



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EFFECTOS DEL HORARIO DE CORTE Y DE LA INOCULACIÓN
SOBRE LA CALIDAD DE FERMENTACIÓN Y EL VALOR
NUTRITIVO DE ENSILAJES DE ALFALFA**

DANIEL DARÍO PÉREZ MENDOZA

TESIS DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY
2020**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EFFECTOS DEL HORARIO DE CORTE Y DE LA INOCULACIÓN
SOBRE LA CALIDAD DE FERMENTACIÓN Y EL VALOR
NUTRITIVO DE ENSILAJES DE ALFALFA**

DANIEL DARÍO PÉREZ MENDOZA

**Cecilia Cajarville
Directora de Tesis**

**José Luis Repetto
Co-director**

**Alejandro Britos
Co-director**

2020

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**

Analía Pérez Ruchel DCV, MSc, PhD
Docente Facultad de Veterinaria
Universidad de la República del Uruguay – Uruguay

Rodrigo Zarza Ing. Agr., MSc, PhD
Investigador Adjunto
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Juan Díaz Ing. Agr., MSc, PhD
Investigador Adjunto
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

2020

ACTA DE DEFENSA DE TESIS



FACULTAD DE VETERINARIA Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**EFFECTOS DEL HORARIO DE CORTE Y DE LA INOCULACIÓN
SOBRE LA CALIDAD DE FERMENTACIÓN Y EL VALOR
NUTRITIVO DE ENSILAJES DE ALFALFA**

Por: MVZ. DANIEL DARÍO PÉREZ MENDOZA

Directora de Tesis: DRA. CECILIA CAJARVILLE

**Codirectores de Tesis: DR. JOSÉ LUIS REPETTO
DR. ALEJANDRO BRITOS**

Tribunal

Presidente: Dra. Analía Pérez

Segundo Miembro: Dr. Rodrigo Zarza

Tercer Miembro: Dr. Juan Díaz

Fallo del Tribunal:

JUEVES 26 DE NOVIEMBRE DE 2020.

PLATAFORMA ZOOM, POSGRADO

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)



ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Maestría

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Sala Virtual de Plataforma Zoom, Facultad de Veterinaria, UdelaR, jueves 26 de noviembre de 2020.

Tribunal: Dra. Analía Pérez (Presidente), Dr. Rodrigo Zarza, Dr. Juan Díaz.

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
1309533709	Pérez Mendoza , Daniel	B.B.B.	6

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

Dra. Analía Pérez (Presidente)

Dr. Rodrigo Zarza.

Dr. Juan Díaz.

FIRMA

NOTA: Las calificaciones de aprobación de la Tesis de Maestría pueden ser:
B.B.B. - 6 , o S.S.S. - 12

AGRADECIMIENTO

Agradezco en primera instancia a Dios y mi familia: Papá, Mamá, Todo esto no hubiera sido posible sin ustedes, brindándome el apoyo necesario y ayudándome a concretar este sueño.

A mis tutores uruguayos, Dr. (PhD) José Luis Repetto, Dra. (PhD) Cecilia Cajarville y a Dr. MSc. Alejandro Britos. Por haberme recibido y su incentivo en iniciarme en la carrera de Posgrado, despertar mi interés en la producción animal y sus invaluable aportes a la redacción de este manuscrito.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	iii
ABSTRACT	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	4
2.1. Proceso de ensilaje	4
2.2. Aditivos e inoculantes	7
2.3. Efecto de los tratamientos sobre la utilización digestiva de los forrajes y ensilajes	10
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
3.1. Planteamiento del problema	11
3.2. Hipótesis	12
3.3. Objetivo general	12
3.4. Objetivos específicos	12
4. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	13
5.1. Cosecha del forraje y elaboración de los ensilajes	13
5.2. Análisis de composición química	15
5.3. Utilización digestiva <i>in vitro</i>	16
5.3.1. Digestibilidad verdadera <i>in vitro</i>	16
5.3.2. Producción de gas <i>in vitro</i>	17
5.4. Análisis estadísticos	19
6. RESULTADOS	19
6.1. Composición química del ensilaje	19
6.2. Características de fermentación del ensilaje	20
6.3. Utilización digestiva	21
6.4. Correlaciones entre variables de la composición química, de las características de la fermentación y de la utilización digestiva del forraje original y de los ensilajes	23
7. DISCUSIÓN	23
8. CONCLUSIONES	26
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

FIGURAS

Figura 1. Fases del proceso de ensilado	6
Figura 2. Diseño experimental	13
Figura 3. Volumen de producción de gas de ensilajes de alfalfa inoculados y ensilajes de alfalfa sin inocular elaborados en la mañana y en la tarde	22
Figura 4. Tasa de producción de gas de ensilajes de alfalfa inoculados y ensilajes de alfalfa sin inocular elaborados en la mañana y en la tarde	22

CUADROS

Cuadro I. Productos finales de fermentación en diferentes tipos de silos y diferente contenido de materia seca	7
Cuadro II. Clasificación de aditivos para ensilajes	8
Cuadro III. Condiciones climáticas durante la elaboración de los ensilajes de alfalfa en el año 2016	14
Cuadro IV. Composición química de la alfalfa original utilizada para la elaboración de los ensilajes	15
Cuadro V. Composición de la solución buffer utilizada para la determinación de la digestibilidad verdadera in vitro	17
Cuadro VI. Composición del medio de incubación libre de N	18
Cuadro VII. Composición química de ensilajes de alfalfa inoculados o sin inocular elaborados en la mañana o en la tarde	20
Cuadro VIII. Características de fermentación y digestibilidad verdadera in vitro (IVTD) de ensilajes de alfalfa inoculados y sin inocular elaborados en la mañana y en la tarde	21

ABSTRACT

Alfalfa (*Medicago sativa* L.), a forage resource of high production and good nutritional value, is preferably used for cutting, henification and grazing. However, for silage production has difficulties due to the high buffer capacity and low concentrations of water-soluble carbohydrates. These characteristics can be counteracted by the use of bacterial and/or enzymatic additives, wilting the forage before ensilating, or increasing the substrates to improve fermentation. This study was conducted with the aim of determining whether it is more effective to use the physiological diurnal increase of soluble sugars of the plant, the addition of a microbial inoculant, or both at the same time, to improve the quality of fermentation and the nutritional value of alfalfa silage. The experimental design consisted of a factorial 2×2 (cut in the morning (AM) and in the afternoon (PM) and WITH or WITHOUT inoculant). Three plots of alfalfa (replicas) were used, each of which was divided into subplots, using three of them per plot and treatment, making a total of 36 microspieces. The dose of inoculant applied was 2.10×10^{10} cfu/g. The pastures were cut and silage in plastic containers of 18 liters capacity. After 60 days of storage, a sample was taken from each silage and the pH of each microstyle was immediately measured. Samples of silage and fresh pasture were dried at 60°C and ground at 1mm to determine the content of dry matter (MS), ash (Cz), crude protein ($N \times 6.25$) (PB), organic matter (MO), neutral detergent fiber (FDN), acid detergent fiber (FDA), non-protein N (NNP), soluble protein (PS), insoluble N in neutral detergent (NIDN), insoluble N in acid detergent (NIDA) and soluble sugars (Az. Sol.), in addition to determined Ammoniacal N, organic acids (lactic, acetic, butyric and propionic), determined true digestibility *in vitro* and gas production *in vitro*. Data were analyzed using SAS[®] PROC MIXED statistical program. In the silage material the cutting×inoculant interaction was significant for the MS content (P=0.019) and the lactic acid content (P=0.021). Cutting alfalfa in the evening increased Az sol. concentration remnants (P<0.001), decreased the proportion of FDA (P=0.005), decreased the concentration of total NH₃-N (P=0.018) and decreased pH (P=0.001). True *in vitro* digestibility (IVTD) was higher (P=0.029) for PM-cutting silages, while no effect of cutting time or inoculant application was observed for *in vitro* gas production. The results of this study showed that the inoculation of silage had no significant effect on the parameters studied, but the determining factor was the cutting time since in the material harvested in the afternoon there was an improvement in the chemical composition, fermentation characteristics and *in vitro* digestibility of alfalfa silage.

Keywords: *Medicago sativa*, microbial inoculant, silage, cutting hours

RESUMEN

La alfalfa (*Medicago sativa* L.), recurso forrajero de alta producción y buen valor nutritivo, es utilizado preferentemente para cortes, henificación y en pastoreo. Sin embargo, para la producción de ensilaje tiene dificultades debido a la alta capacidad tampón y bajas concentraciones de carbohidratos solubles en agua. Estas características pueden ser contrarrestadas mediante el uso de aditivos bacterianos y/o enzimáticos, marchitando el forraje antes de ensilar, o incrementando los sustratos para mejorar la fermentación. Este estudio fue conducido con el objetivo de determinar si es más efectivo utilizar el incremento fisiológico diurno de azúcares solubles de la planta, el agregado de un inoculante microbiano, o ambos a la vez, para mejorar la calidad de fermentación y el valor nutritivo de ensilajes de alfalfa. El diseño experimental consistió en un factorial 2×2 (corte en la mañana (AM) y en la tarde (PM) y CON o SIN inoculante). Se emplearon tres parcelas de alfalfa (réplicas), cada una de las cuales se dividió en subparcelas, empleándose tres de ellas por parcela y tratamiento, elaborándose en total 36 microsilos. La dosis de inoculante aplicada fue de 2.10×10^{10} ufc/g. Las pasturas fueron cortadas y ensiladas en recipientes plásticos de 18 litros de capacidad. Luego de transcurridos 60 días de almacenamiento, se tomó una muestra de cada ensilaje e inmediatamente se midió el pH de cada microsilo. Las muestras de ensilajes y pastura fresca fueron secadas a 60°C y molidas a 1mm para determinar el contenido de materia seca (MS), cenizas (Cz), proteína bruta ($N \times 6.25$) (PB), materia orgánica (MO), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), N no proteico (NNP), proteína soluble (PS), N insoluble en detergente neutro (NIDN), N insoluble en detergente ácido (NIDA) y azúcares solubles (Az. Sol.), además se determinó N amoniacal, ácidos orgánicos (láctico, acético, butírico y propiónico), se determinó la digestibilidad verdadera *in vitro* y la producción de gas *in vitro*. Los datos fueron analizados usando el programa estadístico PROC MIXED de SAS®. En el material ensilado la interacción corte×inoculante fue significativa para el contenido de MS (P=0.019) y el contenido de ácido láctico (P=0.021). El corte de la alfalfa en la tarde aumentó la concentración de Az. Sol. remanentes (P<0.001), disminuyó la proporción de FDA (P=0.005), disminuyó la concentración de NH₃-N total (P=0.018) y disminuyó el pH (P=0.001). La digestibilidad verdadera *in vitro* (IVTD) fue mayor (P=0.029) para los ensilajes de corte PM, mientras que no se observó efecto de la hora de corte ni de la aplicación de inoculante para la producción de gas *in vitro*. Los resultados de este estudio mostraron que la inoculación del ensilaje no tuvo ningún efecto significativo en los parámetros estudiados, pero el factor determinante fue la hora de corte ya que en el material cosechado de tarde se constató una mejora en la composición química, las características de fermentación y la digestibilidad *in vitro* de los ensilajes de alfalfa.

Palabras claves: *Medicago sativa*, inoculante microbiano, ensilajes, horario de corte

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos 15 años en el Uruguay la superficie total dedicada a la lechería disminuyó en un 21%, pero la productividad por hectárea aumentó reflejándose en el ingreso de leche a plantas industrializadoras que pasó de 1146 a 2046 millones de litros (78% de incremento) entre los ejercicios 2000/2001 y 2013/2014 (DIEA, 2005; 2015). En este contexto, con una cadena productiva netamente exportadora, los sistemas productivos lecheros de Uruguay deben ser competitivos internacionalmente y proyectarse en modelos productivos de bajo costo relativo.

Los forrajes representan entre el 40-60% de la dieta en Uruguay. La utilización de pasturas bien manejada puede incidir positivamente en los costos de producción, siendo además importante para mantener un rumen saludable en las vacas, optimizar la producción de leche y disminuir la posibilidad de acidosis y cojeras (Mertens, 1997; Nocek 1997; NRC, 2001; Beauchemin y Yang, 2005). En la mayoría de los sistemas de producción de rumiantes, en este contexto el ganado obtiene entre el 40% y el 90% de sus requerimientos nutricionales a partir de forrajes (Charmley, 2001). Sin embargo, la baja concentración energética relativa de este tipo de alimentos, en adición a sus altos contenidos de humedad y fibra (NRC, 2001), pueden resultar en bajos consumos de materia seca (MS) y energía (Klover y Muller, 1998), que condicionan la producción.

Estos factores, además de las grandes fluctuaciones en la disponibilidad de forraje que se dan en las diferentes épocas del año, han llevado a que los sistemas de alimentación incluyan niveles crecientes de suplemento (reservas de forraje y/o concentrados) en la dieta con el fin de estabilizar la producción de leche a lo largo del año. En este sentido, los ensilajes han pasado de ser un recurso utilizado en momentos de escasez, a convertirse en un componente “estructural” de las dietas en vacas lecheras, representando casi el 30% de las dietas (Cajarville. et al, 2014). Es así que el valor nutritivo de este tipo de alimento cobra especial importancia, y depende del valor nutritivo del forraje original y de los fenómenos que se produzcan durante el proceso de fermentación y almacenamiento (Van Soest, 1994). Por lo tanto, el éxito del almacenamiento de forrajes durante la temporada de abundancia para el posterior consumo animal es un asunto crucial.

Los ensilajes son elaborados principalmente a partir de forrajes, cereales, leguminosas y ocasionalmente de rastrojos de cultivos. En este sentido, la alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una planta de crecimiento erecto que se adapta a los diferentes tipos de producción animal. El momento óptimo para su uso en forma de ensilado está dado, fundamentalmente, por el balance entre la cantidad de azúcares solubles acumulados y el estado de desarrollo alcanzado al momento del corte, lo cual también permite compatibilizar la calidad del forraje obtenido y la duración de la pradera (Soto y Jahn, 1993). Sin embargo, en la alfalfa el alto contenido de proteína y bajo contenido de azúcares solubles en el material fresco (< 1.5%), su alta capacidad tampón y el bajo número de bacterias epifíticas hacen que sea difícil de ensilar. Por estas razones, la adición de productos a base de bacterias productoras de ácido láctico y/o el incremento de sustratos para las bacterias en el momento de la confección del silo pueden mejorar el proceso de fermentación (Henderson, 1993), permitiendo obtener ensilajes de mejor calidad y mayor valor nutritivo (Kung et al. 1987).

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

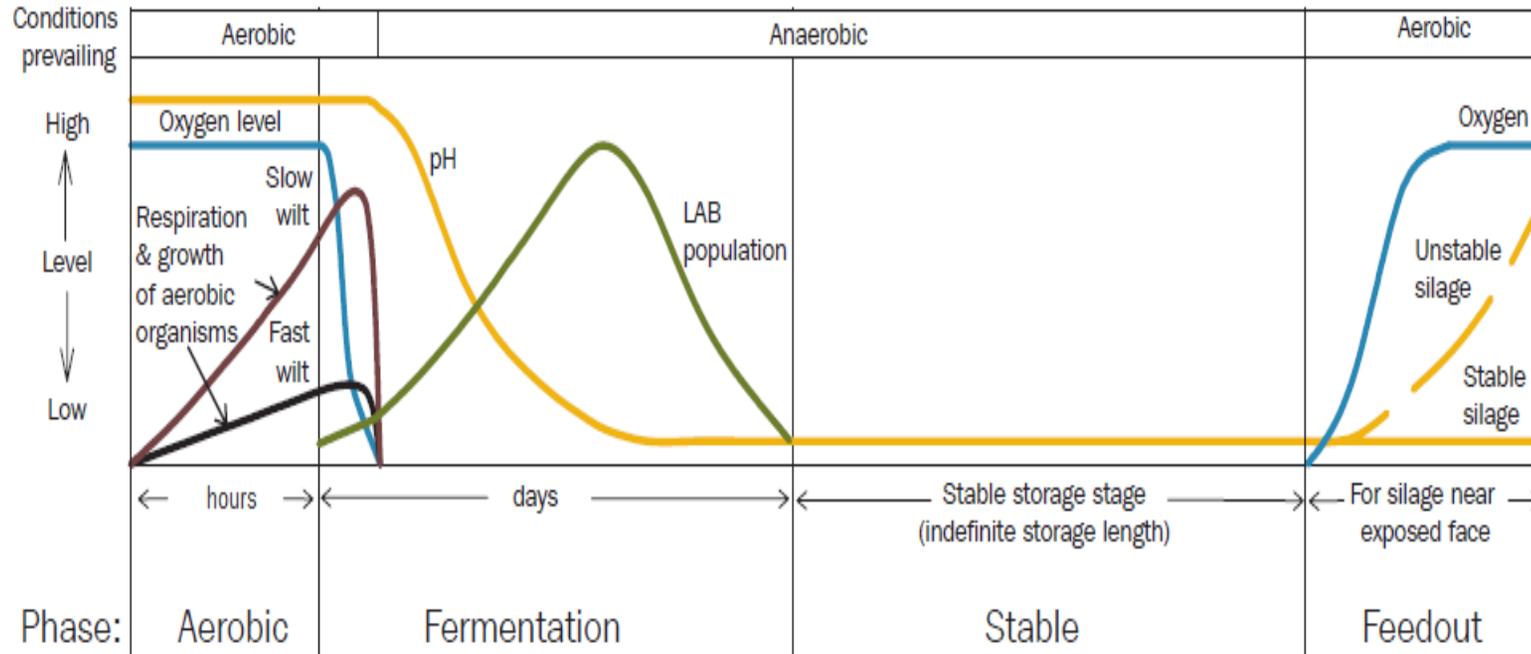
2.1. Proceso de ensilaje

El ensilaje es una metodología de conservación basada en la fermentación anaeróbica en donde se producen cambios físicos y químicos, que se realizan hasta constituir un alimento con ciertas características propias y en el que intervienen tres factores que interactúan correlacionados: las bacterias, el aire y la composición del material vegetal. Esta fermentación es llevada a cabo por grupos de bacterias epifíticas y transformados en diferentes ácidos, principalmente ácido láctico y otros ácidos grasos, pero en baja proporción que promueven el descenso del valor del pH del material ensilado (McDonald et al., 1991). En este contexto, muchas variables pueden influir en la fermentación, como el contenido de MS del forraje, el contenido de azúcares solubles, la presencia de enterobacterias y de bacterias productoras de ácido láctico, o el agregado de aditivos microbianos (Kent, 1988). Una vez que el pH ha disminuido hasta valores inferiores a pH 4,5 se detienen las reacciones enzimáticas del forraje y se limita el crecimiento bacteriano, considerándose que el ensilaje se ha estabilizado. Para obtener un ensilaje bien preservado este proceso debería transcurrir rápidamente, a fin de conservar la mayor cantidad de nutrientes del forraje original (Van Soest, 1994). El proceso de fermentación involucra varias reacciones físicas y químicas. En las que se presentan, la fase aeróbica, de fermentación, estable y de deterioro aeróbico (Weinberg y Muck 1996). Ver Figura 1.

La fase aeróbica dura sólo pocas horas, el oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal disminuye rápidamente debido a la respiración de los materiales vegetales y a la presencia de microorganismos aeróbicos y aeróbicos facultativos como las levaduras y las enterobacterias. Además, hay una actividad importante de enzimas vegetales, como las proteasas y carbohidrasas, siempre que el pH se mantenga en el rango normal (pH 6,5-6,0) para el forraje fresco (Stefanie et al., 2001). La fase de fermentación es la fase más prolongada del ensilaje, esta tiene una duración que puede ser de una semana o más de un mes, dependiendo de la velocidad de disminución de los valores de pH por la acción de los *Lactobacillus* que convierten con rapidez los carbohidratos fácilmente fermentables en ácido láctico (McDonald et al., 1991). Durante la fase estable las enzimas hidrolíticas, que toleran los medios ácidos, degradan lentamente los carbohidratos estructurales a carbohidratos solubles para el suministro continuo de sustratos fermentables para las bacterias productoras de ácido láctico durante el tiempo de almacenamiento. Además, las proteasas de las bacterias convierten los compuestos nitrogenados en nitrógeno amoniacal (N-NH₃) (Pahlow et al., 2003), esto ocurre hasta que el valor del pH disminuye a 4,0, donde todas las enzimas se vuelven inactivas (Pahlow et al., 2003; Rooke y Hatfield 2003). La fase de deterioro aeróbico comienza con la apertura del silo y la exposición del ensilaje al aire, que es inevitable cuando se requiere extraer y distribuir el ensilaje, pero puede ocurrir antes de iniciar la exposición por daño de la cobertura del silo (por ejemplo, roedores o pájaros). El período de deterioro puede dividirse en dos etapas. La primera se debe al inicio de la degradación de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje, por acción de levaduras y ocasionalmente por bacterias que producen ácido acético. Esto

induce un aumento en el valor del pH, lo que permite el inicio de la segunda etapa de deterioro; en ella se constata un aumento de la temperatura y de la actividad de microorganismos que deterioran el ensilaje, como algunos bacilos. La última etapa también incluye la actividad de otros microorganismos aeróbicos, también facultativos, como mohos y enterobacterias (Weinberg y Muck, 1996).

Figura 1. Fases del proceso de ensilado



Adaptado de, Pitt (1990)

En este contexto, los productos finales de la fermentación reflejan el tipo de microorganismos que dominan durante el proceso de ensilado (Cuadro I). Los ácidos que se producen en mayor cantidad (ácido acético, ácido láctico y ácido butírico) determinan la calidad final del ensilaje y por ende la calidad del material conservado (Hiriart, 2008). Los microorganismos del ensilaje catabolizan los azúcares solubles principalmente a ácidos orgánicos y alcohol. Los principales azúcares presentes en la fracción de los *azúcares solubles en agua* de los forrajes de leguminosas son fructosa, glucosa y sacarosa (McDonald et al., 1991).

Cuadro I. Productos finales de fermentación en diferentes tipos de silos y diferente contenido de materia seca

Parámetro, %	Silo alfalfa (30-35% MS)	Silo alfalfa (45-55% MS)	Silo pradera (25-35% MS)	Silo maíz (35-40% MS)
pH	4.3 - 4.5	4.7 - 5.0	4.3 - 4.7	4.0 - 4.5
Ácido láctico	7 - 8	2 - 4	6 - 10	4 - 7
Ácido acético	2 - 3	2.0 - 0.5	1 - 3	1 - 3
Ácido propiónico	< 0.5	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Acido butírico	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Etanol	0.5 - 1.0	0.5	0.5 - 1.0	1 - 3
N-NH ₃ (%PB)	10 - 15	< 12	8 - 12	5 - 7

Adaptado por Kung (2000)

2.2. Aditivos e Inoculantes

El objetivo principal de los aditivos en el ensilaje es garantizar un buen almacenamiento y minimizar el deterioro antes y durante el proceso de ensilaje, así como en el proceso de la alimentación. Según McDonald, et al., (1991), hay cuatro grupos de aditivos basados en sus acciones: i) estimulantes de la fermentación, ii) inhibidores de la fermentación, iii) inhibidores del deterioro aeróbico, y iv) nutrientes (Cuadro II). Los aditivos se agregan para que, en conjunto con las acciones físicas como el corte, el embalaje y el sellado del silo, se logre una fermentación deseable durante el ensilado.

Los inhibidores de la fermentación reducen o detienen el metabolismo microbiano de la planta. Estos incluyen varios ácidos que inhiben a las enzimas, proteasas, de las plantas y el crecimiento microbiano a través de la rápida reducción del pH (Channley et al 1994). El tratamiento con ácido se usa generalmente en forrajes con alta humedad, donde la rápida acidificación es una necesidad para una conservación adecuada (McDonald et al., 1991; Muck y Kung, 1997). Nadeau et al. (2000 a,b) probaron el efecto del ácido fórmico en ensilados de pradera y alfalfa y observaron que el ácido fórmico restringió la fermentación en los silos y mantuvo los azúcares del ensilaje conservado. Mientras tanto, como nutrientes (Cuadro II) se han utilizado mezclas de amoníaco anhidro, amoníaco acuoso o melaza con amoníaco. Dentro de los beneficios de la aplicación de amoníaco antes de ensilar se incluye un aumento en la proteína (Huber et al., 1979) y en

la estabilidad aeróbica (Britt y Huber, 1975), una reducción de la proteólisis debido a la inhibición de las enzimas de la planta (Johnson et al., 1982) y la inhibición del crecimiento de moho. Sin embargo, dado que el amoníaco aumenta la capacidad de amortiguación del ensilaje, lo que dificulta la bajada de pH y, por lo tanto, puede tener efectos adversos en la recuperación de MS (Boisen et al., 1992). Por ese mismo motivo, el tratamiento con amoníaco no es recomendable para la alfalfa.

Cuadro II. Clasificación de aditivos para ensilajes

Estimulantes de la fermentación		Inhibidores de la fermentación		Inhibidores del deterioro aeróbico		Nutrientes
BAL ^{Ho}	Fuentes de carbohidratos	Ácidos	Otros	Ácidos	Bacterias	
<i>Lactobacillus Plantarum</i>	Melaza	Ácido propiónico	Formaldehido	Ácido acético	Propiónico Bacterias lácticas	Urea
<i>Lactobacillus Acidophilus</i>	Azúcares	Ácido fórmico	CO ₂	Ácido propiónico	BAL ^{Het}	Amoníaco
<i>Pediococcus Cerevisiae</i>	Cultivos altos en azúcares	Ácido acético				
<i>Pediococcus Acidilactici</i>						
<i>Streptococcus Faecium</i>	Celulosas					
<i>Enterococcus Faecium</i>	Hemicelulasas					

BAL^{Ho}: Bacterias ácido lácticas homofermentativas, BAL^{Het}: Bacterias ácido lácticas heterofermentativas
Adaptado de McDonald et al (1991)

Considerando las dificultades que se han identificado en el uso de algunos inhibidores, el desarrollo y uso de aditivos biológicos para la conservación del forraje ha aumentado. El objetivo de agregar inoculantes microbianos es la producción predominante de ácido láctico como el producto final del proceso de fermentación dando como resultado un ensilaje de calidad (Schroeder, 2004). Entre los inoculantes bacterianos más importantes están los relacionados con la inhibición del deterioro aeróbico y los estimulantes de la fermentación, Los inhibidores del deterioro aeróbico se agregan al forraje antes de ensilar para mejorar su utilidad cuando el material ensilado se expone al aire. Los inoculantes microbianos que contienen bacterias ácido lácticas heterofermentativas (BAL^{Het}) y el ácido propiónico se usan para mejorar la capacidad para inhibir el crecimiento de levaduras y evitar el deterioro aeróbico. Kung et al. (2003) trataron alfalfa (40% MS) con *Lactobacillus buchneri* 40788 en silos de laboratorio y silos a escala comercial. Los silos tratados presentaron mayor contenido de ácido acético, ácido propiónico y N-NH₃ y menor contenido de ácido láctico que el ensilaje control, pero mejoró significativamente la estabilidad aeróbica.

El uso de los aditivos estimulantes de la fermentación proporciona un suficiente sustrato para asegurar el predominio de bacterias ácido lácticas homofermentativas (BAL^{Ho}) en el momento de ensilar el forraje. Las BAL^{Ho} incluyen especies como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus*

acidactili, *Pediococcus pentosaceus* y otros que favorecen una fermentación láctica (Henderson, 1993). En ese sentido, Parvin et al. (2010) hallaron que en ensilajes de ryegrass (*L. multiflorum*), pasto de Guinea (*M. maximus*) y pasto de Rhodes (*C. gayana*) las especies microbianas inoculadas sustituyeron casi totalmente al microbiota epifítica. Recientemente, en un meta-análisis que involucró 130 artículos desde 1997 al 2016, Oliveira et al. (2017) hallaron que la utilización de inoculantes incrementó la concentración de ácido láctico y disminuyó el pH, las concentraciones de ácido acético, ácido butírico, N-NH₃ y la pérdida de MS en ensilajes de gramíneas y de leguminosas. Sin embargo, estos últimos autores no observaron esos efectos en ensilajes de maíz, sorgo y caña de azúcar, sugiriendo que las altas concentraciones de azúcares solubles, las bajas capacidades tampón y altas poblaciones de bacterias epifíticas de estos forrajes no hacen necesaria la inoculación para obtener una fermentación óptima.

Una medida de manejo para mejorar la fermentación al momento de ensilar es la adición de sustratos entre las que se encuentran el uso de enzimas como las celulasas, hemicelulasas y amilasas, que convierten los carbohidratos de cadena larga en carbohidratos solubles, quedando así disponible para las bacterias. Las enzimas son necesarias en forrajes con bajos carbohidratos solubles como las leguminosas (Nadeau et al., 2000a; Zhu et al., 1999; Muck y Kung, 1997). Varias enzimas han sido probadas con éxito en alfalfa. (Nadeau et al., 2000a, b; Sheperd et al., 1995). Nadeau et al. (2000a, b) mostraron que la adición de celulasas en alfalfa aumentó el contenido de carbohidratos solubles, lo que llevó a una mejor calidad de ensilaje. Otra fuente de carbohidratos son los subproductos de la industria como melazas, pulpa de citrus y suero de queso que también se utilizan para mejorar la fermentación del ensilaje (Henderson, 1993). En ese sentido, nuestro equipo de investigación ha observado una mayor disminución de pH respecto a los silos no tratados, con la adición de suero de queso a ensilajes de alfalfa (Repetto et al., 2011) y con la adición de suero de queso y melaza de caña a ensilajes de pasturas mezcla de leguminosas y gramíneas templadas (Britos et al., 2007; Cajarville et al., 2012). Además, en estos experimentos se obtuvo una mejora del valor nutritivo evidenciado por un aumento en la degradación ruminal de la fibra (Repetto et al., 2011), degradación ruminal de la MS (Cajarville et al., 2012) y de la velocidad de producción de gas *in vitro* (Britos et al., 2007) respecto a los silos no tratados.

Una alternativa al uso de carbohidratos externos, para aumentar la cantidad de azúcares en el momento de ensilar puede ser aprovechar los azúcares de la planta que se acumulan durante el correr del día. La fotosíntesis provoca un aumento neto en la concentración de azúcares solubles en la planta durante el día, debido a que la tasa de fotosíntesis excede el ritmo de respiración y de fijación de carbono (Smith, 1973).

En este sentido, nuestro equipo observó en una mezcla de pastura compuesta por festuca y alfalfa que, en nuestras condiciones, los contenidos de azúcares solubles en el ensilaje se duplicaron por la tarde respecto a la mañana (Repetto et al., 2003). En este contexto, Antúnez y Caramelli (2009) reportaron aumentos del contenido de azúcares solubles en el correr del día en 30 pasturas diferentes que se muestrearon a lo largo del año. Este aumento de azúcares solubles provocó un incremento de la magnitud de la fermentación ruminal *in vitro* (Cajarville et al., 2015). Davies et al. (1998) informaron que el ensilaje preparado a partir de forrajes de ryegrass perenne y trébol con alto contenido

de azúcares solubles tenía menor pH que el elaborado de forrajes con bajo contenido de azúcares solubles cosechado en la mañana. Hallazgos similares han reportado otros autores (Hassanat et al., 2006; Merry et al., 2006; Downing, et al., 2008). Además, los azúcares solubles tienen un efecto sobre la concentración del ácido láctico y ácido acético durante el ensilado. Después del ensilado, los forrajes con mayor contenido en azúcares presentaron una mayor concentración de ácido láctico (Davies et al., 1998; Merry et al., 2006; Downing et al., 2008), una menor concentración de ácido acético (Davies et al., 1998; Merry et al., 2006), en relación a los forrajes con bajo contenido de azúcares solubles. Esto podría deberse que hay cierta conversión de ácido láctico en ácido acético por las bacterias ácido láctico cuando el contenido de azúcares es insuficiente para la fermentación (Rooke 1991). La concentración de amoníaco también fue menor para el ensilaje de pradera con mayor contenido de azúcares respecto a aquel con menor contenido de azúcares solubles (Rooke 1991).

Haigh (1990) informó que los forrajes plantados en áreas donde la lluvia es escasa y existe mayor cantidad de luz solar tenían mayor contenido de azúcares solubles, comparada con aquellos plantados en áreas de alta precipitación, baja radiación solar y alta temperatura. Burns et al. (2007) reportó que, las concentraciones de carbohidratos solubles aumentaron en alfalfa al máximo cuando se realiza el corte alrededor de 16:00 h y que la acumulación azúcares se asoció con una reducción en la concentración de la FDN y un aumento en la digestibilidad de materia seca *in vitro* (IVTD). De hecho, Tremblay et al. (2014) observó en alfalfa, que el contenido más alto de azúcar de la tarde reporta mejores atributos de conservación en ensilajes, en comparación con cortes en la mañana.

2.3.Efecto de los tratamientos sobre la utilización digestiva de los forrajes y ensilajes

Filya et al. (2007) evaluaron el efecto de 14 inoculantes bacterianos (1.0×10^6 ufc/g de forraje) sobre la fermentación y valor nutritivo de ensilados de alfalfa y encontraron que los inoculantes bajaron el pH y aumentaron el ácido láctico, pero no mejoraron la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica. González, (2012) observó que al inocular BAL en ensilaje de alfalfa y pasto ovilla (*Dactylis glomerata* L.) cosechados en horario AM, PM y premarchitados, la IVTD fue numéricamente inferior en los tratamientos cosechados en AM, pero no lograron detectar diferencias significativas entre tratamientos. Por otro lado, Fisher et al. (2002) observaron en ensilajes de alfalfa con cosecha AM y PM, la IVTD y fracciones de carbohidratos fueron mayores en los cortes PM. Lechtenberg et al (1971) también determinaron IVTD en muestras de alfalfa cosechada AM y PM, y observaron que esta fue mayor en las de la tarde que las de la mañana.

La técnica de producción de gas *in vitro* tiene como objetivo medir el gas producido como indicador indirecto de la fermentación. Así se determina la magnitud y la cinética de fermentación del alimento incubado (Theodorou et al, 1994). Cuando es incubado un alimento se producen AGV, gases (CO₂ y CH₄ mayoritariamente) y células microbianas. Yuan, et al. (2015) realizaron estudios para comparar los efectos del uso de

inoculantes microbianos, melaza y etanol sobre la calidad de la fermentación, el valor nutritivo y la estabilidad aeróbica del ensilaje de una ración totalmente mezclada (TMR) para rumiantes, observando que en los silos inoculados con *L. plantarum*, influyeron significativamente en cantidad total de potencial de producción de gas, sin efecto sobre la tasa de producción de gas. Liu et al. (2016) observaron que al incluir tres grupos de BAL (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*) en silos de alfalfa, los grupos inoculados tenían un mayor volumen de emisión de dióxido de carbono en comparación con el grupo de control. La posible razón era que la materia orgánica, especialmente los carbohidratos del ensilaje de alfalfa en los grupos inoculados se degradaron más que en el control grupo. Muck et al. (2007) comparando 14 diferentes inoculantes de BAL en ensilajes de alfalfa, observaron que los silos tratados con inoculantes producen o tienden a producir una baja producción de gas por unidad de MS incubada respecto al ensilaje control, siendo la fermentación del ensilaje sustancialmente afectada por la inoculación. Sin embargo, Sánchez et al. (2005) al evaluar los parámetros de degradación de las fracciones solubles e insolubles de carbohidratos contenidos en gramíneas y alfalfa en producción total gas *in vitro* indicó que en la alfalfa no se observó un tiempo de retardo al comienzo de la fermentación (*lag*) durante la fermentación del material original, pero hubo un retardo perceptible en la producción de gas durante la fermentación de la fracción de FDN. Por otro lado, Ellis, et al. (2016) en una serie de ensayos *in vitro* para evaluar el potencial de las BAL en varios niveles de inoculación y usando diferentes sustratos observaron que los efectos de las inoculaciones de BAL en la IVTD, la producción de gas y CH₄ varía con el tipo de BAL agregado y el tipo de sustrato incubado. En la literatura, las respuestas en la IVTD, la producción total de gas y la producción de CH₄ a las inoculaciones de BAL *in vitro* también son variables (Asa et al., 2010, Cao et al., 2010 y O'Brien et al., 2013)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Planteamiento del problema

En Uruguay las condiciones de temperatura y humedad no son las mejores para almacenar el forraje como heno, sobre todo si pensamos en conservar alfalfas que tienen su mayor producción en los meses más húmedos. Una alternativa a la conservación por deshidratación (heno) es el ensilaje.

Tiene especial interés la utilización de inoculantes bacterianos para realizar reservas de forrajes de alfalfa. Esta es una leguminosa reconocida por su capacidad de producir gran cantidad de forraje de alta calidad, además de atributos como la rápida recuperación del cultivo después del corte, su longevidad, su tolerancia al stress ambiental y la fijación al suelo de N atmosférico en simbiosis con *Rhizobium* (Radović et al., 2009). Estas características han llevado a que se conozca a la alfalfa como la “reina” de las plantas forrajeras (García et al., 2011). Como se mencionó en el apartado anterior, presenta algunas características que hacen dificultoso obtener un ensilaje de alta calidad. Su bajo contenido de azúcares solubles y la alta capacidad tampón no permiten un rápido descenso del pH (McDonald et al., 1991). Esto facilita otros procesos bioquímicos que permiten el

crecimiento de clostridios y proteólisis de proteínas vegetales (Rooke et al 1985). Por esto resulta necesario aumentar las concentraciones de azúcares solubles para acelerar el proceso fermentativo.

Para superar esta dificultad que presenta el ensilaje de alfalfa se han desarrollado procedimientos para estimular la fermentación que aceleran la disminución del pH y reducen las pérdidas de nutrientes (Radović et al., 2009), y que han sido descritos en el apartado anterior. Si estas técnicas son utilizadas adecuadamente repercuten favorablemente sobre el valor nutritivo del ensilaje y por lo tanto sobre la performance animal. Entre estos procedimientos se encuentran el agregado de inóculos bacterianos (bacterias ácido lácticas), la adición de sustratos y el uso de los mecanismos fisiológicos de la planta para incrementar los azúcares solubles de la planta hacia horas de la tarde. La efectividad de este último, y sobre todo su combinación con el uso de inoculantes microbianos, no ha sido suficientemente estudiado en alfalfa. En este trabajo se combinó el manejo del horario de corte (AM y PM), con el uso de inoculantes bacterianos, con el fin de obtener ensilajes de alfalfa de mejor calidad fermentativa y mayor valor nutritivo.

3.2.Hipótesis

En ensilajes de alfalfa, la combinación de la cosecha del forraje en la tarde para incrementar la concentración de azúcares solubles con la adición de un inoculante bacteriano en el momento del ensilado mejorarán las características de conservación, estimularán la fermentación ruminal y aumentarán la digestibilidad con una magnitud mayor que la aplicación de ambas prácticas por separado.

3.3.Objetivo general

Determinar si el incremento diurno de los azúcares solubles de la planta y el agregado de un inoculante, por separado y en conjunto mejoran la calidad de la fermentación y el valor nutritivo de ensilajes de alfalfa.

3.4.Objetivos específicos

- Comparar la calidad de fermentación y el valor nutritivo de ensilajes de alfalfa confeccionados considerando el horario de corte del forraje como método de manipular el contenido en azúcares del material original confeccionados con o sin inoculante bacteriano.
- Comparar la efectividad de la variación en el horario de corte, del agregado de inoculante y de la combinación de ambas prácticas sobre la calidad de fermentación y conservación del ensilaje de alfalfa.

4. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

El experimento se desarrolló en el IPAV (Instituto de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria. San José, Uruguay, 34°41'S, 56°32'O). Se elaboraron microsilos a partir de forraje cosechado de 3 parcelas de alfalfa (*Medicago sativa* cv Crioula) sembradas el 15 de septiembre de 2015. La estrategia experimental (ver Figura 2) se planteó en base a un diseño de tipo factorial 2×2, con tratamientos que consistieron en cortar la alfalfa en la mañana (AM) o en la tarde (PM), y para cada corte la aplicación o no de un inoculante (CON y SIN). Obteniendo un total de 36 microsilos. Luego de 60 días de almacenamiento de los microsilos se analizó la composición química y la utilización digestiva *in vitro* de los ensilajes y también de muestras del forraje fresco original.

En el momento del corte se tomaron muestras del forraje fresco (300 g MF) de cada tratamiento, que fueron conservadas a -20°C hasta su posterior análisis. La composición química de las pasturas antes de ensilar se presenta en el Cuadro IV.

Los procedimientos experimentales que involucraron el uso de animales fueron realizados de acuerdo a los principios bioéticos y protocolos de supervisión propuestos por la comisión honoraria de experimentación animal (CHEA) y aprobados en el formulario CEUAFEVET – 642.

Figura 2. Diseño experimental

Parcela 1		Parcela 2		Parcela 3	
AM - CON	PM - CON	AM - CON	PM - CON	AM - CON	PM - CON
PM - SIN	AM - SIN	PM - SIN	AM - SIN	PM - SIN	AM - SIN
PM - CON	AM - CON	PM - CON	AM - CON	PM - CON	AM - CON
AM - SIN	PM - SIN	AM - SIN	PM - SIN	AM - SIN	PM - SIN
PM - SIN	PM - CON	PM - SIN	PM - CON	PM - SIN	PM - CON
AM - CON	AM - SIN	AM - CON	AM - SIN	AM - CON	AM - SIN

AM - CON: corte de la mañana con inoculante, AM - SIN: corte de la mañana sin inoculante, PM - CON: corte de la tarde con inoculante y PM - SIN: corte de la tarde sin inoculante

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cosecha del forraje y elaboración de los ensilajes

El forraje fresco se cosechó cuando cada parcela de alfalfa alcanzó el 10% de floración, entre el 18 de noviembre y el 21 de diciembre de 2016; las condiciones climáticas de los días en que el material fresco fue cosechado y ensilado se presentan en el Cuadro III. Entre el establecimiento y el ensilado, las parcelas de alfalfa fueron sometidas a 4 cortes. Cada parcela se dividió en 12 subparcelas y el forraje cosechado de cada subparcela se empleó para llenar un silo experimental. Con una densidad de siembra de 25 kg/ha, 2 parcelas fueron encaladas (6 ton/ha) y las 3 fueron fertilizadas (superfosfato 400 kg/ha, hiperfosfato + boro 200 kg/ha, KCl 500 kg/ha, NPK 15 15 15 150 kg/ha el 1° de julio del 2015. Los factores aplicados, correspondientes al arreglo 2x2, fueron el momento de corte (AM o PM) y la aplicación o no de inoculante (CON o SIN). Los cortes del forraje se realizaron, en todos los casos a las 08:00 h (AM) y a las 14:00 h (PM). Cada combinación de factores se asignó al azar a 3 subparcelas de cada parcela; así, las parcelas se consideraron réplicas y los microsilos elaborados con forraje de cada subparcela se consideraron unidades de muestreo. El inoculante aplicado en CON fue uno de uso comercial (SIL-ALL® 4x4, Lallemand Brasil Ltda. Chácaras São Pedro, Brasil), que contiene *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus salivarius*, dióxido de silicio, amilasa, celulasa, hemicelulasa y xilanasa. Cada g contiene bacterias ácido-lácticas no menos de 2.1×10^{10} UFC/g. Vehículo excipientes. 1 g, dosis: de 5 a 10 g/ton de forraje a ensilar.

Cuadro III. Condiciones climáticas durante la elaboración de los ensilajes de alfalfa en el año 2016

<i>Datos climáticos</i>	<i>Fecha de corte y elaboración microsilos</i>		
	<i>18 de nov</i>	<i>28 de nov</i>	<i>21 de dic</i>
Temperatura máxima °C	20	25.2	35.2
Temperatura promedio °C	13.2	20	26.6
Temperatura mínima °C	6.4	14.8	17.9
Humedad relativa máxima %	87	92	64
Humedad relativa mínima %	34	53	24
Precipitación mm	0	0	0
Heliofanía h	12.6	9.4	13.5

Fuente: INIA estación meteorológica La Estanzuela, 2016

La alfalfa fue cosechada cuando la etapa de madurez alcanzó el 10% de floración o botón floral, criterio que se utiliza para lograr una maximizar la relación entre calidad y biomasa (INIA 2016), realizando el corte a una altura de 5 cm del suelo utilizando una cortadora-picadora de pasto, e inmediatamente fue ensilada.

El forraje picado (tamaño de partícula 1,5-2 cm) se compactó entre las 08:00 y 14:00 del mismo día mediante una prensa manual hasta una densidad de $0,7 \text{ kg/m}^3$ (12 kg de MF en cada microsilo) en recipientes plásticos de 18 L (14 cm de alto x 11.5 cm de diámetro) con tapa hermética y provistos de un tubo para el drenaje de efluentes. El inoculante fue reconstituido en agua destilada y aplicado (en los tratamientos que correspondiera), según

las recomendaciones del fabricante. Una vez elaborados, los microsilos se almacenaron a una temperatura promedio de 22 grados centígrados.

Cuadro IV. Composición química de la alfalfa original utilizada para la elaboración de los ensilajes

<i>Parámetro</i>	<i>PARCELA 1</i> <i>(corte 18/11)</i>		<i>PARCELA 2</i> <i>(corte 28/11)</i>		<i>PARCELA 3</i> <i>(corte 21/12)</i>	
	AM	PM	AM	PM	AM	PM
	% en base a MS					
MS	24.70	20.89	22.33	21.12	22.08	20.49
MO	90.02	90.81	87.67	88.54	92.12	90.16
PB	25.54	23.52	23.79	24.32	26.05	25.24
FDN	39.38	37.21	34.72	34.58	37.72	34.54
FDA	21.99	23.21	22.57	23.18	20.08	19.31
HC	17.39	13.99	12.15	11.40	18.60	14.27
Azúcares						
solubles	5.78	8.52	9.19	12.53	8.16	10.28
NIDN	1.15	0.95	0.92	0.87	1.05	1.14
NIDA	0.37	0.35	0.24	0.24	0.26	0.27
NNP	1.71	1.80	1.51	1.33	1.96	1.47
PI	1.63	1.23	1.92	2.17	1.69	2.06

AM: corte de alfalfa a las 8:00 hs, PM: corte de alfalfa a las 14:00 hs, MS: Materia seca, MO: Materia orgánica, PB: Proteína bruta, N: nitrógeno total, FDN: Fibra detergente neutro, FDA: Fibra detergente ácido, HC: Hemicelulosa, NIDN: Nitrógeno insoluble en detergente neutro; NIDA: Nitrógeno insoluble en detergente ácido, NNP: Nitrógeno no proteico; PI: Proteína insoluble

5.2. Análisis de composición química

Una vez transcurridos 60 días de almacenamiento, se procedió a la apertura y toma de muestras de cada microsilo. 10g de muestra de ensilaje fueron inmediatamente macerados en 100 ml de agua destilada por 5 minutos y el pH del macerado se midió utilizando un pHmetro digital (Oakton® eChem Instruments Pte. Ltd., Singapore). El resto de la muestra fue congelada a -20°C para su posterior análisis. Las muestras de ensilajes y pastura fresca fueron secadas a 60° C por 48 horas y molidas a 1mm (Fritsch GMBH, Idar-Oberstein, Alemania). Se determinó el contenido de MS, cenizas (Cz) y PB (N x 6.25), según A.O.A.C. (1990, procedimientos 934.01, 942.05, 954.01) y la proporción de MO se calculó como 100 - % Cz. Los contenidos de FDN y FDA se analizaron de acuerdo con Van Soest et al. (1991) de forma no secuencial, sin adición de α -amilasa y sin sulfito de sodio, en un analizador de fibra (ANKOM modelo A200I Technology Corporation, Macedon, NY, USA) y los resultados expresados con la ceniza residual. La proporción de hemicelulosa (HC) se estimó como la diferencia entre FDN y FDA. Se determinaron los contenidos de N no proteico (NNP), proteína soluble (PS), (NIDN) y (NIDA) según Licitra et al. (1996). Los azúcares solubles se midieron mediante la técnica descrita por Yemm y Willis (1954).

Así mismo, en el material ensilado se determinó N-NH₃ y ácidos orgánicos (láctico, acético, butírico y propiónico). El N amoniacal se determinó por destilación directa, como describe Filya (2003). La extracción de la muestra para el análisis de ácidos grasos volátiles (AGV) en cromatografía líquida de alta performance (HPLC), se realizó de acuerdo a Adams et al., (1984) y su determinación fue realizada en un (HPLC, Dionex Ultimate[®] 3000) usando una columna Acclaim, C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm y a 205 nm. siguiendo las indicaciones de Adams et al. (1984), Todas las muestras fueron analizadas por duplicado, aceptando coeficientes de variación de hasta el 5%.

5.3.Utilización digestiva in vitro

Para estimar la utilización digestiva se utilizaron 2 técnicas *in vitro*: digestibilidad verdadera *in vitro* y producción de gas *in vitro*. Para ambas técnicas se utilizaron como donantes de líquido ruminal 2 vacas Jersey, no gestantes ni lactantes, con un peso de (450 ± 5.4 kg) canuladas en saco dorsal del rumen. Las donantes fueron alimentadas con una dieta compuesta por 70% de forraje (ensilaje de alfalfa) y 30% de concentrado (maíz molido). Esta dieta fue ofrecida por 15 días antes del inicio de las incubaciones *in vitro*. El líquido ruminal se colectó de cada animal luego de 8 h del inicio de la comida, filtrado a través 4 capas de un paño de quesería e inmediatamente mezclados para ser utilizados como inóculo.

5.3.1. Digestibilidad verdadera in vitro (IVTD)

Esta determinación se llevó a cabo utilizando un equipo DAISY (ANKOM Technology Corp, Fairport, NY, USA). Se pesó aproximadamente 0,5g de muestra seca y molida a 1 mm en bolsas porosas filtrantes (F57; 50 × 55 mm; ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA) por duplicado. Las bolsas se distribuyeron al azar en 4 frascos de fermentación que contenían 400 mL de inóculo y 1600 mL de solución buffer (Cuadro V) precalentados a 39° C. Luego de un período de incubación de 48h, los frascos se drenaron y las bolsas se enjuagaron con agua corriente para ser sometidas a una digestión en solución detergente neutra. Finalmente las bolsas fueron secadas en estufa a 60°C y pesadas.

Cuadro V. Composición de la solución buffer utilizada para la determinación de la digestibilidad verdadera in vitro

Reactivos y Soluciones	
Solución A (1330 mL/frasco de fermentación)	
KH ₂ PO ₄	10.0 g/litro
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5 g/litro
NaCl	0.5 g/litro
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.1 g/litro
Urea (Grado Reactivo)	0.5 g/litro
Solución B (226 mL/frasco de fermentación)	
Na ₂ CO ₃	15.0 g/litro
Na ₂ S•9H ₂ O	1.0 g/litro

5.3.2. Producción de gas in vitro

Se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Theodorou et al. (1994) modificado por Mauricio et al. (1999). Se introdujeron 0,5 g de sustrato seco molido a 1 mm en 4 frascos de fermentación de 125 mL. Se agregó a cada frasco de fermentación 38 mL de solución basal, 2 mL de solución tampón y 0,5 mL de solución reductora (Cuadro VI). A continuación, fueron tapados con septos de goma butilo y se mantuvieron refrigerados a 4°C durante un periodo de 8 horas antes de la inoculación para permitir la hidratación del sustrato. Previo a la inoculación los frascos, fueron llevados a un baño maría a 39°C donde se mantuvieron por todo el período de mediciones. La extracción como la inoculación con 10 mL de fluido ruminal se realizó a las 10 de la mañana, cada frasco se tapó con septo de goma butilo y fue sellado con precintos de aluminio. Todas las manipulaciones se realizaron bajo un flujo de CO₂. Todas las muestras de los tratamientos fueron incubadas en simultáneo y se realizaron tres corridas, en las que se incluyeron tres blancos sin sustrato (solo conteniendo buffer, solución reductora y líquido ruminal) para la corrección.

Cuadro VI. Composición del medio de incubación libre de N

SOLUCIÓN BASAL (por L de solución)			
KCl	0.6 g		
NaCl	0.6 g		
CaCl₂.2H₂O	0.2 g		
MgSO₄.7H₂O	0.5 g		
		MnCl ₂ .4H ₂ O	0.025 g
		FeSO ₄ .7H ₂ O	0.020 g
		ZnCl ₂	0.025 g
		CuCl ₂ .2H ₂ O	0.025 g
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0.050 g
Solución de oligoelementos	10 mL	SeO ₂	0.050 g
		NiCl ₂ .6H ₂ O	0.250 g
		Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.250 g
		NaVO ₃	0.0314 g
		H ₃ BO ₃	0.250 g
			Disueltos en HCl 0,02M 1L (c.s.p.)
Solución de hemina	de 10 mL	0.1 g disuelto en una pequeña cantidad de NaOH 0.05M y luego 1L(c.s.p.) de H ₂ O destilada hervida con burbujeo de CO ₂	
SOLUCIÓN REDUCTORA			
Na₂S.9H₂O	20.5 g	Disuelto en 1L (c.s.p.) de H ₂ O destilada hervida con burbujeo de CO ₂	
SOLUCIÓN TAMPÓN			
Na₂CO₃	82 g	Disuelto en 1L (c.s.p.) de H ₂ O destilada hervida con burbujeo de CO ₂ , previo al uso 20 min de burbujeo de CO ₂	

Las mediciones de presión de gas se realizaron con un transductor de presión digital (RZ-68601-00, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h luego de la inoculación. Luego de las mediciones se dejaba insertada una aguja para permitir el escape de gas hasta equilibrar con la presión atmosférica y se agitaba suavemente para mezclar el contenido de los frascos. La cantidad de gas en mL fue estimada de acuerdo a la ecuación $V = 4,40P + 0,09P^2$ (V es el volumen de gas en mL y P es la presión observada en psi). Esta ecuación fue obtenida en un experimento previo en condiciones similares; fue realizado en el mismo lugar, utilizando los mismos frascos, empleando la misma composición y cantidad de solución buffer y midiendo la presión con el mismo transductor).

Con los datos obtenidos se calculó el volumen de gas (mL) por g de MS incubada acumulado en los distintos horarios de medición. Además, se calculó la tasa de producción de gas entre los horarios de medición como mL de gas/g de MS por hora.

5.4. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron analizados por un procedimiento mixto mediante PROC MIXED de SAS® (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). El modelo utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + I_j + (C*I)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

donde Y es la variable en estudio, μ es la media general, C el efecto fijo del corte (i = corte AM o PM), I el efecto fijo del agregado de inoculante (j = CON o SIN), C*I la interacción entre ambos factores y ϵ_{ijk} el error residual, en k réplicas (3 parcelas de alfalfa). Las medias fueron separadas por la opción PDIF de LSMEANS de SAS®.

Las variables de la producción de gas *in vitro* (el volumen y la tasa de producción de gas) se analizaron como medidas repetidas con el mismo procedimiento. El modelo utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + H_j + (T*H)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

donde Y es la variable en estudio, μ es la media general, T es el efecto fijo del tratamiento (i= AM CON, AM SIN, PM CON y PM SIN), H es el efecto fijo del horario de medición (j= 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h), T*H la interacción entre ambos efectos fijos y ϵ_{ijk} el error residual, en k réplicas (3 parcelas de alfalfa). Cuando el efecto del horario de medición y de la interacción horario de medición con tratamiento fueron significativos (P>0,05) las medias de los tratamientos fueron comparadas en cada horario de medición mediante LSMEANS de SAS®.

Se analizaron correlaciones (coeficientes de correlación de Pearson, r) entre variables de composición química del forraje original y de composición y fermentación de los ensilajes, así como entre variables de composición química y de utilización digestiva de los ensilajes, utilizando PROC CORR de SAS®.

Las diferencias con P<0,05 fueron consideradas estadísticamente significativas y cuando 0,05<P<0,10 se consideraron tendencias.

6. RESULTADOS

6.1. Composición química del ensilaje

La composición química de los ensilajes se presenta en el Cuadro VII. Los contenidos de MO, PB, N, FDN y HC no fueron afectados por el horario de corte ni por la inoculación. Se observó una interacción entre la hora de corte y la inoculación (P=0,019) en el

contenido de MS de los ensilajes, presentando menor contenido de MS los ensilajes inoculados elaborados en la mañana. Los contenidos de FDA fueron menores cuando se cortó el forraje de tarde (27,9 vs 25,6%; AM y PM respectivamente; $P<0,01$). Los ensilajes cortados en la tarde presentaron mayor contenido de azúcares solubles remanentes que los cortados en la mañana (1,2 vs 2,09; AM y PM respectivamente; $P=0,01$); mientras que la inoculación microbiana no tuvo efecto sobre esta variable.

Cuadro VII. Composición química de ensilajes de alfalfa inoculados o sin inocular elaborados en la mañana o en la tarde.

<i>Hora de corte</i>	AM		PM		<i>P - valor</i>			
<i>Inoculante</i>	CON	SIN	CON	SIN	EEM	hora	inoc.	h x i
<i>Parámetro</i>	% en base a MS							
MS	21.94 ^b	23.14 ^a	23.09 ^a	22.47 ^{ab}	0.65	0.52	0.429	0.019
MO	87.38	88.41	88.04	89.33	1.22	0.26	0.102	0.847
PB	22.19	23.69	22.70	22.19	1.15	0.34	0.332	0.057
N	3.55	3.79	3.62	3.55	0.19	0.29	0.289	0.065
FDN	41.97	39.30	39.62	39.48	3.23	0.33	0.207	0.254
FDA	28.68	27.12	26.00	25.28	1.54	0.01	0.137	0.579
HC	13.31	12.20	13.64	14.22	2.58	0.279	0.808	0.433
Az. Sol.	1.20	1.23	2.03	2.16	0.99	0.01	0.707	0.825

AM: corte de alfalfa a las 8:00 hs, PM: corte de alfalfa a las 14:00 hs, MS: Materia seca, MO: Materia orgánica, PB: Proteína bruta, N: nitrógeno total, FDN: Fibra detergente neutro, FDA: Fibra detergente ácido, HC: Hemicelulosa, Az. Sol: Azúcares solubles, Inoc: Inoculante, (h x i): interacción hora de corte y aplicación de inoculante, EEM: Error estándar de las medias.

6.2. Características de fermentación del ensilaje

En el Cuadro VIII se presentan las variables que describen las características de fermentación de los ensilajes de alfalfa cortados a las 8:00 o 14:00 hs (AM o PM) y ensilado con o sin inoculación (CON o SIN). Los ensilajes elaborados con alfalfa cortada en la tarde presentaron menores valores de pH que los elaborados en la mañana (4,46 vs 4,37, AM y PM respectivamente; $P<0,01$). Asimismo, los ensilajes cortados en la tarde presentaron menores concentraciones de N-NH₃ comparados con los ensilajes elaborados con alfalfa cortada en la mañana (2,37 vs 2,19%, AM y PM respectivamente; $P<0,05$). Sobre la concentración de ácido láctico se puede observar un efecto de la interacción entre la hora de corte y la aplicación de inoculante ($P=0,02$), los valores más altos se observaron en los ensilajes elaborados en la mañana con inoculante y en la tarde sin inoculante.

Los contenidos de NIDN, NIDA, NNP, PI y N-NH₃ del % del N total no fueron afectados por el horario de corte ni por la inoculación.

Cuadro VIII. Características de fermentación y digestibilidad verdadera *in vitro* (IVTD) de ensilajes de alfalfa inoculados y sin inocular elaborados en la mañana y en la tarde

<i>Hora de corte</i>	AM		PM		P - valor			
<i>Inoculante</i>	CON	SIN	CON	SIN	EEM	hora	inoc	h x i
<i>Parámetro</i>	% en base a MS							
pH	4.47	4.44	4.36	4.37	0.05	0.001	0.52	0.41
NIDN	0.60	0.60	0.56	0.58	0.08	0.43	0.77	0.86
NIDA	0.35	0.33	0.34	0.32	0.02	0.51	0.27	0.82
NNP	2.03	2.20	1.99	1.89	0.16	0.10	0.73	0.21
PI	1.01	1.04	1.14	1.15	0.11	0.07	0.76	0.87
NH₃	2.37	2.38	2.17	2.21	0.18	0.02	0.70	0.83
NH₃NT	10.72	10.10	9.68	9.99	0.91	0.13	0.68	0.22
Acético	8.16	7.64	7.14	6.46	0.56	0.05	0.28	0.88
Propiónico	1.26	0.40	0.70	0.76	0.26	0.71	0.13	0.09
Butírico	1.55	1.03	0.84	1.07	0.53	0.33	0.67	0.28
Láctico	13.46 ^a	11.94 ^b	12.60 ^{ab}	13.36 ^a	0.84	0.56	0.42	0.02
<i>Parámetro</i>								
IVTD (%)	71.54	75.20	75.91	76.27	1.83	0.03	0.10	0.17

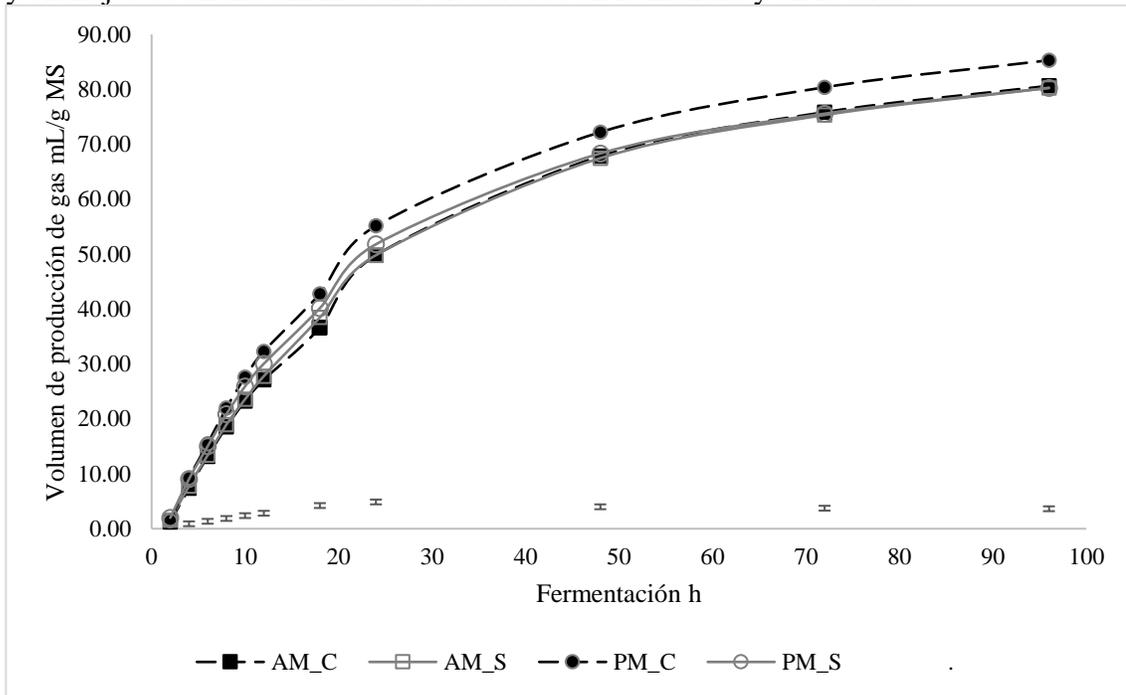
AM: Corte de la alfalfa a las 8:00 hs, PM: Corte de la alfalfa a las 14 hs NIDN: Nitrógeno insoluble en fibra detergente neutro, NIDA: Nitrógeno insoluble en fibra detergente ácido, NNP: Nitrógeno no proteico, PI: Proteína insoluble, NH₃ Concentración de nitrógeno amoniacal, N-NH₃ de %NT: Concentración de nitrógeno amoniacal expresado en porcentaje del N total, IVTD: digestibilidad *in vitro* de la MS, EEM: Error estándar de las medias, (h x i): interacción hora de corte e inoculante

6.3. Utilización digestiva

Los resultados de digestibilidad verdadera *in vitro* (IVTD) de la MS se presentan en el Cuadro VIII. Los ensilajes cosechados en la tarde se digirieron más que los ensilajes cosechados en la mañana (73,4 vs 76,1%; AM y PM respectivamente, P<0,05).

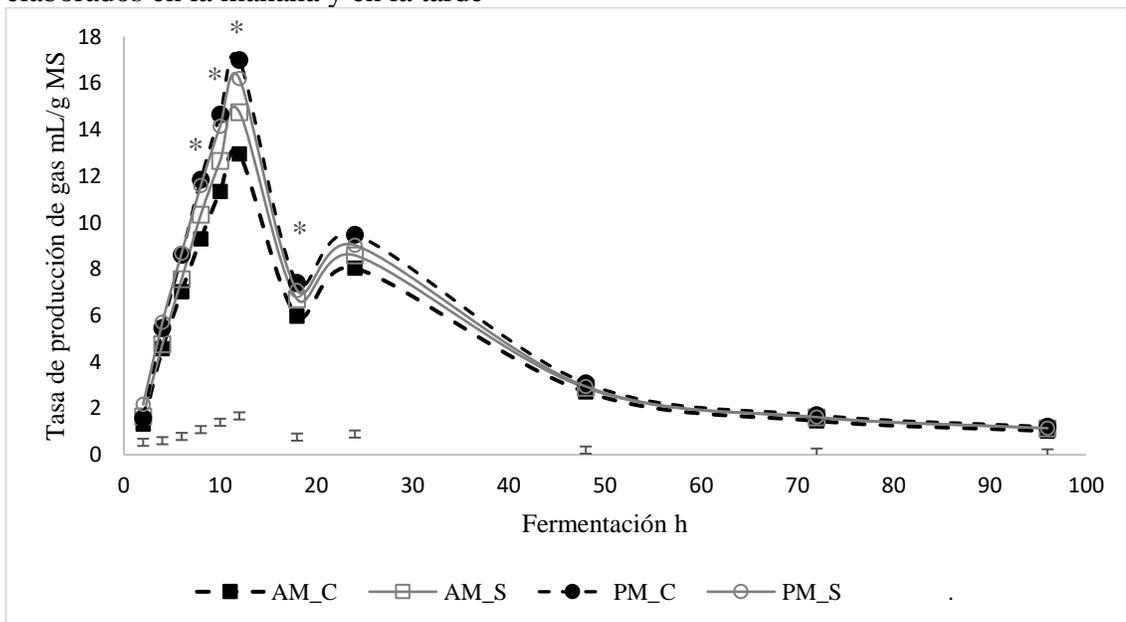
Dentro de las características de fermentación, el volumen de gas acumulado de los 4 tratamientos fue similar en todos los horarios de medida (Figura 3). En la figura 4 se presenta la evolución de la tasa de producción de gas *in vitro*. El horario de corte PM presentó mayor velocidad de producción de gas entre las 8 y 18 hs de incubación.

Figura 3. Volumen acumulado de producción de gas de ensilajes de alfalfa inoculados y ensilajes de alfalfa sin inocular elaborados en la mañana y en la tarde



AM_C: ensilajes elaboradas a las 8:00 h con inoculante, AM_S: ensilajes elaboradas a las 8:00 h sin inoculante PM_C: ensilajes elaboradas a las 14:00 h con inoculante y PM_S: ensilajes elaboradas a las 14:00 h sin inoculante

Figura 4. Tasa de producción de gas de ensilajes de alfalfa inoculados y sin inocular elaborados en la mañana y en la tarde



AM_C: ensilajes elaboradas a las 8:00 h con inoculante, AM_S: ensilajes elaboradas a las 8:00 h sin inoculante PM_C: ensilajes elaboradas a las 14:00 h con inoculante y PM_S: ensilajes elaboradas a las 14:00 h sin inoculante.

6.4 Correlaciones entre variables de la composición química, de las características de la fermentación y de la utilización digestiva del forraje original y de los ensilajes

La proporción de azúcares solubles fue la única variable de la composición química del forraje original que se correlacionó con variables de los ensilajes. Así, el contenido de azúcares solubles de la alfalfa fresca se correlacionó positivamente con el contenido de azúcares solubles remanentes en el ensilaje ($R^2=0,604$; $P<0,001$), negativamente con el pH de los ensilajes ($R^2=-0,487$; $P=0,003$), la concentración de NNP ($R^2=-0,452$; $P=0,006$) y la proporción de PB de los ensilajes ($R^2=-0,339$; $P=0,043$). Además, se observó una correlación entre las concentraciones de ácido láctico y de ácido acético de los ensilajes ($R^2=0,381$; $P=0,022$). La digestibilidad verdadera in vitro correlacionó positivamente con el contenido de PB ($R^2=0,460$; $P=0,043$) y negativamente con los niveles de FDA ($R^2=-0,342$; $P=0,042$) de los ensilajes.

7. DISCUSIÓN

Se partió de un forraje inicial de alta calidad que coincide con las características buscadas al definir el momento de cosecha. El mismo fue fijado con el cultivo en el 10% de floración o botón floral, criterio que se utiliza para lograr maximizar la relación entre valor nutritivo y biomasa (INIA 2016). Es de destacar que la alfalfa utilizada presentó contenidos de FND inferiores a 40% y contenidos de PB entre 23,5 y 26,1% de la MS. Es sumamente interesante y desafiante conservar este tipo de forraje preservando las cualidades del mismo. Como era previsible, los contenidos de azúcares solubles del forraje fresco fueron mayores en los cortes de la tarde, con incrementos de entre 26 y 48%.

Al analizar los resultados en cuanto a cómo los tratamientos afectaron la composición química de los ensilajes, se evidenció que la inoculación no provocó ningún cambio en los productos finales mientras que el horario de corte fue determinante para algunos parámetros evaluados. Dos resultados se destacan, no por inesperados, y son el aumento de los Az. Sol. remanentes en los ensilajes y la disminución en el contenido de FDA de los ensilajes elaborados con materiales cosechados de tarde. Trabajos como los de Fisher et al. (2002), Filya et al. (2007), Muck et al. (2007) y Brito et al. (2009) comunicaban cambios en el mismo sentido, pero en la totalidad de las fracciones fibrosa (FDN, FDA, celulosa, HC, lignina y FDA). Los cambios en las fracciones de fibra seguramente se deben a un efecto de dilución por el aumento de los azúcares solubles del ensilaje en el corte PM. En este trabajo los contenidos de hemicelulosas no fueron afectados en los ensilajes de corte AM y PM. La hidrólisis tanto de la hemicelulosa como del almidón resultan ventajosas desde el punto de vista de la fermentación del ensilaje ya que aportan carbohidratos simples, los cuales constituyen sustratos fermentables en estados fenológicos en los cuales el nivel de azúcares solubles es bajo como el caso de la alfalfa. Sin embargo, representa una desventaja desde el punto de vista de la calidad nutricional del ensilaje ya que reduce el valor nutritivo y la degradabilidad ruminal del mismo. Los azúcares solubles aumentaron conforme se retrasó el corte para la tarde como consecuencia del proceso de fotosíntesis que provoca un aumento neto en la concentración de azúcares solubles en la planta durante el día, debido a que la tasa de fotosíntesis excede

el ritmo de respiración y de fijación de carbono (Smith, 1973). Concuerdan estos resultados con los de trabajos realizados en la región (Cajarville et al., 2012; Repetto et al., 2006; Antúnez y Caramelli, 2009) para pasturas templadas, tanto para cultivos puros como para mezclas de gramíneas y leguminosas. En otras latitudes Holt y Hilst (1969) encontraron que los carbohidratos solubles en agua en alfalfa de tercer crecimiento fueron en promedio las más bajas a las 6 AM, aumentaron hasta 12 del medio día y disminuyó ligeramente a partir de las 6 PM. Y se debe a que la planta acumula azúcares previos a la síntesis de almidón (McDonald, 1981). Similares resultados reportan Filya et al 2007 y Brito et al 2009. Un aspecto a destacar es que las diferencias reportadas sobre el contenido inicial de azúcares del forraje original cosechado, se mantienen en los materiales luego de ser ensilados, siendo los azúcares remanentes mayores en los ensilajes de la tarde. Se debe considerar que los valores de azúcares remanentes son muy bajos, ya que la mayoría de los mismos, se utilizan en el proceso de fermentación del ensilaje. Contrario a lo esperado, no se observaron diferencias en el contenido en MS de los materiales. Sin embargo, son coincidentes estos resultados con los descritos por Lechtenberg et al (1971), que comunican que no hay cambios diurnos marcados o pérdidas nocturnas en la MS, pero sí un aumento pequeño pero significativo en los azúcares y el almidón desde la mañana hasta la tarde. También podría explicarse la ausencia de cambios en el contenido en MS a que se trabajó en plena primavera, una época del año con mucha humedad relativa, y a que el corte de la tarde fue realizado a las 14 horas, lo que llevó a que el forraje no estuviera muchas horas al sol.

Como se expresó al inicio de la discusión es un importante desafío conservar un material forrajero de la calidad del utilizado en este experimento en las mejores condiciones. En el proceso de ensilaje se pueden ocasionar pérdidas tanto de MS, como de nutrientes y deterioros que también pueden afectar algunas características organolépticas que inciden sobre el consumo animal y pueden propiciar la contaminación principalmente con hongos. En ese sentido evaluar cómo los distintos tratamientos influyen sobre dicho proceso fermentativo y el producto final es un tema central. El primer comentario es que en este experimento los parámetros que tradicionalmente son utilizados para evaluar la calidad del proceso del ensilaje muestran valores muy buenos para todos los tratamientos. Según referentes en la temática como Demarquilly y Andrieu (1980), Harrison et al. (1992) y McDonald et al. (2011), los buenos ensilajes de pasturas deberían mostrar un pH entre 4 y 4,5, N soluble por debajo del 50% y un amplio predominio del ácido láctico sobre los demás ácidos. En nuestro trabajo, estos valores se observaron para todos los materiales. Sin embargo, al comparar los tratamientos se observan diferencias menores en lo cuantitativo pero muy significativas y trascendentes, evidenciándose efectos del horario de corte y no de la inclusión del inoculante. Claramente estos resultados que no muestran efecto de la inoculación, se contraponen a los de varios trabajos que comunican que el uso de aditivos en base a BAL (Filya et al., 2007; Muck et al., 2007; Contreras-Govea et al., 2011; Jatkauskas et al., 2015) mejoran el proceso de ensilaje. Por su parte, los ensilajes elaborados con material cosechado en la tarde mostraron resultados a destacar. La diferencia más importante encontrada en este trabajo fue el menor pH logrado por los ensilajes de alfalfa cortada en la tarde y también el menor contenido en N-NH₃ y ácido acético, todos indicadores de una muy buena fermentación. Sin duda, y así lo corroboran las correlaciones, el contenido en azúcares, se relaciona de manera significativa con los buenos valores de pH, de N y de composición porcentual de ácido láctico.

Un aspecto central en la evaluación de estos alimentos es el relacionado al aprovechamiento digestivo por parte de los rumiantes. En este trabajo dicha valoración se realizó a través de dos ensayos, una prueba clásica de digestibilidad *in vitro* y un experimento de producción de gas *in vitro*. La digestibilidad *in vitro* de la MS fue significativamente mayor en los ensilajes de materiales cortados en la tarde. La mayor digestibilidad de los ensilajes de la tarde queda explicada por lo menores valores de FAD y así lo establece la correlación significativa encontrada entre estos 2 parámetros. Similares resultados comunican otros autores (Fisher et al., 2002; Pelletier et al., 2010; Tremblay et al., 2014) en ensilajes de alfalfa cortadas de tarde. La prueba de producción de gas *in vitro* aportó resultados en el mismo sentido. La cinética de producción de gas que es reflejo de la velocidad con que se degradan los sustratos fue mayor para los materiales PM entre las 8 y las 18 horas de incubación. En cuanto al efecto de los componentes de la pared celular sobre la degradabilidad ruminal, varios trabajos han reportado que la FND, FAD y lignina se correlacionan negativamente con la digestión de la pared celular (Cherney et al., 1983) y con la producción de gas *in vitro* (Getachew et al., 2004; Kamalak et al., 2005; Coblenz et al., 2013). Por otro lado, Cajarville et al. (2015) observaron un aumento en la tasa de producción de gas *in vitro* en festuca (*Festuca arundinacea*) conforme aumentó el contenido de azúcares solubles a lo largo del día. Según Contreras-Govea et al. (2011), en ensilajes de alfalfa esta variación diurna en la digestibilidad presumiblemente refleja en cierta medida la acumulación y disminución diaria de los carbohidratos solubles, siendo este dato importante en determinar qué tan rápido se alcanza un pH deseable en el proceso de ensilado (Melvin, 1965). Donde no hay concordancia entre los trabajos es en el efecto al inocular los materiales. Como en los anteriores parámetros evaluados, en el presente trabajo la inoculación no demostró efecto alguno sobre la digestibilidad de los materiales ni sobre la capacidad de degradar sustratos. Lo mismo reportan autores como Fisher et al. (2002), Pelletier et al. (2010) y Tremblay et al. (2014). Sin embargo, otros autores han propuesto el uso de sustancias aditivas en base a BAL (Filya et al., 2007; Contreras-Govea et al., 2011; Jatkauskas et al., 2015) como mejoradores de la fermentación y el valor nutritivo de los ensilajes. Ellis et al. (2016) observaron en silos mixtos de ryegrass y trébol, silos de maíz y silos de ryegrass que la adición de BAL afectaron significativamente la producción de gas acumulada. Muck et al. (2007), quienes realizaron un estudio *in vitro* con ensilaje de alfalfa inoculado con 14 inoculantes microbianos más un control no inoculado, encontraron que algunos inoculantes aplicados a los ensilajes de alfalfa produjeron menos y algunos otros produjeron más gases que el tratamiento control, lo que sugiere que los efectos de los inoculantes microbianos no producen los mismos efectos cuando se determina la fermentación *in vitro*.

Una de las posibles explicaciones a la ausencia de efecto en la aplicación del inoculante en el presente trabajo para todos los parámetros evaluados, puede estar por el lado de los buenos resultados de fermentación que se lograron para la totalidad de los ensilajes, en parte dado por las excelentes condiciones de compactación y anaerobiosis lograda para todos los materiales en los silos experimentales. Esto, sin embargo, como quedó demostrado, no fue impedimento para que el efecto del horario de corte mostrara claros efectos positivos. Otra explicación es la propuesta por Pang et al. (2011), que estudiaron qué tipo de población microbiana acompañaba a cada cultivo. Estos autores comunicaron

que las especies y cepas de lactobacilos naturales se distribuyen en forma muy diferente en silos de maíz, sorgo, arroz o alfalfa. Y que, si bien en arroz y sorgo se lograba una mejor fermentación al utilizar lactobacilos, en alfalfa la abundancia de éstos no se relacionaba con una buena calidad de fermentación. Sin duda que es un tema para profundizar en la investigación por parte de instituciones de investigación.

8. CONCLUSION

Los resultados permiten concluir que el hecho de cosechar el cultivo de alfalfa en el horario de la tarde mejoró las características del ensilaje en cuanto a composición química, calidad de la fermentación y de la conservación y aprovechamiento digestivo del forraje ensilado. La inoculación con BAL no provocó ningún efecto sobre los parámetros estudiados.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams R.F; Jones R.L; Conway P.L. (1984). High performance liquid chromatography of microbial acid metabolites, *Journal of Chromatography*, 336, 125-137
2. Antúnez M; Caramelli A. (2009). Variación en la composición química y producción de gas in vitro de pasturas de acuerdo al horario de corte. Tesis de grado. Montevideo. Facultad de Veterinaria. 43 p.
3. AOAC (1990). *Official Methods of Analysis (Volume 1)*, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, VA.
4. Asa, R., Tanaka, A., Uehara, A., Shinzato, I., Toride, Y., Usui, N., Hirakawa, K., Takahashi, J. (2010). Effects of protease-resistant antimicrobial substances produced by lactic acid bacteria on rumen methanogenesis. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23, 700–707.
5. Beauchemin K. A., Yang W. Z. (2005). Effects of physically effective fiber on intake, chewing activity, and ruminal acidosis for dairy cows fed diets based on corn silage. *J. Dairy Sci.* 88: 2117-2129.
6. Boisen, K. K., Sonon R. N., Dalke B., Pope R., Riley J. G. and Laytimi A. (1992). Evaluation of inoculant and NPN silage additives. A summary of 26 trials and 65 farm scale silages. *Rept. Prog. Kansas State Univ.*
7. Brito A.F., Tremblay G.F., Lapierre H., Bertrand A., Castonguay Y., Bélanger G., Michaud R., Benchaar C., Ouellet D.R., Berthiaume R. (2009). Alfalfa cut at sundown and harvested as baleage increases bacterial protein synthesis in late-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:1092–1107
8. Britos A., Repetto J.L., Garcarena D., Cajarville C. (2007) Efecto del suero de queso como aditivo de ensilajes de pastura sobre la conservación, los azúcares solubles y la producción de gas in vitro. *Agrociencia* 11:72-77.
9. Britt D.G., Huber J.T. (1975). Fungal growth during fermentation and re-fermentation of non-protein nitrogen treated corn silage. *J. Dairy Sci.* 58: 1666-1671.
10. Burns J.C., Fisher D.S., Mayland H.F. (2007). Diurnal shifts in nutritive value of alfalfa harvested as hay and evaluated by animal intake and digestion. *Crop Sci.* 47:2190-2197.

11. Cajarville C., Britos A., Garcarena D., Repetto J.L. (2012) Temperate forages ensiled with molasses or fresh cheese whey: Effects on conservation quality, effluent losses and ruminal degradation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 171:14-19.
12. Cajarville C., Stirling S., Repetto J.L. (2014). Ensilajes de pastura de alta calidad: asignatura pendiente en el camino de intensificación de los sistemas lecheros. Últimos avances tecnológicos para mejorar el proceso de elaboración. XLII Jornadas Uruguayas Buiatría. Paysandú, Uruguay.
13. Cajarville C., Britos A., Errandonea N., Gutiérrez L., Cozzolino D., Repetto J.L. (2015). Diurnal changes in water-soluble carbohydrate concentration in lucerne and tall fescue in autumn and the effects on in vitro fermentation. *New Zeal. J. Agric. Res.* 58:281-291
14. Canale A., Valente M.E., Ciotti A. (1984) Determination of volatile carboxylic acids (C1–C5) and lactic acid in aqueous acid extracts of silage by high performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 35:1178–1182.
15. Cao Y., Takahashi T., Horiguchi K., Yoshida N. (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. *Grass Sci.* 56, 19–25.
16. Cherney J.H., Marten G.C., Goodrich R.D. (1983). Rate and extent of cell wall digestion of total forage and morphological components of oats and barley. *Crop Sci.* 23:213–216.
17. Charmley E. (2001). Towards improved silage quality-a review. *Can. J. Anim. Sci.* 81:157-168.
18. Charmley E., McQueen R. E., Veira D.M. (1994). Influence of carboxylic salts (Maxgrass) on silage conservation, and voluntary intake and growth of steers given Lucerne silage. *Anim. Prod.* 58: 221-229.
19. Coblenz W.K., Nellis S.E., Hoffman P.C., Hall M.B., Weimer P.J., Esser N.M., Bertram M.G. (2013). Unique interrelationships between fiber composition, water-soluble carbohydrates, and in vitro gas production for fall-grown oat forages. *J. Dairy Sci.* 96:7195–209.
20. Contreras-Govea F.E., Muck R.E., Mertens D.R., Weimer P.J. (2011). Microbial inoculant effects on silage and in vitro ruminal fermentation, and microbial biomass estimation for alfalfa, bmr corn, and corn silage. *Anim Feed Sci Technol* 163: 2-10.
21. Davies D.R, Merry R.J, Williams A.P., Bakewell E.L., Leemans D.K., Tweed J.K.S. (1998). Nutrition, feeding, and calves. Proteolysis during ensilage of forages varying in soluble sugar content. *J. Dairy Sci.* 81: 444–453.
22. DIEA (2005). Anuario estadístico agropecuario 2005. Ministerio de ganadería agricultura y pesca. Dirección de estadísticas agropecuarias, Uruguay. Disponible en <http://www.magap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2005>.
23. DIEA (2015) Anuario estadístico agropecuario 2015. Ministerio de ganadería agricultura y pesca. Dirección de estadísticas agropecuarias, Uruguay. Disponible en <http://www.magap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2015>.
24. Downing T.W., Buysérie A, Gamroth M., French P. (2008). Effect of water soluble carbohydrates on fermentation characteristics of ensiled perennial ryegrass. *The Professional Animal Scientist* 24: 35–39.
25. Ellis J.L., Bannink A., Hindrichsend I.K., Kinleya R.D., Pellikaana W.F., Milorad N., Dijkstra J. (2016). The effect of lactic acid bacteria included as a probiotic or silage inoculant on in vitro rumen digestibility, total gas and methane production. *Animal Feed Sci. Technol* 211: 61–74

26. Filya I. (2003). The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. *J. Dairy Sci.* 86:3575–3581.
27. Filya I., Muck R.E., Contreras-Govea F.E. (2007). Inoculant effects on alfalfa silage: Fermentation products and nutritive value. *J. Dairy Sci.* 90:5108–5114.
28. Fisher S.D., Mayland H.F., Burns J.C. (2002). Variation in ruminant preference for alfalfa hays cut at sunup and sundown. *Crop Sci.* 42:231-237.
29. García González H., De la Rosa Martínez R., Erives Orozco A., Núñez Perea H., Morales López B., Licón Holguín C. (2011). Evaluación de la calidad del forraje para rumiantes con una técnica de simulación. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, p. 14.
30. González O.R. (2012). Ensilaje de alfalfa (*Medicago sativa* L.) y ovillo (*Dactylis glomerata* L.) en contenedores de 200 litros durante la época de lluvias. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Chapingo. México.
31. Getachew G., Robinson P.H., DePeters E.J., Taylor S.J. (2004). Relationships between chemical composition, dry matter degradation and in vitro gas production of several ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 111:57–71.
32. Haigh P.M. (1990). Effect of herbage water soluble carbohydrate content and weather conditions at ensilage on the fermentation of grass silages made on commercial farms. *Grass and Forage Sci.* 45: 263-271.
33. Harrison S.P., Mytton L.R., Skot L., Dye M., Cresswell A. (1992). Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. *Canadian Journal of Microbiology* 38: 1009-1015.
34. Hassanat F, Mustafa A.F., Seguin P. (2006). Chemical composition and ensiling characteristics of normal and brown midrib pearl millet harvested at two stages of development in south western Québec. *Can. J. Anim. Sci.* 86: 71–80.
35. Henderson N. (1993). Silage additives. *Anim. Feed Sci. Technol.* 45:35-56
36. Hiriart M. (2008). Ensilados. *Procesamiento y Calidad*. Editorial Trillas. 2da edición. México. p. 110.
37. Holt D.A., Hilst A.R. (1969). Daily variation in carbohydrate content of selected forage crop. *Agron. J.* 61:239.
38. Huber J.T., Foldager J., Smith N.E. (1979). Nitrogen distribution in corn silage treated with varying levels of ammonia. *J. Anim. Sci.* 48: 1509-1515.
39. INIA (2016). Banco datos agroclimáticos. Instituto nacional de investigación agropecuaria, Uruguay. Disponible en: <http://www.inia.uy/gras/Clima/Banco-datos-agroclimatico>
40. Jatkauskas J., Vrotniakienė V, Lanckriet A. (2015). The effect of different types of inoculants on the characteristics of alfalfa, ryegrass and red clover/ryegrass/timothy silage. *Zemdirbyste-Agriculture*, vol. 102, No. 1, p. 95–102.
41. Johnson C.O.L.E., Huber J.T., Bergen W.G. (1982). Influence of ammonia treatment and time of ensiling on proteolysis in corn silage. *J. Dairy Sci.* 65: 1740-1747.
42. Kamalak A., Canbolat O., Gurbuz Y., Erol A., Ozay O. (2005). Effect of maturity stage on chemical composition, in vitro and in situ dry matter degradation of tumbleweed hay (*Gundelia tournefortii* L.). *Small Rumin. Res.* 58:149–156
43. Kent B. (1988). Effect of bacterial inoculant on alfalfa haylage: ensiling characteristics and milk production response when fed to dairy cows in early lactation. Theses master of science. Utah State University, EEUU.

44. Kolver E.S., Muller L.D. (1998). Performance and nutrient intake of high producing Holstein cow consuming pasture or a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* 81, 1403-1411
45. Kung L. Jr. (2000). Silage fermentation and additives. Originally published in the 2000-2001 Direct fed microbial, enzyme & forage additives compendium. Miller Publishing Co., Minnetonka, MN.
<http://stephenville.tamu.edu/~butler/foragesoftexaslhaysilage/silagemngt.pdf>
46. Kung L. Jr., Satter L.D., Jones B.A., Genin K.W., Sudoma A.L., Enders G.L. Jr., Kim H.S. (1987). Microbial inoculation of low moisture alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 70:2069.
47. Kung L. Jr., Taylor C.C., Lynch M.P., Neylon L. M. (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.
48. Lechtenberg V.L., Holt D.A., Youngberg H.W. (1971). Diurnal Variation in Nonstructural Carbohydrates, In Vitro Digestibility, and Leaf to Stem Ratio of Alfalfa. *Agronomy Journal*, vol. 63, 719-724
49. Licitra G., Hernandez T.M., Van Soest P.J. (1996). Standardization of procedures of nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 57:347–358.
50. Liu C., Lai Y., Lu X., Guo P., Luo H. (2016). Effect of lactic acid bacteria inoculants on alfalfa (*Medicago sativa* L.) silage quality: assessment of degradation (in situ) and gas production (in vitro). *Journal of Integrative Agriculture* 15(12): 2834–2841
51. McDonald P. (1981). *The biochemistry of silage*. John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, UK.
52. McDonald P., Henderson A.R., Ralston I. (1973). Energy changes during ensilage. *J. Sci. Food Agric.* 24:827.
53. McDonald P., Henderson A.R., Heron S.J.E. (1991). *The biochemistry of silage*. 2nd ed. Chalcombe Publications, Bucks, Great Britain.
54. McDonald P., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A., Edwards R.A., Sinclair L.A., Wilkinson R.G. (2011). *Animal Nutrition*. Ed. Pearson 7^a ed. Canadá, USA.
55. Merry R.J., Lee M.R.F., Davies D. R., Dewhurst R.J., Moorby J.M., Scollan N.D., Theodorou M.K. (2006). Effects of high-sugar ryegrass silage and mixtures with red clover silage on ruminant digestion. 1. In vitro and in vivo studies of nitrogen utilization. *J. Anim. Sci.* 84: 3049-3060.
56. Mertens D. R. (1997). Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 1463–1481.
57. Melvin J.F. (1965). Variation in the carbohydrates content of lucerne and effect on ensilage. *Aust. J. Agric. Res.* 16:951.
58. Muck R.E., Kung L. (2007). Silage production. In: *Forages: The science of grassland agriculture*. Barnes, R. F., C. J. Nelson, K. J. Moores, and M. Collins, eds. 6th Edition. Volume II. p. 617-633.
59. Muck R.E., Kung, L. (1997). Effects of silage additives on ensiling. pp. 42-43 in U. S. Dairy Forage Res. Center 1996 Res. Summaries.
60. Nadeau E.M.G., Russel L.R., Buxton D. R. (2000a). Intake, digestibility, and composition of orchardgrass and alfalfa silages treated with cellulose, inoculant, and formic acid fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 78: 2980-2989.
61. Nadeau E.M.G, Buxton D.R., Russel J.R., Allison M.J., Young J.W. (2000b). Enzyme, bacterial inoculant, and formic acid effects on silage composition of Orchardgrass and Alfalfa. *J. Dairy Sci.* 83: 1487-1502.

62. Nocek, J.E. (1997). Bovine acidosis: Implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80: 1005 – 1028.
63. NRC (National Research Council). (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*, 7th
64. O'Brien M., Hashimoto T., Senda A., Nishida T., Takahashi J. (2013). The impact of *Lactobacillus plantarum* TUA1490L supernatant on in vitro rumen methanogenesis and fermentation. *Anaerobe* 22, 137–140.
65. Oliveira A.S., Weinberg Z.G., Ogunade I.M., Cervantes A.A.P., Arriola K.G, Jiang Y., Kim D., Li X., Gonçalves M.C.M., Vyas D., Adesogan A.T. (2017) Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:4587–4603.
66. Pahlow G., Muck R.E., Driehuis F., Oude S. J., Elferink W.H., Spoelstra S.F. (2003). In: *Silage science and technology*. Buxton, D. R., R. E. Muck, and J. H. Harrison, eds. American Society of Agronomy, Inc., Wisconsin, USA p. 31-93.
67. Pang H., Zhang M., Qin G. (2011). Identification of lactic acid bacteria isolated from corn stovers. *Anim Sci J* 82: 642– 653.
68. Parvin S., Wang C., Li Y., Nishino N. (2010). Effects of inoculation with lactic acid bacteria on the bacterial communities of Italian ryegrass, whole crop maize, guinea grass and rhodes grass silages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 160:160-166.
69. Pelletier S., Tremblay G.F., Bertrand A., Bélanger G., Castonguay Y., Michaud R. (2010). Drying procedures affect non-structural carbohydrates and other nutritive value attributes in forage samples. *Anim. Feed Sci. Technol.* 157:139–150.
70. Pitt E.E. (1990). *Silage and hay preservation*. NRAES-5. Northeast Reg. Agric. Eng. Service. Ithaca, NY.
71. Radović J., Sokolović D., Marković J. (2009) Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25:465-475.
72. Repetto J.L, Britos A., Cozzolino D., Errandonea N., Cajarville C. (2003). Nutritive value of lucerne and fescue during autumn I: Relationship between soluble carbohydrates and nitrogen contents throughout the day. *Proceedings of the IX World Conference on Animal Production*, Porto Alegre, Brasil, p. 26.
73. Repetto J.L., Echarri V., Aguerre M., Cajarville C. (2011). Use of fresh cheese whey as an additive for Lucerne silages: Effects on chemical composition, conservation quality and ruminal degradation of cell walls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 170:160-164
74. Rooke J.A., Hatfield R.T. (2003). Biochemistry of ensiling. In: *Silage science and technology*, Buxton, D. R., R. E. Muck, and J. H. Harrison, eds. American Society of Agronomy, Inc., Wisconsin, USA p 95-139.
75. Rooke J.A., Bell S.L., Armstrong D.G. (1985). The chemical composition of grass silages prepared with and without a pretreatment with inoculants containing *Lactobacillus planetarium* *Anim. Feed Sci. Technol.* L3:269-279.
76. Rooke J.A. (1991). Acetate silages: microbiology and chemistry. *Landbauforsch.Voelkenrode.* 123: 309–312.
77. Sánchez D.E., Arreaza L.C., Abadía B. (2005). Estudio de la cinética de degradación in vitro de cuatro forrajes tropicales y una leguminosa de clima templado. *Revista Corpoica* 6 (1): 58-68.
78. Schroeder J.W. (2004). *Silage Fermentation and Preservation AS-1254*. 8: North Dakota State University (NDSU) Extension Service.

79. Sheperd A.C., Maslanka V., Quinn D., Kung L. Jr. (1995). Additives containing bacteria and enzymes for alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 78: 565-572.
80. Smith D. (1973). The non-structural carbohydrates. En: Butler, G.W and Bailey, R.W. *Chemistry and Biochemistry of herbage*. New Cork. Ed: Academic Press. p. 105-155.
81. Soto P., Jahn E. (1993). Use of irrigated lucerne in different growth stages. Evaluation under cutting. *Proceeding of the XVIII International Grassland Congress*. Palmerston North, New Zealand. 8-21 February 1993. p. 869-870.
82. Stefanie J.W.H., Elferink O., Driehuis F., Gottschal J.C., Spoelstra S.F. (2001). Silage fermentation processes and their manipulation, *FAO Electronic Conference on Tropical Silage*.
83. Theodorou M.K., Williams B.A., Dhanoa M.S., McAllan A.B., France J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:185-197.
84. Tremblay F.G., Morin C., Bélanger G., Bertrand A., Castonguay Y., Berthiaume R., Allard G. (2014). Silage Fermentation of PM and AM cut alfalfa wilted in wide and narrow swaths. *Crop Science Society of America*, 54:439–452.
85. Van Soest P.J. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
86. Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A. (1991). Methods for dietary fiber, NDF and non-starch polysaccharide in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583–3597
87. Weinberg Z.G., Muck R.E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol. Rev.* 19: 53-68.
88. Yemm E.W., Willis A.J. (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.* 57:508-514.
89. Yuan X., Guo G., Wen A., Desta S.T., Wang J., Wang Y., Shao T. (2015.) The effect of different additives on the fermentation quality, in vitro digestibility and aerobic stability of a total mixed ration silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 207: 41–50
90. Zhu Yu., Nishino N., Kishida Y. and Uchida S. (1999). Ensiling characteristics and ruminal degradation of Italian ryegrass and Lucerne silages treated with cell wall-degrading enzymes. *J. Sci. Food Agric.* 79: 1987-1992.