kg MN m³. Os baldes foram vedados com fita adesiva 45 mm (3M-5802, Scotch®, Sumaré-SP, Brasil), pesados (peso cheio inicial) e armazenados a temperatura ambiente até o momento da abertura. Na Tabela 1 são mostrados a composição química e a população de microrganismos nos diferentes tratamentos, antes da ensilagem.

Tabela 1. Caracterização da composição química e microbiológica dos tratamentos experimentais antes da ensilagem.

Item	Tratamentos experimentais ¹			
	SC-CTRL	SC-LB	RMT-CTRL	RMT-LB
pH	5,83	6,06	6,09	6,06
Matéria seca (g kg ⁻¹ MN ²)	280,36	284,15	533,33	539,59
Concentração (g kg ⁻¹ MS ³)				
Matéria mineral	15,86	17,41	30,21	34,58
Matéria orgânica	984,14	982,59	969,79	965,42
Proteína bruta	27,80	27,45	131,49	128,66
Extrato etéreo	17,77	14,14	31,44	31,00

Amido	-	-	453,50	449,80
Fibra em detergente neutro	584,19	514,49	209,82	252,16
FDNcp ⁴	551,77	486,48	182,51	225,16
Fibra em detergente ácido	258,55	259,01	93,03	111,19
NIDA ⁵	0,35	0,31	0,54	0,59
Lignina	107,00	105,10	39,66	34,77
Carboidratos solúveis	383,74	421,84	132,38	108,45
Populações microbianas (Log ufc g ⁻¹ forragem) ⁶				
Enterobactérias	5,19	5,30	5,16	5,21
Bactérias ácido lácticas	5,85	5,85	5,31	5,31
Leveduras	5,88	5,79	6,13	6,04
Fungos filamentosos	4,86	5,03	5,17	5,08

¹SC-CTRL, Cana-de-açúcar controle “sem inoculante”, e o concentrado ofertado no momento do trato; SC-LB, Cana-de-açúcar inoculada (LaSil Cana *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788. Lallemand®, Brasil) e o concentrado ofertado no momento do trato; RMT-CTRL, Ração em mistura total controle “sem inoculante”; RMT-LB, Ração em mistura total inoculada com LB; ²MN, Matéria natural; ³MS, Matéria seca; ⁴FDNcp, Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; ⁵NIDA, Nitrogênio insolúvel em detergente ácido; ⁶Log ufc g⁻¹ forragem, Unidade logarítmica de unidade formadora de colônia g⁻¹ forragem.

Perfil fermentativo e estabilidade aeróbia

Amostras de 25 g da planta e das silagens após 60 dias de fermentação foram homogeneizadas em 225 mL de solução de Ringer's solution estéril (Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) em liquidificador industrial (1 min). O extrato aquoso foi dividido

em duas alíquotas: Uma alíquota foi usada para medição do pH, com potenciômetro digital (W38 / Tecnal®, São Paulo-SP, Brasil). Após, 20 mL do extrato aquoso foi filtrado e acidificado com H₂SO₄ 1:1 (armazenados a -20 °C) para posteriores análises das concentrações de carboidratos solúveis em água por método colorimétrico (Nelson, 1944), amônia, pelo método fenol-hipoclorito (Okuda et al., 1965) e ácidos orgânicos (ácido lático, ácido acético, ácido butírico, ácido propiônico, 1,2-propanodiol e etanol) (Siegfried et al., 1984).

A segunda alíquota do extrato aquoso foi usada para quantificação das populações de enterobactérias (ENT), BAL, LEV e fungos filamentosos (FUN). Foram realizadas diluições seriadas 10¹ a 10⁹. Em seguida, foi realizado o plaqueamento em placas de Petri estéreis (método *pour-plate*) em meios de cultura. Foi utilizado o MRS ágar (De Man, Rogosa & Sharpe, Merck®, Darmstadt, Alemanha) para o cultivo de BAL (37 °C / 48 h), VRB ágar (Violet Red Bile Agar, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) para o cultivo de ENT (37 °C / 24 h) e DRBC ágar (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol Base Agar, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) para cultivo de LEV (25 °C / 72 h) e de FUN (25 °C / 120 h). Para contagem das populações microbianas considerou-se o intervalo de ufc entre 25 a 250 (American Public Health Association, 2015).

Após 60 dias de ensilagem os baldes foram abertos e pesados, uma amostra de 2 kg de silagem retornou aos baldes que foram cobertos por uma camada de tecido de nylon para avaliação da EA. Os baldes foram armazenados em sala com temperatura ambiente constante (\pm 22 °C), e no centro da massa da silagem foi inserido um *data-logger* (Cryopark iMINI™, Cryopark Company Inc., VA, USA) para mensuração da temperatura, a cada 10 min durante sete dias. Dois *data-loggers* foram distribuídos na sala para mensuração da temperatura ambiente. A EA foi definida

como o número de horas que a silagem permaneceu estável antes da temperatura da mesma elevar 2 °C acima da temperatura ambiente (Kung Junior et al., 2003).

As PMS foram quantificadas por diferença de pesagem dos baldes. A recuperação de MS (RMS) foi calculada de acordo com Zanine et al. (2006) pela equação: $RMS (g\ kg^{-1}\ de\ MS) = [(MVfo \times MSfo) / (MSi \times MSsi)] \times 100$ Onde: RMS (g kg⁻¹ de MS): Recuperação de MS em porcentagem; MVfo: Massa Verde de forragem (kg) antes da ensilagem; MSfo: MS forragem (%) antes da ensilagem; MSi: Massa da Silagem (kg) antes da abertura dos silos; MSsi: MS da Silagem (%) na abertura dos silos.

Experimento 2. Consumo, digestibilidade e parâmetros da fermentação ruminal em bovinos de corte recebendo cana-de-açúcar ensilada ou não como ração em mistura total

Dietas e animais

Além da ensilagem em baldes plásticos para avaliação das características fermentativas e ensaio de EA, os ingredientes também foram ensilados 2 t⁻¹ de cada tratamento (SC-CTRL, SC-LB, RMT-CTRL e RMT-LB) em manilhas de concreto com capacidade de 1 m³ para o ensaio de consumo e digestibilidade com bovinos de corte. Após a compactação, cada manilha foi vedada com filme plástico de polietileno dupla face com 200 micras (Lonax, PaperPlast™, Belo Horizonte-MG, Brasil), envolta com arame de zinco 1,24 mm (BWG18, Gerdau®, Ouro Branco-MG, Brasil) e acrescido de 10 cm de areia para proteção do filme plástico.

Foram utilizados quatro novilhos da raça Nelore, não-castrados, fistulados no rúmen, peso corporal médio (PCm) de 280 ± 16 kg e idade média de 14 ± 2 meses no

início do ensaio. Os animais foram previamente tratados com medicamentos contra ecto e endoparasitas e alojados em baias individuais cobertas, com piso cimentado, dispostas de comedouro e bebedouro, com ingestão voluntária e livre acesso a água. Foi usado o delineamento em quadrado latino 4 × 4, com quatro animais, quatro dietas e quatro períodos experimentais, em esquema fatorial 2 × 2 sendo dois tipos de silagem [silagem de cana-de-açúcar (SC) e silagem de ração em mistura total (RMT)], com ou sem (CTRL) inoculante microbiano (LB). A silagem de RMT foi composta por cana-de-açúcar, farelo de milho, farelo de soja, ureia e núcleo vitamínico-mineral. A composição das dietas é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Proporção dos ingredientes, composição química das dietas experimentais e caracterização microbiológica das silagens após 60 dias de fermentação.

Ingredientes (% MS ¹)	Dietas experimentais ²			
	SC-CTRL	SC-LB	RMT-CTRL	RMT-LB
Cana-de-açúcar	29,80	29,80	29,80	29,80
Milho fubá	60,93	60,93	60,93	60,93
Soja farelo	6,09	6,09	6,09	6,09
Ureia/Sulfato amônio (9:1)	1,42	1,42	1,42	1,42
Núcleo mineral-vitamínico	1,76	1,76	1,76	1,76
	Composição química das dietas (g kg ⁻¹ MS)			
Matéria seca (g kg ⁻¹ MN ³)	484,42	501,18	513,62	525,66
Matéria mineral	40,51	41,29	37,65	39,31
Matéria orgânica	957,97	957,20	962,35	960,69
Proteína bruta	134,14	136,14	131,88	129,68
Proteína solúvel (g kg ⁻¹ PB)	52,71	56,25	67,09	68,62

Extrato etéreo	32,28	32,62	40,31	41,35
Amido	509,44	507,53	470,42	477,13
FDNcp ⁴	282,10	263,21	195,01	191,41
Carboidratos não-fibrosos	537,88	553,65	624,37	627,45
Nutrientes digestíveis totais	775,40	773,98	840,72	846,69
<hr/>				
Carboidratos solúveis	88,54	57,21	3,35	4,21
N-NH ₃ (g kg ⁻¹ nitrogênio total)	72,32	69,18	62,45	60,37
pH	3,12	3,19	4,33	4,55
Populações microbianas (Log ufc g ⁻¹ forragem) ⁵				
Bactérias ácido lácticas	6,09	6,92	5,88	7,95
Leveduras	4,62	4,21	3,97	2,65
Fungos filamentosos	2,58	2,34	2,62	1,86

¹MS, Matéria seca; ²SC-CTRL, Silagem de cana-de-açúcar controle “sem inoculante”, e concentrado ofertado no momento do trato; SC-LB, Silagem de cana inoculada (LaSil Cana *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788. Lallemand®, Brasil) e o concentrado ofertado no momento do trato; RMT-CTRL, Silagem de ração em mistura total controle; RMT-LB, Silagem de ração em mistura total inoculada com LB; ³MN, Matéria natural; ⁴FDNcp, Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; ⁵Log ufc g⁻¹ forragem, Unidade logarítmica de unidade formadora de colônia g⁻¹ de forragem.

As dietas foram formuladas para atender as exigências nutricionais de bovinos zebuínos em crescimento, com ganho de 1,5 kg peso vivo (PV) dia⁻¹, usando o BR-Corte 4.0 (Valadares Filho et al., 2020), com proteína bruta (PB) de ± 130 g kg⁻¹ MS e

NDT de $\pm 770 \text{ g kg}^{-1}$ MS, além de minerais e vitaminas. Foi usada uma relação volumoso:concentrado de 30:70, na base da MS.

A duração do ensaio de consumo e digestibilidade foi de 80 dias, dividido em quatro períodos experimentais de 20 dias cada, sendo 14 dias (1º ao 14º dia) para adaptação e 6 dias (15º ao 20º dia) para coletas (Machado et al., 2016). A estimativa do teor MS das dietas foi realizada semanalmente para ajustar o teor de MS ao longo do ensaio experimental. As dietas foram fornecidas duas vezes ao dia, às 8h00 e 16h00.

Mensuração do consumo, amostragem de ingredientes e sobras

As dietas foram ajustadas diariamente, o consumo foi *ad libitum* e as sobras mantidas $\pm 10\%$ do total ofertado. Os animais foram pesados ao início e ao final de cada período experimental para medir a variação de peso vivo em percentual (PV %). A mensuração do consumo dos animais foi quantificada pela diferença entre o alimento ofertado e as sobras.

Os alimentos e as sobras foram amostrados diariamente a partir do 14º até 20º dia de cada período experimental, e acondicionadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ para posteriores análises. As sobras foram amostradas $\pm 10\%$ do total de cada dia de coleta, com a confecção de uma amostra composta por animal e por período. As amostras foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar ($55 \text{ }^\circ\text{C}$) por 72 h e moídas em moinho de facas com peneira de 2 e 1 mm para posteriores análises.

Coleta total de fezes e urina

Foram realizadas coletas totais de fezes e urina do 15º ao 19º dia de cada período experimental. As fezes foram coletadas em baldes plásticos de 50 L de

capacidade, providos de tampa e devidamente identificados, os quais foram pesados diariamente. A urina foi coletada com auxílio de sondas coletoras, que foram acopladas aos animais, conectadas a galões plásticos 20 L, que continham 200 mL de uma solução de H₂SO₄ 20% (v / v) (Hristov et al., 2019).

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

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

Coleta de líquido ruminal e mensuração do pH

A coleta de líquido ruminal foi realizada no 20º dia de cada período experimental. As amostras foram coletadas em cinco pontos distintos na interface líquido-sólido do rúmen e foram filtradas em três camadas de gaze estéril. Foram coletadas ± 250 mL de líquido ruminal em cada horário de coleta (0; 2; 4 e 6 horas após alimentação). A digesta foi retirada para separação das frações líquida e sólida

e medição do pH da fração líquida com auxílio de um potenciômetro digital, imediatamente após a filtragem (Deusch et al., 2017). Aproximadamente 50 mL da fração líquida foi acidificada com 1 mL de H₂SO₄ 1:1 (v / v) e armazenada a -20 °C para posteriores análises de N-NH₃ ruminal e ácidos orgânicos.

Análises químicas, experimentos 1 e 2

As amostras da planta no dia da ensilagem, das silagens, de ingredientes, dietas, fezes e sobras foram submetidas à secagem parcial em estufa de circulação forçada de ar (55 °C / 72 h). Posteriormente, as amostras foram moídas em moinho de facas (R-TE-650 / 1, Tecnal®, Piracicaba-SP, Brasil), com peneira de crivo de 1 mm, para análises da composição química.

As amostras foram submetidas às análises de quantificação dos teores de matéria seca (MS, método 934,01), matéria orgânica (MO, método 972,43), matéria mineral (MM, método 942,05), proteína bruta (PB = N × 6,25, método 984,13), extrato etéreo (EE, método 920,39) e fibra em detergente ácido (FDA, método 973,18) (AOAC, 1990). Também foram determinados os teores de fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), utilizando-se α-amilase termoestável sem o uso de sulfito de sódio (Mertens, 2002), nitrogênio insolúvel em detergente ácido [(NIDA) (Licitra et al., 1996)], lignina [(LIG) (Gomes et al., 2011)] e proteína solúvel em tampão borato-fosfato (Licitra et al., 1996).

Os teores de carboidratos não-fibrosos (CNF) foram estimados pela fórmula: $100 - [(proteína\ bruta\ (PB) - PB\ da\ ureia + ureia) + FDNcp + extrato\ etéreo + cinzas]$ (Detmann e Valadares Filho, 2010). O cálculo do NDT foi realizado conforme proposto pelo Nutrient Requirements of Beef Cattle (NRC, 2001). Foi realizada análise de amido conforme Silva et al. (2019). Foram determinados os consumos de MS, MO, PB,

FDNcp, EE, CNF, NDT e o consumo de amido, bem como suas respectivas digestibilidades, exceto para NDT (Mertens e Grant, 2020).

A concentração de N-NH₃ do fluido ruminal foi avaliada pelo método fenol-hipoclorito (Okuda et al., 1965). Os ácidos orgânicos do rúmen (lactato, acetato, propionato e butirato) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; SPD-10 AVP, Shimadzu®, Oregon, USA), com detector ultravioleta em 210 nm. A coluna utilizada foi C18 (fase reserva), e utilizado o H₂SO₄ como fase móvel, com fluxo de 1,5 mL min⁻¹, pressão da coluna de 168 kgf e volume injetado de 20 µL (Siegfried et al., 1984).

A urina foi analisada quanto à concentração de nitrogênio (N) e derivados de purina (alantoína e ácido úrico) (Chen e Gomes, 1992). Derivados de purina (DP) e volume total de urina foram utilizados para estimar as purinas absorvidas e a síntese de proteína microbiana no rúmen. Os derivados de purinas foram obtidos pela multiplicação de cada um pelo volume total urinário (Barbosa et al., 2011).

As purinas absorvidas (PA) foram calculadas pela fórmula:

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

Onde: PC = peso corporal; 0,301 PC^{0,75} = excreção endógena de DP; 0,80 = recuperação de PA. A síntese de N microbiano (NMic) foi determinada pela fórmula:

$$NMic = [(70 \times PA) / (0,93 \times 1000 \times 0,137)];$$

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

O balanço de N (BN) foi obtido por diferença entre N total ingerido e N total excretado nas fezes e urina (Hristov et al., 2019). O BN foi determinado pela fórmula:

$$BN = NI - (N \text{ fezes} + N \text{ urina});$$

Onde: NA = NI – N fezes; NI = N ofertado – N sobras; Onde: NR = nitrogênio retido; NI = nitrogênio ingerido; N fezes = nitrogênio nas fezes; N urina = nitrogênio na urina; N ofertado = nitrogênio ofertado; N sobras = nitrogênio sobras.

Análises estatísticas, experimentos 1 e 2

Todos os dados foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade e homogeneidade. Os dados referentes ao experimento 1 foram analisados de acordo com o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2×2 . Os dados da avaliação microbiológica foram transformados para a base logarítmica na base dez (Log ufc). O modelo incluiu os efeitos fixos de silagem, inoculante e da interação silagem \times inoculante, de acordo com o seguinte modelo:

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

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

Os dados referente ao experimento 2 foram analisados de acordo com o delineamento experimental em quadrado latino 4×4 , arranjado em esquema fatorial 2×2 , com quatro tratamentos e quatro períodos experimentais, conforme o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + I_j + (S \times I)_{ij} + A_k + P_l + e_{ijkl}$$

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

Os dados referentes às medições do rúmen (0, 2, 4 e 6 h após alimentação) como o pH ruminal, ácidos orgânicos e N-NH₃ ruminal foram analisados como medidas repetidas no tempo, com efeito fixo para tempo de amostragem e interação entre dieta \times tempo.

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

Resultados

Experimento 1

Houve efeito da interação silagem \times inoculante ($P < 0,05$) sobre CHOs, pH, LEV, BAL e perdas (Tabela 3). Registrou-se menor teor de carboidratos solúveis residuais em silagens de RMT do que em SC, com ou sem inoculante. Silagens tratadas com LB apresentaram valores mais baixos de pH que o CTRL, enquanto os valores foram mais baixos na SC do que na RMT, com ou sem inoculante. Foram observadas menores ($P < 0,05$) populações de LEV e BAL, bem como PMS nas silagens RMT, tanto na ausência como na presença do inoculante. Na silagem exclusiva de cana foi registrado menor PMS no material tratado com LB (Tabela 3).

Tabela 3. Perfil fermentativo e perdas de silagens de cana-de-açúcar (SC) e silagens de ração em mistura total à base de cana (RMT), com ou sem inoculante microbiano.

Inoculante ¹	Silagem		EPM ²	P-valor ³		
	SC	RMT		I	S	I × S
Carboidratos solúveis residuais (g kg ⁻¹ MS ⁴)						
CTRL	79,71Aa	3,59Ab	7,59	<0,0001	<0,0001	<0,0001
LB	21,79Ba	3,81Ab				
pH						
CTRL	3,39Ab	4,28Aa	0,11	<0,0001	<0,0001	0,0102
LB	3,17Bb	4,16Ba				
Leveduras (Log ufc g ⁻¹ forragem) ⁵						
CTRL	4,46Aa	3,84Ab	0,21	0,0100	0,0002	0,0368
LB	4,30Aa	2,55Bb				
BAL ⁶ (Log ufc g ⁻¹ forragem)						
CTRL	6,44Ba	5,78Bb	0,22	<0,0001	0,9419	0,0015
LB	8,15Aa	7,47Ab				
Perdas (g kg ⁻¹ MS)						
CTRL	212,58Aa	42,35Ab	18,55	0,0199	<0,0001	0,0249
LB	110,99Ba	40,12Ab				

¹Inoculante, CTRL (controle, sem uso de aditivo); LB, Inoculante comercial (LaSil Cana *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788. Lallemand®, Brasil); ²EPM, Erro padrão da média; ³P-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I × S); ⁴MS, Matéria seca; ⁵Log ufc g⁻¹ forragem, Unidade logarítmica de unidade formadora de colônia g⁻¹ de forragem; ⁶BAL, Bactérias ácido

láticas; Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste F de Fischer ($P < 0,05$).

Não houve efeito de nenhum dos fatores estudados ($P > 0,05$) sobre o conteúdo de $N-NH_3$, com valor médio de $64,99 \pm 12,02$ g kg^{-1} nitrogênio total, bem como sobre as populações de fungos filamentosos, com valor médio de $2,37 \pm 0,74$ Log ufc g^{-1} silagem. Não foi detectada a presença de enterobactérias.

Em relação a composição química das silagens, verificou-se efeito da interação silagem \times inoculante ($P < 0,05$) sobre os teores de MO, MM, EE, FDNcp e FDA (Tabela 4). A SC apresentou mais alto teor de MO que RMT, com e sem inoculante; o resultado para MM foi o inverso. Foram registrados mais altos teores de EE nas RMT que na SC, sem ou com inoculante. Comportamento inverso foi observado para os teores de FDNcp e FDA (Tabela 4).

Tabela 4. Composição química das silagens de cana-de-açúcar (SC) e silagens de ração em mistura total à base de cana (RMT), com ou sem aplicação de inoculante microbiano.

Inoculante ¹	Silagem		EPM ²	P-valor ³		
	SC	RMT		I	S	I \times S
Matéria orgânica (g kg^{-1} MS ⁴)						
CTRL	979,60Ba	969,78Ab	1,38	0,2287	<0,0001	0,0173
LB	982,20Aa	968,84Ab				
Matéria mineral (g kg^{-1} MS)						
CTRL	20,40Ab	30,22Aa	1,38	0,2287	<0,0001	0,0173
LB	17,80Bb	31,16Aa				

Extrato etéreo (g kg ⁻¹ MS)						
CTRL	17,68Ab	27,45Ba	1,67	0,4423	<0,0001	0,0365
LB	15,57Ab	31,80Aa				
FDNcp ⁵ (g kg ⁻¹ MS)						
CTRL	616,66Aa	187,29Ab	46,04	<0,0001	<0,0001	<0,0001
LB	538,13Ba	173,50Bb				
FDA ⁶ (g kg ⁻¹ MS)						
CTRL	341,34Aa	88,70Ab	27,13	0,0271	<0,0001	0,0012
LB	312,63Ba	95,42Ab				

¹Inoculante, CTRL (controle, sem aditivo); LB, Inoculante comercial (LaSil Cana *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788. Lallemand®, Brasil); ²EPM, Erro padrão da média; ³P-valor, Probabilidade de efeitos de inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I × S); ⁴MS, Matéria seca; ⁵FDNcp, Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; ⁶FDA, Fibra em detergente ácido; Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste F de Fischer (P < 0,05).

Foi observado efeito (P < 0,05) de silagem e de inoculante sobre o teor de MS, enquanto que os teores de PB e de NIDA foram afetados (P < 0,01) apenas por silagem (Tabela 5). Mais alto teor de MS foi obtido com RMT ou com LB, enquanto mais alto teor de PB e mais baixo teor de NIDA foi obtido com RMT.

Tabela 5. Composição química das silagens de cana-de-açúcar (SC) e silagens de ração em mistura total à base de cana (RMT), com ou sem aplicação de inoculante microbiano.

Inoculante ¹	Silagem		Média	EPM ²	P-valor ³		
	SC	SRMT			I	S	I × S
Matéria seca (g kg ⁻¹ MN ⁴)							
CTRL	231,95Bb	519,18Aa	375,56B	31,82	0,0264	<0,0001	0,0813
LB	258,88Ab	522,84Aa	390,87A				
Média	245,42b	521,01a					
Proteína bruta (g kg ⁻¹ MS ⁵)							
CTRL	34,04	120,92	77,48	10,16	0,0614	<0,0001	0,4638
LB	29,18	118,70	73,94				
Média	31,61b	119,81a					
NIDA ⁶ (g kg ⁻¹ MS)							
CTRL	0,36	0,24	0,30	0,02	0,7572	0,0087	0,9999
LB	0,37	0,26	0,32				
Média	0,36a	0,25b					

¹Inoculante, CTRL (controle, sem aditivo); LB, Inoculante comercial (LalSil Cana *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788, Lallemand®, Brasil); ²EPM, Erro padrão da média; ³P-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I × S); ⁴MN, Matéria natural; ⁵MS, Matéria seca; ⁶NIDA, Nitrogênio insolúvel em detergente ácido; Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste F de Fischer (P < 0,05; P > 0,05; P < 0,10).

Verificou-se efeito ($P < 0,001$) de silagem sobre a EA registrando-se maior valor na silagem de RMT (156,73 vs 39,24 h). Também, foi verificado tendência ($P = 0,0582$) de inoculante sobre esta variável, com mais alto valor para LB. As temperaturas máximas das silagens de diferentes formas foram afetadas ($P < 0,001$) pelo fator silagem (Tabela 6), com mais baixo valor para RMT.

Foi observado efeito ($P < 0,05$) da interação silagem \times inoculante sobre o pH e população de leveduras das silagens após a exposição aeróbia (Tabela 6). Ao avaliar o efeito de inoculante dentro de silagem, observou-se menor pH na SC não tratada. Encontrou-se mais alta população de LEV na silagem CTRL, independentemente da forma de ensilagem da cana-de-açúcar. A silagem CTRL também apresentou FUN, porém não houve efeito ($P > 0,05$) dos fatores estudados, com valor médio de $2,5 \pm 0,28$ Log ufc g^{-1} silagem, entretanto, não foi detectada presença deste microrganismo nas silagens inoculadas.

Tabela 6. Estabilidade aeróbia e populações microbianas das silagens de cana-de-açúcar (SC) e silagens de ração em mistura total à base de cana (RMT), com ou sem inoculante microbiano após sete dias de exposição aeróbia.

Inoculante ¹	Silagem		Média	EPM ²	P-valor ³		
	SC	RMT			I	S	I \times S
Estabilidade (h)							
CTRL	34,41	145,46	89,94B	14,37	0,0582	<0,0001	0,4250
LB	44,07	168,00	106,03A				
Média	39,24b	156,73a					
Temperatura máxima (°C)							
CTRL	40,65Aa	29,12Ab	34,89	1,84	0,2767	<0,0001	0,0909

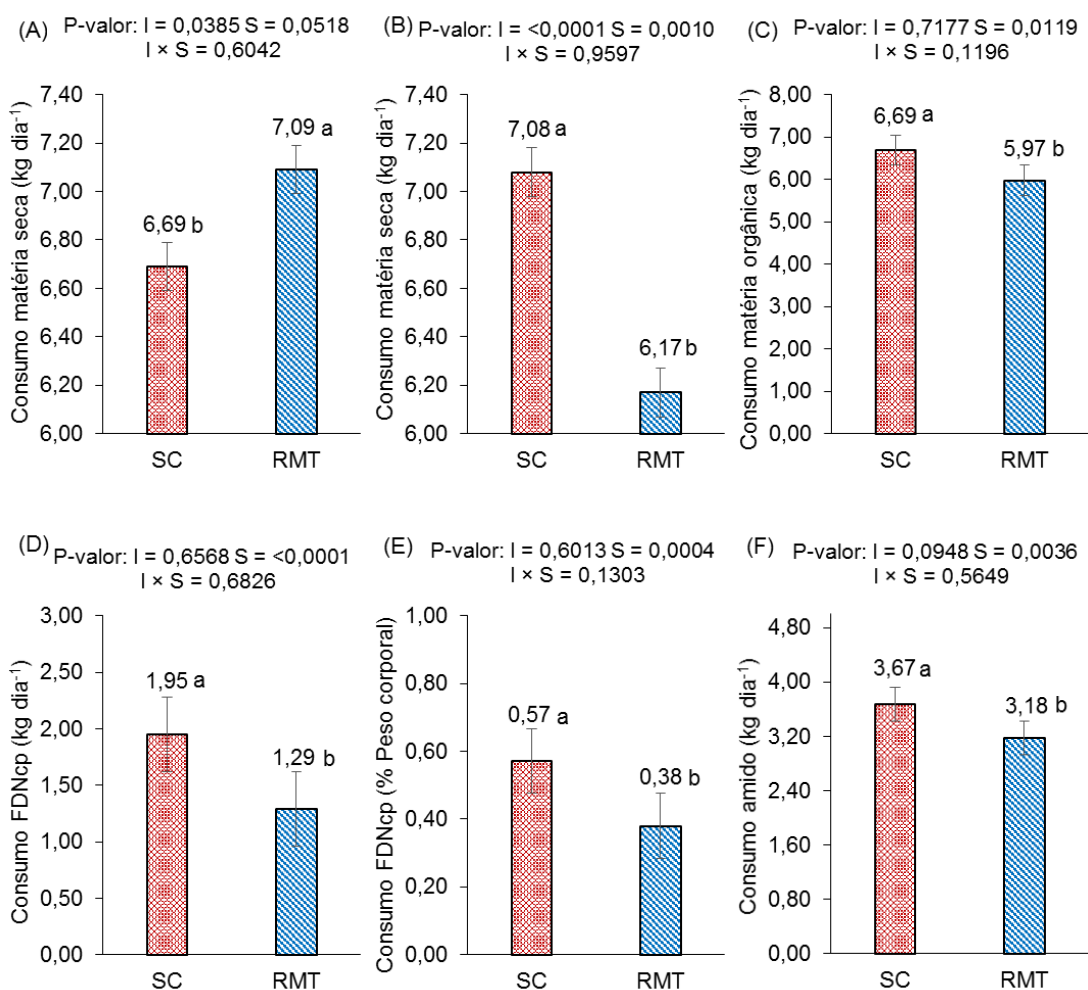
LB	41,64Aa	24,83Bb	33,24				
Média	41,15a	26,97b					
pH							
CTRL	3,30Bb	4,58Aa		0,19	0,1162	0,2354	0,0074
LB	4,71Aa	4,16Aa					
Leveduras (Log ufc g ⁻¹ forragem) ⁴							
CTRL	6,53Aa	7,82Aa		0,39	0,0179	0,8960	<0,0001
LB	5,25Ba	4,08Bb					

¹Inoculante, CTRL (controle, sem aditivo); LB, Inoculante comercial (LaSil Cana *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788. Lallemand®, Brasil); ²EPM, Erro padrão da média; ³P-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I × S); ⁴Log ufc g⁻¹ forragem, Unidade logarítmica de unidade formadora de colônia por g⁻¹ de forragem; Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste F de Fischer (P < 0,05; P > 0,05; P < 0,10).

Experimento 2

Na Figura 1 são mostrados os consumos médios de nutrientes das dietas. Foi observado efeito (P < 0,05) de inoculante sobre os consumos de MS, CNF e NDT, expressos em kg/dia, registrando-se maiores valores nas silagens inoculadas. Foi observada tendência (P = 0,0518) de efeito de silagem sobre o consumo de MS, com maior valor para a dieta contendo SC. Observou-se efeito de silagem sobre os consumos de MO, FDNcp, amido, EE e CNF. Mais altos consumos de MO, FDNcp e amido e mais baixos consumos de EE e CNF foram observados para SC. Observou-se tendência (P = 0,0727) de silagem sobre o consumo de NDT. O consumo de MS

em percentual de peso corporal e de PB não foram afetados ($P > 0,05$) pelos fatores estudados, nem pela interação destes, apresentando valores médios de 2,04 % e 0,97 kg dia⁻¹, respectivamente.



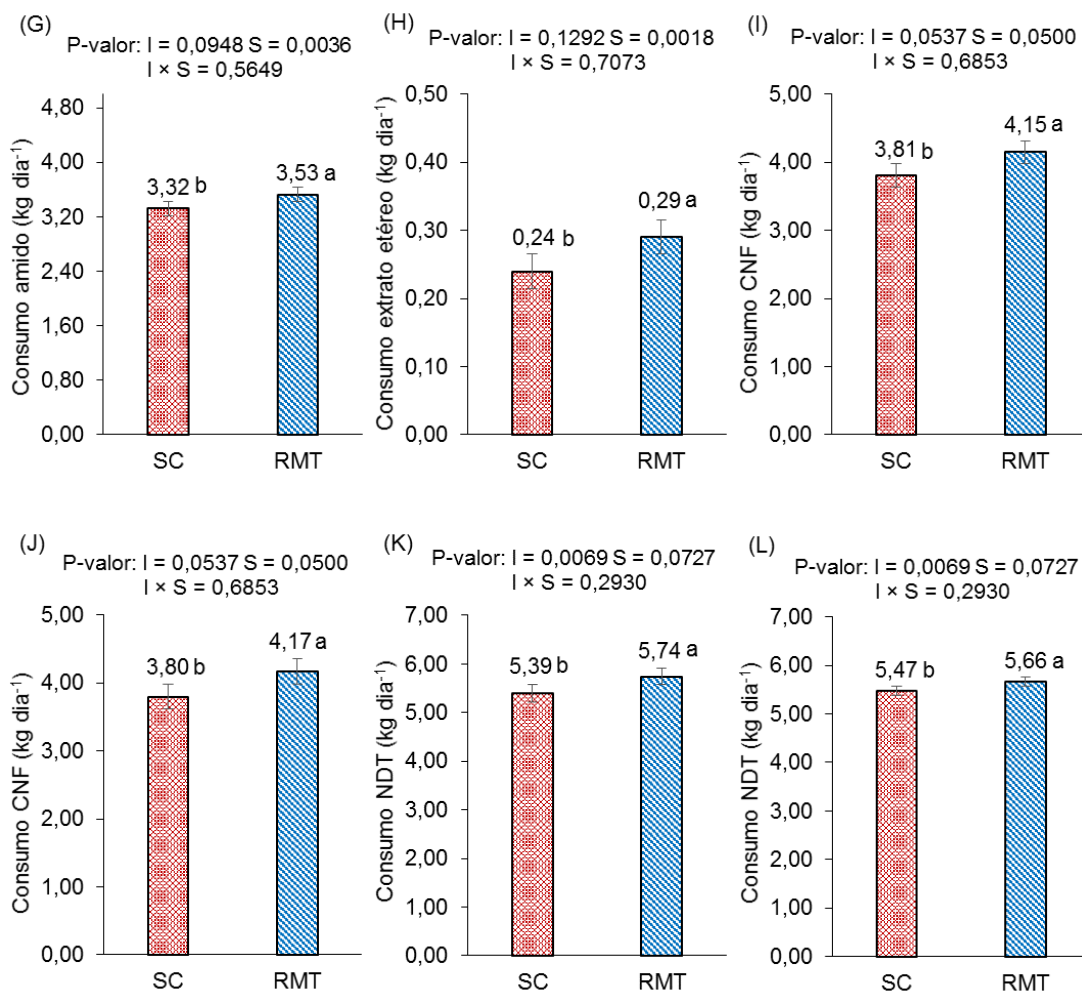


Figura 1. Consumos de matéria seca (A) efeito de inoculante (I), matéria seca (B) efeito de silagem (S), matéria orgânica (C), fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína (FDNcp; D), FDNcp em relação ao percentual de peso corporal (E), amido (F) efeito de I, amido (G) efeito de S, extrato etéreo (H), carboidratos não-fibrosos (CNF; I) efeito de I, CNF (J) efeito de S, nutrientes digestíveis totais (NDT; K) efeito de I e NDT (L) efeito de S de bovinos de corte alimentados com silagens de cana-de-açúcar (SC) e silagens de ração em mistura total à base de cana (RMT), com ou sem inoculante microbiano; P-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I x S); Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste F de Fischer ($P < 0,05$; $P > 0,05$; $P < 0,10$).

As digestibilidades aparentes dos nutrientes foram afetadas ($P < 0,05$) apenas por silagem (Figura 2), exceto PB, FDNcp e EE, cujos valores médios foram 75,06%, 41,08% e 83,91%, respectivamente.

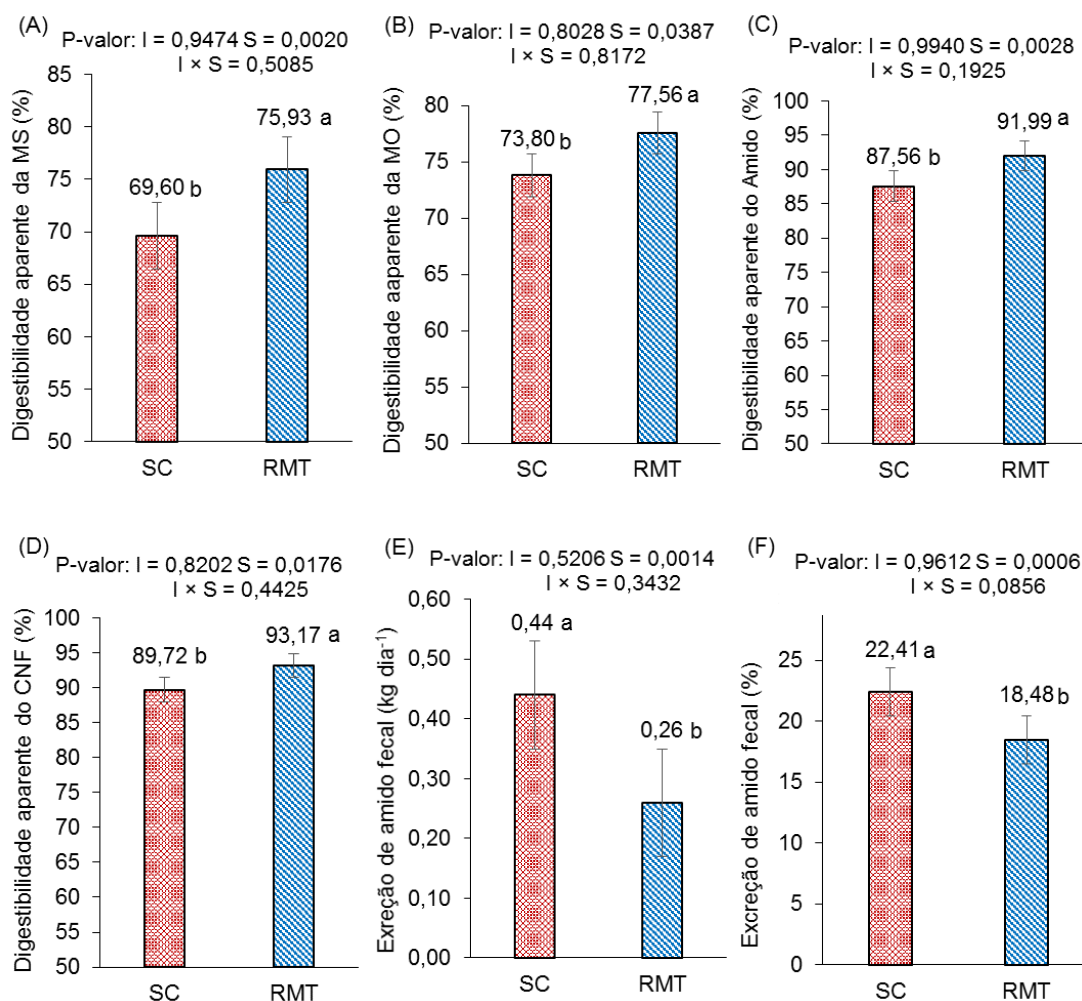


Figura 2. Digestibilidades aparentes totais da matéria seca (MS; A), matéria orgânica (MO; B), amido (C), carboidratos não-fibrosos (CNF; D), excreção de amido fecal em kg dia⁻¹ (E) e em percentual da matéria seca fecal (F) de bovinos de corte alimentados com silagens de cana-de-açúcar (SC) e silagens de ração em mistura total à base de cana (RMT), com ou sem inoculante microbiano; P-valor, Probabilidade de efeitos

para inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I × S); Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste F de Fischer ($P < 0,05$).

Foi observado efeito ($P < 0,01$) de inoculante (Figura 3A) e de silagem (Figura 3B) sobre o pH ruminal, registrando-se menor valor com a silagem LB (6,40) e com a silagem RMT (6,42). A concentração de amônia ruminal foi afetada apenas por silagem, com mais baixo valor para RMT (Figura 3B). Na Figura 4 é mostrado o comportamento do pH e da amônia ruminal antes e após a alimentação dos animais.

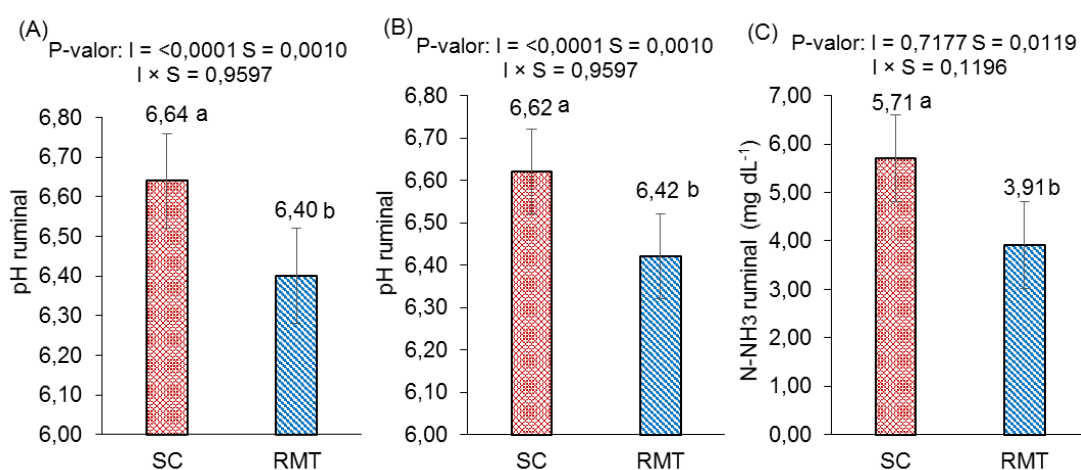


Figura 3. Valores de pH ruminal (A) em função do efeito de inoculante (I), pH ruminal (B) em função do efeito de silagem (S) e N-NH₃ ruminal (B) de bovinos de corte alimentados com silagens de cana-de-açúcar (SC) e silagens de ração em mistura total (RMT), com ou sem aplicação de inoculante microbiano; P-valor, Probabilidade de efeitos para I, S e interação I com S (I × S); Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste F de Fischer ($P < 0,05$).

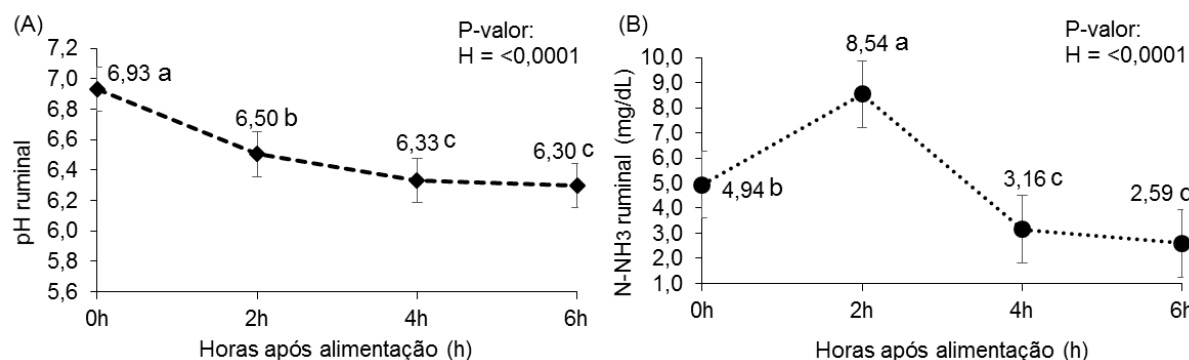


Figura 4. pH (A) e N-NH₃ ruminal (B) ao longo do tempo (0, 2, 4 e 6h) após alimentação em bovinos de corte alimentados com silagens de cana-de-açúcar (SC) e silagens de ração em mistura total (RMT), com ou sem inoculante microbiano; P-valor, Probabilidade de efeito de tempo (H); Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste F de Fischer ($P < 0,05$).

Foi observado efeito ($P < 0,05$) de silagem sobre síntese de nitrogênio microbiano (NMic), síntese de proteína microbiana (PMic) e eficiência de síntese de proteína microbiana (EfMic), com maiores valores para a dieta contendo silagem de RMT (Figura 5).

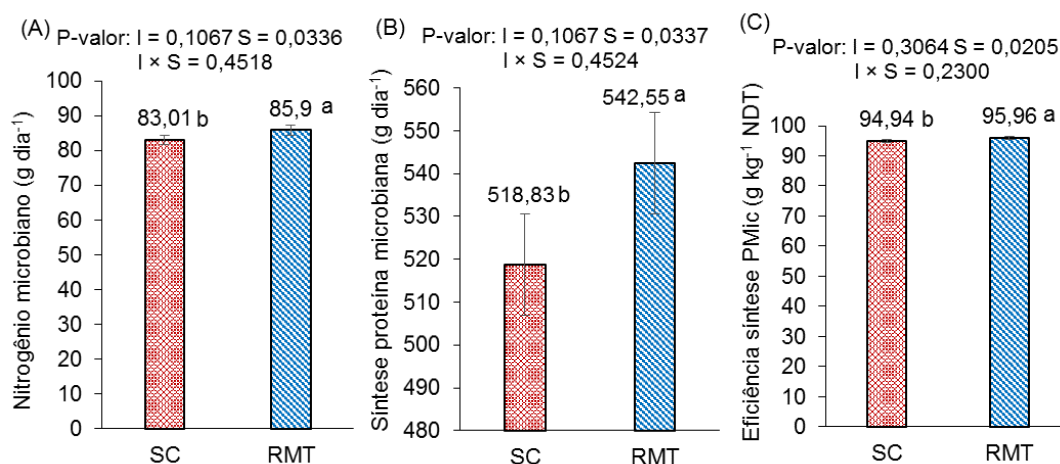


Figura 5. Nitrogênio microbiano (A), síntese de proteína microbiana (PMic) (B) e eficiência de PMic em relação aos nutrientes digestíveis totais (NDT) (C) de bovinos

de corte alimentados com silagens de cana-de-açúcar (SC) e silagens de ração em mistura total à base de cana (RMT), com ou sem aplicação de inoculante microbiano; P-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I × S); Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste F de Fischer ($P < 0,05$).

Não houve efeito para BN ($P > 0,05$) pelos fatores estudados, obtendo-se valores médios de 155,25 g dia⁻¹, 37,82 g dia⁻¹, 55,36 g dia⁻¹, 117,14 g dia⁻¹, 62,06 g dia⁻¹, 0,50 e 0,38, para N ingerido, N fecal, N urinário, N absorvido, N retido, N absorvido:N retido e N retido:N consumido, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7. Balanço de nitrogênio (N) de bovinos de corte alimentados com silagens de cana-de-açúcar (SC) e silagens de ração em mistura total à base de cana (RMT), com ou sem aplicação de inoculante microbiano.

Inoculante ¹	Silagem		EPM ²	P-valor ³		
	SC	RMT		I	S	I × S
N ingerido (g dia ⁻¹)						
CTRL	159,10	150,12	8,50	0,9161	0,3785	0,8620
LB	162,50	149,28				
N fecal (g dia ⁻¹)						
CTRL	38,41	35,67	2,01	0,6595	0,2810	0,7192
LB	41,25	35,97				
N urinário (g dia ⁻¹)						
CTRL	55,93	54,27	2,84	0,8885	0,5706	0,3311
LB	52,63	58,63				
N absorvido (g dia ⁻¹)						

CTRL	120,69	114,44				
LB	121,25	113,32	7,74	0,9823	0,5863	0,9478
N retido (g dia ⁻¹)						
CTRL	64,76	60,17				
LB	68,61	54,69	7,58	0,9462	0,4547	0,7010
N absorvido:N retido						
CTRL	0,53	0,43				
LB	0,56	0,49	0,04	0,5098	0,1881	0,8032
N retido:N consumido						
CTRL	0,40	0,33				
LB	0,42	0,37	0,03	0,6820	0,3351	0,8391

¹Inoculante, CTRL (controle); LB, Inoculante comercial (LaSil Cana *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788. Lallemand®, Brasil); ²EPM, Erro padrão da média; ³P-valor, Probabilidade de efeitos para inoculante (I), Silagem (S) e interação I com S (I × S).

Discussão

Experimento 1

O menor teor de CHOs residual da silagem de RMT provavelmente se deve ao menor teor de CHOs (120 g kg⁻¹ MS) da silagem RMT, comparado ao da cana-de-açúcar (400 g kg⁻¹ MS), antes da ensilagem. O menor teor de CHOs residual verificado na SC-LB indica que LB foi efetivo em consumir o substrato disponível e acidificar o material ensilado comparado a SC-CTRL. O teor de CHOs residual na silagem é um indicativo importante, como fator inicial no processo de deterioração aeróbia (Borreani et al., 2018). Após exposição da silagem ao oxigênio, leveduras e outros microrganismos deterioradores iniciam a deterioração aeróbia da silagem, utilizando esses carboidratos como fonte de substrato. Tanto na cana-de-açúcar ensilada

exclusiva ou como RMT, o inoculante proporcionou menor pH, o que pode indicar sua melhor eficiência na produção de ácidos orgânicos e no abaixamento do pH. No entanto, essa rápida diminuição do pH, devido a altas taxas de crescimento de BAL, poderá acidificar o meio, com valores de pH abaixo de 3,80 e inibir o crescimento de BAL, contribuindo para atuação de LEV acidófilas que continuam crescendo e produzindo etanol (Wang et al., 2020).

A cana-de-açúcar naturalmente apresenta elevada população epifítica de LEV e quando ensilada sem aditivos, além da alta população desses microrganismos apresenta também alto teor de etanol (Pedroso et al., 2008; Ávila et al., 2014). No nosso estudo, a menor população de LEV na silagem de RMT tratada com LB pode indicar uma melhor eficiência do inoculante no controle desse grupo microbiano, uma vez que na silagem exclusiva de cana-de-açúcar, a população tenha sido semelhante entre silagem tratada e não tratada. É importante destacar, que a população de LEV reduziu 1,42; 1,49; 2,29 e 3,49 log de ufc g⁻¹, em relação à sua população inicial (Tabela 1), nos tratamentos SC-CTRL, SC-LB, RMT-CTRL e RMT-LB, respectivamente, possivelmente devido à produção de compostos antifúngicos (ácido acético e bacteriocinas) (Danner et al., 2003; Heintl e Grabherr, 2017), favorecendo assim melhor controle desses microrganismos.

Resultados semelhantes também foram observados por Wang et al. (2020), que ao avaliarem as características fermentativas, a diversidade microbiana e a EA, em silagens de cana-de-açúcar inoculadas com uma espécie de BAL heterofermentativa obrigatória *Lentilactobacillus hilgardii* (LH), observaram aumento do teor de ácido acético nas silagens inoculadas, maior predominância de LH sobre a diversidade microbiana das silagens inoculadas e menor abundância de LEV dos gêneros *Kazachstania* spp., *Candida* spp., *Pichia* spp., e *Wickerhamomyces* spp.

Tendo em vista que LEV são microrganismos capazes de crescer em uma ampla faixa de pH ($\geq 3,0 \leq 6,0$), são necessárias estratégias para sua inibição, como o uso de inoculantes microbianos que sejam capazes de produzir ácido acético na massa ensilada (Woolford e Pahlow, 1998). Além disso, as LEV são iniciadoras do processo de deterioração aeróbia, capazes de utilizar CHOs e ácido lático como fonte de substrato, produzindo etanol, CO_2 e água, o que gera calor, eleva o pH da silagem, e possibilita a proliferação de bacilos e bactérias aeróbias não tolerantes à acidez (Borreani et al., 2018), tendo como consequências elevadas perdas de MS e diminuição do valor nutritivo da silagem (Danner et al., 2003; Ávila et al., 2014; Ávila e Carvalho, 2020).

A maior taxa de crescimento de BAL nas silagens inoculadas, comparada com as silagens controle, já era esperada, indicando a efetividade de LB em modular as comunidades microbianas, bem como predominar sobre a microbiota epifítica dos materiais ensilados (Arriola et al., 2021).

A maior população de BAL na silagem de cana exclusiva, controle ou inoculada, provavelmente se deve às condições de ensilabilidade diferentes, como teor de MS, atividade de água (A_w), presença de ureia, minerais e de monensina sódica, fatores esses que podem influenciar o desenvolvimento de BAL (Carvalho et al., 2021), uma vez que a silagem de RMT tinha somente 30% de cana (base MS) na sua composição.

A menor perda de MS na silagem exclusiva de cana-de-açúcar tratada com LB ($110,99 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$) provavelmente está associada a uma maior efetividade do inoculante em converter CHOs em ácidos orgânicos (com destaque para os ácidos lático e acético), que inibem a atuação de LEV e, conseqüentemente, reduzem as PMS (Oude-Elferink et al., 2001; Gomes et al., 2021). Gomes et al. (2021), ao avaliarem silagem de cana-de-açúcar aditivada com *L. buchneri*, *L. hilgardii* ou combo

(*L. buchneri* + *L. hilgardii*) também verificaram menores perdas de MS no material tratado. Em silagem de cana-de-açúcar sem aditivos, é comum ocorrer elevadas PMS (> 300 g kg⁻¹ MS) (Pedroso et al., 2008; Daniel et al., 2013), pois, além do etanol, as LEV produzem CO₂, com liberação de água e calor no interior do silo, gerando perdas de carbono, o que resulta em elevadas PMS (McDonald et al., 1991). É interessante destacar a baixa PMS da silagem de RMT, com ou sem LB, que foi inferior a 50 g kg⁻¹ MS. Esse resultado corrobora com aqueles obtidos por Macêdo et al. (2018), em silagem de RMT composta por palma forrageira, capim-buffel e alimentos concentrados, que também verificaram baixas PMS (5,0 vs 12,50 g kg⁻¹ MS).

Em relação ao valor de pH de silagens inoculadas com LB podem apresentar aumento de 0,1 a 0,2 unidades de pH e PMS 1-2% superior, quando comparadas às silagens com fermentação homolática, devido à produção de ácido acético, 1,2-propanodiol e conversão de parte do ácido lático em ácido acético (Oude-Elferink et al., 2001; Heintl e Grabherr, 2017). Assim, esses efeitos são compensados pelo prolongamento da EA e redução das populações de FUN e de LEV, o que resulta em menores PMS (Kung Junior et al., 2018).

O teor médio de N-NH₃ de 65 g N-NH₃ kg⁻¹ nitrogênio total, observado no presente estudo, está abaixo do valor máximo aceitável para silagens de gramíneas bem preservadas (≤ 100 g N-NH₃ kg⁻¹ nitrogênio total) (Kung Junior et al., 2018), indicando baixa atividade proteolítica da fração nitrogenada. Possivelmente, rápida acidificação da massa ensilada, adequado teor de MS, ambiente anaeróbio, satisfatória produção de ácidos orgânicos e pH na faixa ideal justifiquem estes resultados. Gomes et al. (2021) também verificaram baixa atividade proteolítica em silagem de cana-de-açúcar, com valor médio de 62,60 g N-NH₃ kg⁻¹ nitrogênio total.

A população média de fungos, de $2,37 \log \text{ufc g}^{-1}$, foi próxima aos $2,0 \log \text{ufc g}^{-1}$ forragem reportados por Borreani et al. (2018) como valor abaixo do qual a qualidade da silagem não é comprometida. O fato de não ter sido detectada a presença de enterobactérias nas silagens avaliadas é um bom indicativo, pois esse grupo microbiano é indesejável em silagens devido à competição com as BAL por substratos (McDonald et al., 1991). A rápida acidificação é essencial para a inibição de enterobactérias que poderão crescer até que a condição de um pH baixo, seja atingida (Pahlow et al., 2003). Portanto, a redução ou ausência de enterobactérias na silagem é devido as boas condições de ensilabilidade, como os produtos da fermentação e baixo pH e, também, temperaturas moderadas (Pahlow et al., 2003).

A diferença na composição química das silagens avaliadas já era esperada, pois são materiais com composição química distintas, isto é, silagem exclusiva de cana-de-açúcar ou na forma de RMT. O aumento dos teores de FDNcp das silagens comparados aos seus respectivos valores antes da ensilagem, se deve ao consumo de carboidratos solúveis em água durante a fermentação das silagens. Pedroso et al. (2008) reportaram reduções de até 70% no teor de CHOs, seguido de aumento proporcional nos constituintes da fração fibrosa (celulose, hemicelulose e lignina). Pedroso et al. (2005) também verificaram elevação dos teores de FDN em silagem de cana-de-açúcar ($400,90$ a $700,30 \text{ g FDN kg}^{-1} \text{ MS}$), após 120 dias de armazenamento, e atribuíram ao desaparecimento da fração solúvel.

Em silagens de cana-de-açúcar com predomínio de fermentação alcoólica, quantidades consideráveis de MS e de energia são perdidas quando a cana é conservada por fermentação natural. Durante a fase aeróbia, a maioria dos ácidos orgânicos e etanol são volatilizados na atmosfera, o que resulta em silagem com

aumento da concentração da fração fibrosa, com baixo valor nutritivo e baixa EA (Ávila et al., 2014; Daniel et al., 2019).

A maior estabilidade aeróbia na silagem de RMT possivelmente decorre da menor população de LEV nessa silagem, seguido de baixos teores de CHOs residuais, presença de ácido acético, conforme já reportado, uma vez que esses microrganismos são considerados os iniciadores do processo de deterioração aeróbia. Mais altas estabilidades também foram reportadas em silagens de RMT por Chen et al. (2016) e Bueno et al. (2020). A EA em silagens de cana é variável ($\geq 20 \leq 150$ h) e depende de vários fatores, como o aditivo utilizado, se químico ou microbiano, maturidade de colheita, processamento, compactação, vedação e teor de CHOs dentre outros fatores (Silva et al., 2018; Daniel et al., 2019; Gomes et al., 2021).

O tempo de EA da SC (39,24 h) verificado neste estudo foi similar aos verificados em outros trabalhos com silagens de cana-de-açúcar (Ávila et al., 2014; Silva et al., 2018). Devido à maior disponibilidade de CHOs residual na SC, possivelmente o metabolismo das leveduras e o processo de deterioração foi mais intenso, o que justifica os maiores picos de elevação da temperatura máxima verificados na SC em comparação a RMT (Pedroso et al., 2008; Kung Junior et al., 2018; Daniel et al., 2019).

Conforme verificado na tendência observada de LB sobre a EA nos tratamentos avaliados, a maior EA nas silagens inoculadas com LB é resultado do efeito que esse inoculante apresenta devido sua capacidade de elevar a EA (Danner et al., 2003; Gomes et al., 2021), conforme verificado neste estudo. A menor população de LEV após exposição aeróbia, nas silagens inoculadas com LB, comprova a capacidade que esta espécie de BAL possui de fermentar açúcares em ácido lático, como também ácido acético, que atua com efeito fungistático sobre microrganismos indesejáveis

(fungos filamentosos e leveduras) e promove melhorias na EA (Danner et al., 2003; Silva et al., 2018; Daniel et al., 2019; Arriola et al., 2021).

Quando o armazenamento da silagem de RMT ocorre por alguns meses, as populações de microrganismos indesejáveis tendem a baixar, devido à estabilização da massa ensilada e produção equilibrada de ácidos orgânicos, o que melhora ainda mais a EA de RMT ensilada (Nishino et al., 2004; Cao et al., 2010). Enquanto a deterioração aeróbia da RMT não ensilada ocorre em um ou dois dias, a resistência da RMT ensilada pode atingir sete ou mais dias, mesmo no verão, onde o calor pode afetar a velocidade das reações bioquímicas e microbiológicas (Wang e Nishino, 2013; Daniel et al., 2019).

Experimento 2

O maior consumo de MS e de NDT nas silagens tratadas com LB pode ser devido as melhores características fermentativas que estas silagens apresentaram (maior população de BAL e menores PMS), bem como menores concentrações de FDNcp em relação as silagens não inoculadas. O baixo acúmulo de compostos hipofágicos (N-NH₃, aminas biogênicas e butirato) em silagens inoculadas pode ter refletido no aumento do consumo de MS em silagens inoculadas (Allen, 2020). Além disso, a redução da fração fibrosa das silagens, em resposta à inoculação com LB, pode ter favorecido o consumo de MS (Allen, 2020; Arriola et al., 2021). Destaca-se, também, possível interação (efeito probiótico) entre essas bactérias e o ambiente ruminal (Muck, 2013; Heini e Grabherr, 2017; Rabelo et al., 2019).

Por outro lado, a tendência de maior consumo de MS na dieta contendo silagem exclusiva de cana-de-açúcar não refletiu em diferenças no consumo de NDT das dietas, o que pode sugerir que os animais alimentados com RMT ensilada atenderam

suas exigências energéticas com menor consumo de MS. De fato, a silagem de RMT proporcionou consumo diário de MS de 0,37 kg inferior à dieta contendo SC. Em confinamentos em escala comercial, uma redução mesmo que pequena, como a verificada neste estudo, pode ser benéfica do ponto de vista financeiro e, a depender das condições da dieta, o animal poderia reduzir seu consumo em até 1 kg MN dia⁻¹ (Ferraretto et al., 2018; Michelotti et al., 2021).

Considerando que o milho é o principal ingrediente energético utilizado em dietas de ruminantes, além dos custos elevados com a alimentação, reduzir a excreção de amido fecal através da melhor utilização do milho dietético, ao aplicar alternativas que otimizem o amido digestível, implicará em menores custos devido ao aumento da eficiência alimentar (Michelotti et al., 2021). Nesse contexto, no nosso estudo, dietas à base RMT ensilada proporcionaram menor excreção fecal e melhor utilização do amido.

A maior digestibilidade de MS, MO, CNF e amido nas dietas à base RMT ensilada, provavelmente se deve ao fato de que durante o processo de ensilagem ocorre a proteólise da matriz amido-proteína (prolaminas) que revestem os grânulos de amido no milho, conhecidas como zeínas (Hoffman et al., 2011), bem como pela solubilização das prolaminas em ácidos orgânicos e pela atividade enzimática bacteriana e de enzimas do próprio grão, o que aumenta a disponibilidade e digestibilidade de amido no trato gastrointestinal dos animais, seguido de aumentos de eficiência alimentar e de digestibilidade total da dieta (Silva et al., 2020).

Respostas semelhantes tem sido reportadas na literatura para silagens de grãos úmidos ou reidratados de milho ou sorgo, como também para RMT ensilada (Hoffman et al., 2011; Ferraretto et al., 2014; Miyaji et al., 2017; Lazzari et al., 2021). A atividade microbiana é considerada a principal contribuinte para a proteólise das

prolaminas, seguido da atuação de enzimas vegetais ativas. Portanto, a ensilagem de RMT contendo grãos de milho ou de sorgo processados contribui de forma efetiva para diminuir a concentração de prolaminas e aumentar a disponibilidade do amido no sistema digestivo (Junges et al., 2017; Miyaji e Nonaka, 2018).

Assim, a menor excreção de amido fecal verificada nesse estudo para a RMT ensilada é justificada pelo ganho em digestibilidade do amido. Logo, com a maior disponibilidade do amido no trato gastrointestinal do animal, menos amido foi excretado nas fezes, o que é desejável, pois além de aumentar a eficiência alimentar, também reduz os custos de alimentação (Ferraretto et al., 2014; Miyaji e Nonaka, 2018; Michelotti et al., 2021).

Dietas com alta excreção de amido fecal implica em seu menor aproveitamento no rúmen, com maior escape de amido no intestino, pois as enzimas do animal não conseguem quebrar os grânulos de amido envoltos pelas prolaminas e também maior escape de amido para o intestino pode acarretar em problemas digestivos pelo acúmulo de ácidos orgânicos e causar inflamação intestinal no animal (Ferraretto et al., 2018; Harmon e Swanson, 2020). Ao melhorar a digestibilidade da dieta, além de reduzir as perdas de energia fecal, consegue-se aumentar a disponibilidade de energia para o animal e conseqüentemente aumentar a retenção de energia e a eficiência alimentar (Subepang et al., 2019; Bueno et al., 2020; Lazzari et al., 2021).

Embora tenha sido detectado efeito de inoculante e de silagem sobre o pH ruminal, destaca-se que os valores observados no presente estudo estão na faixa que proporcionam máximo crescimento microbiano com riscos mínimos de distúrbios metabólicos, como a acidose ruminal (Nagaraja e Titgemeyer, 2007). Por outro lado, a diminuição do pH ao longo do tempo, após alimentação, se deve à ingestão de

carboidratos prontamente fermentescíveis, que favorece a produção de ácidos orgânicos e diminuição do pH ruminal (Harmon e Swanson, 2020).

A menor concentração de N-NH₃ ruminal na dieta a base de RMT ensilada encontra-se abaixo dos 5 mg N-NH₃ dL⁻¹, considerado com valor mínimo para o crescimento microbiano, com intervalo aceitável de 5 a 30 mg N-NH₃ dL⁻¹ para que ocorra maximização da síntese PMic (Satter e Slyter, 1974). Nair et al. (2020) avaliaram silagem de RMT com ou sem *L. buchneri* sobre o desempenho e parâmetros ruminais de bovinos de corte e verificaram que a concentração média de NH₃-N ruminal foi de 4,97 ± 2,44 mg dL⁻¹.

O balanço de N similar entre as dietas, provavelmente se deve ao consumo de PB semelhante entre as mesmas, bem como ao fato destas serem isonitrogenadas. Isto sugere que a fração nitrogenada da RMT ensilada não foi alterada durante o processo de fermentação. Esses resultados corroboram com aqueles reportados por Yanti et al. (2019) ao avaliarem o balanço de N em ovelhas fistuladas no rúmen, alimentadas com dietas compostas de silagem de RMT com diferentes aditivos. Nair et al. (2020) também não verificaram alteração no balanço de N em bovinos de corte confinados alimentados com silagem de RMT à base de milho, com ou sem inoculante microbiano.

A maior síntese de NMic e PMic na dieta a base de RMT ensilada pode ser devido a disponibilidade síncrona entre maior aporte de energia advindo de carboidratos rapidamente fermentescíveis, com adequado teor proteico degradável no rúmen (Firkins et al., 2007; Hall e Huntington, 2008). Resultados semelhantes também foram verificados por Yani et al. (2015), em estudos com ovinos alimentados com dietas à base de RMT ensilada.

Em dietas com adequado teor proteico, o aumento da degradabilidade ruminal do amido é associado à melhoria no desempenho animal (produção de carne ou de leite), em virtude do maior aporte energético para o animal, com aumento da síntese de NMic e consequente maior fluxo de proteína microbiana para o intestino (Owens e Bergen, 1983; Firkins et al., 2007). Contudo, em dietas com menor disponibilidade de amido ruminal degradado, observa-se menor fluxo de NMic para o intestino. Logo, menor quantidade de amido degradado no rúmen pode limitar o crescimento microbiano (Matthews et al., 2019; Harmon e Swanson, 2020).

Clemmons et al. (2021), em estudo com novilhas leiteiras da raça holandesa, utilizando mesma dieta na forma de RMT *in natura* ou RMT ensilada, verificaram que o grupo alimentado com RMT ensilada apresentou melhor desempenho comparado ao controle, devido à RMT ensilada proporcionar fluxo contínuo de nutrientes no trato digestivo das novilhas, diminuição da flutuação do pH ruminal e menor variação microbiana, devido a intervalos diferentes entre consumo de volumoso e concentrado, assim, o uso de RMT ensilada pode maximizar a síntese de proteína microbiana e manter o ambiente ruminal estável, diminuindo a ocorrência de acidose ruminal.

Conclusões

O inoculante microbiano usado foi efetivo em inibir o crescimento de LEV, reduzir perdas de matéria seca e da fração fibrosa, tanto na cana-de-açúcar ensilada exclusiva ou na forma de RMT, bem como favorecer a estabilidade aeróbia nas silagens avaliadas. No ensaio com animais, as silagens inoculadas com LB proporcionaram maiores consumos de MS e de nutrientes digestíveis totais. A ensilagem da cana-de-açúcar na forma de RMT mostra-se uma alternativa interessante, pois proporciona maior digestibilidade de MS, MO, CNF e de amido, bem como maior eficiência microbiana e menor excreção de amido fecal. Portanto,

baseado no exposto, conclui-se pela ensilagem da cana-de-açúcar na forma RMT, com uso de aditivo, pois também facilita a logística operacional de alimentação dos animais.

Agradecimentos

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

Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Referências

- Allen, M. S. 2020. Review: Control of feed intake by hepatic oxidation in ruminant animals: integration of homeostasis and homeorhesis. *Animal*. 14:55–64. doi:10.1017/S1751731119003215.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Arlington, Virginia, USA.
- American Public Health Association. 2015. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 5th ed. (Y. Salfinger and M. Lou Tortorello, editors.). American Public Health Association (APHA), Washington, DC, USA.
- Arriola, K. G., A. S. Oliveira, Y. Jiang, D. Kim, H. M. Silva, S. C. Kim, F. X. Amaro, I. M. Ogunade, H. Sultana, A. A. Pech Cervantes, L. F. Ferraretto, D. Vyas, and A. T. Adesogan. 2021. Meta-analysis of effects of inoculation with *Lactobacillus buchneri*, with or without other bacteria, on silage fermentation, aerobic stability, and performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 104:7653–7670. doi:10.3168/jds.2020-19647.
- Ávila, C. L. S., and B. F. Carvalho. 2020. Silage fermentation—updates focusing on the performance of micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* 128:966–984. doi:10.1111/jam.14450.
- Ávila, C. L. S., B. F. Carvalho, J. C. Pinto, W. F. Duarte, and R. F. Schwan. 2014. The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. *J. Dairy Sci.* 97:940–951. doi:10.3168/jds.2013-6987.

- Barbosa, A. M., R. F. D. Valadares, S. C. Valadares Filho, D. S. Pina, E. Detmann, and M. I. Leão. 2011. Endogenous fraction and urinary recovery of purine derivatives obtained by different methods in nellore cattle. *J. Anim. Sci.* 89:510–519. doi:10.2527/jas.2009-2366.
- Borreani, G., E. Tabacco, R. J. Schmidt, B. J. Holmes, and R. E. Muck. 2018. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *J. Dairy Sci.* 101:3952–3979. doi:10.3168/jds.2017-13837.
- Bueno, A. V. I., G. Lazzari, C. C. Jobim, and J. L. P. Daniel. 2020. Ensiling total mixed ration for ruminants: A review. *Agronomy.* 10:1–18. doi:10.3390/agronomy10060879.
- Cao, Y., Y. Cai, T. Hirakubo, H. Fukui, and H. Matsuyama. 2011. Fermentation characteristics and microorganism composition of total mixed ration silage with local food by-products in different seasons. *Anim. Sci. J.* 82:259–266. doi:10.1111/j.1740-0929.2010.00840.x.
- Cao, Y., T. Takahashi, K. I. Horiguchi, and N. Yoshida. 2010. Effect of adding lactic acid bacteria and molasses on fermentation quality and in vitro ruminal digestion of total mixed ration silage prepared with whole crop rice. *Grassl. Sci.* 56:19–25. doi:10.1111/j.1744-697X.2009.00168.x.
- Carvalho, B. F., G. F. C. Sales, R. F. Schwan, and C. L. S. Ávila. 2021. Criteria for lactic acid bacteria screening to enhance silage quality. *J. Appl. Microbiol.* 130:341–355. doi:10.1111/jam.14833.
- De Carvalho, F. A. L., M. A. Á. Queiroz, J. G. da Silva, and T. V. Voltolini. 2014. Características fermentativas na ensilagem de cana-de-açúcar com maniçoba. *Cienc. Rural.* 44:2078–2083. doi:10.1590/0103-8478cr20131471.
- Chen, L., G. Guo, X. Yuan, J. Zhang, J. Li, and T. Shao. 2016. Effects of applying molasses, lactic acid bacteria and propionic acid on fermentation quality, aerobic stability and in vitro gas production of total mixed ration silage prepared with oat-common vetch intercrop on the Tibetan Plateau. *J. Sci. Food Agric.* 96:1678–1685. doi:10.1002/jsfa.7271.
- Chen, X. B., and M. J. Gomes. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details. In: International Feed Research Unit. Rowett Research Institute, Aberdeen, UK. p. 21. Available from: https://www.researchgate.net/profile/M-Gomes-2/publication/265323654_Estimation_of_Microbial_Protein_Supply_to_Sheep_and_Cattle_Based_on_Urinary_Excretion_of_Purine_Derivatives_-_An_Overview_of_Technical_Details/links/557579bc08aeb6d8c0195f72/Estimation-o
- Clemmons, B. A., M. T. Henniger, and P. R. Myer. 2021. Data of bacterial community dynamics resulting from total rumen content exchange in beef cattle. *BMC Res. Notes.* 14:21–23. doi:10.1186/s13104-021-05726-1.
- Daniel, J. L. P., T. F. Bernardes, C. C. Jobim, P. Schmidt, and L. G. Nussio. 2019. Production and utilization of silages in tropical areas with focus on Brazil. *Grass Forage Sci.* 74:188–200. doi:10.1111/gfs.12417.
- Daniel, J. L. P., F. A. Jacovaci, D. Junges, M. C. Santos, J. R. Lima, I. A. Anjos, M. G. A. Landell, P. Huhtanen, and L. G. Nussio. 2016. Fibre digestibility and its

relationships with chemical and morphological traits in thirty-two sugarcane varieties. *Grass Forage Sci.* 72:545–555. doi:10.1111/gfs.12254.

Daniel, J. L. P., K. Weiß, L. Custódio, A. S. Neto, M. C. Santos, M. Zopollatto, and L. G. Nussio. 2013. Occurrence of volatile organic compounds in sugarcane silages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 185:101–105. doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.06.011.

Danner, H., M. Holzer, E. Mayrhuber, and R. Braun. 2003. Acetic Acid Increases Stability of Silage under Aerobic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:562–567. doi:10.1128/AEM.69.1.562-567.2003.

Detmann, E., and S. C. Valadares Filho. 2010. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 62:980–984. doi:10.1590/s0102-09352010000400030.

Deusch, S., A. Camarinha-Silva, J. Conrad, U. Beifuss, M. Rodehutschord, and J. Seifert. 2017. A structural and functional elucidation of the rumen microbiome influenced by various diets and microenvironments. *Front. Microbiol.* 8:1–21. doi:10.3389/fmicb.2017.01605.

Dong, Z., S. Wang, J. Zhao, J. Li, Q. Liu, Y. Bao, and T. Shao. 2021. Evaluating fermentation quality, in vitro digestibility and aerobic stability of a total mixed ration ensiled with different additives on Tibet plateau. *Anim. Biosci.* 34:223–232. doi:10.5713/ajas.19.0972.

Ferraretto, L. F., W. I. Silva Filho, T. Fernandes, D. H. Kim, and H. Sultana. 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. doi:10.3168/jds.2017-14329.

Ferraretto, L. F., K. Taysom, D. M. Taysom, R. D. Shaver, and P. C. Hoffman. 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. doi:10.3168/jds.2013-7680.

Firkins, J. L., Z. Yu, and M. Morrison. 2007. Ruminal Nitrogen Metabolism: Perspectives for Integration of Microbiology and Nutrition for Dairy. *J. Dairy Sci.* 90:1–16. doi:10.3168/jds.2006-518.

Gomes, A. L. M., A. V. I. Bueno, M. P. Osmari, J. Machado, L. G. Nussio, C. C. Jobim, and J. L. P. Daniel. 2021. Effects of Obligate Heterofermentative Lactic Acid Bacteria Alone or in Combination on the Conservation of Sugarcane Silage. *Front. Microbiol.* 12:1–9. doi:10.3389/fmicb.2021.643879.

Gomes, D. I., E. Detmann, S. de C. Valadares Filho, R. S. Fukushima, M. A. de Souza, T. N. P. Valente, M. F. Paulino, and A. C. de Queiroz. 2011. Evaluation of lignin contents in tropical forages using different analytical methods and their correlations with degradation of insoluble fiber. *Anim. Feed Sci. Technol.* 168:206–222. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.05.001.

Hall, M. B., and G. B. Huntington. 2008. Nutrient synchrony: Sound in theory, elusive in practice1. *J. Anim. Sci.* 86:287–292. doi:10.2527/jas.2007-0516.

Harmon, D. L., and K. C. Swanson. 2020. Review: Nutritional regulation of intestinal starch and protein assimilation in ruminants. *Animal.* 14:17–28.

doi:10.1017/S1751731119003136.

Heinl, S., and R. Grabherr. 2017. Systems biology of robustness and flexibility: *Lactobacillus buchneri* —A show case. *J. Biotechnol.* 257:61–69. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.01.007.

Hoffman, P. C., N. M. Esser, R. D. Shaver, W. K. Coblenz, M. P. Scott, A. L. Bodnar, R. J. Schmidt, and R. C. Charley. 2011. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 94:2465–2474. doi:10.3168/jds.2010-3562.

Hristov, A. N., A. Bannink, L. A. Crompton, P. Huhtanen, M. Kreuzer, M. McGee, P. Nozière, C. K. Reynolds, A. R. Bayat, D. R. Yáñez-Ruiz, J. Dijkstra, E. Kebreab, A. Schwarm, K. J. Shingfield, and Z. Yu. 2019. Invited review: Nitrogen in ruminant nutrition: A review of measurement techniques. *J. Dairy Sci.* 102:5811–5852. doi:10.3168/jds.2018-15829.

Junges, D., G. Morais, M. H. F. Spoto, P. S. Santos, A. T. Adesogan, L. G. Nussio, and J. L. P. Daniel. 2017. Short communication: Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. *J. Dairy Sci.* 100:9048–9051. doi:10.3168/jds.2017-12943.

Kilkenny, C., W. Browne, I. Cuthill, M. Emerson, and D. Altman. 2014. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *Animals.* 4:35–44. doi:10.3390/ani4010035.

Kung Junior, L., R. D. Shaver, R. J. Grant, and R. J. Schmidt. 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 101:4020–4033. doi:10.3168/jds.2017-13909.

Kung Junior, L., C. C. Taylor, M. P. Lynch, and J. M. Neylon. 2003. The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:336–343. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73611-X.

Lazzari, G., A. C. O. Poppi, J. Machado, A. V. I. Bueno, A. L. M. Gomes, C. C. Jobim, and J. L. P. Daniel. 2021. Effects of protein source and lipid supplementation on conservation and feed value of total mixed ration silages for finishing beef cattle. *J. Anim. Sci.* 99:1–13. doi:10.1093/jas/skab032.

Licitra, G., T. M. Hernandez, and P. J. Van Soest. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 57:347–358. doi:10.1016/0377-8401(95)00837-3.

Macêdo, A. J. da S., E. M. Santos, G. G. L. de Araújo, R. L. Edvan, J. S. de Oliveira, A. F. Perazzo, W. C. C. dos S. Sá, and D. M. Pereira. 2018. Silages in the form of diet based on spineless cactus and buffelgrass. *African J. Range Forage Sci.* 35:121–129. doi:10.2989/10220119.2018.1473494.

Machado, M. G., E. Detmann, H. C. Mantovani, S. C. Valadares Filho, C. B. P. Bento, M. I. Marcondes, and A. S. Assunção. 2016. Evaluation of the length of adaptation period for changeover and crossover nutritional experiments with cattle fed tropical forage-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 222:132–148. doi:10.1016/j.anifeedsci.2016.10.009.

- Matthews, C., F. Crispie, E. Lewis, M. Reid, P. W. O'Toole, and P. D. Cotter. 2019. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes*. 10:115–132. doi:10.1080/19490976.2018.1505176.
- McDonald, P., A. R. Henderson, and S. J. E. Heron. 1991. *The biochemistry of silage*. 2nd ed. Aberystwyth: Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, UK.
- Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 85:1217–1240. doi:10.1093/jaoac/85.6.1217.
- Mertens, D. R., and R. J. Grant. 2020. Digestibility and Intake. In: K. J. Moore, M. Collins, C. J. Nelson, and D. D. Redfearn, editors. *Forages*. 7th ed. Wiley. p. 609–631. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119436669.ch34>
- Michelotti, T. C. de A., R. A. da Silva, J. H. Carneiro, R. B. Navarro, I. Q. de Carvalho, E. M. de Paula, L. F. Ferraretto, M. Caetano, D. P. D. Lanna, and R. de Almeida. 2021. Effect of ensiling time on apparent total tract starch digestibility in Southern Brazilian dairy herds. *Sci. Agric.* 78:1–20. doi:10.1590/1678-992x-2019-0096.
- Miyaji, M., H. Matsuyama, and K. Nonaka. 2017. Effect of ensiling process of total mixed ration on fermentation profile, nutrient loss and in situ ruminal degradation characteristics of diet. *Anim. Sci. J.* 88:134–139. doi:10.1111/asj.12610.
- Miyaji, M., and K. Nonaka. 2018. Effects of altering total mixed ration conservation method when feeding dry-rolled versus steam-flaked hulled rice on lactation and digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:5092–5101. doi:10.3168/jds.2017-13802.
- Muck, R. E. 2013. Recent advances in silage microbiology. *Agric. Food Sci.* 22:3–15. doi:10.23986/afsci.6718.
- Nagaraja, T. G., and E. C. Titgemeyer. 2007. Ruminal Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook. *J. Dairy Sci.* 90:17–38. doi:10.3168/jds.2006-478.
- Nair, J., N. Huaxin, E. Andrada, H.-E. Yang, E. Chevaux, P. Drouin, T. A. McAllister, and Y. Wang. 2020. Effects of inoculation of corn silage with *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus buchneri* on silage quality, aerobic stability, nutrient digestibility, and growth performance of growing beef cattle. *J. Anim. Sci.* 98:1–20. doi:10.1093/jas/skaa267.
- Nelson, N. 1944. A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. *J. Biol. Chem.* 153:375–380. doi:10.1016/S0021-9258(18)71980-7.
- Nishino, N., H. Wada, M. Yoshida, and H. Shiota. 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. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73381-0.
- NRC. 2001. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 8th ed. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Okuda, H., S. Fujii, and Y. Kawashima. 1965. A direct colorimetric determination of

blood ammonia. *Tokushima J. Exp. Med.* 12:11–23. Available from:
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19661405652>

Oude-Elferink, S. J. W. H., E. J. Krooneman, J. C. Gottschal, S. F. Spoelstra, F. Faber, and F. Driehuis. 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:125–132. doi:10.1128/AEM.67.1.125-132.2001.

Owens, F. N., and W. G. Bergen. 1983. Nitrogen Metabolism of Ruminant Animals: Historical Perspective, Current Understanding and Future Implications. *J. Anim. Sci.* 57:498–518. doi:https://doi.org/10.2527/animalsci1983.57Supplement_2498x.

Pahlow, G., R. E. Muck, F. Driehuis, S. J. W. H. Oude-Elferink, and S. F. Spoelstra. 2003. Microbiology of Ensiling. In: D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, editors. *Silage Science and Technology*. Vol. 10. Agronomy M. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI 53711, USA. p. 31–93. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.2134/agronmonogr42.c2>

Pedroso, A. D. F., L. G. Nussio, D. R. S. Loures, S. D. F. Paziani, J. L. Ribeiro, L. J. Mari, M. Zopollatto, P. Schmidt, W. R. S. Mattos, and J. Horii. 2008. Fermentation, losses, and aerobic stability of sugarcane silages treated with chemical or bacterial additives. *Sci. Agric.* 65:589–594. doi:10.1590/S0103-90162008000600004.

Pedroso, A. de F., L. G. Nussio, D. R. S. Loures, S. de F. Paziani, J. L. Ribeiro, L. J. Mari, M. Zopollatto, P. Schmidt, W. R. S. Mattos, and J. Horii. 2008. Fermentation, losses, and aerobic stability of sugarcane silages treated with chemical or bacterial additives. *Sci. Agric.* 65:589–594. doi:10.1590/S0103-90162008000600004.

Pedroso, A. de F., L. G. Nussio, S. de F. Paziani, D. R. S. Loures, M. S. Igarasi, R. M. Coelho, I. H. Packer, J. Horii, and L. H. Gomes. 2005. Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. *Sci. Agric.* 62:427–432. doi:10.1590/S0103-90162005000500003.

Rabelo, C. H. S., C. J. Härter, C. L. da S. Ávila, and R. A. Reis. 2019. Meta-analysis of the effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, chemical composition and aerobic stability of sugarcane silage. *Grassl. Sci.* 65:3–12. doi:10.1111/grs.12215.

SAS Institute Inc., Cary, NC, U. 2010. *Statistical Analysis Systems User's Guide*.

Satter, L. D., and L. L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br. J. Nutr.* 32:199–208. doi:10.1079/BJN19740073.

Siegfried, V. R., H. Ruckemann, and G. Stumpf. 1984. Eine HPLC-methode zur bestimmung organischer säuren in silagen. *Landwirtsch Forsch.* 37:298–304.

Silva, B. de C., L. A. Godoi, S. de C. Valadares Filho, D. Zanetti, P. D. B. Benedeti, and E. Detmann. 2019. A suitable enzymatic method for starch quantification in different organic matrices. *MethodsX.* 6:2322–2328. doi:10.1016/j.mex.2019.09.040.

Silva, B. de C., M. V. C. Pacheco, L. A. Godoi, H. M. Alhadas, J. M. V. Pereira, L. N. Rennó, E. Detmann, P. V. R. Paulino, J. P. Schoonmaker, and S. de C. Valadares Filho. 2020. Reconstituted and ensiled corn or sorghum grain: Impacts on dietary

nitrogen fractions, intake, and digestion sites in young Nellore bulls. W. Ma, editor. *PLoS One*. 15:e0237381. doi:10.1371/journal.pone.0237381.

Silva, L. D., O. G. Pereira, T. C. Silva, E. S. Leandro, R. A. Paula, S. A. Santos, K. G. Ribeiro, and S. C. Valadares Filho. 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. doi:10.1111/gfs.12360.

Subepang, S., T. Suzuki, T. Phonbumrung, and K. Sommart. 2019. Enteric methane emissions, energy partitioning, and energetic efficiency of zebu beef cattle fed total mixed ration silage. *Asian-Australasian J. Anim. Sci*. 32:548–555. doi:10.5713/ajas.18.0433.

Valadares Filho, S. de C., S. A. Lopes, M. L. Chizzotti, F. A. de S. Silva, G. S. Martins, L. B. Fialho, M. A. A. M. Cabral, and L. O. M. Silva. 2020. BR-CORTE 4.0. Formulação dietas, predição desempenho e análise econômica zebuínos puros e cruzados. Available from: www.brcorte.com.br

Voltolini, T. V., J. G. da Silva, W. E. de L. Silva, J. M. L. do Nascimento, M. A. Á. Queiroz, and A. R. de Oliveira. 2012. Valor nutritivo de cultivares de cana-de-açúcar sob irrigação. *Rev. Bras. Saúde e Produção Anim*. 13:894–901. doi:10.1590/s1519-99402012000400001.

Wang, C., and N. Nishino. 2013. Effects of storage temperature and ensiling period on fermentation products, aerobic stability and microbial communities of total mixed ration silage. *J. Appl. Microbiol*. 114:1687–1695. doi:10.1111/jam.12200.

Wang, T., K. Teng, Y. Cao, W. Shi, Z. Xuan, J. Zhou, J. Zhang, and J. Zhong. 2020. Effects of *Lactobacillus hilgardii* 60TS-2, with or without homofermentative *Lactobacillus plantarum* B90, on the aerobic stability, fermentation quality and microbial community dynamics in sugarcane top silage. *Bioresour. Technol*. 312:123–135. doi:10.1016/j.biortech.2020.123600.

Woolford, M. K., and G. Pahlow. 1998. The silage fermentation. *Microbiol. Fermented Foods*. 73–102. doi:10.1007/978-1-4613-0309-1_3.

Yani, S., K. Ishida, S. Goda, S. Azumai, T. Murakami, M. Kitagawa, K. Okano, K. Oishi, H. Hirooka, and H. Kumagai. 2015. Effects of utilization of local food by-products as total mixed ration silage materials on fermentation quality and intake, digestibility, rumen condition and nitrogen availability in sheep. *Anim. Sci. J*. 86:174–180. doi:10.1111/asj.12263.

Yanti, Y., S. Kawai, and M. Yayota. 2019. Effect of total mixed ration silage containing agricultural by-products with the fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria on rumen fermentation and nitrogen balance in ewes. *Trop. Anim. Health Prod*. 51:1141–1149. doi:10.1007/s11250-019-01798-1.

Zanine, A. D. M., E. M. Santos, D. D. J. Ferreira, O. G. Pereira, and J. C. C. de Almeida. 2006. Efeito do farelo de trigo sobre as perdas, recuperação da matéria seca e composição bromatológica de silagem de capim-mombaça. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci*. 43:803. doi:10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26560.

CONCLUSÕES GERAIS

A idade de rebrota influencia a composição química da silagem de amendoim, a abundância relativa de sua população microbiana, sem comprometer seu valor nutritivo. Portanto, com base na matéria seca produzida recomenda-se a colheita desta leguminosa para ensilagem, aos 80d de rebrota, associada ao uso de inoculante bacteriano. O uso de inoculante microbiano melhora a qualidade da silagem de amendoim forrageiro, reduzindo o pH, a atividade proteolítica e inibindo o crescimento de enterobactérias, leveduras e fungos filamentosos. Além disso, a cepa AV14.17 contribuiu para aumentar a abundância relativa de *Lactiplantibacillus*, com redução do gênero *Enterobacter*, indica potencial de uso dessa cepa como aditivo microbiano, porém faz-se necessário a avaliação com outras forrageiras e em condições de campo, ensilagem em larga escala.

O perfil fermentativo, a diversidade microbiana, a composição química e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca de silagens de soja variam em função do estágio de colheita, bem como pelo uso de inoculante microbiano, embora a fermentação predominante tenha sido tipicamente acética, possivelmente devido à presença dos gêneros *Weissella*, *Ligilactobacillus* e *Levilactobacillus* nas silagens. Destaca-se a presença do gênero *Clostridium* em todas as silagens avaliadas, o que pode também ter comprometido a fermentação da massa ensilada. Portanto, recomenda-se a colheita da soja para produção de silagem no estágio R6, associado à aplicação de inoculante microbiano, por promover melhorias em algumas características fermentativas, como concentração de N-NH₃ e pH e melhorar a digestibilidade *in vitro* da matéria seca, bem como proporcionar maior rendimento de matéria seca por área.

O inoculante usado foi efetivo em inibir o crescimento de leveduras, reduzir perdas de matéria seca e da fração fibrosa tanto na cana-de-açúcar ensilada exclusiva ou na forma de ração em mistura total (RMT), bem como favorecer a estabilidade aeróbia nas silagens avaliadas. No ensaio com animais, as silagens inoculadas com *Lentilactobacillus buchneri* proporcionaram maiores consumos de matéria seca e de nutrientes digestíveis totais.

A ensilagem da cana-de-açúcar na forma de RMT mostra-se uma alternativa interessante, pois proporciona maior digestibilidade de matéria seca, matéria orgânica, carboidratos não-fibrosos e de amido, bem como maior eficiência

microbiana e menor excreção de amido fecal. Portanto, baseado no exposto, conclui-se pela ensilagem da cana-de-açúcar na forma RMT, com uso de aditivo, pois além dos pontos acima reportados, a ensilagem de cana como RMT poderá facilitar a logística operacional de alimentação dos animais.