

Sección: Artículo de investigación
Efectos del estado fenológico, del marchitado y de la aplicación de un inoculante microbiano sobre la calidad nutricional de ensilaje de alfalfa

Artículo de Genero GA, Pechin GH, Sánchez LO, Ginart LA, Denda SS, Sánchez C, Godoy TA, Gerena A
CIENCIA VETERINARIA, Vol. 24, Nº 2 (2022) ISSN 1515-1883 (impreso) E-ISSN 1853-8495 (en línea)
DOI: <http://dx.doi.org/10.19137/cienvet20224201>

Efectos del estado fenológico, del marchitado y de la aplicación de un inoculante microbiano sobre la calidad nutricional de ensilaje de alfalfa

Effects of phenological stage, wilting and microbial inoculant application on nutritional quality of alfalfa silage

Efeitos do estado fenológico, murcha e aplicação de inoculante microbiano na qualidade nutricional da silagem de alfafa

Genero GA, Pechin GH, Sánchez LO, Ginart LA, Denda SS, Sánchez C, Godoy TA, Gerena A

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, calle 5 esquina 116, General Pico (6360), La Pampa.

Correo electrónico: generog@vet.unlpam.edu.ar

DOI: <http://dx.doi.org/10.19137/cienvet20224201>

Fecha de recepción del artículo: 03/03/2022

Fecha de aceptación para su publicación: 07/04/2022

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del estado fenológico, del marchitado y de la aplicación de un inoculante microbiano sobre la composición química, la concentración de ácidos orgánicos y la degradabilidad ruminal de la materia seca (DRMS) en ensilaje de alfalfa. La pastura fue cortada en dos estados fenológicos: 10 % (F10) y 50 % (F50) de floración y el material fue dividido en dos fracciones: con marchitado (CM) y sin marchitado (SM). Cada fracción fue picada y asperjada con un inoculante (*Lactobacillus plantarum*, 5×10^9 células



Esta obra se publica bajo licencia Creative Commons 4.0 Internacional. (Atribución-No Comercial-Compartir Igual) a menos que se indique lo contrario, <http://www.creativecommons.org.ar/licencias.html>

viables/g, CI) o con agua destilada (sin inoculante, SI) y ensilada en microsilos de PVC, con 6 repeticiones por tratamiento. Al cabo de 90 días se determinaron: pH, contenido de materia seca (MS), proteína bruta (PB), nitrógeno amoniacal (N-NH₃), fibra detergente neutra (FDN) y ácida (FDA), DRMS a tiempo fijo (30 h), ácidos acético (C2), propiónico (C3), butírico (C4) y láctico (AL). El marchitado disminuyó el pH, el contenido de N-NH₃, FDN y FDA, e incrementó la concentración de PB del ensilaje. En F10, el marchitado disminuyó la concentración de C2, C3 y C4, y aumentó la de AL. En F50, el marchitado disminuyó la concentración de C2 en los dos niveles de inoculante y, solo cuando el inoculante no fue aplicado, el marchitado disminuyó la de C3 y C4, y aumentó la de AL. En F50-SM, la aplicación de inoculante disminuyó el contenido de C2, C3 y C4, y aumentó la de AL. La DRMS fue más alta en CM que en SM, y fue mayor en F10 vs. F50 solamente cuando se aplicó marchitado. La aplicación del inoculante disminuyó el contenido de FDN y, en F50, bajó el nivel N-NH₃. Puede concluirse que el uso del marchitado mejora la calidad nutricional del ensilaje de alfalfa, mientras que el efecto de *L. plantarum* se limita a algunas combinaciones de tratamientos.

Palabras clave: Ensilaje de alfalfa, *Lactobacillus plantarum*, Estado fenológico, Marchitado

ABSTRACT

The objective of this work was to assess the effects of phenological stage, wilting and a microbial inoculant on chemical composition, organic acids concentration and ruminal degradability of dry matter (DMRD) of alfalfa silage. The pasture was cut in two phenological stages: 10 % (F10) and 50 % (F50) of flowering, and the material was divided into two fractions: with wilting (W) and without wilting (NW). Each fraction was chopped and sprayed with an inoculant (*Lactobacillus plantarum*, 5×10^9 viable cells/g, I) or with distilled water (no inoculant, NI) and ensiled in PVC microsilos, with 6 replications per treatment. After 90 days, pH, dry matter (DM), crude protein (CP), ammonia nitrogen (NH₃-N), neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF), DMRD at 30 h, acetic (C2), propionic (C3), butyric (C4) and lactic (LA) acids were determined. The wilting process decreased pH, NH₃-N, NDF and ADF, and increased CP of the silage. In F10, wilting decreased the concentration of C2, C3 and C4, and increased LA. In F50, wilting decreased the C2 concentration at the two levels of inoculant, and only when inoculant was not applied, wilting decreased C3 and C4, and increased LA. In F50-NW the application of

inoculant decreased the content of C2, C3 and C4, and increased LA. The DMRD of W was higher than NW, and it was higher in F10 vs F50 only when wilting was applied. The inoculant application decreased the NDF content, and in F50 it decreased NH₃-N level. It can be concluded that the use of wilting improves the nutritional quality of alfalfa silage, while the effect of *L. plantarum* is limited to some combinations of treatments.

Key words: Alfalfa silage, *Lactobacillus plantarum*, Phenological stage, Wilting

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do estágio fenológico, murchamento e aplicação de inoculante microbiano sobre a composição química, a concentração de ácidos orgânicos e a degradabilidade ruminal da matéria seca (DMR) em silagem de alfafa. A pastagem foi cortada em dois estádios fenológicos: 10 % (F10) e 50 % (F50) de floração e o material foi dividido em duas frações: murcha (CM) e sem murcha (SM). Cada fração foi triturada e polvilhada com um inoculante (*Lactobacillus plantarum*, 5×10⁹ células viáveis/g, CI) ou com água destilada (sem inoculante, SI) e ensilada em microsilos de PVC, com 6 repetições por tratamento. Após 90 dias, foram determinados: pH, teor de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), nitrogênio amoniacal (N-NH₃), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), DRMS em um tempo fixo (30 h), ácidos acético (C2), propiônico (C3), butírico (C4) e láctico (AL). A murcha diminuiu o pH, o teor de N-NH₃, FDN e FDA, e aumentou a concentração de PB da silagem. Em F10, a murcha diminuiu a concentração de C2, C3 e C4 e aumentou a de AL. Em F50, a murcha diminuiu a concentração de C2 nos dois níveis de inoculante e, somente quando o inoculante não foi aplicado, a murcha diminuiu a de C3 e C4 e aumentou a de AL. Em F50-SM, a aplicação do inoculante diminuiu o teor de C2, C3 e C4, e aumentou o de AL. DRMS foi maior em CM do que em SM, e foi maior em F10 vs. F50 somente quando aplicado murcha. A aplicação do inoculante diminuiu o teor de FDN e, em F50, o teor de N-NH₃ diminuiu. Pode-se concluir que o uso da murcha melhora a qualidade nutricional da silagem de alfafa, enquanto o efeito de *L. plantarum* é limitado a algumas combinações de tratamentos.

Palavras-chave: Silagem de alfafa, *Lactobacillus plantarum*, Estágio fenológico, Murcha

Introducción

El uso de la alfalfa para la confección de reservas forrajeras juega un rol importante en los planteos de producción bovina de carne y leche, permitiendo no sólo estabilizar la oferta forrajera, sino también ajustar las dietas en cuanto a su contenido de fibra efectiva y proteína. Aunque la forma de reserva más común de la alfalfa es el heno, los análisis de composición química muestran deficiencias en calidad nutricional: 16 % de proteína bruta (PB), con mínimo de 13 y máximo de 24 %, 56 % de fibra detergente neutro (FDN), 44 % de fibra detergente ácido (FDA) y 58 % de digestibilidad de la materia seca, en parte explicadas por el uso de maquinaria de corte inapropiada, un inadecuado manejo de los lotes y el almacenamiento de los rollos a la intemperie⁽¹⁾. Una alternativa de conservación y almacenamiento que puede mejorar el valor nutricional de las reservas de alfalfa es la confección de ensilajes. Sin embargo, este cultivo tiene una baja concentración de azúcares y un alto contenido de proteína que limitan una rápida fermentación y acidificación del material ensilado. La baja concentración de azúcares condiciona el crecimiento bacteriano, mientras que el elevado contenido proteico cumple la función de buffer⁽²⁾.

Durante la fermentación del forraje, la tasa y magnitud de disminución del pH determina el grado de pérdida de nutrientes del ensilaje. Esta pérdida de calidad es debida a la acción de enzimas de la planta y de microbios anaerobios. El uso de aditivos biológicos y químicos puede promover patrones de fermentación adecuados, especialmente cuando existen condiciones subóptimas, como puede ser el caso del ensilado de alfalfa. Dentro de los aditivos biológicos, se encuentran los inoculantes microbianos y las enzimas⁽³⁾. Entre los inoculantes microbianos usados más frecuentemente están los que contienen bacterias ácido lácticas (BAL) homofermentativas (Ho). Actualmente, la mayoría de las bacterias de este grupo se clasifican taxonómicamente como heterofermentativas facultativas (HeF) en lugar de Ho obligadas⁽⁴⁾. Ambos grupos fermentan las hexosas y producen ácido láctico (AL) pero, además, las BAL HeF poseen la enzima fosfocetolasa que les permite fermentar pentosas hasta AL y ácido acético (C2). Otro grupo lo constituyen las heterofermentativas obligadas (por ejemplo, *Lactobacillus buchneri*) que producen otros compuestos, además de AL⁽⁵⁾. La inoculación de ensilajes con BALHo y BALHeF ha demostrado ser efectiva para mejorar los parámetros de fermentación a través del incremento de AL y de la reducción del pH, de la concentración de ácido butírico (C4) y de nitrógeno amoniacal (N-NH₃). Por otro lado, también se verificó una inhibición del crecimiento de microbios epífitos deletéreos, como clostridios y hongos. Algunas de estas especies

de BAL son *L. plantarum*, *L. faecium*, *Enterococcus faecium* y varias especies del género *Pediococcus*⁽⁶⁾.

Otro factor que dificulta una adecuada fermentación láctica en el cultivo de alfalfa es el alto contenido de agua en el momento óptimo de calidad nutricional del forraje. En general, el contenido de materia seca (MS) en la planta de alfalfa se encuentra entre $18,3 \pm 6,2$ % y $22,4 \pm 6,5$ % para alfalfas en pre-floración y mediados de floración, respectivamente⁽⁷⁾. Si el forraje es ensilado con un alto contenido de humedad, el establecimiento de las BAL se ve alterado y la disminución del pH no es suficiente como para inhibir el crecimiento de clostridios, los cuales se multiplican y fermentan el AL a butírico y a los aminoácidos a amonio, resultando en incrementos del pH y pérdidas de MS^(3,8). Una herramienta para reducir el contenido de humedad del cultivo a ensilar, favorecer la fermentación y disminuir las pérdidas de MS es realizar el marchitado u oreo previo al picado^(2,9). Sin embargo, un marchitado de mayor magnitud predispone a una fermentación más lenta y con menores valores finales de AL, debido a que el crecimiento bacteriano se reduce cuando la concentración de agua es baja⁽¹⁰⁾. Los ensilajes confeccionados con forrajes marchitados suelen presentar un mayor pH o una disminución más lenta de este, un mayor nivel de carbohidratos solubles en agua (CSA), y un menor contenido de AL, C2 y $N-NH_3$ ^(10,9).

Por otro lado, se han observado interacciones entre el uso de marchitado y la aplicación de inoculantes microbianos sobre algunos parámetros de fermentación y la degradabilidad de la MS⁽⁹⁾, lo cual amerita una mayor investigación.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos del estado fenológico, de la aplicación de un inoculante microbiano a base de *L. plantarum* y del marchitado sobre la composición química, la concentración de ácidos orgánicos y la degradabilidad ruminal de la MS (DRMS) en ensilaje de alfalfa.

Materiales y métodos

Se trabajó con la variedad de alfalfa Don Gaspar 15-601 (Brandemann y Cía. S.C.), grupo 6, implantada en un campo ganadero a 35 km al suroeste de General Pico, La Pampa. El forraje fue cortado mediante motoguadaña, en diciembre de 2015, en dos estados fenológicos: 10 % (F10) y 50 % (F50) de floración. El material correspondiente a cada estado fenológico fue dividido en dos fracciones: con marchitado (CM) y sin marchitado (SM). La fracción SM fue picada inmediatamente posterior al corte con una minipicadora de forraje para la confección de los microsilos. En la fracción CM, el marchitado se llevó a cabo en

el mismo lugar de corte, sobre el suelo y en condiciones naturales. El contenido de MS del forraje CM fue monitoreado cada una hora por la metodología de microondas, según Petruzzi et al.⁽¹¹⁾, hasta alcanzar el valor deseado de 45 %. Una vez alcanzado este porcentaje de MS, el material fue procesado de igual manera que SM. Para la confección de los microsilos se procedió de la siguiente manera: de cada porción del material de F10-SM, F10-CM, F50-SM y F50-CM, se tomaron 12 fracciones de 2,4 kg de peso húmedo, 6 de las cuales fueron asperjadas con 30 ml de una solución de inoculante biológico (con inoculante, CI) y 6 con el mismo volumen de agua destilada (sin inoculante, SI). El inoculante estuvo compuesto por cultivos de *L. plantarum* (5×10^9 células viables/g) y para la dosificación se siguieron las indicaciones del fabricante (100 g de inoculante cada 50 toneladas de peso húmedo de forraje). Cada una de las porciones de 2,4 kg de forraje fue ensilada en microsilos de PVC, de 11 cm de diámetro y 50 cm de largo (48 microsilos en total), equivalente a una densidad de 610 kg/m³.

De esta manera quedaron definidos 8 tratamientos por la combinación de 3 factores (F: estado fenológico; M: marchitado; I: inoculante), con 2 niveles cada uno (F: F10 y F50; M: CM y SM; I: CI y SI), en un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial $2 \times 2 \times 2$, con 6 repeticiones.

Los microsilos fueron llevados al Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLPam) y conservados a temperatura ambiente hasta su apertura después del día 90 de su confección, para la realización de los distintos análisis. Inmediatamente luego de la apertura, se tomaron dos muestras de 25 g, una para la medición del pH con un pHmetro digital, y la otra, para la determinación de ácidos orgánicos. Para la medición de los ácidos orgánicos se procedió a la obtención de un extracto de la siguiente manera: la muestra de 25 g se colocó en un recipiente de vidrio y se adicionaron 250 ml de agua destilada, se tapó herméticamente y se mantuvo refrigerada a 8 °C. Pasadas 24 h, el contenido fue filtrado. De este filtrado se tomaron 8 ml, se adicionaron 2 ml de HCl 0,2 N y se refrigeró por 24 h más. Por último, se procedió a la centrifugación a 10.000 rpm y 10 °C y se obtuvo 1 ml del sobrenadante, que fue congelado hasta la determinación de los ácidos orgánicos en el Laboratorio de Nutrición Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. La purificación de las muestras se realizó con ácido meta-fosfórico (25 % en ácido sulfúrico 0,5 M) a razón de 0,5 ml por cada 2 ml de muestra y luego fueron centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm. La determinación de AGVs y AL se realizó por cromatografía gaseosa con un equipo Konik-3000 y una columna BP-20 (marca SGE) con N₂ como vehículo y según protocolo recomendado por el fabricante de la columna⁽¹²⁾.

La temperatura del inyector y del detector de ionización de llama fue mantenida a 250 °C.

Para la determinación de la concentración de N-NH₃ se tomó una muestra de 10 g de ensilaje y se homogeneizó en 600 ml de agua destilada durante 2 minutos, en licuadora a potencia máxima. El homogeneizado fue filtrado y el líquido resultante centrifugado a 10.000 g durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C. Sobre el líquido sobrenadante se determinó la concentración de N-NH₃ por medio de la lectura en un espectrofotómetro, según la técnica de Weatherburn⁽¹³⁾.

Por último, una porción representativa de cada microsilo fue congelada a - 20 °C, hasta la realización de los análisis de MS, PB, FDN, FDA y DRMS. Con una submuestra de 200 g se determinó MS con estufa de flujo continuo a 105 °C. Otra submuestra de 200 g fue secada a 60 °C y molida en un molino tipo Resch, provisto con una malla de 2 mm de diámetro, la cual fue utilizada para los análisis de PB⁽¹⁴⁾, FDN y FDA⁽¹⁵⁾ y DRMS.

Para la determinación de la DRMS se pesaron 3,6 g de MS de cada muestra y se colocaron en bolsas de poliamida de 10 × 20 cm con una porosidad de 50 µm (Ankom®). Cada bolsa fue cerrada mediante un precinto plástico para evitar la pérdida de material, quedando una superficie efectiva de 360 cm² (10 × 18 × 2) y una relación de 10 mg/cm² entre cantidad de muestra y superficie de la bolsa, de acuerdo a Vanzant et al.⁽¹⁶⁾. Las 48 bolsas correspondientes a cada repetición de cada tratamiento, más 2 blancos, se colocaron dentro de una bolsa rejilla, junto con una cadena de 1 kg de peso, para permitir su contacto con el saco ruminal ventral, y una cuerda de nylon de 60 cm de longitud para fijarla a la cánula, permitiendo su libre movimiento dentro del rumen⁽¹⁷⁾. La bolsa rejilla fue introducida en el rumen de una hembra bovina Hereford, canulada y alimentada con heno de alfalfa. Las bolsas fueron retiradas a las 30 h pos incubación e inmediatamente lavadas bajo el flujo de agua, por aproximadamente 90 segundos, hasta que el agua salió límpida, para frenar la acción microbiana y eliminar restos de contenido ruminal⁽¹⁸⁾. Luego, se llevaron a estufa a 60 °C hasta peso constante para determinar la cantidad de MS no degradada y calcular la DRMS.

Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con un modelo que consideró los efectos fijos de los 3 factores (F, M, I) y sus interacciones (F×M, F×I, M×I, F×M×I). Cuando la interacción triple resultó significativa ($p < 0,05$), la variable en cuestión fue analizada en dos modelos independientes separados por el factor "F" que consideró los efectos M, I y M×I. La estimación y comparación de las medias de los tratamientos se hizo por el método LSMEANS (*least squares means*: Medias de mínimos cuadrados) del procedimiento "PROC GLM" del paquete

estadístico SAS 9.1⁽¹⁹⁾. Los efectos de tratamiento y las interacciones fueron declarados significativos cuando *p* resultó menor a 0,05.

Resultados

En ambos estados de floración (Tabla 1), el marchitado disminuyó consistentemente el pH de los ensilajes, ya sea en SI (-0,82 y -1,08 unidades de pH en F10 y F50, respectivamente) como en CI (-1,39 y -0,39 unidades de pH en F10 y F50, respectivamente). En F10, la aplicación de inoculante disminuyó el pH de los ensilajes CM (-0,41 unidades), pero lo aumentó en SM (+0,16 unidades). Por el contrario, en F50, el inoculante disminuyó el pH de los ensilajes SM (-0,88 unidades), pero no tuvo efecto en CM.

En F10, los ensilajes CM tuvieron menor concentración de C2, ácido propiónico (C3) y C4, y mayor de AL (para C4, $M \times I$ $p < 0,05$). En F50, en cambio, los tratamientos CM resultaron con menor concentración de C3 y C4 y mayor de AL solamente cuando no se aplicó el inoculante. La excepción fue para C2, donde el marchitado disminuyó su concentración tanto en CI como en SI.

El único efecto detectado del inoculante sobre la concentración de ácidos orgánicos fue en la combinación de F50-SM, donde su aplicación resultó en menor contenido de C2, C3 y C4, y mayor de AL.

Al aplicar el marchitado, las concentraciones de N-NH₃ se redujeron 90 y 75 % para F10 y F50, respectivamente. Por otro lado, el efecto del inoculante sobre esta variable dependió del estado de floración. En F50, los tratamientos CI presentaron menor concentración de N-NH₃ que los SI (- 46 %), mientras que en F10 no hubo diferencias.

Los ensilajes CM presentaron mayores contenidos de PB que los SM. Estas diferencias fueron de 23 % en F10 (23,73 vs. 19,30 %) y 7 % en F50 (21,41 vs. 19,99 %). Por otro lado, solo cuando se aplicó marchitado el contenido de PB difirió entre los estados fenológicos, siendo mayor en F10 (23,73 vs. 21,41 %). Finalmente, no se halló efecto del inoculante sobre el porcentaje de PB.

Comparado con SM, los tratamientos CM presentaron un menor contenido de FDN (51,15 vs. 55,52 %) y FDA (34,92 vs. 44,39 %). De manera similar, los ensilajes CI tuvieron menor FDN respecto a SI (51,52 vs. 55,15 %). Sin embargo, no hubo efecto del inoculante sobre el contenido de FDA (CI: 39,13 %, SI: 40,18 %).

La DRMS de los ensilajes CM fue superior a la de los ensilajes SM. Los incrementos fueron del 20 % en F10 (74,69 vs. 66,22 %) y 9,9 % en F50 (64,60 vs. 71,0 %). Por otro lado, solo cuando se aplicó marchitado hubo diferencias entre estados fenológicos, donde F10 tuvo una

DRMS un 5,2 % mayor que F50. No se encontró efecto del inoculante sobre esta variable.

Discusión

a) Fermentación: pH y ácidos orgánicos

El pH más adecuado para la conservación de los ensilajes de leguminosas depende del contenido de MS. Kung et al.⁽²⁰⁾ recomiendan valores de 4,3 a 4,7 para ensilajes con menos de 30-35 % de MS y un pH de 4,7 a 5 para ensilajes con 45 a 55 % de MS. Si se toma un pH de 5 como punto de corte, ninguna de las cuatro combinaciones que incluyeron el marchitado superaron ese valor y fluctuaron entre 4,39 y 4,86, lo que sería adecuado para una correcta estabilidad del ensilaje con los tenores de MS alcanzados (40 a 45 %). Sin embargo, dentro de las cuatro combinaciones SM, la única en alcanzar un pH relativamente más bajo (4,78) fue F50-CI.

El efecto marchitado sobre la reducción del pH fue biológicamente importante (alrededor de un punto de pH), al principio de floración y en floración media, lo que avala la práctica de realizar un marchitado previo en ensilaje de alfalfa si no se utiliza ningún tipo de aditivo⁽²¹⁾. La caída del pH por efecto del marchitado puede hallarse, incluso, en alfalfa con 100 % de floración⁽²²⁾.

Los inoculantes con BALHo (y BALHeF) promueven una rápida caída del pH y un menor nivel de pH final en los ensilajes debido a una mayor producción de AL^(3,5). Sin embargo, la magnitud de esos efectos depende del material utilizado⁽⁶⁾, por ejemplo, maíz vs. alfalfa. En un metaanálisis realizado por Blajman et al.⁽²³⁾, que cubrió ensayos realizados sobre alfalfa con marchitado previo, la utilización de BalHo y BALHeF generó una reducción del pH de 0,4 unidades, pero en los trabajos que incluyeron solamente *L. plantarum*, una BALHo obligada, el efecto fue más modesto (- 0,2 unidades de pH). Los efectos del inoculante sobre el pH en el presente trabajo fueron diferentes en las combinaciones de tratamientos, pero de magnitud en dos situaciones de interés práctico. En F10-CM, la categoría de mejor calidad nutricional, el inoculante disminuyó el pH en 0,41 unidades. Por otro lado, en F50-SM, que es una alternativa utilizada empíricamente para simplificar la tarea de ensilado, el inoculante bajó el pH en 0,88 unidades, con un aumento en la concentración de AL y una disminución en la de C2 y C4. En F50-CM, se halló una tendencia ($p = 0,06$), pero la disminución del pH fue menor (0,19), sin modificaciones en AL y AGV.

La capacidad de un inoculante para disminuir el pH de un ensilaje puede depender de la concentración de MS y de flora epífita del cultivo

al momento de ensilar, y de la cantidad, de la especie y de la cepa bacteriana incluida en la formulación. A modo de ejemplo, Filya et al.⁽²⁴⁾ hallaron diferentes resultados con inoculantes comerciales a base de *L. plantarum*, en alfalfas de primer y segundo corte. En alfalfa de primer corte, la mayor concentración de MS (47,7 % MS) puede haber restringido la fermentación en el grupo control (pH: 5,08) y aumentar así la acción del inoculante (pH entre 4,33 y 4,51 en los grupos con *L. plantarum*). Sin embargo, en alfalfa de segundo corte, que tenía 39,3 % de MS y mayor población de BAL epífitas, el pH del grupo control fue más bajo (4,42) y el contenido de AL más elevado (8,65 %, base MS) que en el grupo control del primer corte, y ninguno de los 3 inoculantes con *L. plantarum* promovieron una mayor disminución del pH. Similares resultados fueron informados por Contreras-Govea et al.⁽²⁵⁾, quienes atribuyeron la falta de efecto del inoculante (*L. plantarum*) en alfalfa (10 % de floración, 39,5 % MS) a una alta población epífita de BAL, que permitió que el grupo control alcanzara valores bajos de pH (4,58) y elevada concentración de AL (7,65 %, base MS). Si bien en el presente trabajo no se estudió la concentración de flora epífita, una concentración bacteriana igual o superior a la dosis de inoculante aplicada podría explicar la falta de efectos del inoculante sobre el pH en algunos de los tratamientos, y su evaluación debería tenerse en cuenta para futuros experimentos.

Se ha informado que, al aumentar el contenido de MS del cultivo, los inoculantes pueden producir una mayor fermentación láctica y disminuir el pH del ensilaje más rápida y eficientemente. La aplicación de *L. plantarum* en combinación con *Propionibacterium acidipropionici* disminuyó el pH cuando se aplicó en alfalfa con marchitado, pero lo aumentó cuando esta técnica no fue empleada. Sin embargo, no hubo efectos cuando se usó *L. plantarum* solo⁽⁹⁾. Lo hallado con ambos inoculantes combinados concuerda con nuestro trabajo, en el cual la disminución del contenido de agua, ya sea por la aplicación de marchitado o por el avance del estado fenológico, permitió que los ensilajes CI presenten menor pH que los SI.

El efecto de marchitado en F10 (aumento de AL y disminución de AGV) está en línea con una fermentación láctica y la disminución del pH hallada, de igual manera a lo sucedido en F50-SI. Sin embargo, en F50-CI, el marchitado provocó un descenso del pH, sin modificaciones claras en los ácidos orgánicos que lo expliquen.

Las altas concentraciones de N-NH₃, C2, C3 y C4, y los altos valores de pH hallados en los ensilajes SM, a excepción de F50-SM-CI, sumado al olor desagradable percibido (caracteres organolépticos no informados), son indicios del crecimiento de clostridios⁽²⁰⁾. El bajo contenido de MS explicaría este tipo de fermentación indeseable. Cuando el

contenido de MS supera el 30 a 35 %, la elevada presión osmótica inhibe el crecimiento de los clostridios⁽²⁰⁾. Este tipo de ensilajes con fermentaciones indeseables no solamente conlleva pérdidas de MS, sino que puede comprometer el desempeño productivo de los animales. En el presente trabajo, los ensilajes en F10-SM y F50-SM-SI presentaron un promedio de 1,8 % de ácido butírico que podría resultar en una ingesta diaria de más de 120 g (vaca de 650 kg de peso vivo, consumo del 3,5 % del peso vivo, 30 % de ensilaje de alfalfa en la ración). Un consumo diario de más de 50-100 g de ácido butírico podría aumentar los riesgos de incidencia de cetosis en vacas lecheras⁽²⁶⁾.

En F10-SM hay una coincidencia entre la falta de efecto del inoculante sobre el pH y la imposibilidad de establecer una fermentación láctica en estas condiciones, con niveles de AL indetectables. Coincidentemente, Hashemzadeh-Cigari et al.⁽⁹⁾ tampoco hallaron efectos sobre las concentraciones de ácidos orgánicos cuando utilizaron un inoculante a base de *L. plantarum* en alfalfa en prefloración sin oreo. En F10-CM, la disminución del pH producida por el inoculante no es explicada por ninguna modificación de los ácidos orgánicos medidos, a diferencia de otros ensayos con *L. plantarum*^(27,28) en los que se asoció a un incremento de AL. Las concentraciones de ácidos orgánicos en F50-SM fueron alteradas por el inoculante en forma similar a lo hallado por Liu et al.⁽²⁹⁾, en ensilaje de alfalfa florecida sin marchitado previo, y demuestra un efecto positivo de *L. plantarum* en una situación menos desafiante que la hallada en F10-SM. En F50-CM se generó un pH adecuado en el grupo SI y el inoculante no tuvo efecto sobre las concentraciones de ácidos orgánicos.

Al igual que lo observado para la variable pH, la falta de efectos del inoculante sobre AL y AGV, en especial en F10-CM y F50-CM, podría atribuirse a la presencia de flora epífita en concentraciones superiores a la dosis de inoculante empleada⁽²⁴⁾.

b) Composición nutricional: PB, N-NH₃, FDN, FDA

El mayor contenido de PB de los ensilajes CM indica una mejor preservación de esta fracción durante el proceso de ensilado, producto de una menor tasa de fermentación, que se tradujo, además, en una menor proporción de la PB como N-NH₃. Esto coincide parcialmente con Rangrab et al.⁽³⁰⁾ y con Hashemzadeh-Cigari et al.⁽⁹⁾, quienes hallaron que el marchitamiento disminuyó los niveles de N-NH₃, pero no tuvo efectos sobre el contenido de PB.

El efecto del inoculante sobre la proporción de N-NH₃ en F50, sin efecto sobre la PB, fue similar a lo hallado por Guo et al.⁽²⁸⁾. Sin embargo, no se hallaron efectos del inoculante en F10, lo cual también ha

sido observado en otros trabajos que utilizaron *L. plantarum* en alfalfa con 10 % de floración⁽²⁵⁾ o en prefloración^(9,31). La falta de efecto en F10 sobre N-NH₃ plantea las limitaciones de *L. plantarum* para actuar en forrajes con menor cantidad de carbohidratos fermentables, en los cuales pueden verificarse efectos sobre el pH final, pero modificaciones menores en los patrones de fermentación. Las altas concentraciones de N-NH₃ (más del 12 a 15 % de la PB) pueden ser resultado de una descomposición excesiva de proteínas en el ensilaje causada por una lenta caída del pH que no inhibe a las proteasas del cultivo o por un crecimiento excesivo de clostridios o enterobacterias. Los ensilajes con menos del 30 % de MS, como fue el caso de F10-SM y F50-SM, son más susceptibles a sufrir este tipo de fermentaciones. Las altas concentraciones de amoníaco implican un exceso de proteína degradable en rumen, lo que puede tener consecuencias sobre el desempeño reproductivo de las hembras y aumentar el nitrógeno ureico en leche⁽²⁰⁾.

La menor concentración de FDN y FDA en los ensilajes CM coincide con los resultados de Hashemzadeh-Cigari et al.⁽⁹⁾. En nuestro ensayo, el marchitado redujo el contenido de FDN y FDA en el orden del 8 y 21 %, respectivamente, y estaría relacionado con una mejor preservación del contenido celular, como lo demuestra la mayor concentración de PB. Además, Hashemzadeh-Cigari et al.⁽⁹⁾ hallaron que el marchitado incrementó el contenido de CSA. Aunque en nuestro trabajo no se midió la concentración de CSA, una menor fermentación de esa fracción también podría explicar el menor contenido de pared celular en los ensilajes CM.

El inoculante disminuyó el contenido de FDN y esto también puede estar relacionado con una mejor conservación del contenido celular, aunque no se verificó a través de un aumento de la PB. Por otro lado, el inoculante no afectó la concentración de FDA, lo que guarda directa relación con la falta de efecto sobre la DRMS. Otros investigadores^(24,28) no han podido hallar efectos de inoculantes a base de *L. plantarum* sobre las cantidades de FDN y FDA en ensilajes de alfalfa.

c) DRMS

El incremento de la DRMS provocada por el marchitado muestra una relación con la disminución en el contenido de FDA y la mejor conservación de los componentes más digestibles del forraje. Como sucedió con la alfalfa en pastoreo directo, el avance del estado fenológico tuvo como consecuencia una disminución de la DRMS en los cortes CM.

La falta de efecto del inoculante a base de *L. plantarum* sobre la DRMS coincide con los resultados de producción de gas *in vitro*⁽²⁵⁾ y

de degradabilidad *in vitro* de la MS publicados en otros trabajos⁽³¹⁾. De manera similar, Filya et al.⁽²⁴⁾ hallaron que la inoculación con BAL mejoró parámetros de fermentación, como pH y niveles de ácidos orgánicos (disminuyó C2 e incrementó AL), pero no tuvo efecto sobre la digestibilidad *in vitro* de la MS a las 48 h.

Hashemzadeh-Cigari et al.⁽⁹⁾ hallaron que la inoculación con *L. plantarum* y *Propionibacterium acidipropionici* aumentó la DRMS a las 24 h en ensilajes de alfalfa con marchitado, mientras que *L. plantarum* tuvo este efecto en los ensilajes sin marchitado, lo que significó una interacción I x M, situación que no se observó en nuestro trabajo. Sin embargo, Hashemzadeh-Cigari et al.⁽⁹⁾ no hallaron cambios en la DRMS por efecto del marchitado.

Conclusiones

El marchitado del forraje contribuye a mejorar el proceso de fermentación y la degradabilidad ruminal de ensilajes de alfalfa en floración temprana y media, lo cual la sitúa como una práctica de elección para la confección de este tipo de reservas forrajeras. En F10-CM y en F50-CM la aplicación del inoculante, al menos en las condiciones de este ensayo, no produce mejoras adicionales de importancia. Sin embargo, en F50-SM, una situación a la que puede llegarse por dificultades técnicas para realizar el oreado, la aplicación de *L. plantarum* mejora los parámetros fermentativos del ensilaje.

Tabla 1. Contenido de materia seca (MS), perfil de fermentación, composición nutricional y degradabilidad ruminal (Medias de mínimos cuadrados) de ensilajes de alfalfa confeccionados al 10% (F10) o 50% (F50) de floración, con (CM) o sin (SM) marchitado y con (CI) o sin (SI) inoculante microbiano.

	F10				F50				EE	p ¹						
	SM		CM		SM		CM			F	M	I	F×M	F×I	M×I	F×M×I
	SI	CI	SI	CI	SI	CI	SI	CI								
MS	19,54	19,98	45,17	43,47	23,44	25,06	40,77	42,05								
pH	5,68 ^{aA}	5,84 ^{bA}	4,86 ^{aB}	4,45 ^{bB}	5,66 ^{aA}	4,78 ^{bA}	4,58 ^{aB}	4,39 ^{aB}	0,06	**	**	**	**	**	NS	**
C2	6,01 ^a	5,73 ^a	1,48 ^b	1,30 ^b	5,30 ^{aA}	3,79 ^{bA}	1,40 ^{aB}	1,28 ^{aB}	0,22	**	**	**	**	NS	*	*
C3	3,54 ^a	2,96 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	1,93 ^{aA}	0,00 ^{bA}	0,00 ^{aB}	0,00 ^{aA}	0,17	**	**	**	**	**	**	**
C4	1,58 ^{aA}	2,30 ^{bA}	0,00 ^{aB}	0,00 ^{aB}	1,50 ^{aA}	0,33 ^{bA}	0,00 ^{aB}	0,00 ^{aA}	0,13	**	**	NS	**	**	NS	**
AL	0,00 ^a	0,00 ^a	4,73 ^b	4,10 ^b	0,00 ^{aA}	1,58 ^{bA}	1,08 ^{aB}	1,23 ^{aB}	0,19	**	**	NS	**	**	**	NS
N-NH₃	26,22 ^{aA}	27,34 ^{aA}	3,26 ^{bA}	2,07 ^{bA}	23,74 ^{aBa}	13,07 ^{aBb}	6,32 ^{bBa}	3,00 ^{bBb}	2,58	NS	**	**	**	*	NS	NS
PB	20,10 ^a	18,50 ^a	23,39 ^{bA}	24,06 ^{bA}	19,41 ^a	20,56 ^a	21,22 ^{bB}	21,60 ^{bB}	0,58	NS	**	NS	**	NS	NS	NS
FDN	59,37	52,89	52,93	48,75	56,37	53,44	51,93	51,00	1,55	NS	**	**	NS	NS	NS	NS
FDA	43,60	42,44	32,85	33,02	46,41	45,11	37,84	35,96	1,50	**	**	NS	NS	NS	NS	NS
DRMS	62,67 ^{aA}	61,76 ^{aA}	74,52 ^{bA}	74,86 ^{bA}	62,64 ^{aA}	66,55 ^{aA}	70,55 ^{bB}	71,45 ^{bB}	1,32	NS	**	NS	**	NS	NS	NS

EE: error estándar. F: efecto del estado de floración. M: efecto del marchitado. I: efecto del inoculante. Ácido acético (C2), propiónico (C3), butírico (C4) y láctico (AL); proteína bruta (PB), fibra en detergente neutro (FDN) y fibra en detergente ácido (FDA); todos en % de la MS. Degradabilidad ruminal de la materia seca (DRMS) en %. Nitrógeno amoniacal (N-NH₃) en % del N total.

¹ Efectos de tratamiento y de las interacciones: no significativos (NS, p > 0,05) o significativos (* p < 0,05; ** p < 0,01).

^{a, b} Superíndices distintos indican efectos significativos (p < 0,05) de I dentro de cada nivel de M.

^{A, B} Superíndices distintos indican efectos significativos (p < 0,05) de M dentro de cada nivel de I.

^{a, b} Superíndices distintos, en subrayado, indican efectos significativos (p < 0,05) de M dentro de cada nivel de F.

^{A, B} Superíndices distintos, en subrayado, indican efectos significativos (p < 0,05) de F dentro de cada nivel de M.

^{a, b} Superíndices distintos, en cursiva, indican efectos significativos (p < 0,05) de I dentro de cada nivel de F.

Bibliografía

1. Basigalup DH. Situación de la alfalfa en Argentina. 5º Jornada Nacional de Forrajes Conservados, 9 y 10 de abril de 2014, INTA Manfredi, Córdoba, Argentina.
2. Bragachini M, Cattani P, Gallardo M, Peiretti J. Forrajes conservados de alta calidad y aspectos relacionados al manejo nutricional. Manual Técnico N° 6, INTA-PRECOP II. 2008. INTA E.E.A. Manfredi, Córdoba, Argentina.
3. Weinberg ZG, Muck RE. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. FEMS Microbiol Rev. 1996; 19(1):53-68. doi:10.1111/j.1574-6976.1996.tb00253.x.
4. Pahlow G, Muck RE, Driehuis F, Oude Elferink SJWH, Spoelstra SF. Microbiology of ensiling. In: Buxton DR, Muck RE, Harrison JH (eds). Silage science and technology. American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA. 2003.
5. Muck RE, Nadeau MG, McAllister TA, Contreras-Govea FE, Santos MC, Kung L Jr. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. J Dairy Sci. 2018; 101(5):3980-4000. doi:10.3168/jds.2017-13839.
6. Oliveira AS, Weinberg ZG, Ogunade IM, Cervantes AAP, Arriola KG, Jiang Y, Kim D, Li X, Gonçalves MCM, Vyas, D. 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. 2017; 100(6):4587-4603. doi:10.3168/jds.2016-11815.
7. Jaurena G, Danelón JL. Tabla de composición de alimentos para ruminantes de la región pampeana argentina. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur S.A.; 2006.
8. Oude Elferink, SJWH, Driehuis F, Gottschal JC, Spoelstra SF. Silage fermentation processes and their manipulation. En: FAO Electronic Conference on Tropical Silage, 1 September-15 December, 1999. p. 1-28.
9. Hashemzadeh-Cigari F, Khorvash M, Ghorbani GR, Taghizadeh A. The effects of wilting, molasses and inoculants on the fermentation quality and nutritive value of lucerne silage. S Afr J Anim Sci. 2011; 41(4):377-88. doi:10.4314/sajas.v41i4.8.
10. Whiter AG, Kung L Jr. The effect of a dry or liquid application of *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the fermentation of alfalfa silage. J Dairy Sci. 2001; 84(10):2195-202. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74666-8.
11. Petruzzini HJ, Stritzler NP, Ferri CM, Pagella JH, Rabotnikof CM. Determinación de materia seca por métodos indirectos: utilización del horno a microondas. En: Boletín de Divulgación Técnica N° 88. 2005. INTA - Facultad de Agronomía, UNLPam, Anguil, Argentina. p. 8-11.
12. Friggens NC, Oldham JD, Dewhurst RJ, Horgan G. Proportions of volatile fatty acids in relation to the chemical composition of feeds based on grass silage. J Dairy Sci. 1998; 81(5):1331-44. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75696-6.
13. Weatherburn, MW. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal Chem. 1967; 39(8):971-74. doi: 10.1021/ac60252a045.
14. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 17th Ed. AOAC. Arlington, USA. 2000.

-
15. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 1991; 74(10):3583-97. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.
 16. Vanzant E, Cochran R, Titgemeyer E. Standardization of *in situ* techniques for ruminant feedstuff evaluation. *J Anim Sci.* 1998; 76(10):2717-29. doi: 10.2527/1998.76102717x.
 17. Huntington JA, Givens DI. Studies on *in situ* degradation of feeds in the rumen: 1. Effect of species, bag motility and incubation sequence on dry matter disappearance. *Anim Feed Sci Technol.* 1997; 64(2-4):227-41. doi: 10.1016/S0377-8401(96)01057-7.
 18. Michalet-Doreau B, Ould-Bah MY. *In vitro* and *in sacco* methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: a review. *Anim Feed Sci Technol.* 1992; 40(1):57-86. doi: 10.1016/0377-8401(92)90112-J.
 19. SAS Institute Inc. *SAS/STAT 9.1 User's Guide*. Cary, NC, USA. 2004.
 20. Kung LJr, Shaver RD, Grant RJ, Schmidt RJ. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J Dairy Sci.* 2018; 101(5): 4020-4033. doi:10.3168/jds.2017-13909.
 21. Albrecht KA, Beauchemin KA. Alfalfa and other perennial legume silage. In: *Silage science and technology*. 2003. D.R. Buxton, R.E. Muck, J.H. Harrison, Eds. ASA, CSSA and SSSA. Madison, USA. p. 633-64.
 22. Zheng M, Niu D, Zuo S, Mao P, Meng L, Xu C. The effect of cultivar, wilting and storage period on fermentation and clostridial community of alfalfa silage. *Ital J Anim Sci.* 2018; 17(2):336-46. doi:10.1080/1828051X.2017.1364984.
 23. Blajman JE, Vinderola G, Páez RB, Signorini RL. The role of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for alfalfa silage: a meta-analysis. *J Agric Sci.* 2020; 158(1-2):107-18. doi:10.1017/S0021859620000386.
 24. Filya I, Muck RE, Contreras-Govea FE. Inoculant effects on alfalfa silage: Fermentation products and nutritive value. *J Dairy Sci.* 2007; 90(11):5108-14. doi: 10.3168/jds.2006-877.
 25. Contreras-Govea FE, Muck RE, Mertens DR, Weimer PJ. Microbial inoculant effects on silage and *in vitro* ruminal fermentation, and microbial biomass estimation for alfalfa, bmr corn, and corn silages. *Anim Feed Sci Technol.* 2011; 163(1):2-10. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2010.09.015.
 26. Oetzel GR. Herd-level ketosis - Diagnosis and risk factors. In: *Proc. Preconference Seminar 7C: Dairy herd problem investigation strategies: Transition cow troubleshooting*. 2007. Vancouver, BC, Canada, p. 67-91.
 27. Zhang T, Li L, Wang X, Zeng Z, Hu Y, Cui Z. Effects of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on fermentation, aerobic stability, bacteria diversity and ruminal degradability of alfalfa silage. *World J Microbiol Biotechnol.* 2009; 25(6):965-71. doi: 10.1007/s11274-009-9973-x.
 28. Guo XS, Ke WC, Ding WR, Ding ML, Xu DM, Wang WW, Zhang P, Yang FH. Profiling of metabolome and bacterial community dynamics in ensiled *Medicago sativa* inoculated without or with *Lactobacillus plantarum* or *Lactobacillus buchneri*. *Sci Rep.* 2018; 8:357. doi:10.1038/s41598-017-18348-0.

-
29. Liu QH, Dong ZH, Shao T. Effect of additives on fatty acid profile of high moisture alfalfa silage during ensiling and after exposure to air. *Anim Feed Sci Technol.* 2018; 236(1):29-38. doi:10.1016/j.anifeedsci.2017.11.022.
 30. Rangrab, LH, Frenzel Mühlbach PR, Berto JL. Silagem de alfalfa colhida no início do florescimento e submetida ao emurchecimento e à ação de aditivos biológicos. *Rev Bras Zootec.* 2000. 29(2):349-356. doi:10.1590/S1516-35982000000200005.
 31. Hashemzadeh-Cigari F, Khorvash M, Ghorbani GR, Ghasemi E, Taghizadeh A, Kargar S, Yang WZ. Interactive effects of molasses by homofermentative and heterofermentative inoculants on fermentation quality, nitrogen fractionation, nutritive value and aerobic stability of wilted alfalfa (*Medicago sativa L*) silage. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2014; 98(2):290-99. doi:10.1111/jpn.12079.

