



Universidad de la Republica

Facultad de Veterinaria

Programa de Posgrados

Evaluación de la conservación y calidad nutricional de
ensilajes de pasturas y cereales de invierno elaborados en
predios comerciales

Bruno Guidi Eguía

Tesis de Maestría en Nutrición de Rumiantes

Uruguay

2020



Universidad de la Republica

Facultad de Veterinaria

Programa de Posgrados

Evaluación de la conservación y calidad nutricional de
ensilajes de pasturas y cereales de invierno elaborados en
predios comerciales

Bruno Guidi Eguía

Tesis de Maestría en Nutrición de Rumiantes

Cecilia Cajarville
Directora de Tesis

Darío Hingoyen
Co-director

José L. Repetto
Co-director

Uruguay

2020

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Alejandro Mendoza; Ing. Agr. PhD

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
INIA - Uruguay

Francisco Diéguez; Ing. Agr. PhD

Facultad de Veterinaria
Universidad de la Republica - Uruguay

Jose Maria Arroyo; Ing. Agr. PhD

Instituto de Ciencia Animal
Universidad de Bonn - Alemania

ACTA de Defensa



ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Maestría

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Sala Virtual de Plataforma Zoom, Facultad de Veterinaria, UdelaR, viernes 28 de agosto de 2020

Tribunal: Dr. Alejandro Mendoza (Presidente), Dr. José María Arroyo, Dr. Francisco Diéguez

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4.392.708-5	GUIDI EGUÍA, Bruno	B.B.B	6

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

Dr. Alejandro Mendoza (Presidente)

FIRMA

Dr. José María Arroyo

Dr. Francisco Diéguez

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

Agradecimientos

Al tribunal, por su tiempo, sus comentarios y correcciones.

A la Cooperativa Colaveco por la oportunidad de hacerme formar parte, al personal por la enorme ayuda durante el trabajo, principalmente Marina, Jenny Jose, Victor, Cecilia y Mauricio!

A la barra del IPAV, Compañeros de carrera y Docentes, por el apoyo y ayuda en los trabajos y la compañía en este largo recorrido.

A Cecilia, Joselo y Darío, por su confianza, apoyo y motivación a dar un paso más en mi carrera.

A toda mi familia y amigos, porque de una forma u otra han ayudado en mi formación.

A Flor y en el último tirón a Oli, por el apoyo, la paciencia y por ser mi motivación constante. Las Amo.

A mi padres y especialmente a Sandra mi madre, porque antes que todo con sus valores, me han llevado a ser la persona que soy, siempre estaré agradecido.

A Sabrina mi hermana, por ser para mí una referente, por tu integridad y tenacidad, te quiero mucho.

A Jaime, Manu, Mery, Nacho, Jime y Renee, por el apoyo en este recorrido.

Tabla de contenido

1. Resumen.....	8
2. Summary.....	9
3. Introducción	10
4. Antecedentes específicos	11
4.1 Ensilaje.....	11
- Fase Aeróbica.....	11
- Fermentación anaeróbica	11
- Apertura y alimentación	11
4.2 Ensilajes de Pradera.....	12
4.3 Ensilaje de Cereales de Invierno	13
4.4 Compactación	13
4.5 Evaluación del aprovechamiento digestivo y su predicción	14
4.6 Bacterias ácido butíricas del genero Clostridium	15
5. Hipotesis.....	¡Error! Marcador no definido.
6. Objetivos.....	16
7. Materiales y métodos.....	16
7.1 Toma de muestras y logística.....	17
7.1.1 Calado de los silos:.....	17
7.1.2 Separación y conservación de las muestras obtenidas:.....	17
7.2 Determinaciones.....	18
7.2.1 Estimación de la Densidad	18
7.2.2 Composición química	18
7.2.3 Características fermentativas.....	18
7.2.4 Digestión ruminal <i>in vitro</i>	19
7.2.5 Recuento de esporas de bacterias ácido-butíricas (BABC).....	20
7.3 Análisis estadístico	20
8. Resultados.....	21
9. Discusión.....	33
10. CONCLUSIONES	38
11. Referencias Bibliográficas	39

1. Resumen

La elevada proporción que representan los ensilajes en las dietas de vacas lecheras y la alta variabilidad de su valor nutritivo, hacen importante predecir su calidad para que puedan ser empleados en forma eficiente. Este trabajo pretende brindar información de ensilajes de pasturas y cultivos de invierno elaborados en condiciones productivas de nuestro país, que comprenda un amplio espectro de parámetros de calidad. En base a esta información se evaluaron las variables, desarrollando ecuaciones que ayuden a estimar el aprovechamiento digestivo de los ensilajes de pasturas y cultivos de invierno en base a mediciones accesibles. Durante la zafra del año 2015-2016 se muestrearon 54 silos de cultivos de invierno y praderas realizados por productores. En cada muestra de ensilaje colectada (27 de cereales de invierno y 27 de praderas), se estimó la densidad media, se analizó la composición química (materia seca (MS), cenizas (Cen) proteína bruta (PB), fibra detergente neutro y ácido (FDN y FDA), nitrógeno insoluble en detergente neutro y ácido (NDIN y ADIN), el pH, la concentración de N amoniacal, los ácidos orgánicos y se realizó el recuento de bacterias ácido-butíricas del género *Clostridium* (BABC). Se evaluó el aprovechamiento ruminal mediante la medición de la producción de gas y la digestión ruminal *in vitro* de la MS (DMS) y de la FDN (DFDN). Los ensilajes de cultivos de invierno se caracterizaron por pH adecuado, con escasa variación, aproximadamente 40% de MS, 9% de PB y 60% de FDN. En los ensilajes de pradera el pH fue más elevado, con una media de 4,5 y baja variación, las concentraciones de proteína fueron de 18% y de FDN 53%. Para ambos grupos de silos, las menores variaciones se observaron en el pH, y las mayores en la concentración de ácidos orgánicos, mientras que las variables de composición mostraron coeficientes de variación intermedios. La digestibilidad de la materia seca (DMS) y la FDN (DFDN) mostraron una media más alta para ensilajes de pradera que para los de cultivos invernales. En silos de cultivos de invierno, la DFDN se correlacionó positivamente con el ácido láctico ($r = 0,47$), y negativamente con la de propiónico ($r = -0,49$). Para estos silos el volumen de gas producido por (V_t) se relacionó en forma negativa con la concentración de fibras ($r = -0,45$ FDN y $-0,41$ FDA), y se destacan las relaciones negativas observadas entre la velocidad con que se produjo el gas y la concentración de fibras ($r = -0,84$ y $-0,61$ con FDN y FDA). La digestibilidad de los silos de pradera en cambio no tuvo relaciones significativas con las concentraciones de fibras, pero la digestibilidad de la fibra se relacionó negativamente la relación FDA/FDN ($r = -0,72$; $P < 0,05$). Se observó una relación positiva de la tasa de producción de gas con la PB ($r = 0,72$; $P < 0,05$). La tasa de producción de gas en cereales de invierno se pudo predecir a partir de la concentración de fibra, MS y pH con un R^2 de 0,93, mientras que, para los silos de pradera, el mayor R^2 se obtuvo en la predicción de la DFDN a partir de la relación FDA/FDN, el NDIN sobre el nitrógeno total y la densidad expresada en base seca, con un R^2 de 0,86. Las relaciones estudiadas, confirman la estrecha relación entre las variables la composición y conservación con el valor nutritivo.

2. Summary

The high proportion that silages represent in the diets of dairy cows and the high variability of their nutritional value make it important to predict their quality in order to use them efficiently. This work aims to provide information on silages from pastures and winter crops produced under productive conditions in our country, which includes a wide spectrum of quality parameters. Based on this information, the variables were evaluated, developing equations that help to estimate the digestive use of silages from pastures and winter crops based on accessible measurements. During the summer period of the year 2015-2016, 54 silage of winter crops and pastures made by producers were sampled. In each sample of silage collected (27 from winter cereals and 27 from pastures), the mean density was estimated, the chemical composition (dry matter (MS), ash (Cen) crude protein (CP), neutral detergent fiber and acid (FDN and FDA), nitrogen insoluble in neutral and acid detergent (NDIN and ADIN), pH, ammonia N concentration, organic acids, and a count of acid-butyric bacteria of the genus *Clostridium* (BABC) was performed. Ruminant utilization was evaluated by measuring gas production and in vitro ruminal digestion of DM (DMS) and FDN (DFDN). Silages from winter crops were characterized by adequate pH, with little variation, approximately 40 % DM, 9% CP and 60% NDF. In the pasture silages the pH was higher, with a mean of 4.5 and low variation, protein concentrations were 18% and NDF 53%. For both groups of silages, the smallest variations were observed in the pH, and the largest in the concentration of organic acids, while the composition variables showed intermediate coefficients of variation. Dry matter digestibility (DMS) and NDF digestibility (DFDN) showed a higher mean for grass silages than for winter crops. In winter crops silages, the DFDN was positively correlated with lactic acid ($r = 0.47$), and negatively with that of propionic ($r = -0.49$). For these silos, the volume of gas produced by (V_t) was negatively related to the concentration of fibers ($r = -0.45$ FDN and -0.41 ADF), and the negative relationships observed between the speed with which gas and fiber concentration occurred ($r = -0.84$ and -0.61 with FDN and FDA). On the other hand, the digestibility of the pasture silos did not have significant relationships with the fiber concentrations, but the fiber digestibility was negatively related to the ADF / NDF relation ($r = -0.72$; $P < 0.05$). A positive relationship was observed between the gas production rate and the CP ($r = 0.72$; $P < 0.05$). The gas production rate in winter cereals could be predicted from the fiber concentration, DM and pH with an R^2 of 0.93, while, for grassland silos, the highest R^2 was obtained in the prediction of the DFDN from the FDA / NDF ratio, the NDIN on total nitrogen and the density expressed on a dry basis, with an R^2 of 0.86. The relationships studied confirm the close relationship between the composition and conservation variables with the nutritional value.

3. Introducción

El último anuario estadístico DIEA publicado (2019), muestra en sus datos un número de vacas lecheras y un porcentaje de pasturas mejoradas estable, una producción anual con ligero aumento en los últimos años, y un área que decrece. Esta alineación de datos sería difícil de explicar, sin la utilización de concentrados y reservas forrajeras entre otras herramientas. Es así que, según datos relevados en más de 300 empresas lecheras de nuestro país entre 2010-2013 las reservas forrajeras componían aproximadamente el 25% de la dieta de vacas lecheras (Chilibroste, 2015)

Algunos trabajos (D'Alessandro et al., 1994; Irigoyen et al., 2011) de relevamiento de predios comerciales en nuestro país arrojan datos sobre la elaboración y utilización de reservas forrajeras. Irigoyen et al. (2011) reportó que el 95% de los productores lecheros confecciona anualmente reservas forrajeras (henos, ensilajes y henilajes). En lo que respecta a los ensilajes de praderas, estos trabajos comunican que existen dificultades para su confección a nivel de campo, como el contenido de humedad, la calidad de fermentación entre otros que se comentaran más adelante.

La calidad nutricional de los ensilajes de forraje es muy variable y depende en gran medida de dos factores: del valor nutritivo del forraje original, y del proceso de conservación, que a su vez dependerá de alcanzar una correcta fermentación y condiciones adecuadas de almacenaje. Debido a esto y a la alta utilización de ensilajes en las dietas de vacas lecheras, es necesario conocer la calidad y el valor nutritivo de los mismos, de manera que puedan ser empleados en forma eficiente.

Existen antecedentes en el estudio de ensilajes de pasturas, con el objetivo identificar los principales problemas y plantear alternativas tecnológicas para mejorar su valor y conservación (Repetto et al., 2005; Britos et al., 2007; Repetto et al., 2011; Cajarville et al., 2012). En esta oportunidad, se intenta describir, con más precisión e información, la calidad y el valor nutritivo de ensilajes que elaboran los productores en el Uruguay. A la vez, se pretende comenzar a relacionar variables de forma de predecir con mayor precisión el aprovechamiento digestivo de los ensilajes de pasturas y cultivos de invierno.

4. Antecedentes específicos

4.1 Ensilaje

El ensilaje, en lo que refiere a su práctica agronómica, es el proceso en el cual un alimento en condición húmeda, se almacena en reservorios que generan una condición anaeróbica, donde bacterias epifíticas fermentan carbohidratos solubles formando ácido láctico y acético principalmente, bajando el pH del material ensilado a niveles que inhiben el desarrollo de microorganismos que inducen la descomposición del material (Woolford y Pahlow, 1998; Elferink et. al. 2000). Esta tecnología permite, en primera instancia solventar la gran variación anual de producción de forraje en zonas templadas, aprovechando excedentes de forraje para su utilización a lo largo del año, permitiendo uniformizar la disponibilidad de los recursos forrajeros.

El proceso bioquímico del ensilaje puede dividirse en 4 fases (Aeróbica; fermentación, estable y de apertura) para una mejor explicación. (Rooke y Hatfield. 2003):

- Fase Aeróbica

Comprende un período a campo en aquellos materiales que luego de cortados permanecen un período de tiempo en el campo para su deshidratación, donde la actividad metabólica de la planta permanece activa, consumiendo sustratos. Según la duración y condiciones de este período, la fotosíntesis residual puede compensar la pérdida de azúcares, de no ser así disminuiría la disponibilidad de sustratos para las bacterias productoras de ácido láctico.

Una vez ensilado el material, siempre quedara Oxígeno atrapado, dependiendo del tipo de confección y la compactación podrá ser más o menos duradera esta etapa y sus consecuencias, ya que mientras más dure, mayor pérdida de sustratos para la flora productora de ácido láctico, el calor generado por el metabolismo aeróbico quedara retenido a diferencia de la fase a campo, generando alteraciones químicas como reacciones de Maillard (fijación del grupo amino de proteínas a carbohidratos que genera compuestos indigestibles). La pérdida de sustratos y calentamiento excesivo conduce a ensilajes con menor calidad de conservación y pérdida de valor nutritivo.

- Fermentación anaeróbica

La desaparición de oxígeno, permite comenzar la actividad de Bacterias Anaeróbicas, con producción de ácidos orgánicos como producto final, siendo las productoras de ácido láctico las dominantes. La acumulación de estos ácidos permite el descenso del pH. La falta de sustratos puede interferir con este proceso, no permitiendo el descenso deseado del pH, lo que permite la actividad de otras bacterias como Enterobacterias y Clostridios que generan productos finales no deseables (Ac. Butírico, Amoniaco) disminuyendo el valor nutritivo del ensilaje.

- Apertura y alimentación

Inevitablemente se entra en una nueva fase aeróbica, con la exposición al oxígeno se retoma el crecimiento de organismos aeróbicos como las levaduras, que metabolizan carbohidratos y ácido láctico para liberar CO₂ Calor y agua, lo que genera un aumento de la temperatura en el material expuesto al aire siendo este aumento de temperatura característica principal del deterioro aeróbico, además, el incremento del pH permite la actividad de bacilos que degradan proteínas formando NH₃ y mohos que degradan paredes celulares, lo que en efecto deprime el valor nutritivo del alimento.

Atravesar esas fases del proceso de ensilaje deprime el valor nutritivo de los alimentos por alteración y pérdida de nutrientes. Observándose principalmente un aumento de la concentración de paredes celulares en el alimento ensilado, disminución la digestibilidad *in vitro* de la materia seca y fibra insoluble en detergente neutro (MS y FDN respectivamente) y aumento de la solubilidad de la fracción proteica (Wilkinson et al., 2003; Repetto et al., 2005).

Además del valor final de pH, el proceso de fermentación del ensilaje deja como rastro diferentes valores en el perfil de Ácidos orgánicos, NH₃, NIDA entre otras, que permiten analizar qué tan eficiente o correcto fue el proceso de fermentación, a mayor eficiencia es esperable un mayor valor nutritivo (Kung et al. 2018).

Aumentar la disponibilidad sustratos (Repetto et al., 2011; Cajarville et al., 2012), una manipulación y practica correcta tanto a la confección (pre-marchitado, picado, compactación, sellado, etc.) como en la utilización (Diseño, manejo del frente, limpieza y el uso de herramientas adecuadas permitirá que ese descenso del valor nutritivo en el alimento ensilado sea menor. (Rooke y Hatfield. 2003; Cherney y Cherney 2003).

4.2 Ensilajes de Pradera

La utilización de praderas en base a leguminosas perennes, es una práctica ampliamente, principalmente por el potencial de alta producción de forraje de alta calidad, cuando se manejan correctamente. Además la cobertura que provee sobre el suelo lo que limita su erosión y su capacidad de fijar Nitrógeno atmosférico, refleja su utilidad en la sostenibilidad de los sistemas productivos (Albrecht y Beauchemin 2003)

En lo que respecta a su utilización como materiales para ensilar, cuando están en su momento óptimo de cosecha en cuanto a valor nutritivo, poseen algunas características que dificultan el proceso de ensilaje, como son el insuficiente contenido de azúcares solubles, alto contenido de humedad, elevado contenido de proteína y alta capacidad Buffer (Mc Donald et al., 1973). En zonas templadas, los contenidos de azúcares en pasturas pueden ser menores al 5% (Fulkerson et al., 2007; Cajarville et al., 2015) lo que condiciona el proceso de fermentación, por estar los azucares por debajo de los requerimientos (Pitt et al. 1990). Por su parte el exceso de humedad en los materiales, acentúa aún más el problema de déficit de sustrato por el barrido de nutrientes solubles y su perdida como efluentes, Siendo necesario mayor contenido de azucares solubles para compensar este fenómeno (Pitt et. al. 1990).

En nuestro país, existen antecedentes de trabajos de relevamiento para conocer el valor nutritivo de los ensilajes de pasturas y algunos cereales de invierno (Pigurina, 1992; D'Alessandro et al., 1994; Acosta, 2002). En una encuesta y muestreo, Irigoyen et al. (2011) generaron información sobre la utilización de reservas forrajeras en todas las áreas de producción pecuaria ocupada por productores lecheros.

Estos trabajos cuyas muestras datan de entre 2 y 3 décadas atrás aproximadamente, dejaron clara la existencia, en mayor o menor medida, de dificultades para la obtención de ensilajes de pasturas de buena calidad en nuestros sistemas productivos, observándose en los ensilajes relevados, un elevado contenido de humedad (> 70%), procesos de fermentación insuficientes (pH>4.7), altos contenidos de fibra detergente ácida (FDA>40%) y baja concentración proteica (PB<15%).

Algunas características de la operativa, como la contratación de terceros para gran parte del proceso de ensilaje y la escasa supervisión (Irigoyen et al. 2011), pueden explicar parte estos resultados.

4.3 Ensilaje de Cereales de Invierno

Considerando en esta categoría, Avena, Cebada y Trigo como los más frecuentes en nuestro país, Kennelly y Weinberg (2003) destacan en una revisión sobre estos materiales, su adaptación a un amplio rango de climas y suelos, su aptitud para el proceso de ensilaje, por la disponibilidad de azúcares, baja capacidad buffer y un contenido de humedad adecuado al momento de cosecha.

En cuanto a la utilización en nuestro país, los datos publicados en el anuario DIEA (2019) referentes al área utilizada para los principales cultivos, con 1.615.000 has (Trigo, Cebada, Soja, Maíz, Sorgo y Arroz) el área destinada a Trigo y Cebada ocupó el 12 y 10% respectivamente, aunque no hay información de cuanto se utilizó para la producción de ensilaje de estos materiales, en los datos presentados por Irigoyen et al. (2011) de los ensilajes confeccionados, el 3% correspondió a cultivos anuales de invierno, cabe destacar que estos datos fueron relevados en el período 2000-2001.

Las características de estos ensilajes como alimento, son variables de acuerdo al estado de madurez, a medida que madura, se declina el contenido de PB, aumenta el contenido de FDN, desciende la digestibilidad de la materia seca, hasta el punto donde el grano comienza a amortiguar ese descenso por un aumento en el contenido de almidón, por otra parte al aumentar la madurez del cultivo, aumenta la productividad de MS/ha (Kennelly y Weinberg, 2003).

4.4 Compactación

Otro aspecto relacionado con la confección es la densidad, que influye en la porosidad del material. Un material menos denso es más poroso, y esto lo vuelve más susceptible al deterioro (Vissers et al. 2007) y las pérdidas que se producen en el material durante el almacenamiento y la extracción, por la penetración de O₂ (Pitt y Muck, 1993; Muck y Holmes, 2000). Ruppel (1992) relacionó la densidad en silos de tipo bunker con las pérdidas de materia seca, aumentando

las mismas, cuando la densidad era menor producto del deterioro aeróbico. Si bien a nivel internacional hay trabajos que comunican datos de densidad en ensilajes confeccionados como bunker (Muck y Holmes, 2000; Ruppel, 1992), o bolsa (Muck y Holmes, 1998; Muck y Holmes, 2006), son pocos (Kruger et al., 2020), los trabajos donde se adiciona una evaluación nutricional que permita correlacionar esta variable con el valor nutritivo en ensilajes comerciales.

4.5 Evaluación del aprovechamiento digestivo y su predicción

Usualmente cuando se realizan relevamientos de diferentes alimentos para Rumiantes se evalúa principalmente su composición química, aunque ésta no revela información completa sobre el desempeño del alimento a nivel digestivo. Para mejorar este último punto, a la composición, podrían agregarse variables obtenidas por técnicas *in vitro* como la producción de gas *in vitro* y la digestibilidad *in vitro* donde se puede generar un escenario comparativo para diferentes alimentos con ventajas desde el punto de vista operativo y económico en comparación con ensayos con animales (Nocek., 1988; Davies et al., 2000; Dijkstra et al., 2005).

La Digestibilidad real en situaciones productivas de dietas o alimentos para rumiantes, es una variable compleja y afectada por muchos factores, asociados al consumo, al animal, la interacción entre los componentes de la dieta y al manejo de alimentación, por lo que su predicción en base a aspectos relacionados únicamente a un alimento es generalmente imprecisa (Mertens 1987). Se han encontrado correlaciones altas entre componentes químicos de los ensilajes y la digestibilidad *in vivo*, pero utilizando animales alimentados para cubrir requerimientos de mantenimiento que claramente no es la situación frecuente en sistemas productivos (Mertens 1987; Nousiainen et al. 2003), y considerando solo variables de composición química como cenizas, FDN, FDA extracto etéreo y Proteína entre las principales (De Boever et al. 1996; García et al. 2005; Givens et al. 1989), no es frecuente que los análisis de correlaciones o regresiones en estos trabajos incluyan factores relacionados a la confección y la conservación, sin embargo García et al. (2005) concluyó que inclusión de alguna variable que guarde relación al estado de conservación como el pH o el amoníaco reportan mejoras en las regresiones para la predicción de la digestibilidad *in vivo* de la materia orgánica.

Algunos autores, sin embargo sugieren la digestibilidad *in vitro* de la MS y la FDN, no como variable para predicción sino como una variable descriptiva de estos alimentos, que brinda información del aprovechamiento a nivel ruminal que puede tener un alimento o fracciones del mismo en condiciones determinadas. En este sentido, Hoffman y Combs (2004) señalan a los nutricionistas de campo la importancia de conocer la digestibilidad de la fibra neutro detergente (DFDN) medida *in vitro* en los forrajes, por el impacto que tiene sobre la estimación del contenido energético de los forrajes, y considerándola útil para la toma de decisiones en las lecherías.

Sustentando lo antes mencionado, Oba y Allen (1999) realizaron un meta análisis de ensayos que reportaron utilización de forrajes con diferencias significativas en digestibilidad, y que midieran consumo de MS y producción de leche,

observando que el aumento en la DFDN medida *in vitro* o *in situ* se asociaba con incrementos en el consumo de materia seca, y en consecuencia de la producción de leche, estimando que cada punto de aumento porcentual en la DFDN repercutiría en 170 g de aumento en el consumo de materia seca y en 250 g de leche producida corregida a 4% de grasa.

La producción de gas *in vitro* nos permite estimar la magnitud y la cinética de fermentación de los alimentos a nivel ruminal, entre otros usos (Davies et al., 2000; Dijkstra et al., 2005). Se ha demostrado previamente (Menke y Steingass, 1988) que esta técnica puede ser utilizada para predecir el contenido energético de un alimento con gran precisión, basándose en la producción de gas a de 24 hs de incubación, cuando a la incubación se agregan heno de paja y almidón como alimentos estándar, en base a esto que a mayor producción de gas a 24 hs es estimable un mayor contenido energético en los alimentos incubados.

4.6 Bacterias ácido butíricas del genero Clostridium

Otro aspecto para considerar en los ensilajes es la presencia de bacterias ácido butíricas del género *Clostridium*. Las bacterias butirogénicas del género *Clostridium* (BAB) son microorganismos esporulados que habitan el suelo. A través de forrajes contaminados con tierra consumidos por los rumiantes alcanzan el tracto digestivo, diseminando las esporas en el ambiente a través de la materia fecal (Gaggiotti et al., 1999). Por un lado, las BAB son perjudiciales para el ensilado, ya que pueden utilizar como fuente de energía el ácido láctico, produciendo ácido butírico y acético, CO₂ y H₂ (Drouin y Lafrenière, 2012), dificultando el descenso del pH. Estas bacterias se desarrollan en un amplio rango de pH, entre 4,4 y 7,5 (Martínez y Laulhe, 2011) y según datos presentados por Vissers et al. (2007) el deterioro aeróbico en las zonas menos compactadas de los ensilajes favorece su desarrollo. Dentro de este grupo se encuentran *C. tyrobutiricum*, *C. beijerinckii*, *C. sporogenes*, entre otras. Los ensilados con alto contenido de ácido butírico (>0,5%) se asocian con baja palatabilidad, olor desagradable (a veces rancio), amarronamiento, degradación de los azúcares solubles y una importante pérdida de proteínas por proteólisis (Rooke et al., 2003). A su vez, las BAB pueden a través de las heces presentes en el ambiente y la ubre, alcanzar la leche. Cuando esto sucede, concentraciones mayores a 200 esporas/L (Bottazzi, 1983) representan un riesgo de hinchamiento tardío en quesos de pasta dura y corteza sólida como los tipos Parmesano, Emmenthal, Grana, Gruyere, entre otros de alto valor agregado, por lo que revisten importancia tanto en las queserías artesanales como las industrias lácteas.

La presencia de esporas de bacterias butirogénicas en la leche guarda estrecha relación con el grado de contaminación de los ensilajes que se suministra al rodeo, del medio ambiente que rodea a la sala de ordeño, y de la higiene en el proceso de ordeño (Gaggiotti et al., 1999; Thomas et al., 2012).

Si bien este aspecto es de importancia, sobre todo en sistemas productivos que destinarán la leche a la elaboración de quesos, hasta el momento no hay información disponible sobre la presencia y grado de contaminación con bacterias butirogénicas del género *Clostridium* en ensilajes de nuestro país.

5. Hipótesis

El valor nutritivo de los forrajes ensilados en predios comerciales de nuestro país se ve afectado tanto por la composición estructural del alimento, como por la calidad de conservación durante el proceso de fermentación.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Comenzar a conformar una base de datos de ensilajes de pasturas y cultivos de invierno elaborados en condiciones productivas de nuestro país, que comprenda un amplio espectro de parámetros de calidad, y estudiar la relación entre variables medidas en laboratorio, accesibles para predios comerciales, y variables descriptivas del aprovechamiento ruminal como la digestibilidad y la tasa de producción de gas inaccesibles a nivel comercial.

6.2 Objetivos específicos.

1. Conformar una base de datos sobre el valor nutritivo y calidad de conservación, que contenga indicadores sobre calidad de fermentación y utilización digestiva de ensilajes de praderas y cultivos de invierno elaborados a nivel de predios comerciales.
2. Estudiar las relaciones entre variables indicadoras de composición química y calidad de fermentación de los ensilajes, con variables indicadoras de aprovechamiento ruminal de los ensilajes, estableciendo un conjunto de ecuaciones de regresión para predecir el valor nutritivo a partir de variables de medibles en laboratorios comerciales.
3. Evaluar el grado de contaminación en ensilajes de pastura y cultivos de invierno, por bacterias ácido butíricas del género *Clostridium* (BABC) en nuestro país.

7. Materiales y métodos

Se realizó un muestreo de ensilajes en establecimientos comerciales que participaron del proyecto INNOVAGRO “Creación y validación de herramientas analíticas para estimar calidad fermentativa y tipo de Clostridios de los ensilados en el Uruguay” (FSA_2_2013_1_13148). El mencionado proyecto tuvo como objetivo, crear y hacer disponibles herramientas analíticas para la caracterización del perfil fermentativo de los ensilados, así como la identificar y cuantificar los Clostridios gasógenos que afectan la calidad de los quesos en Uruguay a partir de predios de la cuenca lechera uruguaya (principalmente de los Departamentos de Colonia y San José).

El trabajo analítico se realizó en el laboratorio de Nutrición Animal del Instituto de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria (IPAV) (Ruta nacional 1, km 42,5, Departamento de San José) y en el Laboratorio COLAVECO (Parque del Retiro, Nueva Helvecia, Departamento de Colonia).

7.1 Toma de muestras y logística

Para la realización del presente trabajo se conformó un banco de muestras específico de silos realizados a partir de cultivos de invierno o praderas. El muestreo se realizó durante los meses de noviembre de 2015 y febrero de 2016, y se tomaron muestras de silos confeccionados en la estación inmediatamente anterior. Para ello, se realizó un llamado público a productores que quisieran analizar sus ensilajes de cultivos de invierno o praderas, indicando que el proyecto colaboraría con la obtención de estas. De esta forma, se concertó con cada productor una fecha de muestreo, teniendo en cuenta que los ensilajes tuvieran al menos 30 días de confeccionados.

De esta forma, se concurría al establecimiento el día indicado, y para el muestreo se siguieron los procedimientos y las pautas que se describen a continuación.

El muestreo comprendió silos de diferente formato: silos bolsa, silos “torta”, silopacks. Con silos “torta” se hace referencia a ensilajes sobre el suelo, que luego de compactado se sellan con nylon por arriba. En el Anexo 1 se presenta la colección de ensilajes que comprende este trabajo, el tipo de silo, y departamento y fecha de muestreo.

7.1.1 Calado de los silos:

Para la extracción de las muestras y estimación de la densidad de los silos, se utilizó un calador cilíndrico de 3 cm de radio x 55 cm de largo, de acero inoxidable y con extremo afilado, adaptado a un taladro a combustión Stihl BT 45®.

Para ensilajes confeccionados en bolsa, en cada una se calaron 3 puntos a lo largo, alejándose los calados al menos 3 m de los extremos de la bolsa. Para los ensilajes confeccionados como “torta”, se realizaron 6 calados en el frente del silo, luego de remover los primeros 30 cm de material. Con las sub-muestras obtenidas de cada silo se confeccionó una muestra compuesta, que se guardó en doble bolsa de nylon rotulada y se mantuvo refrigerada hasta la llegada al laboratorio, al que se arribó en menos de 6 h en todos los casos.

7.1.2 Separación y conservación de las muestras obtenidas:

La muestra de compuesta de cada ensilaje se homogeneizó y se fraccionó en 5 submuestras para las posteriores determinaciones:

Submuestra 1: se procesaba directamente para análisis químico básico (Colaveco).

Submuestra 2: congelada a -20 °C para posterior extracción y determinación de ácidos grasos volátiles (AGV) y ácido láctico (Colaveco e IPAV).

Submuestra 3: congelada a -20 °C para posterior determinación de esporas de BABC (Colaveco).

Submuestra 4: congelado a -20 °C para posterior determinación de nitrógeno amoniacal (IPAV).

Submuestra 5: congelado a -20 °C para liofilización (IPAV) y empleo en las determinaciones de N insoluble en detergente neutro y ácido (NIDN y NIDA respectivamente), pruebas de digestibilidad y fermentación *in vitro*.

7.2 Determinaciones

7.2.1 Estimación de la Densidad

Para estimar la densidad promedio del silo se utilizó el calador antes mencionado (ver 6.1.1.) que se introdujo directamente en el ensilaje. Al retirar el calador se midió el largo del cilindro ocupado por la muestra en cada calado, de manera de contar con las medidas necesarias para calcular el volumen del cilindro que ocupaba la muestra ($V = h \times r^2 \times \pi$, donde V = volumen, h = altura, r = radio y $\pi = 3,1416$). La muestra obtenida de cada calado se guardaba individualmente en una bolsa para su posterior pesaje en el laboratorio. La densidad final del silo se calculó a partir del promedio de todos los calados de cada ensilaje y se expresó como los kg de materia fresca por m³ (kg/m³) y la correspondiente corrección a materia seca.

7.2.2 Composición química

Se determinó materia seca (MS), cenizas y proteína bruta (PB) según A.O.A.C. (2000) siguiendo los métodos 934.01, 967.05 y 968.06, respectivamente. La fibra insoluble en detergente neutro (FDN) según Van Soest (1991), y la insoluble en detergente ácido (FDA) de acuerdo con Robertson y Van Soest (1981) utilizando sulfito de Sodio y alfa-amilasa termoestable, sin corrección por cenizas. El nitrógeno insoluble en detergente neutro y ácido (NDIN y NIDA respectivamente), según Licitra et al. (1996).

7.2.3 Características fermentativas

Se determinó el pH pesando 10 g de ensilaje fresco y agregando 100 mL de agua destilada, utilizando un pH metro digital (Oakton® eChem Instruments Pte. Ltd., Singapur) previamente calibrado con soluciones 4 y 7. El nitrógeno amoniacal (N-NH₃) se determinó por destilación directa (Filya, 2003). Los ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) y el ácido láctico se determinaron por cromatografía. La extracción se realizó siguiendo el siguiente procedimiento: se pesaron 12 g de muestra de ensilaje congelado a los que se adicionaron 25 mL de Ácido Sulfúrico 0,05 M y se procesaron en un Stomacher durante 4 minutos filtros, la fase líquida se filtró con papel Whatman® n°5 para su posterior análisis por duplicado. Los ácidos grasos volátiles (AGV) Acético, propiónico y butírico se determinaron por cromatografía de gases. El equipo contaba con un muestreador automático Headspace (Teledyne Tekmar modelo HT3; Teledyne Technologies Incorporated, OH, USA) en conexión con un Cromatógrafo de gases (Agilent 7890 GC System; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) equipado con un espectrómetro de masas de impacto electrónico (70 eV) (Agilent 5975C MSD; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Se utilizó una Columna capilar de 30-m polyethylene glycol (PEG) (250- μ m d.i., 0,25- μ m grosor de película; Agilent J&W GC columns, Santa Clara, CA, USA). La misma extracción que se utilizó para la determinación de los AGV se centrifugó a 10000 rpm para medir la concentración de ácido láctico, que se midió por Cromatografía

liquida de alta presión (HPLC), empleando un equipo Dionex Ultimate® 3000 (Waltham, Massachusetts, USA con una columna de 7,8 x 300 mm a 210 nm.

7.2.4 Digestión ruminal *in vitro*

Para las pruebas de digestión y fermentación ruminal *in vitro* se empleó líquido ruminal fresco que se obtuvo de 3 vacas Jersey x Holando secas y vacías, de 500 kg de peso vivo, que contaban con agua a voluntad y eran alimentadas con heno de pradera a voluntad y suplementadas una vez al día con una mezcla de harina de soja y grano de maíz molido (50/50) a razón de 4 kg por vaca y por día. La colecta de líquido se realizaba a las 12:00 h, 4 horas después del suministro de suplemento diario. El contenido extraído de cada animal era filtrado a través de 3 capas de una tela de quesería y era almacenado en un recipiente térmico. El líquido así obtenido de cada animal se mezcló para formar una muestra compuesta de inóculo, que se utilizó tanto para las incubaciones correspondientes a la medición de producción de gas, como para las pruebas de digestibilidad ruminal *in vitro*. La manipulación del líquido ruminal se realizó en todo momento bajo corriente de CO₂

La cinética de fermentación de los ensilajes se midió empleando la técnica de producción de gas descrita por Theodorou y col. (1994) modificada por Mauricio y col. (1999) sobre muestras liofilizadas. Brevemente, 0,5 g de muestra de cada uno de los ensilajes se introdujo en frascos de 125 mL, a los que se agregó 40 mL de solución tampón. Los frascos fueron tapados con tapón de goma y se mantuvieron refrigerados a 4°C durante 12 h antes de la inoculación, para hidratar la muestra. Luego se llevaron a baño María (39°C), donde se mantuvieron durante todo el período de mediciones. Una vez inoculados con 10 mL de fluido ruminal, cada frasco se tapó con tapón de goma butilo y fue sellado con precintos de aluminio. Todas las manipulaciones se realizaron bajo un flujo de CO₂. Cada muestra de ensilaje se incubó por duplicado, en dos corridas independientes y además 6 frascos de fermentación sin sustrato fueron incluidos como blancos para corregir la fermentación propia del inóculo. Las mediciones de presión de gas se realizaron mediante un transductor de presión, en psi (libras por pulgada al cuadrado), luego de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 horas de incubación. Luego de medida la presión se liberaba el gas, hasta obtener presión 0,00 psi. La cantidad de gas en mL fue estimada empleando la ecuación $V = 3,91 \times P - 0,20$, donde V es volumen de gas en mL y P es la presión observada en psi, obtenida durante el experimento.

Los resultados de las cinéticas de producción de gas se ajustaron por regresión no lineal al modelo de Ørskov y McDonald (1979) utilizando PROC NLIN de SAS®. El mencionado modelo se representa como:

$$Y=A*(1-e^{(k_p \cdot (t-L))})$$

Dónde: Y son los mL de gas total producido, t es la hora, A es el volumen de gas a tiempo t (mL), k_p es la tasa de producción de gas (h⁻¹) y L (h) es el tiempo de latencia antes de comenzar la producción de gas.

Para la digestibilidad *in vitro* de la MS y la FDN se utilizó un equipo DAISY (ANKOM Technology Corp, Fairport, NY, USA), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Ankom Technology, 2005). Brevemente, se pesaron aproximadamente 0,5 g de cada una de las muestras de ensilajes que se colocaron en bolsas porosas (F57; 50 x 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 precalentados a 39° C. Luego de un período de incubación de 48 h los frascos se drenaron y las bolsas se enjuagaron con agua corriente, se secaron a 60° C hasta peso constante y se pesaron para obtener la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DMS). Luego de pesadas, las bolsas fueron sometidas a una digestión en solución detergente neutra, luego de lo que fueron nuevamente secadas en estufa a 60°C y pesadas, a fin de obtener la digestibilidad *in vitro* de la FDN (DFDN). Por cada muestra de ensilaje se realizaron 2 corridas de digestibilidad *in vitro*.

7.2.5 Recuento de esporas de bacterias ácido-butíricas (BABC)

Para la cuantificación no específica de BABC se utilizó el método del número más probable (NMP) (NEN, 1994), en diluciones -1, -2, -3 y -4. Se comenzó a partir de 10 g de silo en 90 mL de agua peptonada, se procesó en stomacher, de ahí se tomó el primer mililitro (primera dilución es -1). Para realizar las siguientes diluciones se tomó 1 mL de la dilución anterior y se transfirió a otro tubo de 9 mL de buffer y así sucesivamente hasta llegar a la -4. Cada una de estas diluciones se inoculó por triplicado en medios de Bryant y Burkey, incubándose durante 7 días a 37°C. Los ensilajes se clasificaron en base al recuento de esporas según el siguiente criterio: valor esporas/g <100 = óptimo, <1000 = bueno, entre 1000 y 10000 = malo, y ≥10000 = muy malo (Botazzi, 1983).

7.3 Análisis estadístico

Para la estadística descriptiva se utilizó la media, error estándar de la media (ESM), coeficiente de variación (CV), y valores mínimo y máximo.

Se compararon los valores medios entre los silos de cultivos de invierno y praderas mediante ANOVA, utilizando el Proc ANOVA de SAS®.

El estudio de relaciones entre las distintas variables se realizó en primer lugar mediante análisis de correlación lineal simple, utilizando el procedimiento Proc corr de SAS®.

Para representar las ecuaciones de regresión simple entre variables que se consideraron de especial interés se empleó el procedimiento Reg de SAS®. Adicionalmente se empleó el método de selección R-Square de SAS® para obtener ecuaciones de regresión lineales múltiples, que permitiera estimar las variables de digestibilidad y fermentación *in vitro* en base a características de la composición química o aspectos físicos.

8. Resultados

Se muestrearon y analizaron un total de 54 ensilajes. Los resultados descriptivos de los ensilajes muestreados se presentan por separado para cultivos de invierno y praderas.

La densidad, composición química y variables relacionados a la fermentación (ácidos orgánicos y nitrógeno amoniacal) se muestran en las Tablas 1 y 2 para cereales de invierno y praderas respectivamente, en la Tabla 3 se presenta la comparación de medias mediante análisis de varianza entre los dos grupos de ensilajes.

Los ensilajes de cultivos de invierno (Tabla 1) se caracterizaron por un pH medio cercano a 4, porcentajes de MS cercanos al 40% (con un rango de variación de 35 puntos entre valores mínimo y máximo), y niveles de PB y FDN de alrededor de 9 y 60%, respectivamente. Las mayores variaciones se produjeron en los contenidos de ácido butírico, propiónico y láctico, con 315, 83 y 57 % de coeficiente de variación (CV), respectivamente, mientras que la menor variación se observó para los valores de pH, que osciló entre 3,8 y 4,4. Las variables de composición química básica (MS, PB, fibras y cenizas) mostraron coeficientes de variación intermedios, de entre 12 y 20%, mientras que los contenidos en N asociado a la FDA y el N amoniacal, mayores que para las variables anteriores (del orden del 30%).

Tabla 1. Composición química y fermentación de ensilajes de cereales de invierno muestreados en el trabajo (valores medios, medidas de dispersión, valor mínimo y valor máximo para cada variable, n = 27)

Variable	Media	CV %	Mínimo	Máximo
Densidad MF	352	29,1	193	578
Densidad MS	137	34,8	64,3	282
MS	39,7	17,2	28,6	63,7
Cenizas*	8,24	15,2	6,05	10,8
FDN*	60,3	12,1	38,0	69,0
FDA*	35,4	20,3	15,6	43,1
PB*	8,96	16,8	6,7	13,5
pH	4,06	4,20	3,81	4,43
NDIN/NT	0,21	21,2	0,12	0,29
NIDA/NT	0,10	32,0	0,12	0,14
N-NH ₃ /NT	0,13	30,4	0,06	0,21
Láctico*	4,17	57,3	0,18	11,8
Acético *	1,29	37,2	0,546	2,70
Propiónico*	0,01	83,3	0,01	0,04
Butírico*	0,04	315	0,01	0,60

CV: coeficiente de variación

* Valores expresados como % de la Materia Seca

Densidad MF: kg de materia fresca/m³; Densidad MS: kg de materia seca/m³; MS: materia seca; FDN: fibra insoluble en detergente neutro; FDA: fibra insoluble en detergente ácido; PB: proteína bruta; NIDN/NT: relación de nitrógeno insoluble en detergente neutro sobre nitrógeno total; NIDA/NT: relación de nitrógeno insoluble en detergente ácido sobre nitrógeno total; N-NH₃/NT: relación de nitrógeno amoniacal sobre el nitrógeno total.

Mientras tanto, los ensilajes de praderas (Tabla 2) se caracterizaron por un pH más elevado (4,5), niveles de PB medios de 18 % y de FDN de 53 %. Al igual que con el grupo anterior, las variaciones mayores se observaron en el contenido de ácidos butírico y propiónico (con 173 y 161% de CV, respectivamente), aunque en las praderas las variaciones en el contenido de ácido acético (CV de 60%) superó a la variación observada para ácido láctico (CV de 44 %). También las variables de composición química básica (MS, PB, fibras y cenizas) mostraron coeficientes de variación relativamente bajos (15 a 17 %), y en los contenidos de N asociado a la FDA y el N amoniacal se observaron coeficientes

de variación del orden del 40%. La menor variación se registró para el pH, que osciló entre 4,1 y 5,1.

Tabla 2. Composición química y fermentación de ensilajes de praderas muestreados en el trabajo (valores medios, medidas de dispersión, valor mínimo y valor máximo para cada variable, n = 27)

Variable	Media	CV %	Mínimo	Máximo
Densidad MF	501	25,9	335	802
Densidad MS	206	20,9	121	316
MS	41,7	16,0	28,9	52,3
Cenizas*	10,3	17,6	6,91	13,8
FDN*	53,2	14,7	37,8	68,9
FDA*	30,3	15,3	24,4	41,2
PB*	18,0	16,5	10,0	22,3
pH	4,48	5,60	4,14	5,14
NDIN/NT	0,23	28,6	0,10	0,36
NIDA/NT	0,08	39,7	0,02	0,16
N-NH ₃ /NT	0,09	36,8	0,04	0,18
Ac. Láctico*	5,08	43,9	2,61	14,5
Ac. Acético*	0,98	59,7	0,41	3,39
Ac. Propiónico*	0,01	161	0,006	0,12
Ac. Butírico*	0,03	173	0,008	0,23

CV: coeficiente de variación

* Valores expresados como % de la Materia Seca

Densidad MF: kg de materia fresca/m³; Densidad MS: kg de Materia seca/m³; MS: materia seca; FDN: fibra insoluble en detergente neutro; FDA: fibra insoluble en detergente ácido; PB: proteína bruta; NIDN/NT: relación de nitrógeno insoluble en detergente neutro sobre nitrógeno total; NIDA/NT: relación de nitrógeno insoluble en detergente ácido sobre nitrógeno total; N-NH₃/NT: relación de nitrógeno amoniacal sobre el nitrógeno total.

Tabla 3. Análisis de varianza entre ensilajes de cereales de invierno y praderas para las variables de composición química, fermentación y Densidad.

Variables	Cereales	Praderas	ESM	p-valor
MS	39.66	41.68	0.915	0.28
Cen*	8.24	10.27	0.252	< 0.05
FDN*	60.31	53.18	1.131	< 0.05
FDA*	35.40	30.32	0.885	< 0.05
PB*	8.96	17.99	0.697	< 0.05
NDIN_NT	0.21	0.232	0.008	0.11
NIDA_NT	0.10	0.080	0.004	0.054
pH	4.07	4.48	0.040	< 0.05
Láctico*	4.17	5.08	0.324	0.16
Acético*	1.29	0.98	0.076	<0.05
Propiónico*	0.01	0.01	0.002	0.78
Butírico*	0.04	0.03	0.012	0.85
Densidad MS	136	205	8.375	<0.05
N-NH ₃ /NT	0.13	0.09	0.006	<0.05
NMPlog	2.06	2.54	0.100	<0.05

ESM: error estándar de las medias;

* Valores expresados como % de la Materia Seca

MS: materia seca; FDN: fibra insoluble en detergente neutro; FDA: fibra insoluble en detergente ácido; PB: proteína bruta; NIDN/NT: relación de nitrógeno insoluble en detergente neutro sobre nitrógeno total; NIDA/NT: relación de nitrógeno insoluble en detergente ácido sobre nitrógeno total; Densidad MS: kg de Materia seca/m³; N-NH₃/NT: relación de nitrógeno amoniacal sobre el nitrógeno total; NMPlog logaritmo en base 10 del conteo de esporas de Clostridios gasógenos.

En las tablas 4 y 5 se presentan los resultados de producción de gas in vitro y digestibilidad in vitro para cereales de invierno y praderas, respectivamente.

El coeficiente de variación entre muestras de la producción de gas total (Vt) y del tiempo de latencia (L) resultó en el orden de un dígito para ambos grupos, mientras que la tasa de producción de gas (kp) mostró mayor variabilidad con un CV de 20,3 % para ambos grupos, siendo su valor absoluto medio más alto para praderas (0,074) que para cultivos de invierno (0,05).

Tabla 4 Producción de gas y digestibilidad *in vitro* de ensilajes de cultivos de invierno muestreados en el trabajo (valores medios, medidas de dispersión, valor mínimo y valor máximo para cada variable, n = 27)

Variable	Media	CV %	Mínimo	Máximo
Vt	234	8,70	202	271
kp	0,05	20,3	0,03	0,07
L	3,20	8,80	2,65	3,83
DMS	51,7	13,2	36,6	65,9
DFDN	38,5	24,9	20,4	56,3

ESM: error estándar de las medias; CV: coeficiente de variación

Vt: Volumen total de gas (mL/g MS); kp: tasa de producción de gas (h^{-1}); L: tiempo de latencia (h); DMS: porcentaje desaparecida luego de 48 h de incubación; DFDN: porcentaje de fibra insoluble en detergente neutro desaparecida luego de 48 h de incubación.

Tanto la digestibilidad de la materia seca (DMS) como de la fibra (DFDN) mostraron una media más alta para ensilajes de pradera. La DFDN fue más variable con CV de 25% y 30% para cereales de invierno y praderas respectivamente.

De la comparación de los dos grupos de ensilajes, se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) para todas las variables (Vt, kp, L, DMS y DFDN) obtenidas en ensayos *in vitro*.

Respecto a cómo se relacionaron las variables entre sí, el contenido de FDN expresado como % se correlacionó negativamente con la densidad expresada en kg/m^3 para el conjunto de todos los ensilajes ($r = -0,439$; $P = 0,02$), lo que se representa gráficamente en la Figura 1.

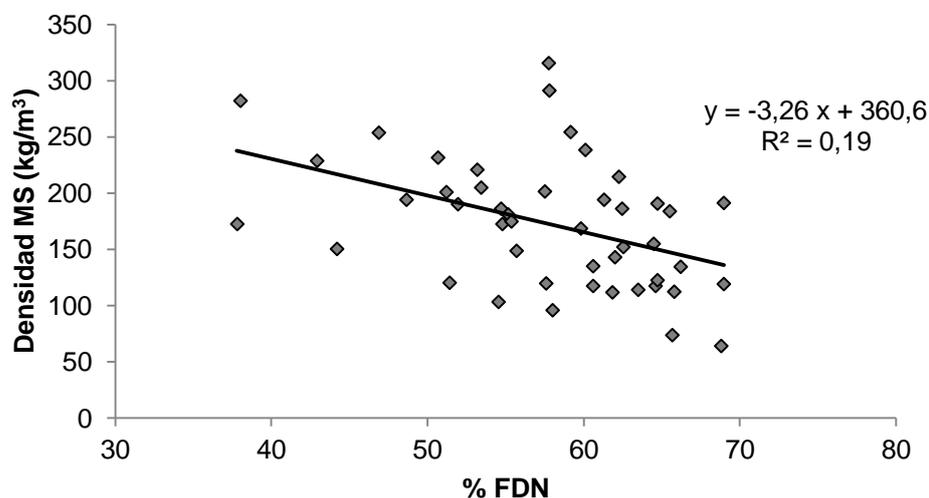
Tabla 5 Producción de gas y digestibilidad in vitro de ensilajes de praderas muestreados en el trabajo (valores medios, medidas de dispersión, valor mínimo y valor máximo para cada variable, n = 27)

ítem	Media	CV %	Mínimo	Máximo
Vt	198	7,3	170	226
kp	0,07	20,3	0,04	0,09
L	2,58	11,0	1,48	3,35
DMS	60,2	11,0	42,1	70,3
DFDN	46,5	30,1	19,2	67,8

ESM: error estándar de las medias; CV: coeficiente de variación

Vt: Volumen total de gas (mL/g MS); kp: tasa de producción de gas (h⁻¹); L: tiempo de latencia (h); DMS: porcentaje desaparecida luego de 48h de incubación; DFDN: porcentaje de fibra insoluble en detergente neutro desaparecida luego de 48 h de incubación.

Figura 1 Correlación entre el contenido en fibra detergente neutro (FDN) y densidad (expresada como kg de MS/m³) para todos los ensilajes (n=46)



Evaluando ambos grupos por separado, para los ensilajes elaborados con cereales de invierno, se presentan en la tabla 6 aquellos coeficientes de correlación de Pearson que mostraron una $P < 0,05$ entre variables de composición química y aquellas obtenidas a través de los ensayos de fermentación y digestibilidad in vitro.

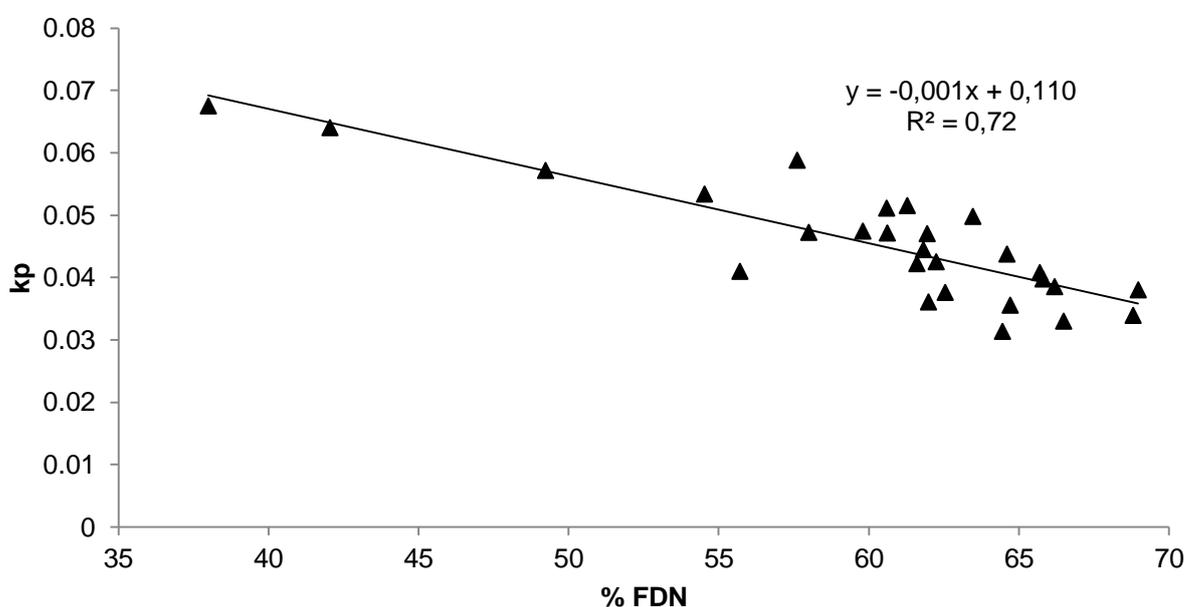
Tabla 6 Coeficientes de correlación de Pearson entre variables de composición química y de comportamiento in vitro para ensilajes de cereales de invierno. Se presenta el coeficiente de correlación (r) para las correlaciones que mostraron una $P < 0,05$ (n=27)

	MS	Cen	FDN	FDA	FDA/FDN	PB	NIDN/NT	NIDA/NT	pH	Láctico	Acético	Propiónico	Butírico
Digestibilidad <i>in vitro</i>													
DMS			- 0,41					- 0,41					
DFDN									0,47			- 0,49	
Fermentación <i>in vitro</i>													
Vt			- 0,45	- 0,41									
Kp	0,53		- 0,84	- 0,61				- 0,59					
L	- 0,41		0,40	0,39		0,40							

MS: materia seca; Cen: cenizas; FDN: fibra insoluble en detergente neutro; FDA: fibra insoluble en detergente acido; PB: proteína bruta; NIDN/NT: relación nitrógeno insoluble en detergente neutro sobre nitrógeno total; NIDA/NT: relación nitrógeno insoluble en detergente acido sobre nitrógeno total; DMS: porcentaje desaparecida luego de 48 h de incubación; DFDN: porcentaje de fibra insoluble en detergente neutro desaparecida luego de 48 h de incubación; Vt: Volumen total de gas (mL/g MS); kp: tasa de producción de gas (h^{-1}); L: tiempo de latencia (h).

Entre la composición química y la DMS y DFDN se observaron algunas correlaciones significativas pero menores a 0,5, siendo positiva la relación entre la concentración de ácido láctico y la digestibilidad de la fibra (DFDN), y negativa la relación entre contenido en FDN, NIDA y ácido propiónico con la digestibilidad. Para las variables de producción de gas *in vitro*, se observaron mayor cantidad de correlaciones, destacándose el conjunto observado entre éstas y las concentraciones de fibras. El volumen de gas producido (Vt) y su velocidad (kp) se relacionaron negativamente con las concentraciones de FDN y FDA, mientras que lo contrario sucedió con el tiempo de latencia (L) y las mismas variables. La correlación más fuerte observada fue entre la velocidad con que se produjo el gas (kp) y la concentración de FDN (Figura 2).

Figura 2 Relación entre el contenido de FDN y la tasa de producción de gas (kp) para los ensilajes de cultivos de invierno (n =27).



En la tabla 6 se presentan los coeficientes de correlación de Pearson que mostraron una $P < 0,05$ entre variables de composición química y las de digestibilidad y fermentación *in vitro* para los ensilajes de pradera. Para este grupo, se destacan las relaciones positivas observadas entre digestibilidad y cenizas, y las negativas entre digestibilidad y concentración de ácido butírico.

Coefficientes de correlación de Pearson entre variables de composición química y de comportamiento in vitro para ensilajes de praderas. Se presenta el coeficiente de correlación (r) para las correlaciones que mostraron una $P < 0,05$ ($n=27$)

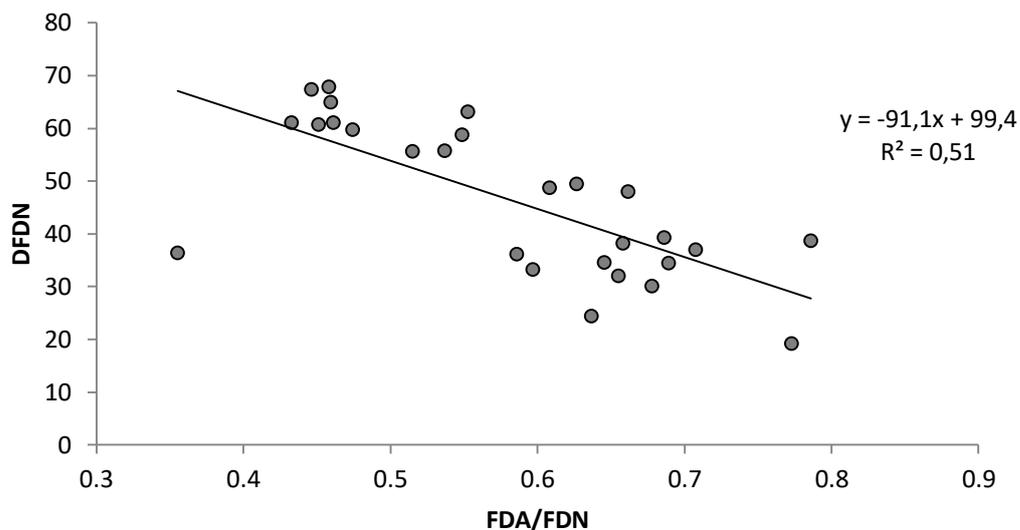
Tabla 7 Coeficientes de correlación de Pearson entre variables de composición química y de comportamiento in vitro para ensilajes de praderas. Se presenta el coeficiente de correlación (r) para las correlaciones que mostraron una $P < 0,05$ ($n=27$)

variable in vitro	MS	Cen	FDN	FDA	FDA/FDN	PB	NIDN/NT	NIDA/NT	pH	Láctico	Acético	Propiónico	Butírico
Digestibilidad in vitro													
DMS		0,60						- 0,41					- 0,38
DFDN		0,62	0,57		- 0,72		0,50					- 0,39	- 0,42
Fermentación in vitro													
Vt													- 0,45
kp		0,59				0,72							
L						- 0,40							

MS: materia seca; Cen: cenizas; FDN: fibra insoluble en detergente neutro; FDA: fibra insoluble en detergente acido; PB: proteína bruta; NIDN/NT: relación nitrógeno insoluble en detergente neutro sobre nitrógeno total; NIDA/NT: relación nitrógeno insoluble en detergente acido sobre nitrógeno total; DMS: porcentaje desaparecida luego de 48 h de incubación; DFDN: porcentaje de fibra insoluble en detergente neutro desaparecida luego de 48 h de incubación; Vt: Volumen total de gas (mL/g MS); kp: tasa de producción de gas (h^{-1}); L: tiempo de latencia (h).

La relación más fuerte observada para digestibilidad fue la relación negativa entre digestibilidad de la FDN y la proporción de FDN que representa la FDA (FDA/FDN), cuya regresión se representa en la Figura 3.

Figura 3 Relación entre el cociente de concentraciones entre la fibra ácido y neutro detergente (FDA/FDN) y la digestibilidad in vitro de la FDN (DFDN) para los ensilajes de pradera



Para este grupo de ensilajes las correlaciones entre componentes químicos con variables de producción de gas fueron escasas, destacándose la relación positiva de la tasa de producción de gas con la PB y las cenizas, y la negativa de la producción total de gas con la concentración de ácido butírico.

En la tabla 7 se presentan las ecuaciones de regresión múltiple con mayor R^2 que permiten estimar la digestibilidad de la materia seca y fibras, así como la tasa de producción de gas in vitro obtenidas en este estudio para ambos grupos de ensilajes. Para los cereales de invierno el mayor R^2 que se obtuvo fue la predicción de la k_p a partir de las concentraciones de fibra, materia seca y pH. Para los silos de pradera, el mayor R^2 se obtuvo para predecir la (DFDN) a partir de la relación FDA/FDN, la proporción del N total que representa el NDIN (NDIN/NT) y la densidad expresada en base seca.

Tabla 8 Ecuaciones de regresión múltiples que mejor predicen la digestibilidad y fermentación in vitro para ensilajes de pradera y cereales de invierno

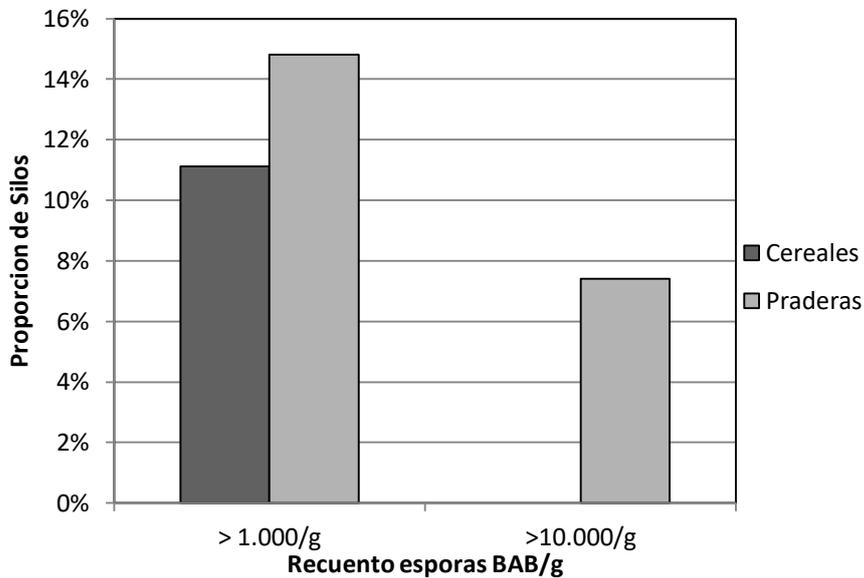
		Ecuación	R ²
Cereales de invierno			
DFDN (%)			
1		15,4 + 4,80 (AGV)	0,36
2		32,3 – 156,8 (NH ₃ /NT) + 5,4 (AGV)	0,69
3		43,6 – 163,9 (NH ₃ /NT) + 7,6 (AGV) – 0,57 (FDA)	0,80
DMS (%)			
1		61,5 – 91,2 (NH ₃ /NT)	0,22
2		53,2 - 102 (NH ₃ /NT) + 7,7 (Acético)	0,38
3		77,8 – 149 (NH ₃ /NT) – 52,7 (Láctico/AGV) + 8,3 (Láctico)	0,70
Fermentación in vitro (kp)			
1		0,11 – 0,0011 (FDN)	0,74
2		0,126 – 0,0012 (FDN) – 0,092 (NH ₃ /NT)	0,88
3		0,20 – 0,0013 (FDN) – 0,00068 (MS) – 0,013 (pH)	0,93
Praderas			
DFDN (%)			
1		119 – 121 (FDA/FDN)	0,79
2		110 – 152 (FDA/FDN) + 0,84 (FDA)	0,83
3		0,90 - 151 (FDA/FDN) + 100 (NDIN/NT) – 0,06 (Densidad MS)	0,86
DMS (%)			
1		86,0 – 48,2 (FDA/FDN)	0,63
2		124 – 48,2 (FDA/FDN) – 7,75 (pH)	0,72
3		142 – 52,2 (FDA/FDN) – 12,2 (pH) + 47,9 (NH ₃ /NT)	0,78
Fermentación in vitro (kp)			
1		- 0,0003 + 0,0042 (PB)	0,55
2		0,0115 + 0,00424 (PB) – 0,0024 (AGV total)	0,70

DMS: porcentaje desaparecida luego de 48 h de incubación; DFDN: porcentaje de fibra insoluble en detergente neutro desaparecida luego de 48 h de incubación; kp: tasa de producción de gas (h⁻¹); AGV: ácidos grasos volátiles totales; FDA: fibra insoluble en detergente ácido; FDN: fibra insoluble en detergente neutro; N-NH₃/NT: relación de nitrógeno amoniacal sobre el nitrógeno total; MS: materia seca; PB: proteína bruta; NIDN/NT: relación de nitrógeno insoluble en detergente neutro sobre nitrógeno total

En lo que refiere a la presencia de BAB, se presenta en la figura 4, la proporción en cada grupo de ensilajes que tuvo recuentos de esporas/g >1000 y > a 10.000, que de acuerdo con Botazzi (1983) se consideran como malos y muy malos, respectivamente. En los ensilajes de cereales de invierno se observó un 11% de las muestras con más de 1000 esporas/g, y para los ensilajes de pradera, 15%

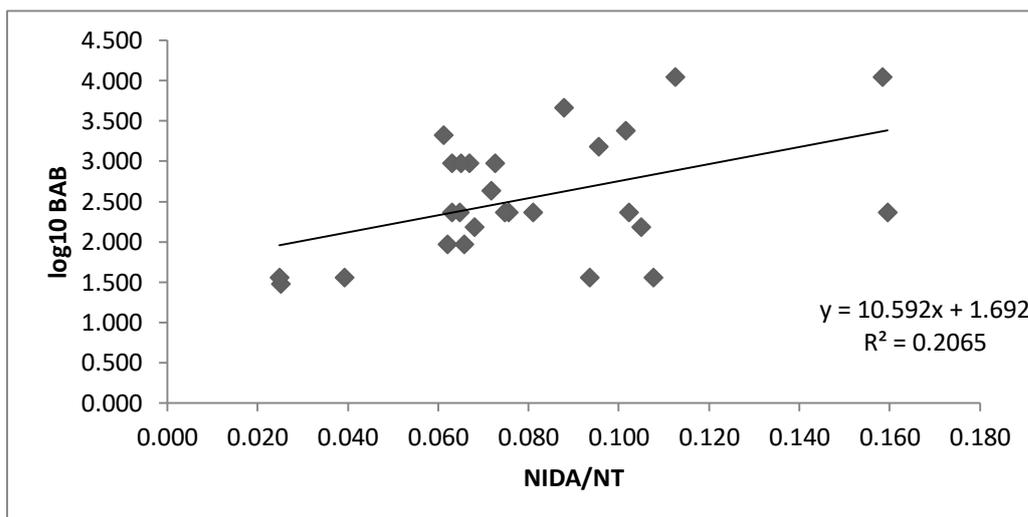
entre 1000 y 10000 esporas/g y un 7% con más de 10000, sumando en total un 22% de las muestras clasificadas como mala calidad en relación a esta variable.

Figura 4 Frecuencia de Ensilajes con más de 1000 y más de 10.000 esporas de BAB/g.



Se encontró relación entre el logaritmo en base 10 del recuento de esporas/g de BAB con la MS, el NIDA y el ácido butírico estas 2 últimas variables relacionadas al deterioro aeróbico. Siendo la correlación -0,39, +0,45 (figura 5) y + 0,34, respectivamente.

Figura 5 Relación entre NIDA/NT y Log10 BAB para los ensilajes de pradera



9. Discusión

Antes de comenzar a discutir los resultados de este trabajo, corresponde aclarar, que si bien el trabajo se basa es un relevamiento en predios comerciales, no es posible extrapolar la información generada para la totalidad de los productores del país, considerando que la muestra se compuso por inscripción voluntaria de los productores, y esto de alguna forma puede generar cierto sesgo en los datos que se presentan. Asimismo, indicamos respecto a las densidades presentadas en las tablas 1 y 2, que como se trataba de ensilajes comerciales cerrados, los muestreos se realizaron en la parte lateral de las bolsas de silo, y como se muestra en la Figura 6, la densidad en los silos bolsa puede ser variable en relación con el punto donde se realiza la medición.

Respecto a esto último, la densidad media de los silos de pradera concuerda con los datos relevados por Muck y Holmes (2006), para ensilajes de alfalfa confeccionados en bolsas, por lo que puede considerarse adecuada, al menos respecto a lo que realizan productores en Estados Unidos. De todas formas, los altos coeficientes de variación para ambos tipos de silos (35% y 21% para cereales de invierno y praderas respectivamente), así como el amplio rango verificado, indican que existe un margen de mejora. La densidad de los ensilajes es entonces una variable para trabajar en el sector productivo. De acuerdo con la variación, se observan mayores dificultades en el grupo de cereales de invierno, aunque no se encontraron reportes de densidad en este tipo de ensilajes. La mayor dificultad para compactar el material en los ensilajes de cereales de invierno podría explicarse por el mayor contenido de fibra en estos ensilajes respecto a los de pradera. En este trabajo en particular, al correlacionar todos los silos evaluados, encontramos una correlación lineal moderada y negativa ($r = -0.439$) entre el contenido de FDN y la densidad de MS/m^3 (Figura 2), concuerda esta correlación con lo presentado por Kruger et al. (2020) para ensilaje de maíz planta entera. Tampoco se pueden descartar otros aspectos que pueden incidir en la facilidad de compactación, como la humedad al momento de cosecha (Muck y Holmes, 2000). De acuerdo con nuestros datos, no parece haber sido éste un problema en estas muestras, pero no contamos con registros sobre algunos aspectos de la confección a nivel de campo que podrían eventualmente incidir en la densidad final.

En lo que respecta a los ensilajes de cereales de invierno, el contenido promedio de MS fue adecuado y acorde a las recomendaciones para ensilajes de planta entera (Demarquilly y Andrieu, 1990; Harrison et al., 1994), con una variación moderada ($CV = 17\%$). Los niveles de fibra altos y bajo contenido proteico, son frecuentes en este tipo de materiales (Kennelly y Weinberg, 2003). Los elevados coeficientes de variación en estas últimas se pueden explicar por el estado de madurez, principal factor que afecta los contenidos de proteína y fibra, así como otros aspectos, como el cultivar utilizado, altura de corte al momento de cosecha, entre otros (Kennelly y Weinberg, 2003; Stirling, 2016), datos que no pudieron

ser relevados en esta oportunidad. Otro factor que puede explicar la mayor variación en estos componentes puede ser la gran dependencia de la contratación de servicios para la elaboración de ensilajes en nuestro país (Irigoyen et. al. 2011), lo que puede generar desajustes entre el momento óptimo de confección y la disponibilidad de las empresas que ofrecen el servicio de elaboración.

Las variables utilizadas para evaluar la fermentación fueron las que mostraron la mayor variación. La excepción es el pH, que mostró un valor medio adecuado (Demarquilly y Andrieu, 1990; Harrison et al., 1994) con una baja variación (coeficiente de variación de 4,2%). Los valores registrados de pH, por un lado demuestran que los cultivos de cereales de invierno reúnen con frecuencia las condiciones para una correcta fermentación y acidificación del material. Sin embargo, la baja variación, pone en duda la utilidad del pH como variable discriminatoria para evaluar la calidad de fermentación en un material en particular. Las demás variables relacionadas con la fermentación del ensilaje, como los ácidos orgánicos, NIDA/NT y NH_3/NT , indican un proceso de fermentación adecuado en sus valores medios (Kung et al., 2018). La gran variación registrada para la concentración de ácidos orgánicos podría deberse, entre otras cosas, a que no en todos los casos los productores emplean aditivos específicos para mejorar la fermentación, a lo que se suma la diversidad de fermentos que se utilizan a nivel comercial. En este trabajo no fue posible relevar el dato de los fermentos utilizados, por no disponer los productores de información completa al respecto. La relación $\text{N-NH}_3/\text{NT}$ se encuentra algo elevada con respecto a valores esperados para estos ensilajes (Kung et al., 2018), indicando excesiva descomposición de las proteínas. Esta descomposición puede asociarse a un proceso de fermentación inadecuado ya sea por una confección lenta del ensilaje o pobre compactación, lo que concuerda con la baja densidad ya comentada, observada para los ensilajes de gramíneas.

En los ensilajes de praderas, al igual que en los ensilajes de cereales, la concentración de MS fue acorde con las recomendaciones para estas reservas (Demarquilly y Andrieu, 1990; Harrison et al., 1994). Aunque también con variación moderada (16%), esta variable, considerada de importancia para lograr ensilajes de buena calidad, representaba un problema por sus bajos valores según trabajos de relevamiento en nuestro país (Figurina, 1992; D'Alessandro et al., 1994; Acosta, 2002; Irigoyen et al., 2011). La adecuación a las recomendaciones podría indicar que los productores están cuidando las tecnologías de pre marchitado o acondicionado de los forrajes, aunque se recuerda lo dicho al principio, respecto al probable sesgo de representatividad de este muestreo respecto a la realidad nacional. Los valores de FDN, FDA y PB, fueron adecuados para este tipo de ensilajes, pero también con una variación moderada, lo que indica que estas variables pueden trabajarse en la

elaboración de ensilajes, siendo los factores principales de su variación el estado de madurez, la composición botánica y la manipulación del forraje una vez cortado (Harrison et al., 1994; Acosta, 2002).

El pH se encontró dentro del rango aceptable para este tipo de ensilaje (Kung et al., 2018), pero consistente con el concepto de que estos materiales presentan mayores dificultades para alcanzar la acidez que asegure una correcta conservación en el tiempo, se observa que algunas muestras quedaron sobre el rango recomendado. Esas dificultades han sido comentadas por diversos autores (Mc Donald et al. 1973; Acosta, 2002; Cajarville et al. 2012) quienes adjudican esta dificultad, a características de la composición química del material original como el alto contenido de proteínas y sales como los fosfatos (que generan un efecto tampón), a lo que se suma el bajo contenido de azúcares solubles (Fulkerson et al., 2007 y 2008; Cajarville et al., 2012; Cajarville et al., 2015; Repetto et al., 2006; Antúnez y Caramelli, 2009), lo que puede limitar la producción de ácidos orgánicos. Si bien no se evaluó la capacidad buffer en los materiales originales en este estudio, el hecho de apreciarse niveles de ácido láctico más altos en este grupo respecto a los cereales de invierno, y aun así un pH mayor, hace pensar que la capacidad tampón influyó en gran medida para contener el descenso. En lo que respecta al resto de los ácidos orgánicos, y el N-NH₃, se encontraron dentro de los valores deseados, reflejando un correcto proceso de fermentación, lo que supone, al menos en los productores alcanzados en este estudio, una confección adecuada de ensilajes de pradera.

Antes de comenzar a discutir los resultados de los ensayos in vitro, se cree conveniente realizar un par de puntualizaciones. En primer lugar, el aprovechamiento ruminal de los forrajes es influido por gran cantidad de variables, tanto relacionadas directamente al alimento en cuestión, como a características del animal y de la dieta total (Mertens, 1987). Es por eso por lo que la gran mayoría de los modelos de predicción de digestibilidad no son totalmente satisfactorios. Este trabajo se enfoca únicamente en las variables relacionadas directamente con el alimento. Por otra parte, no es intención de este trabajo correlacionar variables y realizar regresiones con la finalidad predictiva, sino que se pretende conocer cuáles son las variables que pueden impactar en mayor medida en el desempeño a nivel ruminal (ya sean estas de composición, de conservación o confección), con el fin de profundizar en ellas en futuros trabajos.

Los resultados de digestibilidad y producción de gas in vitro muestran diferencias importantes entre los dos grupos de ensilajes. En lo que respecta a los ensilajes de cereales de invierno, se observó una producción de gas total mayor en la incubación de 96 h, pero en contrapartida, la tasa de producción de gas fue más lenta, respecto a los ensilajes de pradera, y con un período de latencia más prolongado. Estos datos sugieren que los ensilajes de praderas son un alimento con gran potencial en cuanto al aporte de energía metabolizable dada su alta

tasa de producción de gas. En este sentido, Menke y Steingass (1988) mostraron una fuerte relación entre la producción de gas a 24 h de incubación con el contenido en energía metabolizable en diferentes tipos de forrajes. Este concepto se refuerza en el resultado de digestibilidad in vitro, en el que se observaron casi 10 puntos porcentuales de diferencia tanto para la MS y la FDN a favor de los ensilajes de praderas, aunque hay que considerar que el CV para la DFDN fue relativamente alto, con un rango de valores muy amplio. Esto indica que los ensilajes de pradera pueden ser un buen insumo cuando son elaborados en las condiciones ideales en cuanto a estado de madurez, confección y un almacenamiento que asegure una adecuada conservación.

La correlación negativa observada entre la DMS y el contenido de FDN para los ensilajes de cereales de invierno puede ser explicada por el hecho que este tipo de alimento puede contener cantidades significativas de almidón, que diluirían la concentración de FDN en el material a la vez que aumentan su digestibilidad total (Sinclair et al. 2003; Stirling, 2016).

En lo que respecta a los ensilajes de praderas, la principal relación encontrada fue la negativa entre la DFDN y la relación FDA/FDN. Esto indicaría que, en las praderas, la mayor proporción de celulosa y lignina es un factor a tener en cuenta a la hora de asegurar la calidad de la fibra (en términos de digestibilidad). Pese a que no está claro, a partir de nuestros datos, que factores específicos pudieron afectar esta relación, tanto el estado de madurez como la composición botánica de los materiales ensilados intervendrían en la conformación de estos contenidos, ya que en la mayoría de los casos fueron praderas que contenían mezclas de especies. Otro factor para considerar al respecto podría radicar en la manipulación mecánica del material luego del corte (acondicionadores, rastrillos, entre otros), dado que es sabido que algunos manejos pueden redundar en excesiva pérdida de hojas (Borreani et al., 2018). Lógicamente, la pérdida de hojas puede alterar la relación FDA/FDN a favor de la FDA, con el resultado de una menor digestibilidad de la FDN. Sin embargo, en este caso hubiera sido esperable una disminución concomitante de la DMS, cosa que no sucedió en este trabajo y permite descartar, al menos en la mayoría de los casos, un defecto de manipulación.

Se observó en los ensilajes de praderas relación entre el contenido en cenizas con la DMS y DFDN la tasa de producción de gas. No está claro a que pudo deberse este hecho, una posibilidad podría ser que al ser praderas mixtas con gramíneas y leguminosas, la diferente proporción de leguminosas en las muestras afecte el contenido de cenizas, ya que suele ser más alto en leguminosas respecto a gramíneas (Hoffman, 2005). También podría atribuirse a mayor contaminación con partículas de suelo. Estas pueden no ser retenidas por las bolsas utilizadas para los ensayos de digestibilidad (Ankom A57), en caso de tener diámetros menores de 25 micrones, algo que es frecuente para partículas de arcillas y limo (INIA Tacuarembó, 2015). Lo anterior promovería un

error en la prueba cuando la contaminación sea alta, que supone un aumento en el valor de las cenizas. Una problemática similar en ensayos de digestibilidad fue abordada por Alexander y McGowan (1966). De todas formas esto no explica la relación observada entre las cenizas y la tasa de producción de gas.

En cuanto a la relación de una adecuada conservación y el deterioro aeróbico, con el valor nutricional existe una revisión reciente (Borreani et al., 2018), que hace referencia a algunas relaciones observadas en este estudio para los ensilajes de cereales de invierno. Por ejemplo, la correlación negativa entre la relación NIDA/NT con la DMS, así como también el hecho de que la concentración de ácido propiónico que generalmente está asociado a fermentaciones inadecuadas (Kung et al., 2018) se correlacionó negativamente con la DFDN, mientras que el ácido láctico tuvo una relación positiva con la DFDN. Similares relaciones se observaron en los ensilajes de pradera. En este caso NIDA/NT y la concentración de ácido butírico se relacionaron negativamente con la DMS, y tanto el ácido propiónico como el butírico se relacionaron negativamente con la DFDN, estas relaciones son acordes a lo planteado por Borreani et al., (2018), donde la magnitud del deterioro en toda el proceso de elaboración y alimentación de ensilajes pueden afectar el aprovechamiento por parte de los animales, por pérdidas de los componentes con mayor valor nutritivo.

Las ecuaciones de regresión registran adecuadamente las relaciones encontradas entre las variables discutidas anteriormente, y permiten adelantar que un eje de trabajo para los ensilajes de cereales de invierno puede estar vinculado a mejorar la velocidad de fermentación (kp), que como comentábamos ha sido relacionada con el contenido energético. Mientras tanto, los ensilajes de pradera que realizan los productores, parece ser que la digestibilidad de los componentes fibrosos puede ser un tema de investigación y trabajo a nivel de técnicos y productores que permita mejorar en mayor medida los ensilajes que se realizan a campo.

Respecto a la presencia de BAB en esta muestra de ensilajes, la mayor proporción de ensilajes con mala clasificación en los ensilajes de pradera se encuentra en línea con lo presentado por Gaggioti et al. (1999), y puede estar relacionado con problemas de manipulación. Las praderas son materiales que muchas veces requieren el uso de rastrillos para agrupar hileras, las picadoras de forraje llevan plataformas que van más al ras del suelo, suponiendo todo lo anterior una mayor incorporación de tierra en el material a ensilar, aumentando el riesgo de contaminación. La presencia de BAB en los ensilajes de pradera se relacionó con el contenido de MS en forma negativa, y esto puede deberse a que en ensilajes con elevado contenido de humedad y mayor capacidad buffer se enlentece el proceso de acidificación, generando mayor oportunidad de desarrollo para estos microorganismos. Además de lo anterior, Vissers et al. (2007) en un ensayo sobre ensilajes comerciales en Holanda demostró que las

zonas de los ensilajes con mayor deterioro aeróbico presentan mayor frecuencia de contaminación con BAB, lo que está en línea con las correlaciones que encontramos en este estudio entre NIDA/NT y el log10 de BAB, ya que NIDA/NT puede aumentar en muestras que estuvieron mayor tiempo con temperatura elevada por presencia de aire. Por otro lado, la presencia de BAB se relacionó con la concentración de ácido butírico en forma positiva, lo que permite suponer la presencia y actividad de estas bacterias que en su metabolismo producen este ácido orgánico como producto final (Drouin y Lafrenière, 2012). La presencia de ácido butírico en ensilajes supone importancia al aumentar el riesgo de cetosis en vacas lactantes, cuando consumen 50-100 g/d (Oetzel, 2007).

10. CONCLUSIONES

De los datos relevados, se destaca como problemática a abordar para la mejora de ensilajes de cereales de invierno y de praderas la baja digestibilidad de los materiales, principalmente en cereales de invierno y aunque en el caso de los ensilajes de pradera la calidad nutritiva fue superior, la variabilidad observada en ambos grupos permite suponer que existe un considerable margen de mejora, si bien no fue relevado el estado de los materiales originales previo al ensilaje, el detallado estudio de variables asociadas a la conservación donde ambos grupos mostraron buenos valores nos hace pensar que en el estado de los materiales originales se podría encontrar esas mejoras.

Por otra parte, la escasa variación registrada en el pH para ambos tipos de silos, refuerza la idea de que esta variable, si bien es de medición necesaria, no es suficiente, dado que muchas veces no explica la variabilidad en cuanto a valor nutritivo y calidad de fermentación.

Las Correlaciones y regresiones observadas, confirman la hipótesis de este trabajo, de que el valor nutritivo de los ensilajes involucrados en este estudio está ligado tanto a la composición estructural de los ensilajes, como a la calidad de conservación de los mismos incluso cuando esta fue buena.

Sería interesante en futuros trabajos de investigación sobre esta temática, centrarse en una variedad de ensilaje, e intentar relevar información sobre todo el proceso de producción, desde el material original, su manejo de cosecha y hasta el material al final del proceso de fermentación, para profundizar en aspectos de gran relevancia que este trabajo no pudo atender.

11. Referencias Bibliográficas

1. Acosta Y. (2002). Ensilajes de pasturas: algunas consideraciones para su confección. Boletín de divulgación N° 80, INIA. pp:80
2. Albrecht, K. A., & Beauchemin, K. A. (2003). Alfalfa and other perennial legume silage. *Silage science and technology*, 42, 633-664.
3. Alexander, R. H., & McGowan, M. (1966). The routine determination of in vitro digestibility of organic matter in forages-an investigation of the problems associated with continuous large-scale operation. *Grass and Forage Science*, 21(2), 140-147.
4. Ankom Technology (2005). *In vitro true* digestibility using the DAISY^{II} incubator. Ankom technology Method 3.
5. 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, Facultad de Veterinaria. Universidad de la Republica. 43p).
6. Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R. J., Holmes, B. J., & Muck, R. E. (2018). Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3952-3979.
7. Bottazzi, V. (1983). Clostridium e fermentazioni butirriche dei formaggi. *L'industria del latte*. vol.3: 3-26. 10.
8. Britos, A., Repetto, J. L., Garciarena, 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(2), 72-77.
9. 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 de Buiatría. Paysandú, Uruguay.
10. Cajarville C, Britos A, Garciarena 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.
11. 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 Zealand journal of agricultural research*, 58(3), 281-291.

12. Cherney, J. H., & Cherney, D. J. R. (2003). Assessing silage quality. *Silage science and technology*, 42, 141-198.
13. Chilibroste, P. (2015). ¿Carga o productividad individual? ¿Pasto o concentrado? Mitos y realidades en la intensificación de los sistemas de producción de leche en Uruguay. XLIII Jornadas Uruguayas de Buiatría.
14. Davies, Z. S., Mason, D., Brooks, A. E., Griffith, G. W., Merry, R. J., & Theodorou, M. K. (2000). An automated system for measuring gas production from forages inoculated with rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes on grass silage. *Animal Feed Science and Technology*, 83(3), 205-221.
15. D'Alessandro J., Corengia C.F., Repetto J.L., Cajarville C., Echarri V., Hareau M. (1994). Valor nutritivo de distintos ensilados en la alimentación del ganado lechero, *Veterinaria* 29, 4–10.
16. De Boever, J. L., Cottyn, B. G., De Brabander, D. L., Vanacker, J. M., & Boucqué, C. V. (1996). Prediction of the feeding value of grass silages by chemical parameters, in vitro digestibility and near-infrared reflectance spectroscopy. *Animal Feed Science and Technology*, 60(1-2), 103-115.
17. Demarquilly C., Andrieu J, 1990. Forrajes. En: Alimentación de bovinos, ovinos y caprinos. INRA. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
18. Dijkstra J., Kebreab E., Bannink A., France J., Lopez S. (2005). Application of the gas production technique to feed evaluation systems for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* (123-124) 561-578.
19. Dirección de Información y Estadística Agropecuaria. Anuario Estadístico Agropecuario, (2019). Anuario estadístico. Disponible en: <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2019/Anuario2019.pdf>
20. Drouin, P., & Lafrenière, C. (2012). Clostridial spores in animal feeds and milk. In *Milk Production-An up-to-date overview of animal nutrition, management and health*. IntechOpen.
21. Elferink, S. J. W. H. O., Driehuis, F., Gottschal, J. C., & Spoelstra, S. F. (2000). Silage fermentation processes and their manipulation. *FAO Plant Production and Protection Papers*, 17-30.
22. 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.

23. Fulkerson WJ, Horadagoda A, Neal JS, Barchia I, Nandra KS 2008. Nutritive value of forage species grown in the warm temperate climate of Australia for dairy cows: herbs and grain crops. *Livestock Science* 114: 75–83.
24. Fulkerson WJ, Neal JS, Clark CF, Horadagoda A, Nandra KS, Barchia I 2007. Nutritive value of forage species grown in the warm temperate climate of Australia for dairy cows: grasses and legumes. *Livestock Science* 107: 253–264.
25. Gaggiotti, M.; Romero, L.; Taverna, M.; Calvino, L.; Bruno, O. (1999) Clostridios gasógenos en leche: influencia del uso de alfalfa y de la limpieza de la ubre. INTA Rafaela. <http://rafaela.inta.gov.ar/anuario1999/p3.htm>.
26. García-Rodríguez, A., Mandaluniz, N., Flores, G., & Oregui, L. M. (2005). A gas production technique as a tool to predict organic matter digestibility of grass and maize silage. *Animal feed science and technology*, 123, 267-276.
27. Givens, D. I., Everington, J. M., & Adamson, A. H. (1989). The digestibility and metabolisable energy content of grass silage and their prediction from laboratory measurements. *Animal Feed Science and Technology*, 24(1-2), 27-43.
28. Harrison J.H., Blauwiel R., Stokes M.R. 1994. Fermentation and Utilization of Grass Silage, *J. Dairy Sci.* 77 3209–3235.
29. Hoffman P., Combs D., (2004). Using NDF Digestibility in Ration Formulation. *Focus on Forage* vol. 6 no 3. University of Wisconsin-Madison.
30. Hoffman, P. C. (2005). Ash content of forages. *Focus on Forage*, 7(1), 1-2.
31. INIA Tacuarembó, 2015: Semana de la Ciencia y Tecnología, Jornada de Puertas Abiertas. Disponible en: (<http://inia.uy/Documentos/P%C3%BAblicos/INIA%20Tacuaremb%C3%B3/2015/EI%20Suelo%2020%20de%20mayo.pdf>). Fecha de consulta: 25 de junio de 2020
32. Irigoyen A., Majó E., Chalkling D. 2011. Relevamiento nacional de reservas forrajeras y caracterización de su uso en establecimientos comerciales. Serie: FPTA N° 119, INIA, Uruguay.
33. Kennelly, J. J., & Weinberg, Z. G. (2003). Small Grain Silage en: *Silage science and technology*, 749-779.
34. Krüger, A. M., Lima, P. D. M. T., Abdalla Filho, A. L., de Geus Moro, J., de Carvalho, I. Q., Abdalla, A. L., & Jobim, C. C. (2020). Dry matter

concentration and corn silage density: Effects on forage quality. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, 8(1), 20-27.

35. Kung Jr, L., Shaver, R. D., Grant, R. J., & Schmidt, R. J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of dairy Science*, 101(5), 4020-4033.
36. Licitra, G., Hernandez, T. M., & Van Soest, P. J. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal feed science and technology*, 57(4), 347-358.
37. Martínez, M.; Lulhe, I. (2011). Un problema a prevenir. La ruta del clostridio. *Producir XXI*, Bs.As. (19) 231:10-18.
38. Martin, N. P., Muck, R. E., & Holmes, B. J. (2004). Silage density and dry matter loss of bag and bunker silos. In *Proc. Idaho Alfalfa and Forage Conference* (pp. 23-24).
39. Mauricio R. M , Mould F. L., Dhanoa M. S., Owen E., Channa K. S., Theodorou M. K. (1999). A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79: 321-330.
40. MCDONALD, P. y R. WHITTENBURY. 1973. The Ensilage Process. Chapter 28. Páginas 33 - 60. In *Chemistry and Biochemistry of Herbage*. Buttler, G.W. y R.W. Bailey eds. Academic Press. London.
41. Menke, K. H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal research and development*, 28, 7-55.
42. Mertens, D. R. (1987). Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. *Journal of animal science*, 64(5), 1548-1558.
43. Messer, H. J. M., & Hawkins, J. C. (1977). The influence of the properties of grass silage on bulk density and horizontal pressure. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 22(1), 55-64.
44. Mier Quiroz M., (2009). Caracterización del valor nutritivo y estabilidad aeróbica de ensilados en forma de microsilos para maíz forrajero. Tesis de maestría. Universidad de Córdoba. Córdoba, España. pp: 64
45. Muck, R. E., & Holmes, B. J. (1998). Density and losses in pressed bag silos. In *2001 ASAE Annual Meeting* (p. 1). American Society of Agricultural and Biological Engineers.
46. Muck R.E. y Holmes B.J. (2000). Factors affecting bunker silo densities. *Applied Engineering in Agriculture* 15(6):613-619.

47. Muck, R. y Holmes, B. J. (2006). Bag silo densities and losses. *Transactions of the ASABE*, 49(5), 1277-1284.
48. NEN (Netherlands Standardization Institute), (1994). NEN-ISO-6877: Milk and milk products: Detection of spores of butyric acid bacteria and determination of the content of spores of butyric acid bacteria. 6877. Netherlands Standardization Institute, Delft, Holanda. NEN 6877: 1-4.
49. Nocek, J. E. (1988). In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. *Journal of Dairy Science*, 71(8), 2051-2069.
50. Nousiainen, J., Rinne, M., Hellämäki, M., & Huhtanen, P. (2003). Prediction of the digestibility of the primary growth of grass silages harvested at different stages of maturity from chemical composition and pepsin-cellulase solubility. *Animal Feed Science and Technology*, 103(1-4), 97-111.
51. Oba M., Allen M. S., (1999). Evaluation of the Importance of the Digestibility of Neutral Detergent Fiber from Forage: Effects on Dry Matter Intake and Milk Yield of Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 82(3), 589-596.
52. Oetzel, G. R. (2007). Herd-level ketosis—diagnosis and risk factors. In *Preconference seminar C* (Vol. 7, pp. 67-91).
53. Ørskov, E. R., & McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, 92(2), 499-503.
54. Pigurina, G. (1992). Características de ensilajes en establecimientos lecheros. Colonia, Uruguay: INIA La Estanzuela.
55. Pitt, R. E. (1990). Silage and Hay Preservation (NRAES 5). <https://ecommons.cornell.edu/bitstream/handle/1813/69422/NRAES-005.pdf?sequence=1>
56. Pitt, R., & Muck, R. (1993). A diffusion model of aerobic deterioration at the exposed face of bunker silos. *Journal of agricultural engineering research*, 55(1), 11-26.
57. Repetto J. L., Cajarville C., D' Alessandro J., Curbelo A., Soto C. y Garin D. (2005). Effect of wilting and ensiling on ruminal degradability of temperate grass and legume mixtures. *Anim Res.* 54: 73-78.
58. Repetto J.L., Britos A., Errandonea N., Cozzolino D., Cajarville C. 2006. Effect of harvest schedule and plant part on in vitro gas production of temperate forages. *J.Dairy Sci.* 89 (Suppl. 1), 102.

59. Repetto JL, Echarri V, Aguerre M, Cajarville C. (2011). Use of 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.
60. Robertson, J.B., Van Soest, P.J., (1981). The detergent system of analysis and its application to human foods. In: James, W.P.T., Theander, O. (Eds.), *The Analysis of Dietary Fiber in Food*. Marcel Dekker, NY, USA, pp. 123–158.
61. Rooke, J. A., & Hatfield, R. D. (2003). *Biochemistry of ensiling*. *Silage science and technology*, 42, 95-139.
62. Ruppel, K. A. (1992). Effect of bunker silo management on hay crop nutrient management. M.S. Thesis, Cornell University, Ithaca, NY.
63. Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G., & Ferguson, D. M. R. (2003). Effects of crop maturity and cutting height on the nutritive value of fermented whole crop wheat and milk production in dairy cows. *Livestock Production Science*, 81(2-3), 257-269.
64. Stirling, S. (2016). Efecto del estado fenológico y del ensilaje sobre la composición química, calidad de fermentación y degradabilidad ruminal de planta entera de avena granífera. Tesis de maestría, Facultad de Veterinaria. Universidad de la Republica. 38 p.
65. Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., Mc Allan, 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.
66. Thomas, J., Dalla Fontana, I., Ramos, E., Demaria, M., Costamagna, D., Faggiano, M., Y Bonzi, E. (2012). Factores de riesgo de contaminación de la leche con bacterias esporuladas (*Clostridium*) en establecimientos lecheros de la provincia de Santa Fe. *FAVE. Sección ciencias agrarias*, VOL 11 (1), 19-28
67. Van Soest, P. V., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*, 74(10), 3583-3597.
68. Vissers, M. M. M., Driehuis, F., Te Giffel, M. C., De Jong, P., & Lankveld, J. M. G. (2007). Concentrations of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 928-936.

69. Wilkinson, J. M., Bolsen, K. K., & Lin, C. J. (2003). History of silage. *Silage science and technology*, 42, 1-30.
70. Woolford, M. K., & Pahlow, G. (1998). The silage fermentation. In *Microbiology of fermented foods* (pp. 73-102). Springer, Boston, MA.