



Efeitos da inoculação com *Lentilactobacillus buchneri* ou combinado com *Lentilactobacillus hilgardii* sobre a diversidade microbiana de silagens de sorgo

Alberto Jefferson da Silva Macêdo⁽¹⁾; **Edson Mauro Santos**⁽²⁾; **Mateus Lacerda Pereira Lemos**⁽³⁾; **Luana Milena Pinheiro Rodrigues**⁽⁴⁾; **Guilherme Medeiros Leite**⁽⁵⁾; **Bruno Rocha de Moura**⁽⁵⁾; **Vanessa Maria Rodrigues de Lima**⁽⁶⁾; **Thácylla Beatriz Duarte Correia**⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Pesquisador Pós-doutorado, Universidade Federal da Paraíba; Areia, Paraíba; macedoajs@gmail.com; ⁽²⁾ Professor, Universidade Federal da Paraíba; ⁽³⁾ Pesquisador Pós-doutorado, Universidade Federal do Maranhão; ⁽⁴⁾ Aluna de Mestrado em Zootecnia, Universidade Federal do Maranhão; ⁽⁵⁾ Aluno de Doutorado em Zootecnia, Universidade Federal da Paraíba; ⁽⁶⁾ Aluna de Graduação em Zootecnia, Universidade Federal da Paraíba.

RESUMO: O sorgo forrageiro apresenta elevado potencial produtivo, além de ser recomendado para ensilagem. O uso de inoculantes microbianos é recomendado, com o intuito de melhorar a qualidade fermentativa das silagens. Objetivou-se investigar os efeitos da inoculação de *Lentilactobacillus buchneri* ou associado com *Lentilactobacillus hilgardii* sobre a diversidade microbiana de silagens de sorgo forrageiro em diferentes períodos de fermentação. O experimento foi realizado com o delineamento inteiramente casualizado, arranjado em esquema fatorial 3×3, sendo três períodos de fermentação e três aditivos. O fator uso de inoculante foi significativo ($P < 0,001$) para todos os índices de diversidade alfa. Todos os tratamentos apresentaram diferença significativa ($P < 0,001$) para os fatores uso de inoculante e dia de abertura na avaliação da diversidade beta. Recomenda-se a aplicação de inoculantes à base de *L. buchneri* exclusivo ou associado com *L. hilgardii* para resultar em silagens de alta qualidade.

Termos de indexação: Ácido acético, Ácido láctico, Carboidratos solúveis em água, Levedura, 16S rRNA.

Effects of the inoculation with *Lentilactobacillus buchneri* or combined with *Lentilactobacillus hilgardii* on the microbial diversity of sorghum silages

ABSTRACT: The forage sorghum shows high productive potential and is recommended for silage. The use of microbial inoculants is recommended to improve the fermentative quality of silages. This study aimed to investigate the effects of inoculating *Lentilactobacillus buchneri* alone or associated with *Lentilactobacillus hilgardii* on the microbial diversity of forage sorghum silages at different fermentation periods. The experiment was conducted in a completely randomized design arranged in a 3×3 factorial scheme, with three fermentation periods and three additives. The inoculant use factor was significant ($P < 0.001$) for all alpha diversity indices. All treatments showed significant differences ($P < 0.001$) for the inoculant use and opening day factors in the beta diversity assessment. The application of inoculants based on *L. buchneri* alone or associated with *L. hilgardii* is recommended to produce high-quality silages.

Index terms: Acetic acid, Lactic acid, Water-soluble carbohydrates, Yeast, 16S rRNA.

INTRODUÇÃO

A criação de ruminantes no Nordeste brasileiro enfrenta desafios significativos devido à escassez de pastagens, especialmente durante as secas prolongadas que são comuns na região, uma vez que o clima semiárido, caracterizado por chuvas irregulares e períodos prolongados de estiagem, reduz a disponibilidade de forragem. A técnica de ensilagem permite estocar forragem de qualidade durante os períodos chuvosos para uso nas épocas mais críticas, garantindo a manutenção da produção, logo contribuindo para a sustentabilidade da pecuária na região (Santos et al., 2022).

O sorgo é amplamente utilizado na produção de silagem no semiárido do Nordeste brasileiro devido à sua adaptabilidade às condições semiáridas. No entanto, seu alto teor de açúcares solúveis em água pode levar a perdas significativas na ensilagem devido à fermentação alcoólica provocada por leveduras e fungos filamentosos, o que reduz a qualidade nutricional e higiênica da silagem (Macêdo et al., 2018; Ferrero et al., 2019; Ferrero et al., 2021).

Pesquisas indicam que o uso de inoculantes microbianos, como Bactérias Ácido Lácticas (BAL), pode mitigar a fermentação alcoólica, melhorar a estabilidade aeróbia e reduzir as perdas fermentativas. Inoculantes como *Lentilactobacillus buchneri* (LB) produzem ácido acético, inibindo leveduras e melhorando a estabilidade aeróbia. Contudo, a eficácia total de LB requer um longo período de conservação, o que nem sempre é viável em condições de fazenda (Ferrero et al., 2019; Drouin et al., 2021; Ferrero et al., 2021).

Para superar essa limitação, a combinação de LB com *Lentilactobacillus hilgardii* (LH) está sendo investigada. LH, além de produzir ácido láctico e acético, pode converter ácido láctico em ácido acético, melhorando a estabilidade aeróbia em um período de fermentação mais curto (Ferrero et al., 2019; Drouin et al., 2021). A hipótese do estudo é que a inoculação de silagem de sorgo com LB×LH resulta em uma modulação da diversidade microbiana dessas silagens, estimulando um desenvolvimento mais rápido de BAL e na produção de compostos antifúngicos, melhorando a



III SIMPÓSIO DE CONSERVAÇÃO DE FORRAGENS - SICONFOR

estabilidade aeróbia e a qualidade da silagem mesmo após um curto período de ensilagem.

Objetivou-se avaliar os efeitos da inoculação de *Lentilactobacillus buchneri* ou associado com *Lentilactobacillus hilgardii* sobre a diversidade microbiana de silagens de sorgo forrageiro aos 20, 60 e 100 dias após ensilagem.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Forragicultura da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia, Paraíba, Brasil. A cultivar utilizada foi de sorgo forrageiro BRS Ponta Negra (Guansafra Sementes®, Fortaleza-CE, Brasil).

O experimento foi realizado com o delineamento inteiramente casualizado (DIC), arranjado em esquema fatorial 3×3, sendo três períodos de fermentação (PF): [(D20), (D60) e (D100) dias após ensilagem], três inoculantes (INOC): [Controle (Control); Inoculante comercial Magniva Steel™ à base de *L. buchneri* (Lallemand®, Aparecida de Goiânia-GO, Brasil) (Lb); Inoculante comercial Magniva Platinum 1™ à base de *L. buchneri* e *L. hilgardii* (Lallemand®, Aparecida de Goiânia-GO, Brasil) (Lb×Lh) e com cinco repetições.

A colheita do sorgo foi realizada aos 110 dias após semeadura. Em seguida, o material foi processado em máquina forrageira estacionária (EN9-F3B, Nogueira®, Itapira-SP, Brasil) em tamanhos de partículas de ±10 mm. Os INOC foram aplicados com auxílio de um borrifador tipo spray de acordo com fabricante e diluídos em 50 mL de água destilada. O mesmo volume de água foi adicionado ao CTRL.

A avaliação da alfa e beta diversidade microbiana foi realizada a partir da extração de DNA por meio de um kit comercial (PowerSoil®, QIAGEN), utilizando-se 25 g de silagem em 225 mL de solução salina (0,85% NaCl). As regiões hipervariáveis V3 e V4 do gene 16S rRNA foram amplificadas por PCR: desnaturação a 95 °C por 3 min, com 25 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s, e extensão a 72 °C por 30 s, utilizando os primers 341F: 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG-3' e 785R: 5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C-3', com o kit Illumina MiSeq V2 (2 x 250 ciclos).

A análise da diversidade microbiana foi realizada utilizando a plataforma QIIME2 v. 2023.2 e o software R v. 4.1.3 (Bolyen et al., 2019). O denoising das reads e a geração das Amplicon Sequence Variants (ASVs) foram feitas com DADA2 (Callahan et al., 2016). Foi usado o banco de dados Genome Taxonomy Database (GTDB) v. 207.0. Foram usados os índices de diversidade alfa: Shannon, Simpson, Pielou e para a diversidade beta: Weighted e Unweighted Unifrac (Lozupone e Knight, 2015; Thukral, 2017).

A avaliação estatística foi feita utilizando os testes não paramétricos de Dunn e Kruskal-Wallis, assim como o teste PERMANOVA para avaliação das diversidades alfa e beta, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível identificar 2188 ASVs após normalização de 1900 reads em por amostra. O fator uso de inoculante foi significativo ($P < 0,001$) para todos os índices de diversidade alfa, principalmente em D100, onde os usos de Lb ou Lb×Lh apresentaram menores valores de diversidade microbiana em relação ao controle a partir de D60, pois não houve diferença entre os tratamentos no tempo D20.

Todos os tratamentos apresentaram diferença significativa ($P < 0,001$) para os fatores uso de inoculante e dia de abertura na avaliação da diversidade beta, havendo formação de clusters e dissimilar marcante entre todos os tratamentos, logo indicando composição bacteriana distinta. Em D20 houve baixa dissimilaridade entre os grupos, sendo possível identificar maior dissimilaridade Lb e Lb×Lh em relação ao controle em D60 e D100.

Os principais gêneros bacterianos identificados na análise de abundância relativa foram: *Lentilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Secundilactobacillus*, *Lelliottia*, *Levilactobacillus*, *Staphylococcus*, *Clostridium_B*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Alkalihalobacillus_A*, *Acinetobacter*, *Weissella*. *Lentilactobacillus* foi o gênero dominante em D60 e D100 com o uso de inoculantes, ocupando valores acima de 90% da composição microbiana, enquanto o grupo controle apresentou grande proporção de *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Secundilactobacillus* em D20 e queda gradual da proporção de populações de BAL em D60 e D100.

A análise de abundância diferencial pelo método LEfSe demonstrou populações de BAL, como *Lactobacillus* e *Lentilactobacillus*, foram associadas ao uso de inoculantes em todos os tempos de abertura, enquanto o controle foi associado às populações de espécies bacterianas do tipo não BAL, como *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae* e *Clostridiaceae* nos tempos D60 e D100.

A eficiência da inoculação de *Lentilactobacillus* parece ser proporcional à densidade do silo, na qual silagens inoculadas mais adensadas apresentam maior prevalência das BAL em fases tardias da fermentação (Xu et al., 2022). Além disso, a qualidade da fermentação da silagem de sorgo se difere da clássica do milho, pois valores de matéria seca próximos de 27% aumentam a eficiência das BAL em silagens de sorgo inoculadas com *L. buchneri* (Kharazian et al., 2024).

O presente estudo avaliou o uso de inoculante misto com duas espécies de BAL heteroláticas e verificou não haver diferença estatística em relação ao uso do inoculante simples na melhoria da qualidade da fermentação da silagem de sorgo. No entanto, a eficiência do inoculante pode variar conforme o tipo das combinações. Li et al. (2023) verificou que o uso de



III SIMPÓSIO DE CONSERVAÇÃO DE FORRAGENS - SICONFOR

inoculante misto à base de *L. buchneri* e *Lactiplantibacillus plantarum* foi mais eficiente que o uso de *L. buchneri* isolado na melhoria da fermentação do sorgo por 100 dias, como visto pelo aumento da proporção de outras espécies de BAL.

CONCLUSÕES

O uso de inoculantes exclusivo contendo *L. buchneri* ou misto, associado a *L. hilgardii*, foram eficientes em melhorar a qualidade da fermentação da silagem de sorgo, com o estabelecimento de populações de *Lentilactobacillus* como dominante em cerca de 60 dias de fermentação em comparação ao grupo não inoculado. Silagens de sorgo mais estáveis em tempos de abertura mais longos, devido ao efeito promissor dos inoculantes com, apenas ensejam o objetivo primordial da prática de ensilagem, que é conservar as forragens por mais tempo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem por todo o apoio e suporte ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ciência Animal (INCT-CA).

REFERÊNCIAS

- BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, p. 852–857, 2019.
- CALLAHAN, B. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, p. 5, 2016.
- DROUIN, Pascal et al. Microbiota succession during aerobic stability of maize silage inoculated with *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788 and *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM-I-4785. **Microbiology Open**, v. 10, n. 1, p. e1153, 2021.
- FERRERO, Francesco et al. Effects of conservation period and *Lactobacillus hilgardii* inoculum on the fermentation profile and aerobic stability of whole corn and sorghum silages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 5, p. 2530-2540, 2019.
- FERRERO, Francesco et al. Temperature during conservation in laboratory silos affects fermentation profile and aerobic stability of corn silage treated with *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus hilgardii*, and their combination. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 2, p. 1696-1713, 2021.
- KHARAZIAN, Z. A. et al. Effects of inoculation and dry matter content on microbiome dynamics and metabolome profiling of sorghum silage. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 257, 2024.
- LI, M. et al. Effect of co-inoculation of *Lactobacillus plantarum* and *Lentilactobacillus buchneri* on aerobic stability and microbial community composition of perennial sorghum silage. **Biomass and Bioenergy**, v. 173, p. 106801, 2023.
- LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. The unifrac significance test is sensitive to tree topology. **BMC Bioinformatics**, v. 16, p. 1-3, 2015.
- MACÊDO, Alberto Jefferson da Silva et al. Características morfológicas e produtivas de genótipos de sorgo para produção de forragem no semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 19, p. 256-267, 2018.
- SANTOS, Edson Mauro et al. A conservação de forragens como estratégia alimentar em regiões semiáridas do Brasil. In: PEREIRA, O. G.; RIBEIRO, K. G.; CHIZZOTTI, F. H. M.; FONSECA, D. M. (Org.). **X Simpósio sobre Manejo Estratégico da Pastagem**. 1ed. Viçosa: UFV/DZO, 2022, p. 247-278.
- THUKRAL, A. K. A review on measurement of Alpha diversity in biology. **Agricultural Research Journal**, v. 54, n. 1, p. 1-10, 2017.
- XU, H. et al. Fermentation weight loss, fermentation quality, and bacterial community of ensiling of sweet sorghum with lactic acid bacteria at different silo densities. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1013913, 2022.