



*Efecto de inóculos microbianos como activadores de la fermentación en ensilajes de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray*

**Autor:** Yaimara Pozo Pérez

**Tutores:** Dr. C. Marlen Rodríguez Oliva  
Dr. C Félix Ojeda García

**Matanzas, 2019**

**UNIVERSIDAD DE MATANZAS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo**

*Efecto de inóculos microbianos como activadores de la fermentación en  
ensilajes de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray*

**Autor:** Yaimara Pozo Pérez

**Tutores:** Dr. C. Marlen Rodríguez Oliva

Dr. C Félix Ojeda García

**Matanzas, 2019**

## *Pensamiento*

*El único camino abierto a la prosperidad constante y fácil es el de conocer, cultivar y aprovechar los elementos inagotables e infalibles de la naturaleza.*

*José Martí*

# *Nota de Aceptación*

---

---

---

---

---

---

---

---

---

\_\_\_\_\_  
Presidente del Tribunal Firma

\_\_\_\_\_  
Miembro del Tribunal Firma

\_\_\_\_\_  
Miembro del Tribunal Firma

Dado en Matanzas, el día \_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del año 2019  
"Año del 61 de la Revolución".

# *Declaratoria de autoridad*

Declaro que yo, Yaimara Pozo Pérez, soy la única autora de este Trabajo de Diploma, en calidad de lo cual autorizo a la Universidad de Matanzas y a otros centros educacionales para hacer uso del mismo con la finalidad que se estime pertinente.

---

Firma

# *Dedicatoria*

*Quiero dedicar este trabajo de diploma a mi mamá **Regla Pérez Caballero**, mi papa **Lázaro Pozo Ramírez** y mis hermanas **Jennifer Pozo y Yaima Morales** sin los cuales no hubiera podido llegar hasta aquí. Gracias por su apoyo y su amor durante estos cinco años de carrera. Gracias por estar siempre que fueran necesarios.*

# Agradecimientos

- *A mi familia por su apoyo en estos cinco años de carrera.*
- *A mis tutores, Marlen Rodríguez Oliva y Félix Ojeda García por la paciencia y el tiempo que han dedicado a la asesoría y revisión del presente trabajo, muchas gracias.*
- *A la Dr. C Ana Julia Rondón Castillo por las ideas aportadas a la investigación y la asesoría con los análisis microbiológicos realizados.*
- *A la profesora Yasmery Rubio Fontanills y el resto de profesores y técnicos del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Matanzas. Muchísimas Gracias.*
- *Al profesor Conrado Camacho, por el apoyo que me brindó en estos cinco años y la asesoría con los análisis químicos de la tesis.*
- *A mis profesores de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.*
- *A mis compañeros y amigos de la carrera.*
- *A esas otras personas que de alguna manera contribuyeron a mi formación profesional.*

**A todos muchas gracias,**

# Opinión de los tutores

*Hacemos constar por medio de la presente, que el Trabajo de diploma titulado: Efecto de inóculos microbianos como activadores de la fermentación en ensilajes de Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray, fue realizado como ejercicio de culminación de estudios para optar por el título de Ingeniero Agrónomo.*

*Consideramos que el tema presentado responde a la necesidad que tiene nuestro país, de buscar alternativas sostenibles para ofrecer alimento animal a menor costo y mayor productividad. Además de relacionar la agronomía con el sector científico y agropecuario.*

*La estudiante, Yaimara Pozo Pérez, asumió esta investigación con disciplina y responsabilidad. Logró en esta etapa de su formación un nivel de independencia y sistematicidad, que le permitió desarrollar el trabajo práctico de laboratorio y el experimento de campo. Se superó de manera autodidacta en las temáticas relacionadas con la elaboración de ensilajes para la alimentación animal, así como la utilización y beneficios de los aditivos microbianos para optimizar este proceso; tema que resulta novedoso, ya que se trabaja por primera vez en Cuba el ensilaje de Tithonia diversifolia inoculado con suero de leche y PROBIOLACTIL®.*

*Yaimara, fue receptiva en todo momento a las sugerencias realizadas por diferentes especialistas en la temática. Es de destacar todo el empeño y sacrificio que realizó para lograr el éxito de la presente investigación.*

*Tutores*

*Dr.C. Marlen Rodríguez Oliva*

*Dr.C. Félix Ojeda García*



## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de inóculos microbianos como activadores de la fermentación en ensilajes de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. Los inóculos fueron suero de leche y PROBIOLACTIL<sup>®</sup>, con una concentración de bacterias lácticas de  $10^6$  y  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. *T. diversifolia* se cortó, se trocó (tallos y hojas) y recibió un tratamiento de presecado por 24 h. Posteriormente, el material vegetal se dividió en tres porciones con 3200 g de peso cada porción y se preparó según tratamiento: Tratamiento A (T-A) control, material vegetal, sin inóculo. Tratamiento B (T-B), material vegetal inoculado con suero de leche. Tratamiento C (T-C), material vegetal inoculado con PROBIOLACTIL<sup>®</sup>. Los inóculos se mezclaron con el forraje de forma manual y se aplicaron al 10 %. Se elaboraron 24 microensilajes de 400 g de material vegetal. La conservación se realizó en estantería bajo condiciones ambientales durante 60 días. Los tiempos de apertura de las bolsas (2 x tratamientos) se prefijaron a los 15, 30, 45 y 60 días, para evaluar indicadores químicos, microbiológicos y organolépticos. Además se realizó un estudio de factibilidad. Los resultados fueron procesados a través de la prueba de rangos múltiples (Duncan, 1955) con el Software Statgraphic plus versión 5.0. Los conteos de microorganismos viables se transformaron según Log N. Se demostró que los aditivos bacterianos activan el proceso de fermentación en los ensilajes, lo cual se observó a partir de los resultados de pH, MS, proteínas, conteo de bacterias lácticas y características organolépticas.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of microbial inoculants as activators of fermentation in silages of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. The inocula were whey and PROBIOLACTIL<sup>®</sup>, with a concentration of lactic bacteria of  $10^6$  and  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, respectively. *T. diversifolia* was cut, chopped (stems and leaves) and received a pre-drying treatment for 24 h. Subsequently, the plant material was divided into three portions with 3200 g of weight each portion and was prepared according to treatment: Treatment A (T-A) control, plant material, without inoculum. Treatment B (T-B), plant material inoculated with whey. Treatment C (T-C), plant material inoculated with PROBIOLACTIL<sup>®</sup>. The inocula were mixed with the forage manually and applied at 10%. 24 microensilages of 400 g of plant material were prepared. The conservation was carried out in shelving under environmental conditions for 60 days. The opening times of the bags (2 x treatments) were prefixed to 15, 30, 45 and 60 days, to evaluate chemical, microbiological and organoleptic indicators. In addition, a feasibility study was carried out. The results were processed through the multiple range test (Duncan, 1955) with the Software Statgraphic plus version 5.0. The counts of viable microorganisms were transformed according to Log N. It was demonstrated that the bacterial additives activate the fermentation process in the silages, which was observed from the results of pH, MS, proteins, lactic acid count and organoleptic characteristics.

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

BAL	Bacterias ácido lácticas
CEBIO	Centro de Estudios Biotecnológicos
CUP	Peso cubano
CUC	Peso cubano convertible
Cm	Centímetro
EE	Error estándar
EEPFIH	Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"
FAO	Food and Agriculture Organization
g	Gramos
h	Horas
ha	Hectárea
L	Litro
m	Metros
mL	Mililitro
mm	Milímetros
nm	Nanómetro
°C	Grados Celsius
¢	Centavos
P	Probabilidad
t	Tonelada
TGI	Tracto Gastrointestinal
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UM	Universidad de Matanzas
USD	United states dollar

# Índice

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
Problema científico	<b>3</b>
Hipótesis	<b>3</b>
Objetivo general y específicos	<b>3</b>
<b>I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
I. 1 Ganadería Tropical. Situación actual	<b>4</b>
I. 2 Situación actual de la ganadería en Cuba	<b>6</b>
I.3. Características taxonómicas y hábitos de crecimiento de <i>Tithonia diversifolia</i>	<b>8</b>
I.3.1 Empleo de la <i>Tithonia diversifolia</i> en la alimentación animal	<b>10</b>
I.4 Ensilajes. Características y fases del proceso	<b>14</b>
I.4.1 Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado	<b>16</b>
I.4.2 Producción de ensilajes en Cuba	<b>18</b>
I.4.3 Uso de aditivos para el ensilaje	<b>19</b>
I.5 Suero de leche: composición y alternativas de empleo	<b>21</b>
I.6 PROBIOLACTIL®: su empleo como aditivo microbiano	<b>23</b>
<b>Capítulo II. Materiales y Métodos</b>	<b>27</b>
II. 1 Origen y composición de los inóculos microbianos	<b>27</b>
II.1.1 Suero de leche	<b>27</b>
II.1.2 PROBIOLACTIL®	<b>28</b>

II.2 Selección y tratamiento del material vegetal utilizado para el ensilaje	<b>30</b>
II.2.1 Elaboración de los ensilajes y tratamientos establecidos.	<b>30</b>
II.2.2 Evaluación a escala de laboratorio del efecto de los inóculos microbianos en los indicadores químicos, microbiológicos y organolépticos	<b>31</b>
II.3 Estudio de la factibilidad económica del ensilaje con el uso de los inóculos microbianos	<b>34</b>
II.4 Procesamiento estadístico	<b>34</b>
<b>Capítulo III. Resultados y Discusión</b>	<b>35</b>
III.1 Composición química y microbiológica de los inóculos microbianos	<b>35</b>
III.2 Evaluación de los indicadores químicos, microbiológicos y organolépticos en los ensilajes tratados con diferentes inóculos	<b>35</b>
III. 3 Análisis de los costos de la aplicación de los inóculos suero de leche y PROBIOLACTIL® durante el experimento	43
<b>IV. CONCLUSIONES</b>	45
<b>V. RECOMENDACIONES</b>	46
<b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	

# *Introducción*

## INTRODUCCIÓN

La producción ganadera depende, en gran medida, de los factores climáticos y meteorológicos; por ello, la transición anual de las condiciones del clima, fundamentalmente en cuanto a la temperatura, la humedad relativa y las precipitaciones, genera la correspondiente variabilidad en la producción y el valor nutritivo de los forrajes. En tal sentido, la ganadería tropical basada en el pastoreo de gramíneas y leguminosas enfrenta grandes desafíos, especialmente en la época de sequía, durante la cual disminuyen de manera drástica la disponibilidad y la calidad de los forrajes (Cuartas *et al.*, 2014).

Los pastos y los forrajes son la principal fuente de alimento para los rumiantes y representan el mayor volumen de la dieta, ya que son más baratos, tienen una gran capacidad de producción y crecen fácilmente (Lee *et al.*, 2017). Por otro lado, el consumo de nutrientes es uno de los principales factores que restringe la producción animal en el trópico y solo se puede controlar si el valor nutricional de los forrajes no constituye un factor limitante (Olafadehan y Okunade, 2018).

Impulsar el desarrollo de la ciencia hacia nuevos enfoques de producción que garanticen mayor eficiencia para enfrentar los crecientes problemas de seguridad alimentaria, ha creado la necesidad de buscar alternativas sostenibles para ofrecer alimento animal a menor costo y mayor productividad (FAO, 2017). En Cuba la disponibilidad de forraje para la alimentación de los bovinos en época seca es limitada. En la actualidad, se realizan esfuerzos encaminados a diversificar la oferta forrajera en los sistemas ganaderos tradicionales, con elevado aporte de nutrientes para alimentar al ganado (Galindo *et al.*, 2018).

En los últimos años, la inclusión de forrajeras como *Tithonia diversifolia* en dietas bovinas ha permitido reducir los costos de producción, la incidencia de enfermedades metabólicas, así como incrementar el desempeño productivo y reproductivo de los animales. El uso de esta planta como recurso, para la alimentación animal, es cada vez más frecuente debido a su buen valor nutricional,

rusticidad y a la elevada tasa de producción de biomasa (Gallego *et al.*, 2017; Galindo *et al.*, 2018).

Existen diversas experiencias con el empleo de *T. diversifolia* en sistemas silvopastoriles (Gallego, 2016; Mejías *et al.*, 2017); sin embargo su conservación mediante la técnica del ensilaje, asegura la preservación del material vegetal con mínima pérdida de nutrientes (Cárdenas *et al.*, 2004) además de su disponibilidad durante todo el año (Villegas *et al.*, 2017).

La conservación de los forrajes, por el método de ensilaje, surge como una opción viable por su utilidad y fácil implementación por parte de los productores. Esta forma de preservación se logra por medio de una fermentación espontánea bajo condiciones anaeróbicas (Díaz *et al.*, 2014). El uso de aditivos para mejorar las condiciones del proceso, comenzó hacerse muy común y existe un amplio rango de inoculantes químicos y biológicos adecuados para ensilar residuos de cosechas, maíz, gramíneas y leguminosas (Stefanie *et al.*, 2001; de los Ángeles, 2009).

Aplicar aditivos al ensilaje permite reducir el pH más rápidamente, a fin de preservar los carbohidratos y proteínas, e inhibir el crecimiento de microorganismos que podrían deteriorar el material conservado (Zhang *et al.*, 2014). Los inoculantes con bacterias ácido lácticas se convierten en el tipo más frecuente de aditivo empleado para ensilar (Stefanie *et al.*, 2001; Díaz, 2014). En pastos tropicales, como la arbustiva *Tithonia diversifolia*, estos aditivos microbianos mejoran la calidad de fermentación y reducen las pérdidas durante el ensilaje (Villegas *et al.*, 2017).

En Cuba, la Provincia de Matanzas dispone de un biopreparado probiótico denominado PROBIOLACTIL® y de un subproducto de la industria quesera conocido como suero de leche. Ambos aditivos poseen en su composición altas concentraciones de bacterias ácido lácticas. A pesar de que su uso es todavía muy escaso, pequeñas proporciones se utilizan, con frecuencia, en la dieta para animales con excelentes resultados sobre la fisiología y la salud animal. Sin embargo, no se emplean como inoculantes microbianos para ensilar cultivos forrajeros, lo cual podría



ser una contribución importante para optimizar el funcionamiento de los sistemas de producción ganadero en nuestro país.

### **Problema**

La elaboración de ensilajes constituye una técnica de preservación de forrajes que se logra por medio de una fermentación ácida espontánea bajo condiciones anaerobias. En Cuba, esta tecnología es conocida pero poco empleada por los productores. A pesar de que el uso de aditivos para optimizar el proceso se convierte en una alternativa, no se aplican inóculos microbianos, que adicionados al ensilaje activen el proceso de fermentación y den un valor agregado a este alimento conservado.

### **Hipótesis**

La aplicación de inóculos microbianos, con altas concentraciones de bacterias ácido lácticas, contribuirá a mejorar la fermentación y la calidad nutricional del ensilaje de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.

### **Objetivo General**

Evaluar el efecto de inóculos microbianos como activadores de la fermentación en ensilajes de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.

### **Objetivos específicos**

- 1- Caracterizar química y microbiológicamente los diferentes inóculos microbianos (suero de leche y PROBIOLACTIL®).
- 2- Evaluar a escala de laboratorio el efecto de los inóculos microbianos en los indicadores químicos, microbiológicos y organolépticos.
- 3- Analizar la factibilidad económica del empleo de los inoculantes microbianos.

# *Revisión bibliográfica*

## **I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **I. 1 Ganadería Tropical. Situación actual**

Ganadería se define como una actividad económica de origen muy antiguo que consiste en la crianza de animales para su aprovechamiento. Dependiendo de la especie ganadera, se obtienen diversos productos derivados, como la carne, la leche, los huevos, los cueros, la lana y la miel, entre otros (Arango *et al.*, 2016).

Desde hace muchos años, la propuesta de los productores en países tropicales ha sido promover la disminución del uso de los concentrados a base de granos, por alimentos con potenciales nutricionales capaces de sustituirlos en la nutrición animal (FAO, 2017). Uno de los grandes problemas que enfrenta el sector ganadero es el alto costo de producción, generado por los elevados precios de los alimentos, especialmente para suplementar al ganado en épocas de escasez de pasto. De ahí la importancia de buscar nuevas alternativas para mejorar los rendimientos productivos y económicos para este sector. Según plantearon Olafadehan y Okunade (2018) se deben abaratar los costos de producción y específicamente bajar los costos de alimentación, dado que actualmente es poco rentable alimentar al ganado con concentrados.

Dentro de este contexto, el uso de los árboles y arbustos en los sistemas de producción y en los bancos de forraje en sistemas de corte y acarreo ha desempeñado un papel importante, aunque algo ignorado o subvalorado, en los países latinoamericanos y tropicales en general, donde ocurren variaciones estacionales en la producción de los pastos, los forrajes y otras fuentes de alimentación ganadera (Murgueito *et al.*, 2011). Los sistemas con árboles son capaces de conservar la biodiversidad aportar servicios ambientales a los ecosistemas, incrementar tanto cualitativa como cuantitativamente la oferta de forraje al ganado y minimizar el desbalance en la producción de alimentos (Martínez-Pastur *et al.*, 2017).

La producción ganadera en América Latina se ha relacionado con altas deforestaciones y con bajos niveles de productividad y rentabilidad. Es frecuente observar en los sistemas de producción del trópico, inadecuadas prácticas de manejo que conllevan aun deterioro de los recursos naturales, menor sostenibilidad y menor biodiversidad, afectando la estabilidad ecológica, social, política y económica de los países del tercer mundo (Mejía *et al.*, 2017).

Lo anteriormente planteado explica la necesidad de adoptar sistemas sostenibles de producción ganadera que aprovechen las ventajas del manejo integrado, donde los paisajes naturales y los bosques mixtos se usan incorrectamente como sistemas de pastoreo extensivo (López *et al.*, 2015). Por tanto, la conversión ambiental basada en el silvopastoreo constituye una alternativa promisoría para enfrentar estos problemas (Galindo *et al.*, 2018).

Por otra parte, la determinación de la capacidad de producción actual de los pastos, junto a la presión en relación con el uso de la tierra para la producción ganadera, se ha convertido en uno de los principales desafíos para desarrollar la planificación integrada y la toma de decisiones en los sistemas tropicales de pastoreo (Crestani *et al.*, 2013).

En el trópico se generan una gran variedad de forrajes que podrían, por medio del ensilaje, ser transformados en un alimento más nutritivo y económico para el ganado. El ensilaje, además, permite almacenar grandes volúmenes de alimento para épocas de escasez o incrementar el número de animales por hectárea (Cubero *et al.*, 2010). La fermentación láctica que realizan los microorganismos da un valor agregado a los productos vegetales porque mejora su contenido nutricional, digestibilidad y palatabilidad (Stefanie *et al.*, 2001). También permite manejarlos pastizales como un cultivo de corte y no exclusivamente como zona de pastoreo, lo cual mejora la rentabilidad y eficiencia de las explotaciones ganaderas. Además se produce un alimento natural, ecológico y más económico que los concentrados, cuyas materias primas son en su mayoría importadas, lo que haría del silo una alternativa para el ganadero (Villegas *et al.*, 2017).

## **I. 2 Situación actual de la ganadería en Cuba**

La actividad agropecuaria, en Cuba, demanda una sostenibilidad a corto, mediano y largo plazo, en la cual se consideran tres puntos de vista: el económico, el ecológico y el social. El crecimiento demográfico y la crisis energética internacional traen como consecuencia la elevación de los precios de los alimentos y la agudización de la pobreza; de ahí la importancia actual de producir alimentos sanos, tanto de origen vegetal como animal, para evitar los correspondientes impactos negativos sobre el hombre, los animales y el medio ambiente (ONEI, 2018).

Cuba ofrece hoy un panorama de transformaciones y cambios, donde resaltan más de 300 lineamientos para actualizar el modelo económico, unido a otras iniciativas que se toman como la nueva Ley para la Inversión Extranjera y la Zona de Desarrollo Especial del Mariel. Todo esto tendrá una incidencia sobre el espectro económico del país y de alguna manera sobre la producción ganadera (ACN, 2019).

Según Gustavo Rodríguez Rollero, Ministro de la Agricultura, la ganadería en Cuba se encuentra en un franco proceso de recuperación. En la actualidad, más del 70 % de la producción de leche está en manos de cooperativas y campesinos, lo que se traduce en un crecimiento de la eficiencia. Informó además, que existen aproximadamente 11 millones de hectáreas de tierras disponibles; de ellas, unos 6 millones dedicadas, sobre todo, a cultivos varios y ganadería y otros 3,5 millones pertenecen al desarrollo forestal. En nuestro país, el 80 % de la tierra es propiedad del Estado (Rodríguez, 2018).

En los últimos años, el país, no logra satisfacer la demanda ni de leche ni de carne. Aunque el Grupo Empresarial Ganadero (GEGAN), del Ministerio de la Agricultura, está en camino para sobrecumplir el plan de leche, anunció uno de sus directivos. Se crecerá en 28 millones de litros en relación a años anteriores, declaró a la prensa Juan Carlos González Torrecilla, vicepresidente primero de esa entidad. Señaló que a pesar de las complejidades de los recursos y de la logística hay avances, "e incluso nos hemos propuesto hacia el 2030 una estrategia dirigida a continuar creciendo

cada año, y que ello se traduzca en mayor satisfacción para la población" (ACN, 2019).

En Matanzas, el Buró Provincial del Partido Comunista de Cuba, al evaluar los indicadores del encargo estatal para la agricultura, en 2018, reveló atrasos en más de un millón de litros de leche e incumplimientos en la entrega del plan de carne de res, informó a la prensa Liván Izquierdo, miembro del Buró del Partido en la esfera Agroalimentaria de esa provincia (ACN, 2019).

Según González Torrecilla, son prioridades hoy día la siembra de pastos y forrajes, la elaboración de ensilajes, la concentración del ganado en cuarterones cuando lo amerite, garantizarle agua, impulsar la reproducción mediante el trasplante de embriones, dar un mayor uso a las plantas proteicas, y recurrir más que nunca a la ciencia, la técnica y la innovación, como pidió el Comandante en Jefe Fidel Castro, todo ello sin dañar el medio ambiente y a tono con la Tarea Vida. Reconoce que la ganadería bovina es la rama más complicada de recuperar (ACN, 2019).

Díaz *et al.* (2014), manifiestan que la biotecnología convencional, puede aplicarse a la producción de alimentos para animales, a partir de la utilización de residuos orgánicos post cosecha y agroindustriales, la cual incrementa la cantidad y disponibilidad de nutrientes y su digestibilidad, una de las técnicas utilizadas es la del ensilaje. En países tropicales, como Cuba, la conservación de forraje es un elemento importante en la producción animal de rumiantes, ya que se previene una baja productividad y mortalidad de animales en épocas seca.

En Colombia Villegas *et al.* (2017) demostraron, que es posible hacer una sustitución parcial de concentrado comercial por ensilaje de *Tithonia diversifolia*, sin reducir la producción y composición de la leche en vacas, además de disminuir los costos de producción. En Cuba, los estudios realizados por Morales (2013) y Galindo *et al.*, (2018) muestran que esta arbustiva (*T. diversifolia*) ejerce un efecto importante en el rendimiento productivo del ganado bovino debido a sus características nutricionales, ya sea ensilada o asociada en sistemas silvopastoriles.

### **I.3. Características taxonómicas y hábitos de crecimiento de *Tithonia diversifolia***

#### **Taxonomía**

*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray conocida vulgarmente como “Botón de oro”, es una planta herbácea o arbustiva robusta, perteneciente al Reino Plantae, Subreino Traqueobionta (plantas vasculares), División Magnoliophyta (plantas con flor), Clase Magnoliopsida (dicotiledóneas), Subclase Asteridae, Orden Asterales, Familia Asteráceas y Género *Tithonia* (Medina *et al.*, 2009; Fasuyi *et al.*, 2010). Esta arbustiva es originaria de México y Centro América desde donde se ha distribuido a: India, Ceilán, Cuba (Roig y Mesa, 1974; Inayat y Gordon, 2009); Venezuela, Colombia (Murgueito y Ospina, 2002; Medina *et al.*, 2009); África, Filipinas (Agboola *et al.*, 2006; Sao *et al.*, 2010); Asia; Estados Unidos, las islas del pacífico y Australia (Wang *et al.*, 2004).

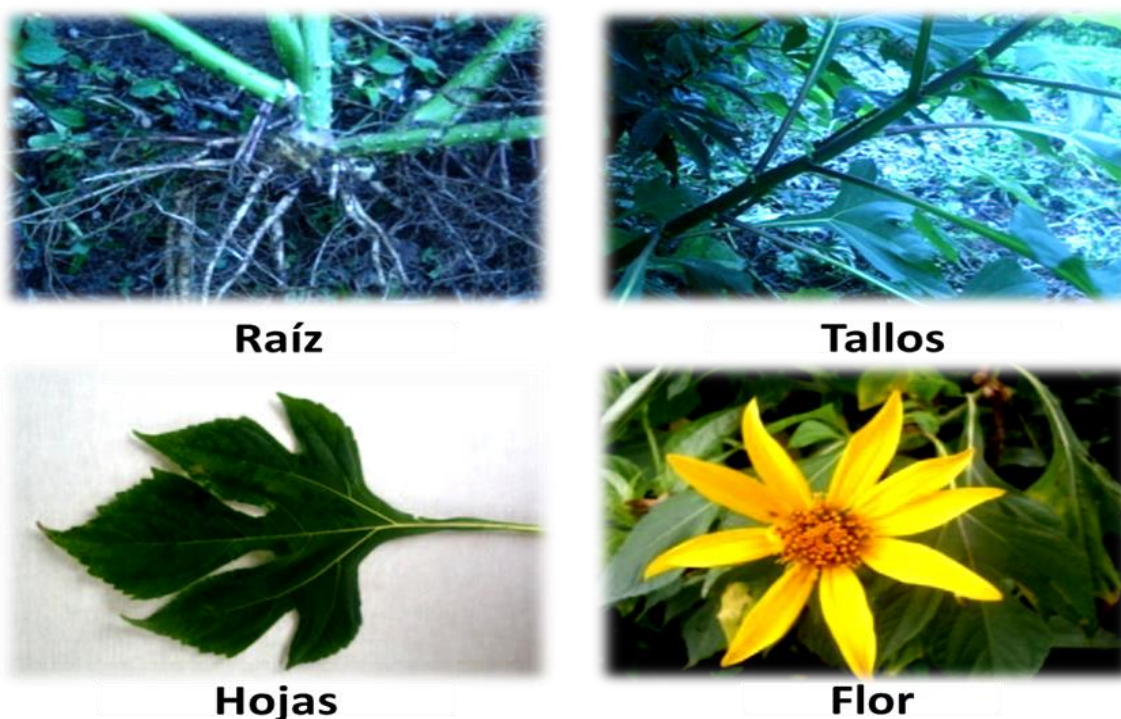
#### **Hábitos de crecimiento**

*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray crece en condiciones agroclimáticas variadas, desde el nivel del mar hasta los 2 700 metros (m) de altitud, con precipitaciones anuales de 800 a 5 000 mm en diferentes tipos de suelo. Esta planta tolera condiciones de acidez y baja fertilidad (Murgueito *et al.* 2003; Inayat y Gordon, 2009). Crece como una arvense en el borde de los caminos, de forma rápida incluso bajo condiciones desfavorables, y se multiplica fácilmente por esquejes. Puede producir hasta 275 t de material verde (unas 55 t de materia seca) por hectárea por año. Es muy ruda y puede soportar la poda a nivel del suelo y la quema; las ramas podadas se les ofrecen como alimento al ganado que no dispone de pasto (Olabode *et al.*, 2007).

La arbustiva (*T. diversifolia*) posee de 1,5 a 4,0 m de altura, caracterizada por una amplia red radicular (Peters *et al.*, 2002; Murgueito *et al.*, 2003), con ramas fuertes su tomentosas, raíz principal fusiforme con numerosas derivaciones secundarias muy finas. Su tallo es erecto, ramificado y único, con aproximadamente 24 a 36

haces vasculares. Las ramas son tiernas y permanecen cubiertas de pelillos, los cuales se pierden con la edad (Pérez *et al.*, 2009; Inayat y Gordon, 2009).

Las hojas son alternas, pecioladas, de 7 a 20 cm de largo por 4 a 20 cm de ancho, con un ápice acuminado, divididas en tres o cinco lóbulos, muy pilosos en el envés. La cara superior está cubierta de pelos, mientras la cara inferior presenta puntos glandulares (Inayat y Gordon, 2009; Ipou *et al.*, 2011). En la figura 1 se muestran las estructuras morfológicas de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.



**Figura 1:** Estructuras morfológicas de *Tithonia diversifolia* (Gonzales *et al.*, 2014).

La inflorescencia de *Tithonia diversifolia* contiene varias cabezuelas grandes, en ocasiones agrupadas, con pétalos amarillos. El conjunto de estas flores está rodeado por fuera, por el involucro anchamente acampanado y se parece al pétalo de una flor sencilla de color amarillo brillante, muy vistosa y tipo margarita. El fruto de esta planta es seco, indehiscente y contiene una sola semilla conocida como aquenio (Pérez *et al.*, 2009; Ipou *et al.*, 2011).



### **I.3.1 Empleo de la *Tithonia diversifolia* en la alimentación animal**

El uso de *Tithonia diversifolia* para la alimentación animal es cada vez más generalizado debido a su alta rusticidad, buen valor nutricional, alta digestibilidad de la materia seca y presencia de aceites en sus hojas y flores; además, de la elevada tasa de producción de biomasa. Posee un porcentaje de azúcares totales del 39,8 %; puede alcanzar altas concentraciones de carbono (C) en su biomasa aérea, mayor de 77 t/ha/año (Gallego *et al.*, 2017).

En Cuba se promueve la implementación de sistemas silvopastoriles (SSP), entre los que se destaca de manera particular *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Grays. En nuestro país, esta forrajera, constituye una alternativa para alimentar el ganado. Estudios realizados por García *et al.* (2016) demostraron incrementos en la producción y calidad de la leche, cuando utilizaron un SSP con esta especie. Por otra parte, Galindo *et al.* (2018) demostraron que al asociar esta planta a una mezcla de gramíneas tropicales, mejora el ecosistema ruminal al incrementar los organismos degradadores de la fibra y reducir los protozoos y metanógenos; así como poner a disposición del animal mayor cantidad de materia orgánica fermentada para la síntesis de proteína microbiana.

Otras experiencias son las reportadas por Morales (2013) cuando utilizó el VITAFERT como aditivo para obtener ensilajes de *Tithonia*. En este caso las mezclas del ensilaje con niveles de VITAFERT 4.5 y 6.0 mL/kg, presentaron mayor valor nutritivo, en términos de superior contenido de proteína, ceniza y menor Fibra Detergente Neutra (FDN). Según el autor es factible su empleo, en la alimentación animal, por ser un follaje abundante en el trópico y componente de la flora cubana.

En otros países tropicales *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Grays ha sido suministrada en la alimentación de diferentes especies y categoría animal. A continuación se enuncian varios de estos ejemplos; de ellos lo tenemos:

## **En ovinos**

En esta especie animal, *Tithonia diversifolia* puede ser usada tanto como suplemento proteico o como fuente única de alimentación. Según Vargas (1994) la inclusión, en la dieta, de un 50 y 100 % de esta forrajera, picada en estado de floración, aumenta el consumo en base seca. García *et al.* (2008) evaluaron la aceptación de varias forrajeras en la dieta por parte de los ovinos y observaron que estos animales consumen ávidamente la biomasa de *T. diversifolia*. Otros estudios son reportados por Ramírez *et al.* (2010) quienes demuestran que la inclusión de la *Tithonia diversifolia* hasta el 20 % de la dieta en la alimentación de ovejas, aumenta el consumo de materia seca y la digestibilidad del alimento. Concluyen que este porcentaje de inclusión no cambia la proporción del nitrógeno retenido, situación que convierte a esta planta en una alternativa para la alimentación de animales criados en pasturas de baja calidad.

## **En gallinas**

Diversos estudios reportan la influencia de la harina de hojas de *Tithonia diversifolia* en la dieta de gallinas de postura, sobre la calidad del huevo. Entre los niveles de inclusión para esta especie se experimentaron 0; 5; 10; 15 y 20 %. Los resultados destacaron que la producción de huevos no presentó diferencias entre las aves que consumieron los diferentes niveles de inclusión, mientras que el consumo de alimento disminuyó de 106,86 g/animal/día en las aves que consumieron la dieta exenta de esta forrajera. También manifiestan que la conversión en términos de kg de alimento por docena de huevos fue mejor para las aves que consumieron la dieta; así como la calidad interna y externa del huevo no fue afectada por el nivel de inclusión, a excepción del color de la yema que fue más pigmentado al incrementar el nivel de *T. diversifolia* en la dieta (Mahecha y Rosales, 2005 y Togun *et al.*, 2006). Estudios realizados por Yalçın *et al.* (2008) demuestran que utilizar 2 % de harina de hojas de *Tithonia diversifolia*, es suficiente para generar mayor masa de huevo, mejor eficiencia alimenticia y menor cantidad de colesterol en la yema. Los

investigadores atribuyen estos resultados a la posible creación de una población bacteriana intestinal que permite una mayor retención de nutrientes.

### **En conejos**

Nieves *et al.* (2011) sostienen que el follaje de *Tithonia diversifolia* es una materia prima alternativa en la alimentación de conejos. Durante la investigación los autores observan, que se eleva el contenido de nutrientes digestibles totales, al incluir entre el 9 y 18 % de follaje de esta forrajera como parte de la dieta de los animales, bajo condiciones tropicales. Sin embargo, López *et al.* (2012) no la recomiendan como única fuente alimenticia. Argumentan que puede generar bajas ganancias de peso, debido al bajo contenido de materia seca de la forrajera, el cual altera la relación energía- proteína de la dieta. Otros autores recomiendan 15, 20 y 30 % de inclusión de follaje de *Tithonia* en dietas ricas en harina de sangre, para alimentar conejos adultos y garantizar que no exista efecto negativo sobre el rendimiento. Además mejorar la digestibilidad y reducir, al mismo tiempo, los costos de producción por unidad de peso sin afectar la ganancia de peso, el peso de los órganos ni la calidad de la canal (Olabanji *et al.*, (2007).

### **En bovinos**

Diversos autores destacan *Tithonia diversifolia* como un recurso potencial, al igual que una fuente de proteína, minerales y carbohidratos, para ser usado en la alimentación de esta especie animal (Hess *et al.* 2006; Galindo *et al.*, 2017, 2018). En vacas se evaluó la producción y calidad de la leche, cuando se usó *T. diversifolia* en la dieta de los animales junto con *Brachiaria* de pastoreo y alimento balanceado como suplemento, en la zona de vida de bosque húmedo tropical. Se demostró que el reemplazo del 35 % del alimento balanceado por forraje de *Tithonia* no afecta la producción ni la calidad de la leche y que, por el contrario, tienden a mejorar estas características, lo cual permite catalogar a esta especie forrajera como eficiente en sistemas de lechería cuando se busca disminuir los costos de producción (Mahecha *et al.*, 2007).

## En cerdos

Sarria (2003) reporta muy baja aceptabilidad del forraje de *Tithonia* al ser ofrecido en la alimentación de los cerdos, atribuyéndole baja palatabilidad en comparación con otras especies forrajeras. Olayeni *et al.* (2006) al evaluar niveles de 0, 10, 15 y 20 % de inclusión de harina de *Tithonia* desde los ocho hasta los dieciséis kilos de peso vivo, encontraron que estos animales soportan una inclusión en la dieta de hasta 20 %, sin afectar la ganancia de peso ni las características hematológicas; además, afirman que su incorporación disminuye los costos de producción. No obstante, los autores, encontraron que algunos órganos internos como los riñones de los animales que consumieron las dietas con los niveles de 15 y 20 % de inclusión tenían mayor peso que los de aquellos que consumieron las dietas con niveles del 0 y 10 %, por lo que le atribuyen este resultado a que los animales con los niveles superiores tienen un mayor trabajo del órgano en el intento de eliminar y extraer del organismo los elementos disuasivos del alimento. El nivel del 20 % de sustitución en el total de la dieta también es recomendado por Savón *et al.* (2008) para cerdos durante las fases de crecimiento y finalización. Aseguran que este nivel no ocasiona trastornos en la morfometría intestinal ni en el rendimiento de los animales, aunque en oposición a los resultados de Olayeni *et al.* (2006) ellos observaron disminución del peso del riñón derecho a medida que se incrementaba la cantidad de reemplazo del alimento por la harina de esta planta.

Herrera *et al.* (2013) afirman que es factible ofrecer el 10 % de la proteína bruta que requieren los cerdos en fase de 60 a 90 kg de peso vivo a partir de la harina de forraje de *Tithonia diversifolia*, sin que se aprecie deterioro productivo en los animales. De la misma forma, Nhan *et al.* (2011) Manifestaron que se reducen los costos de producción al incluir 20 % de ensilaje de hojas y peciolo de esta especie forrajera con un 75 % de *Colocasia esculenta*, en la dieta de los cerdos; y que se puede dar 50 % de follaje de *Tithonia diversifolia* con 50 % de *Colocasia esculenta*, adicionados con melaza, sin que se afecte la digestibilidad ni se perjudique el peso final de los animales.

#### **I.4 Ensilajes. Características y fases del proceso**

El ensilaje se define como una técnica de preservación de forraje que se logra por medio de una fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaeróbicas, es un proceso natural en el cual las bacterias, por su metabolismo, crean un alto nivel de acidez, lo que impide que otros organismos la puedan descomponer. Se argumenta además, que el ensilaje se define como la oxidación incompleta de carbohidratos por acción de microorganismos (Bernal *et al.*, 2015; Pinzón y Lemus, 2017).

Según Garcés *et al.* (2014), las bacterias epifíticas fermentan los carbohidratos hidrosolubles del forraje produciendo ácido láctico y en menor cantidad, ácido acético. Al generarse estos ácidos, el pH del material ensilado baja a un nivel que inhibe la presencia de microorganismos que inducen la putrefacción. Estos mismos autores argumentan que una vez que el material fresco ha sido almacenado, compactado y cubierto para excluir el aire, el proceso del ensilaje se puede dividir en cuatro etapas:

Primera etapa: Fase aeróbica o de respiración: Su duración es de pocas horas, en esta, el oxígeno atmosférico contenido en el forraje disminuye rápidamente por la respiración del forraje a ensilar, ya que después de que la planta es cortada continúan consumiendo oxígeno convirtiendo el azúcar en dióxido de carbono, agua y calor. Esta respiración se da además por la acción de los microorganismos aeróbicos y aeróbicos facultativos (levaduras y las enterobacterias).

Segunda etapa: Fase de fermentación: Inicia cuando se ha consumido el oxígeno y el ambiente es anaerobio. Su duración va desde días a semanas dependiendo de las características del forraje y el medio ambiente que permita el desarrollo de las Bacterias ácido lácticas (BAL) hasta que sean las bacterias predominantes y de esta manera la producción de ácido láctico baje el pH a valores entre 5,0 a 3,8.

Conde (2009) considera que esta fase se subdivide en dos: comienzo de la acidificación e inicio de la fermentación láctica; la primera se caracteriza según Silveria y Franco (2006) porque a medida que se acaba el oxígeno hay muerte de

las células vegetales y además de bacterias aerobias, desarrollándose las bacterias facultativas y posteriormente las anaerobias (lácticas, butíricas y algunas proteolíticas), además de las coli-erógenas que pueden degradar las proteínas en amoníaco y aminos tóxicas. Sin embargo esta es una fase corta por la rápida acidificación. La segunda fase se da por el inicio de la fermentación láctica que depende de las BAL, donde solo el 10% de la microflora epifítica de la planta está compuesta por este tipo de bacterias.

Las BAL hacen parte de la microflora epifítica de los forrajes que se están ensilando y pertenecen a los géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. La mayoría de ellas son mesófilas, (crecimiento a temperaturas entre 5° y 50 °C, con un óptimo entre 25° y 40 °C) y tienen la capacidad de disminuir el pH del ensilaje a valores entre 4 y 5, lo que depende de las especies y del tipo de forraje (Garcés *et al.*, 2014).

Tercera etapa: fase de producción máxima de ácido láctico y estabilización: Si el ensilaje se conserva con condiciones anaerobias no presentarán alteraciones bioquímicas indeseables; ya que se reducen y eliminan las poblaciones de microorganismos patógenos que pudieran descomponer el ensilaje; algunos microorganismos acidófilos sobreviven a este período en estado inactivo.

Conde (2009) refiere que, si el material ha sido correctamente ensilado, las tres primeras fases se realizan los tres primeros días; la fase de estabilización se desarrolla entre el 4 hasta los 17 o 21 días después de haber iniciado el proceso.

Cuarta etapa: fase de deterioro aeróbico: Esta fase da inicio en el momento de abrir el ensilaje al ser expuesto al aire. Se considera que este periodo se divide en dos etapas: La primera relacionada con la degradación de los ácidos orgánicos que conservan al ensilaje, la cual se da por acción de levaduras y otras bacterias que producen ácido acético y aumentan el valor del pH. La segunda es la etapa de deterioro en la cual aumenta la temperatura y con ello el desarrollo de microorganismos descomponedores del ensilaje.

#### **I.4.1 Ensilajes como fuente de alimentación para el ganado**

El proceso de ensilaje sirve para almacenar alimentos en tiempos de cosecha y suministrarlo en tiempo de escasez. Por este método se conserva su calidad y palatabilidad a bajo costo, lo cual permite aumentar el número de animales por hectárea o la sustitución o complementación de los concentrados. Este tipo de alimento se emplea para manejar ganado en forma intensiva, semi-intensiva o estabulada (Palma, 2006).

El ensilaje es una excelente opción para la alimentación en las ganaderías de países tropicales por la gran variedad de forrajes, la intensidad solar y el nivel de lluvias que existen en el trópico. Por las condiciones anteriores se pueden producir varias cosechas en el año, mientras que en los países con estaciones solo se cosecha una vez al año (Garcés *et al.*, 2014).

También hay que destacar que en Cuba, más de la mitad del maíz y otros cereales que se utilizan para la elaboración de concentrado animal, sobre todo para ganado bovino, son importados; por lo que es un sistema de alimentación costoso para el ganadero y el estado.

Convirtiéndose así el ensilaje en un modo de alimentación más económico que puede cumplir con los requerimientos nutricionales del animal. Casos como el de ensilaje de maíz en Colombia, se han convertido en una alternativa muy económica para los criaderos de ganado puro, dándoles a los animales más volumen corporal sin acumulación de grasa y con mayor aumento de peso mensual (Mora, 2010).

El ensilado de cultivos forrajeros o de subproductos industriales podría ser una contribución importante para optimizar el funcionamiento de los sistemas de producción animal en zonas tropicales y subtropicales, pero su empleo es todavía muy escaso (Kayouli y Lee, 2001). Si bien esto se debe en parte a los bajos precios de los productos ganaderos, al poco uso de la mecanización y al alto costo de los materiales para el sellado del silo, también se debe a la falta de experiencia práctica en la técnica del ensilaje. Se necesitan además, más investigaciones para dilucidar ciertos temas específicos del ensilaje en zona tropical. Uno de estos temas se refiere

al hecho de que las gramíneas y las leguminosas tropicales tienen una alta concentración de componentes de la pared celular y un menor contenido de carbohidratos disponibles para la fermentación, comparados con cultivos forrajeros de zonas templadas (Gutierrez y Viviani Rossi, 2008).

Estudios realizados en Argentina demuestran, que el trigo como ensilaje ha sido otra alternativa de gran interés en la producción bovina, frente a otros ensilajes de cereales como la avena y la cebada (Elizalde *et al.*, 1995). Sin embargo en trabajos desarrollados en Chile por Elizalde y Méndez (2005), encontraron un mejor efecto en el consumo voluntario y contenido de proteínas en ensilajes de trigo con respecto a la avena.

En Ecuador Díaz (2014) evaluó varios residuos agrícolas post cosecha en ensilajes inoculados con preparados microbianos nativos, para alimentar vacas lecheras. Los indicadores de calidad de la leche en grasa y proteína incrementaron en un 11 % además se estimuló la producción láctea. Según el autor el ensilaje de rastrojo de maíz con el preparado microbiano a base de suero fresco de leche demostró el mejor comportamiento biológico.



#### **I.4.2 Producción de ensilajes en Cuba**

La inestabilidad de los precios de las materias primas en el mercado internacional para la elaboración de los piensos y la mala calidad de estas a su arribo a puertos cubanos, hacen que las producciones de proteína animal en Cuba se vean afectadas (Lezcano *et al.*, 2015). Acciones científico-tecnológicas han dado lugar al Alimento de Ensilado Cubano (AEC), donde estudios del presente y pasado siglo muestran las bondades de las materias primas y las técnicas de conservación de alimentos en medios de bajo pH (Vázquez *et al.*, 2016).

Por los años 90 comenzaron a usarse los residuos agroindustriales de la caña de azúcar. Las mieles enriquecidas y la levadura *Saccharomyces* son ejemplos de ensilados cubanos que han sido ampliamente estudiados, con excelentes resultados, en la especie porcina por Figueroa y Ly (1990). *Saccharina* es un producto obtenido por fermentación de los tallos de caña de azúcar desprovistos de las hojas, suplementado con urea y sales minerales y en otras diferentes variantes se incluyeron fuentes amiláceas para mejorar la calidad y digestibilidad del producto fermentado (Elías *et al.*, 1990).

Años más tardes las investigaciones fueron dirigidas a utilizar las raíces y los tubérculos de algunos residuos de cosecha. Diversos autores (Rodríguez, 2004; Valdivié 2012 y Lezcano *et al.*, 2014) demostraron las bondades de la yuca y el boniato, para la alimentación animal, como fuentes energéticas del tipo amiláceas.

Sarría y Serrano (2010); Lezcano y Castañeda (2000) y Mora *et al.* (2013), reportaron excelentes resultados con el empleo de la vinaza. Este residual de la agroindustria se evaluó en el comportamiento animal y sus efectos se reflejaron en los indicadores de salud, con reducción de muertes y diarreas en animales jóvenes. Según los autores esta respuesta está asociada al ambiente no viable para los coliformes patógenos, los cuales no crecen en pH ácido. Estos antecedentes sirvieron de base para proponer la tecnología de elaboración del AEC.

No fue hasta el primer semestre del año 2015 que se montaron ocho plantas productoras de AEC en todo el país, con potencialidades para producir 94000 t de AEC al año, según sus capacidades instaladas en 300 días de trabajo. Esta producción puede sustituir 28500 t de maíz al año, lo que implicaría el ahorro de 7.7 millones de dólares. El volumen potencial de alimento ensilado puede cubrir las necesidades de producción para obtener 10490 t de carne de cerdo en banda. Si se considera que el país reporta precios de importación de pierna de cerdo a un costo de 3250.00 USD/t, con el uso de AEC se puede ahorrar la compra de 3147 t a un costo de 10.2 millones de USD (Vázquez *et al.*, 2016).

Aunque las posibilidades de producción son las descritas, hasta la fecha se han obtenido 50000 t de AEC a un costo de 21.2 millones de pesos en CUP; se toma como referencia lo reportado por la planta de Mayabeque en junio de 2015. Los valores de ventas que se logran ascienden a 29.7 millones de CUP (el precio de ventas actual es de 743.44 pesos/t) (Vázquez *et al.*, 2016).

#### **I.4.3 Uso de aditivos para el ensilaje**

Los inoculantes microbianos para ensilaje han tenido un gran auge en los últimos años en diversos países; sin embargo, en muchas regiones del mundo, se carece de información comparativa y detallada al respecto que especifique los efectos que sobre el ensilaje se producen al utilizar un determinado aditivo. Además, se requiere información sobre la conveniencia de su utilización al considerar la gran variedad de material que se utiliza para ensilar (Ruíz *et al.*, 2009).

Según Mier (2009) los aditivos para el ensilaje pueden ser: químicos o biológicos y se pueden clasificar en:

- Conservantes: Ac. fórmico, acético, láctico, propionico, benzoico, caprónico. Estos Inhiben las fermentaciones indeseables y actúan de diversas maneras, unos comunican a la masa del forraje una acidez inicial que favorece la actividad de las bacterias lácticas.

- Inoculantes: bacterias lácticas: *Lactobacillus*, *pediococcus*, *streptococcus*. Tienen como papel principal elevar rápidamente el nivel de acidez del forraje a ensilar.
- Enzimas: amilasas, celulasas, hemicelulasas, pectinasas. Estas se encargan de la ruptura de las paredes celulares, aumentan el contenido de azúcares solubles, fermentados por bacterias lácticas, produciendo la bajada de pH.
- Sustratos: melazas, glucosa, sacarosa, granos de cereales, pulpa de remolacha, pulpa de cítricos.
- Nutrientes o Activadores: amonio, urea, carbonato cálcico.

Los aditivos bacterianos o inoculantes contienen cepas de bacterias seleccionadas que fermentan los azúcares simples en ácido láctico, acidificando rápidamente el medio, o en ácidos con poder anti fúngico que inhiben el crecimiento de hongos y levaduras que causan deterioro del material. Estas bacterias son clasificadas como homolácticas o heterolácticas, respectivamente. Ambos tipos pueden ser usados para mejorar la calidad del ensilaje, aunque tienen diferentes funciones y actúan en distintas fases del proceso de ensilaje (Kung *et al.*, 2003).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) fermentan los carbohidratos hidrosolubles del forraje para producir ácido láctico y en menor cantidad, ácido acético. Al generarse estos ácidos, el pH del material ensilado baja a un nivel que inhibe la presencia de microorganismos que inducen la putrefacción (Filya *et al.*, 2007).

Las BAL pertenecen a la microflora epifítica de los vegetales. Su población natural crece significativamente entre la cosecha y el ensilaje. Las características del cultivo como contenido y composición de azúcares y el contenido de materia seca, combinados con las propiedades del grupo BAL, así como su tolerancia a condiciones ácidas o de presión osmótica, y el uso del sustrato, influirán en forma decisiva sobre la capacidad de competencia de la flora BAL durante la fermentación del ensilaje (Stefanie *et al.*, 2001).

El uso de bacterias homolácticas era común desde el final de la década de los 70. La mayoría de los inoculantes fueron desarrollados bajo el criterio de ser capaces de crecer vigorosamente y dominar la población natural durante la fermentación, ser homofermentativos y altamente tolerantes al medio ácido, para que se produzcan cantidades significativas de ácido láctico. Los microorganismos que reúnen todas estas características son generalmente *Lactobacillus* spp. (Kung *et al.*, 2003).

### **I.5 Suero de leche: composición y alternativas de empleo**

En la actualidad la importancia que ha tomado el problema ambiental lleva a la industria mundial a procesar y buscar alternativas de uso de aquellos residuos industriales que generan un impacto significativo sobre el ambiente. El suero de leche o lacto-suero es uno de los materiales más contaminantes que existen en la industria alimenticia a nivel mundial, sin embargo es uno de los componentes más nutritivos que actualmente se desecha; contiene alrededor del 25% de las proteínas de la leche, el 8% de la materia grasa y cerca del 95% de la lactosa, por lo que se convierte en un residuo altamente proteico y nutritivo (Recinos y Saz, 2006)

El suero de leche o lacto-suero se define como un subproducto líquido resultante de la elaboración del queso, caseína, caseinatos y manteca. Se obtiene tras la separación de las caseínas y de la grasa como resultado de una coagulación, donde estos componentes precipitan y se disgregan del resto de la leche (Carrillo, 2006). De las diversas producciones que lo generan, la elaboración de queso es la de mayor importancia, es decir, que el principal porcentaje de lacto-suero proviene de este proceso y será la materia prima de los subproductos del suero (Menchón, 2016).

En el sector alimentario, el lacto-suero constituye una fuente económica de proteínas que otorga múltiples propiedades en una amplia gama de alimentos. Los productos del suero mejoran la textura, realzan el sabor y color, emulsifican y estabilizan, mejoran las propiedades de flujo y poseen otras propiedades funcionales que aumentan la calidad de los productos alimenticios (Parra Huerta, 2009).

El suero obtenido de la elaboración de queso se vierte generalmente a los ríos, lagos, o embalses de agua afectando la vida acuática. En algunos casos se utiliza para suplementar la alimentación de terneros o cerdos (Westergaard, 2004). Es por eso que surge la necesidad de valorizar este “desecho” buscando alternativas tecnológicas que permitan obtener múltiples ingredientes con valor agregado (Schaller, 2009).

Las proteínas y la lactosa se transforman en contaminantes cuando el líquido es arrojado al ambiente sin ningún tipo de tratamiento, ya que la carga de materia orgánica que contiene permite la reproducción de microorganismos produciendo cambios significativos en la demanda biológica de oxígeno (DBO) del agua contaminada. Por cada 100 kg de lacto-suero líquido se generan aproximadamente 3,5 kg DBO y 6,8 kg de demanda química de oxígeno (DQO) debido principalmente al contenido de lactosa (Muñi *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2009).

El lacto-suero se puede clasificar como dulce, semiácido y ácido, dependiendo de su acidez valorable y de su pH. Estos factores están condicionados por el tipo de coagulación que se aplique a la leche en la fabricación del queso de donde derivará el suero. Mientras que el suero dulce resulta de la elaboración de quesos con la adición de cuajo y presenta una acidez valorable de 0,1-0,2% y un pH entre 5,8 y 6,6; el suero ácido, es resultado de la coagulación ácida y sus valores de acidez son de 0,4% y pH de 4,6. Los sueros semiácidos se caracterizan por valores intermedios de acidez y pH (Menchón, 2016).

El suero de leche contiene bacterias ácido lácticas (BAL), tales como *Lactobacillus delbreueckii*, *L. helveticus* y *Streptomyces termophilus*. El ácido láctico al reducir el pH inhibe el crecimiento de bacterias indeseables. Este suero concentrado posee además, una composición rica en lactosa, proteínas, minerales y elementos traza, y se puede aprovechar en lugar de su eliminación como residuo (Ventura *et al.*, 2012; Alsaed *et al.*, 2013).

Días (2014) utilizó suero fresco de leche como inóculo microbiano para ensilar rastrojo de maíz, en el Ecuador. Al producto obtenido le denominó BIORÉS, el cual al ser suplementado en vacas lecheras, incrementó la grasa y la proteína de la leche en un 11%; además estimuló la producción láctea de estos animales. Esta tecnología incrementa el indicador beneficio/costo de la ganadería lechera de 1,11 a 1,29% y constituye además un aporte a la mitigación de la contaminación ambiental.

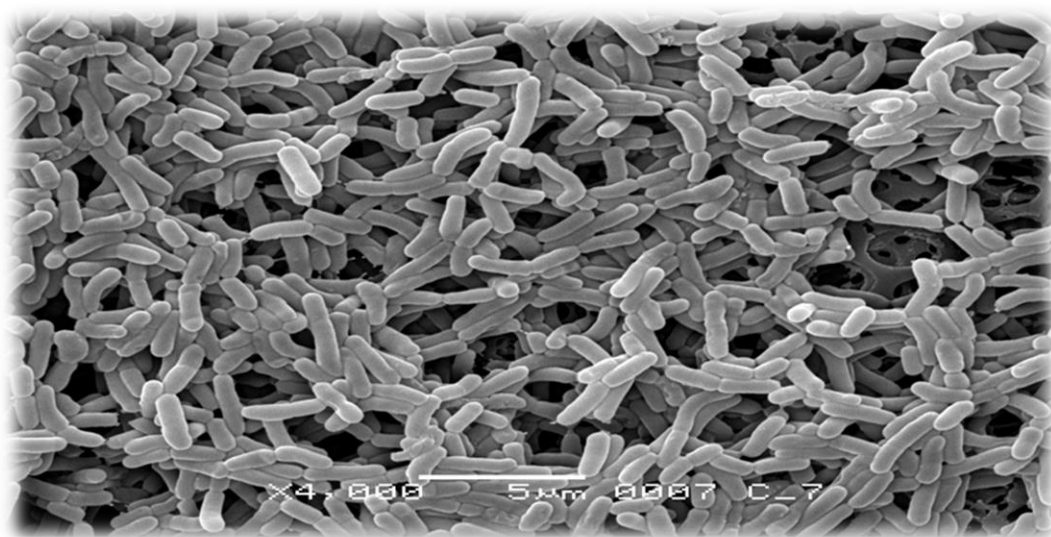
Experiencias de Bautista-Trujillo *et al.* (2009), exponen una combinación de melaza y suero de leche deshidratado, como suplemento para ensilar subproductos de pescado y como aditivos para el ensilaje de maíz. Por otra parte, Ventura *et al.*, (2012) adicionan al ensilaje de paja de trigo y salvado de arroz, suero de leche como residuo barato de la producción de queso.

#### **1.6 PROBIOLACTIL®: su empleo como aditivo microbiano**

El Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas, fue una de las primeras Instituciones de Cuba en obtener diferentes microorganismos con actividad probiótica, para su uso en los sistemas de explotación pecuaria. De estas investigaciones se obtuvieron cuatro productos registrados bajo la marca de: PROBIOMEX®, PROBIOLACTIL®, PROBIOLEV® y SUBTILPROBIO® (Resolución N° 4270; 4271:4272 y 4264/2015, respectivamente). Estos biopreparados se han evaluado en diferentes especies y categoría animal con excelentes resultados.

El efecto probiótico de estos biopreparados, en animales, se debe principalmente a la exclusión de microorganismos patógenos, su acción antimicrobiana y la producción de ácido láctico, con lo que crean un ambiente favorable para la respuesta inmunológica y la prevención de enfermedades infecciosas (Pérez *et al.*, 2015; Milián *et al.*, 2017). Existen además, experiencias con el empleo de SULTILPROBIO® como antiséptico final del pezón, para prevenir y controlar la mastitis subclínica en vacas lecheras (Mesa, 2018) y de la adición de PROBIOLACTIL®, a la pulpa de henequén, para conformar un aditivo simbiótico y suministrarlo en la dieta de terneros jóvenes (del Valle, 2017).

PROBIOLACTIL® es un biopreparado microbiano constituido por la especie *Lactobacillus salivarius*. En la figura 2 se observa una microfotografía electrónica de dicha bacteria, la cual se caracteriza por ser gram-positiva, no formadora de esporas. Es un organismo homofermentativo (sólo produce un subproducto del metabolismo ácido láctico) que se encuentra naturalmente en las cavidades orales de los humanos y animales, los intestinos y la vagina.



**Figura 2:** Microfotografía electrónica de la morfología bacteriana de la cepa *Lactobacillus salivarius* C7 (X4000) (Tomado de Rondón, 2009).

Esta especie se considera no patógena y se utiliza a veces para producir ácido láctico en los alimentos fermentados. Produce también una enzima llamada lactasa, así como bacteriocinas, proteínas o péptidos que son tóxicos para algunos otros tipos de bacterias (Riboulet *et al.*, 2012). Otra característica que los distingue es ser anaerobio facultativo, lo que significa que puede crecer en presencia o ausencia de oxígeno (Rondón, 2009).

Ojito (2012), aplicó PROBIOLACTIL® en la alimentación de crías porcinas, cruce comercial Yorkshire - Landrace x L35, lo cual contribuyó a incrementar ( $P \leq 0,05$ ) el

peso vivo de los animales a las cinco semanas y la ganancia de peso diaria. Por otra parte se produjo la disminución de la conversión alimenticia y la incidencia de diarreas en los cerdos tratados con el biopreparado. Este mismo aditivo se mezcló con SUBTILPROBIO® para incorporarlo a la dieta de gallinas ponedoras L<sub>33</sub>. El autor (Borges, 2013) observó una mejora en los indicadores porcentaje de postura, huevo alojado por ave por semana y conversión en huevo por cada kilogramo de alimento consumido, con respecto a los animales que no recibieron esta mezcla microbiana.

Esta misma mezcla microbiana (PROBIOLACTIL®+SUBTILPROBIO®) se utilizó en la alimentación de aves de inicio de la línea pura pesada B<sub>4</sub>, durante un periodo de 35 días. Se demostró la mejora del peso vivo, la conversión alimenticia, la uniformidad del lote y la mayor cantidad de aves seleccionadas, según el criterio del estándar (Rodríguez *et al.*, 2015). Estos resultados coincidieron con los reportados por Suárez (2013) cuando evaluó solo PROBIOLACTIL® en similares reproductores pesados (P<sub>8</sub>). Dicho autor destacó además, como la inclusión del biopreparado probiótico incidió en el menor porcentaje de mortalidad y mayor viabilidad a las aves que lo consumieron.

Años más tarde, Socorro (2016) trabajó con cerdos de dos categorías; crías y pre-cepta y estableció cuatro tratamientos (I. Dieta basal (Control); II. Dieta basal + PROBIOLACTIL®; III. Dieta basal + SUBTILPROBIO® y IV. Dieta basal + Mezcla de ambos biopreparados). Como resultado comprobó, que los aditivos y su mezcla mejoraron todos los indicadores, expresándose mayores efectos en los cerdos que consumieron PROBIOLACTIL®.

Los biopreparados evaluados produjeron beneficios en ambas categorías, ya que mejoraron la eubiosis del tracto gastrointestinal, lo cual contribuyó a incrementar ( $P \leq 0,05$ ) el peso vivo y la ganancia de peso diaria de los cerdos. Por otra parte, mejoró la conversión alimenticia y disminuyó la incidencia de diarreas en los animales tratados. La aplicación de los biopreparados le confirió a la crianza animal



beneficios económicos por concepto de mejora de los indicadores productivos y la disminución de los gastos en medicamentos (Socorro, 2016).

Se destaca además el empleo de PROBIOLACTIL® como inóculo para la suplementación de *Lactobacillus salivarius*. Esta investigación tuvo como objetivo central obtener un biopreparado simbiótico a partir de la mezcla de pulpa de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) y PROBIOLACTIL®. Se optimizó además, la concentración de miel final como fuente de azúcares reductores e hidrolizado de levadura como fuente de nitrógeno. Como resultado se obtuvieron los valores óptimos para cada uno de los componentes, que aumentan la población de Lactobacilo (del Valle, 2017).

Se constató que el nuevo biopreparado, diseñado a partir de la aplicación de un cultivo probiótico (PROBIOLACTIL®) a residuos agroindustriales, enriquecidos con componentes nacionales y de alta disponibilidad, constituye un aditivo simbiótico de bajo costo y posibilidades de empleo como aditivo nutricional en la alimentación de terneros, durante la etapa de destete (del Valle, 2017).

Por lo expuesto en esta revisión bibliográfica se resume, que los aditivos microbianos suero de leche y PROBIOLACTIL® no solo se pueden utilizar en la alimentación animal; sino que es posible su empleo como activadores de la fermentación para elaborar ensilajes; debido al aporte que hacen de bacterias lácticas y sus consecuentes beneficios en el alimento conservado.

# *Materiales y métodos*

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en la Universidad de Matanzas (UM) y en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey” (EPPFIH). A continuación se describen los materiales y métodos, que de forma general, se utilizaron en toda la secuencia experimental.

### II.1 Origen y composición de los inóculos microbianos

Se trabajó con dos inóculos microbianos como activadores de la fermentación en el proceso de ensilaje. Estos fueron: **Suero de leche** y **PROBIOLACTIL®**.

**II.1.1 Suero de leche:** Este inóculo procede de la fábrica quesera perteneciente a la Empresa Provincial de Productos Lácteos, Matanzas, Cuba. El mismo constituye un subproducto de la industria láctea. De esta planta se tomó una muestra única (5 L) de un lote industrial de queso en forma homogénea (remoción del suero en la cuba por 3 min). La muestra de suero fresca se envasó en un tanque plástico limpio, con tapa y se trasladó hasta el laboratorio de microbiología (UM) donde se almacenó entre 4 y 8°C hasta su procesamiento. Los análisis de laboratorio para conocer la composición química y microbiológica se describen a continuación.

**Análisis químico del suero de leche:** Se tomaron tres muestras de suero para determinar la concentración de proteínas y carbohidratos. El contenido proteico se determinó por el método colorimétrico descrito por Lowry *et al.*, (1951), con el uso de albúmina de suero bovino (BSA) como patrón. Los valores de absorbancia se obtuvieron a 750 nm y las concentraciones ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) se determinaron mediante la curva patrón. Para los azúcares reductores se realizó el método del ácido dinitro salicílico (DNS) y se empleó la D-glucosa (Sigma) como azúcar patrón (Miller, 1959). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 456 nm. Además se determinó el pH y la acidez del suero.

**Análisis de pH** Para determinar el pH se realizaron tres repeticiones. Estas fueron obtenidas de dos mediciones, las cuales fueron promediadas. La medición de los valores de pH se realizó en un pHmetro digital (PHSJ-3F).

**Determinación de la acidez:** Se determinó por el método de Valoración ácido-base de la leche; descrito en el Manual de Determinaciones Analíticas en Leche (López *et al.*, 2015).

**Análisis microbiológico del suero de leche:** La concentración de bacterias ácido lácticas se determinó por los conteos de viables a través del método de las diluciones seriadas y siembra en placa. Para ello se utilizó el medio de cultivo Agar Mann, Rogosa, Sharper (MRS) (De Mann *et al.*, 1960) (CONDO, España). Se realizaron diluciones seriadas de la muestra (suero de leche) en una relación de inoculación de 1:10 (v/v) en agua de peptona (OXOID), desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-9}$ . Todas las diluciones se sembraron por triplicado (1 mL a profundidad) en placas con agar MRS. Las placas se incubaron (Boxun) a 37 °C en condiciones de anaerobiosis por 48 h. Posteriormente, el número de unidades formadoras de colonias (UFC) se determinó bajo lupa por conteo visual de colonias.

La composición del medio Agar Mann, Rogosa, Sharper (MRS) por litro es la siguiente: glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ), 20 g; peptona, 10 g; extracto de carne, 8 g; extracto de levadura, 4 g; citrato de amonio ( $(NH_4)_3 C_6H_5O_7$ ), 2 g; acetato de sodio ( $CH_3COONa$ ), 5 g; fosfato de potasio ( $K_2HPO_4$ ), 2 g; sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ), 0,2 g; sulfato de manganeso ( $MnSO_4$ ), 0,05 g y Tween 80, 1 g y de agar bacteriológico (BioCen), 15 g.  $L^{-1}$ .

**II.1.2 PROBIOLACTIL®:** Este inóculo procede del Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA) de la Universidad de Matanzas (UM). El mismo constituye un biopreparado probiótico a base de *Lactobacillus salivarius* cepa C65, aislada de la mucosa del ciego de pollos de ceba e identificada por técnicas de biología molecular.

Actualmente la cepa de *Lactobacillus salivarius* pertenece al cepario del CEBIO (UM) y se encuentra conservada en tubos de cultivo con tapa de rosca, que contienen el medio Tioglicolato (OXOID) semisólido (1 g.L<sup>-1</sup> de agar) con carbonato de calcio (0,1 g por tubo).

**Elaboración del PROBIOLACTIL®:** Se elaboró 1 L del aditivo microbiano según la metodología propuesta por Rondón (2009). Para ello la cepa de *Lactobacillus salivarius* C65 se cultivó en 10 mL del medio caldo MRS (sin agar bacteriológico) a 37 °C por 18 h. A continuación este pre-inóculo se añadió en 100 mL de caldo MRS y se cultivó en las mismas condiciones. Posteriormente este inóculo se adicionó en 1000 mL del medio para el crecimiento de *Lactobacillus salivarius* o MCLs (Tabla 1), contenido en un elenmeyer de 2 L de capacidad.

**Tabla 1:** Formulación del medio MCLs (Rondón, 2009).

Composición	g. L <sup>-1</sup>
Miel final de caña (58 % azúcares reductores totales)	30
HELSc (17 % nitrógeno total)	210mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
Citrato de Amonio	5
Acetato de Sodio	5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,02

HELSc Hidrolizado enzimático de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*. Elaborado por la metodología patentada por Pérez *et al.*, (2006).

Este cultivo se mantuvo a 37 °C durante 20 h en condiciones estáticas, después de este tiempo, se realizaron los conteos de viables a través del método de las diluciones seriadas y siembra en placa y la medición del pH (6,5), para comprobar la calidad del biopreparado elaborado. Este se envasó en un frasco estéril de 1 L con tapa de goma y se conservó a 5 °C hasta su utilización.

## II. 2 Selección y tratamiento del material vegetal utilizado para el ensilaje

Esta etapa de trabajo se desarrolló en la EEPFIH. El forraje seleccionado para este experimento fue *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. GRAY, la cual se sembró a partir de tallos de plantas jóvenes sin florecer, con una longitud de 50 cm y un diámetro de 2 a 3,5 cm con cuatro yemas. Las labores fitotecnicas realizadas durante el tiempo de plantación fueron: eliminación de plantas indeseables (por el método de chapea) y fertilización a razón de una tonelada de compost por hectárea.

El corte de la *T. diversifolia* se realizó a los 4 meses de ser establecida, aún sin florecer la planta. Se recolectó de forma manual y se llevó a una troceadora estacionaria (JF2-D) donde se picó (tallos y hojas) a dimensiones de 1-2 cm, luego se mezcló cuidadosamente para darle uniformidad. Este forraje verde se trasladó al laboratorio de bromatología (EEPFIH) donde recibió un tratamiento de presecado por 24 h (expuesto en bandejas metálicas a temperatura ambiente en condiciones estáticas).

### II.2.1 Elaboración de los ensilajes y tratamientos establecidos

Los microensilajes se elaboraron de 400 g de peso de *Tithonia diversifolia* presecada, en bolsas dobles de polietileno, hermetizadas con cinta adhesiva en el menor tiempo posible. Para el llenado de las bolsas el material vegetal se dividió en tres porciones con 3200 g de peso cada porción y se preparó según el tratamiento que se describe:

Tratamiento A (T-A) control, material vegetal, sin inóculo.

Tratamiento B (T-B), material vegetal inoculado con suero de leche.

Tratamiento C (T-C), material vegetal inoculado con PROBIOLACTIL®.

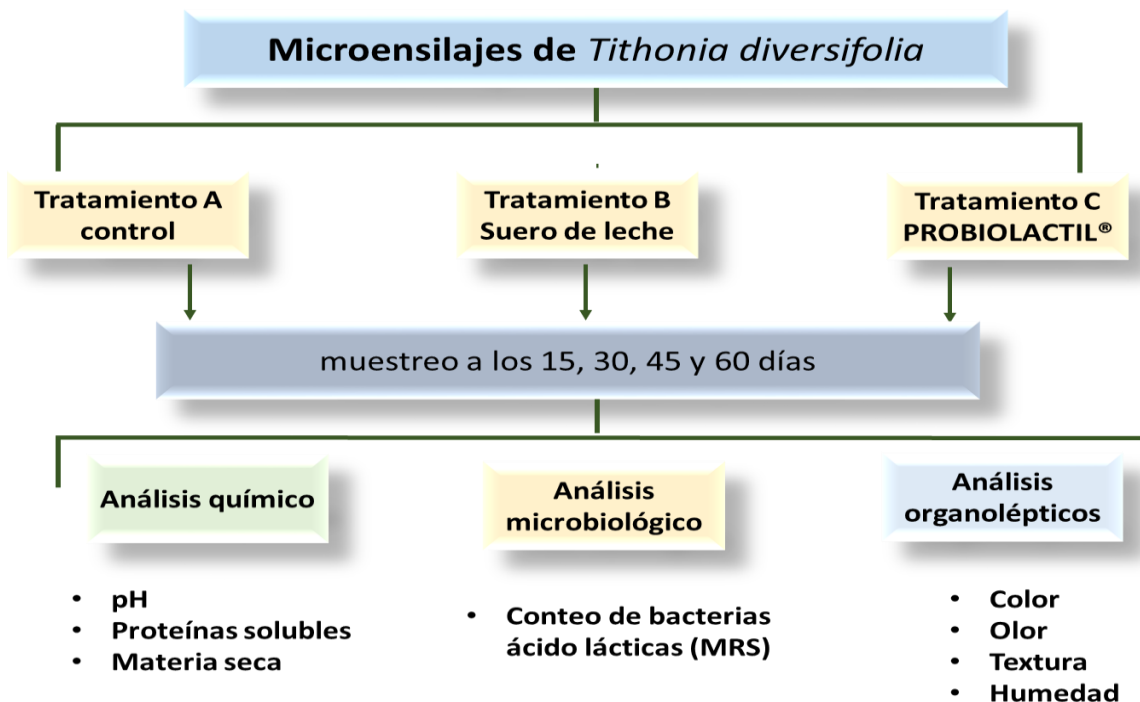
Los inóculos microbianos se mezclaron con el forraje de forma manual y se aplicaron al 10 % (10 mL de inóculo por 100 g de material vegetal), es decir 320 mL de inóculo por tratamiento. El suero de leche que se aplicó está constituido por bacterias lácticas en una concentración de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. En el caso de PROBIOLACTIL® este biopreparado contenía una población de  $10^9$ UFC.mL<sup>-1</sup> de *Lactobacillus salivarius*.

Para cada tratamiento se elaboraron 8 bolsas, para un total de 24 microensilajes. Cada bolsa constituyó una unidad experimental.

Luego de finalizado el proceso los microensilajes se trasladaron al laboratorio de microbiología de la UM. La conservación de los mismos durante el periodo de fermentación (60 días) se realizó en estantería bajo condiciones ambientales. Los tiempos de apertura de las bolsas (2 x tratamientos) se prefijaron a los 15, 30, 45 y 60 días.

### II.2.2 Evaluación a escala de laboratorio del efecto de los inóculos microbianos en los indicadores químicos, microbiológicos y organolépticos.

Los análisis fueron realizados en los laboratorios del CETENZ y microbiología de la Universidad de Matanzas. En la figura 3 se muestra toda la secuencia experimental realizada para evaluar los indicadores químicos, microbiológicos y organolépticos.



**Figura 3:** Secuencia experimental para la evaluación a escala de laboratorio del efecto de los inóculos microbianos en los indicadores químicos, microbiológicos y organolépticos.

### **Técnicas analíticas para la evaluación de los indicadores químicos en el ensilaje:**

**Determinación de pH:** para analizar el pH se tomó 50 g de ensilaje y se disolvió en 100 ml de agua destilada por 15 minutos aproximadamente. Luego se procedió a medir el valor (por triplicado) en un pHmetro digital (PHSJ-3F).

**Determinación de proteínas soluble:** para cuantificar proteínas se tomó 50 g de ensilaje y se disolvió en 250 ml de agua destilada, se batió por 5 minutos (batidora eléctrica, marca Osterizer) se coló (con gaza estéril) la mezcla para separar el líquido del sólido y se aplicó el método de Lowry *et al.* (1951) para calcularla.

**Materia seca (MS):** para determinar el porcentaje de materia seca (MS) se pesaron 50 g del material ensilado, se colocaron en beakers (500 ml de capacidad) y se llevaron a la estufa (WSU 200). Las muestras se pesaron cada 24 h hasta alcanzar un peso estable, los cálculos se realizaron según la metodología descrita por la A.O.A.C. (2010).

### **Técnicas analíticas para la evaluación de los indicadores microbiológicos en el ensilaje:**

**Conteo de bacterias lácticas:** se determinó por los conteos de viables a través del método de las diluciones seriadas y siembra en placa con el medio de cultivo Agar (MRS), según lo descrito anteriormente.

**Conteo de hongos:** se realizó al finalizar el proceso (60 días) para detectar algún tipo de contaminación o putrefacción en los ensilajes. Se determinó a través de la observación visual de las bolsas y por los conteos de viables por el método de las diluciones seriadas y siembra en placas. Las diluciones se realizaron en agua de peptona (OXOID), desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ . Se sembraron (por triplicado) las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ , en placas que contenían el medio Agar Dextrosa de Sabouraud (BioCen). Las placas se incubaron (Boxun) a  $37^{\circ}\text{C}$  por 72 h. Posteriormente, el número de unidades formadoras de colonias (UFC) se determinó bajo lupa por conteo visual de colonias.



**Técnicas analíticas para la evaluación de los indicadores organolépticos en el ensilaje:**

Los microensilajes se abrieron en el tiempo prefijado y se realizó una observación precisa para determinar los indicadores organolépticos. Se tomó una muestra del material vegetal en la mano y se tuvo en cuenta: olor, color, textura y humedad, según lo referenciado por Ojeda (2018), expuesto en la tabla 2.

**Tabla 2:** Sistema de evaluación organoléptica para ensilajes tropicales (Ojeda, 2018).

<b>Indicador Organoléptico</b>	<b>Excelente calidad</b>	<b>Buena calidad</b>	<b>Calidad regular</b>	<b>Mala calidad</b>
<b>Color</b>	Verde aceituna	Verde amarillento. Tallos con diferente tonalidad a las hojas.	Verde oscuro	Carmelita, casi negro, negro.
<b>Olor</b>	Agradable de fruta madura No deja olores desagradables al ser tocado	Ligero olor a vinagre. No deja olores desagradables al ser tocado.	Fuerte olor a vinagre Deja olores desagradables al ser tocado	Olor putrefacto, a humedad o sin olor Deja olores desagradables al ser tocado
<b>Textura</b>	El forraje conserva sus contornos Las hojas permanecen unidas a los tallos	El forraje conserva sus contornos. Las hojas permanecen unidas a los tallos.	El forraje pierde sus contornos Las hojas son transparentes. Los tallos separados de las hojas	No se aprecian diferencia entre hojas y tallos. Forma amorfa y jabonosa al tacto
<b>Humedad</b>	No humedece las manos al ser comprimido	No humedece las manos al ser comprimido.	No humedece las manos al ser comprimido.	Destila líquido al ser comprimido

### **II.3 Estudio de la factibilidad económica del ensilaje con el uso de los inóculos microbianos**

Se realizó la búsqueda con la información económica necesaria, en la Empresa de Productos Lácteos Matanzas, para realizar un análisis del costo del suero de leche. Además se analizó la factibilidad de su empleo como inóculo microbiano en la elaboración de ensilajes. Los datos para el costo de producción de PROBIOLACTIL® se obtuvo en la Universidad de Matanzas.

### **II.4 Procesamiento estadístico:**

Para comparar las medias de las variables pH, MS y proteínas fue necesario comprobar que cumplieran la condición de la distribución normal. Se aplicó la prueba de rangos múltiples, Duncan (1955), para verificar el comportamiento de las diferencias de las medias en las variables medidas y recomendar el mejor resultado. Para este análisis se utilizó el Software Statgraphic plus versión 5.0.

Los conteos de microorganismos viables se transformaron según Log N, para garantizar las condiciones de la normalidad en la curva de crecimiento. Para el análisis, se aplicó la fórmula  $(K+N) \cdot 10^x$ , donde K es la constante que representa el logaritmo de la dilución en la cual se inoculó el microorganismo; N es el número de UFC; 10 es la base de los logaritmos y X es la dilución a la cual se efectuó la inoculación.

## *Resultados y discusión*

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### III.1 Composición química y microbiológica de los inóculos microbianos.

En la tabla 3 se presentan los resultados de la composición química y microbiológica del inóculo microbiano suero de leche.

**Tabla 3:** Composición química y microbiológica del suero de leche.

Indicadores químicos		Indicador microbiológico
Proteínas	1,5 mg/mL	Bacterias ácido lácticas $10^6$ UFC.mL <sup>-1</sup>
Azúcares reductores	0,68 mg/mL	
pH	6,28	
Acidez	0,015 mol/L	

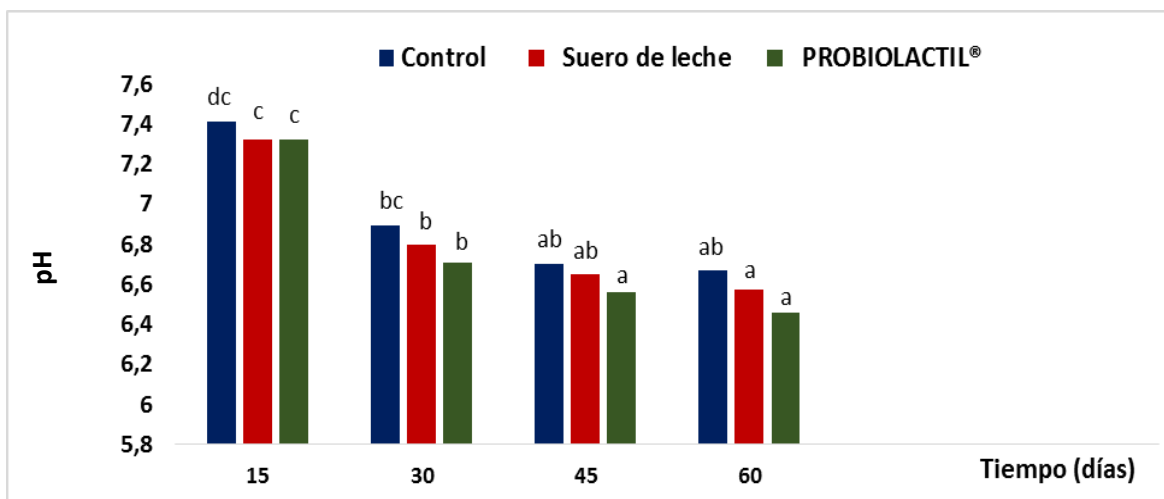
De acuerdo con los valores de acidez y pH el suero es clasificado en tres grupos: suero dulce (pH entre 5,8 y 6,6; acidez 0,1-0,2 %), suero semiácido (pH entre 5 y 5,8; acidez 0,3 %) y suero ácido (pH menor de 5; acidez 0,4 %) (Van der Schans 2002; Menchón, 2016). En el presente trabajo los resultados de los indicadores químicos evaluados permiten clasificarlo como suero dulce.

Según Alsaed *et al.* (2013) el suero dulce posee una composición rica en lactosa, proteínas y minerales, además de bacterias lácticas tales como: *Lactobacillus delbreueckii*, *L. helveticus* y *Streptomyces termophilus*. En la presente investigación no fue posible identificar los microorganismos del suero. Sin embargo, se constata la presencia de este grupo microbiano con una concentración de  $10^6$ UFC.mL<sup>-1</sup>.

El inóculo microbiano PROBIOLACTIL® tiene una composición química de 58 % de azúcares reductores totales y 17 % de nitrógeno total aportado por los componentes, miel final e hidrolizado enzimático de *Saccharomyces cerevisiae*. El pH del biopreparado es de 6,5 y la concentración de *Lactobacillus salivarius* es de  $10^{11}$ UFC.mL<sup>-1</sup>. Estos resultados coinciden con la metodología de elaboración descrita por Rondón (2009).

### III.2 Evaluación de los indicadores químicos, microbiológicos y organolépticos en los ensilajes tratados con diferentes inóculos.

En la figura 4 se muestra el comportamiento del pH en los muestreos realizados a los diferentes ensilajes. Se observa como en la medida que transcurre el proceso, disminuye el valor de este indicador en los tres tratamientos.



a, b, c, d. Medias con letras distintas difieren para  $P < 0,01^{**}$  (Duncan, 1955). E.E $\pm$  0,01.

**Figura 4:** Comportamiento del pH durante el proceso de ensilaje.

Gráficamente se aprecian diferencias ( $P < 0,01$ ) entre los ensilajes tratados con inóculos microbianos y el control (ensilaje sin inocular), tanto a los 15, como a los 60 días. El valor de pH final en los ensilajes tratados no tuvo variaciones estadísticas. Resultó ser 6,4 y 6,5 para PROBIOLACTIL® y suero, respectivamente. Este resultado podría estar relacionado con la presencia de bacterias lácticas y su concentración en los inóculos biológicos. Además esta variación puede deberse, entre otros factores, a la presencia tanto de microorganismos homo como heterofermentadores (Díaz, 2014).

Según trabajos realizados por Contreras y Muck (2006), el pH final del ensilado es más alto cuando la fermentación es dominada por bacterias heterofermentadoras comparado con las homofermentadoras. Este resultado se corresponde con la presente investigación, ya que se conoce que el inóculo PROBIOLACTIL® contiene

la especie *Lactobacillus salivarius*, clasificada como bacteria homoláctica (Rondón, 2009).

Estudios realizados por Gutierrez y Viviani Rossi (2008), demuestran que los inoculantes bacterianos reducen el pH del material ensilado. Los inóculos concentrados de bacterias productoras de ácido láctico ayudan a optimizar el proceso fermentativo de ensilaje, especialmente cuando se trabaja con forrajes tropicales, bajos en contenido de BAL naturales y carbohidratos de rápida fermentación (Garcés *et al.*, 2014).

Otro indicador químico evaluado en los ensilajes fue la concentración de proteínas. En la tabla 4 se aprecia como a medida que transcurre el proceso este valor aumenta en los tres tratamientos.

**Tabla 4:** Valores de proteínas solubles durante el proceso de ensilajes.

Tratamientos	Proteínas solubles (mg/mL)			
	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60
Control	0,64 <sup>d</sup>	0,66 <sup>d</sup>	0,70 <sup>cd</sup>	0,78 <sup>bc</sup>
Suero de leche	0,72 <sup>cd</sup>	0,77 <sup>bc</sup>	0,79 <sup>b</sup>	0,81 <sup>b</sup>
PROBIOLACTIL <sup>®</sup>	0,73 <sup>cd</sup>	0,73 <sup>cd</sup>	<b>0,93<sup>a</sup></b>	<b>0,99<sup>a</sup></b>
EE±	0,03			

Los resultados son el promedio de tres determinaciones. <sup>a, b, c, d.</sup> Medias con letras distintas difieren para  $P < 0,01^{**}$  (Duncan, 1955). E.E. Error estándar.

En todos los muestreos analizados, los valores más elevados corresponden a los tratamientos inoculados, siendo PROBIOLACTIL<sup>®</sup> el valor más alto. Este resultado pudiera estar relacionado con lo planteado por Kung *et al.* (2003), cuando refiere que las bacterias homolácticas causan una rápida disminución del pH acompañado de un aumento en la concentración de ácido láctico, lo que a su vez reduce la proteólisis.

Los resultados de la presente investigación se corresponden con lo informado por Gutiérrez *et al.*, (2014) al evaluar el producto biológico VITAFERT, en ensilajes de *Tithonia diversifolia*. Según los autores, los tratamientos inoculados con el aditivo microbiano mostraron incrementos en el contenido de Proteína Bruta y Ceniza, y reducción de la Fibra Detergente Neutra (FDN).

El contenido de materia seca (MS) es uno de los indicadores principales que miden la calidad de la fermentación durante el proceso de ensilaje (Demagnet, 2017). En la tabla 5 se muestran los valores de este indicador (MS) en los tres tratamientos.

**Tabla 5:** Porcientos de materia seca durante el proceso de ensilaje.

Tratamientos	Materia seca (%)			
	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60
Control	33,1 <sup>c</sup>	34,0 <sup>bc</sup>	34,5 <sup>b</sup>	34,7 <sup>b</sup>
Suero de leche	34,0 <sup>bc</sup>	34,0 <sup>bc</sup>	34,7 <sup>b</sup>	<b>35,0<sup>a</sup></b>
PROBIOLACTIL <sup>®</sup>	33,0 <sup>c</sup>	34,6 <sup>b</sup>	35,1 <sup>a</sup>	<b>35,5<sup>a</sup></b>
EE±	<b>0,2</b>			

Los resultados son el promedio de tres determinaciones. <sup>a, b, c</sup> Medias con letras distintas difieren para  $P < 0,01^{**}$  (Duncan 1955). E.E. Error estándar.

La MS mostró una tendencia a aumentar, en los tres tratamientos, según transcurría el tiempo de conservación. Sin embargo, se observa que existen diferencias ( $P < 0,01^{**}$ ) entre el control y los inoculados. Los porcentos más elevados corresponden a los ensilajes tratado con los aditivos microbianos. Ambos exhiben valores entre 35 y 35,5 % para suero de leche y PROBIOLACTIL<sup>®</sup>, respectivamente.

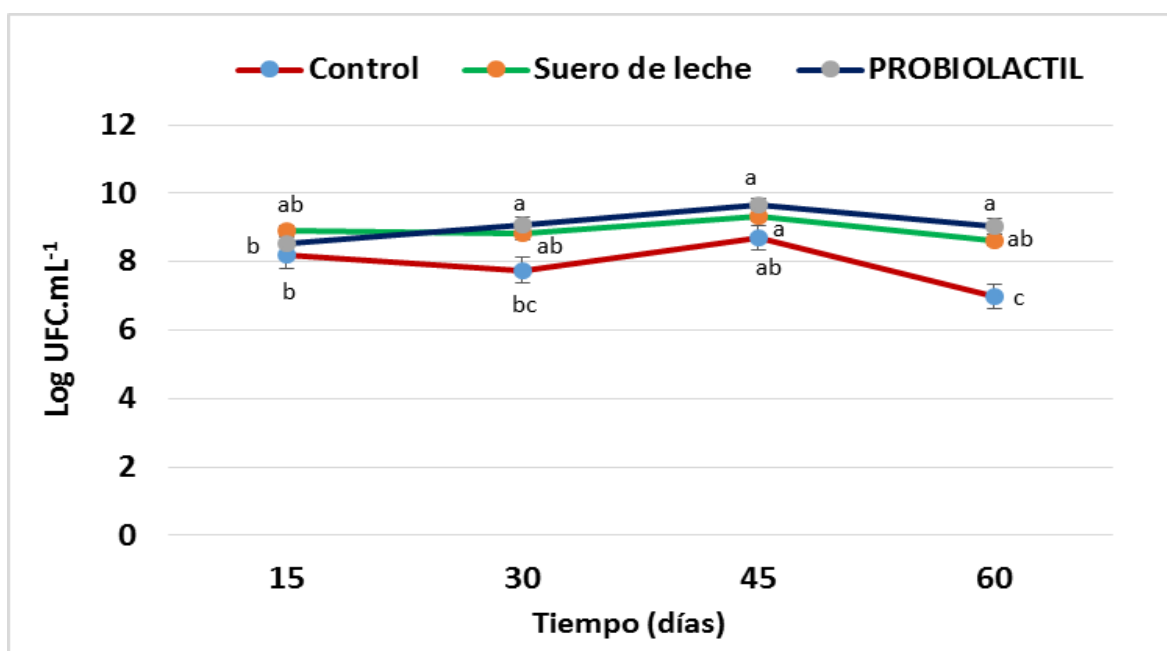
Los estudios realizados con *Tithonia diversifolia* informan que la MS de esta planta, puede variar desde 13,5 hasta 35,0%, en función de la edad y la frecuencia de corte (Mahecha *et al.*, 2007). Además informa la literatura consultada, que los mayores

por ciento de materia seca se hallan con el ensilaje presecado (Ojeda y Montejo, 2001).

Según Ojeda y Montejo (2001), el presecado se perfila como la tecnología de fabricación más ajustada para minimizar las acciones degradativas que ocurren en los compuestos nitrogenados, durante el proceso de conservación. En el presente estudio se realizó el presecado de la *Tithonia diversifolia* durante 24 h.

Este método (presecado) pudo haber influido en que los porcentos de MS, a pesar de tener diferencias entre ellos (control e inoculados), se corresponden con los valores óptimos (28 a 35 %) establecidos por Demanet (2017) para los ensilajes.

Dentro de los indicadores microbiológicos evaluados en los ensilajes, se determinó el conteo de bacterias lácticas en diferentes momentos del proceso. La figura 5 muestra cómo se comportan estas bacterias durante la fermentación.



a, b, c. Medias con letras distintas difieren para  $P < 0,01^{**}$  (Duncan, 1955).. Día 15 ( $EE \pm 0,017$ ); día 30 ( $EE \pm 0,039$ ); día 45 ( $EE \pm 0,040$ ) y día 60 ( $EE \pm 0,069$ ). Para ambos casos  $P < 0,0001$ .

**Figura 5:** Crecimiento de las bacterias lácticas durante el proceso de ensilajes.

En la concentración de BAL se observa un crecimiento exponencial de la población microbiana, solo en el ensilaje tratado con PROBIOLACTIL®. Los ensilajes control e



inóculo con suero de leche muestran comportamientos similares, durante el proceso de elaboración. Las bacterias lácticas, en estos tratamientos, decrecen en la primera etapa del proceso (15 a 30 días). Luego de los 30 días incrementan el número de colonias y a partir de los 45 días disminuyen la concentración bacteriana.

A pesar de este comportamiento, en todos los muestreos realizados, los ensilajes inoculados muestran mayor número de bacterias lácticas que el ensilado control. Este resultado se corresponde con lo expuesto por Demanet (2017) quien refiere que los aditivos biológicos que conservan diferentes forrajes aumentan de dos a tres veces la concentración de ácido láctico en los ensilajes, respecto a los forrajes ensilados en forma natural. Situación que permite acceder aun forraje conservado, estabilizado en menor tiempo y de calidad superior al fermentado naturalmente.

Al finalizar el proceso de fermentación (60 días) el mayor número de bacterias lácticas estuvo en el tratamiento con PROBIOLACTIL®. Esto pudiera relacionarse con la concentración ( $10^9$  UFC) de *Lactobacillus salivarius* que tiene este aditivo. Conservar el follaje de *Tithonia diversifolia* con este biopreparado probiótico le confiere a la planta un valor agregado que repercute favorablemente en el animal.

PROBIOLACTIL® se ha empleado como aditivo probiótico en diferentes especies y categoría animal. Sus beneficios se reflejan en indicadores productivos, morfométricos, inmunológicos y de salud (Ojito, 2012; Socorro, 2016; Rondón *et al.*, 2018). Además mejora la palatabilidad y digestibilidad de la pulpa de henequén suministrada, a terneros en crecimiento, como alimento alternativo (del Valle, 2017).

Dentro de los indicadores microbiológicos evaluados se tuvo en cuenta la presencia de hongos en el ensilaje elaborado. Este análisis se realizó a los 60 días (fin del proceso) a través de la observación visual de las bolsas y el conteo en placas. Se observó que los microensilajes con inóculos biológicos no presentan evidencias de contaminación. Sin embargo, al observar el ensilaje natural se muestran signos de deterioro (mal olor y aspecto blanquecino en la superficie del material vegetal).

Los resultados del conteo en placa corroboran esta observación. Aunque es preciso aclarar que en los tratamientos inoculados también hubo presencia de colonias blancas con aspecto filamentosas. Esto podría deberse a que la siembra se realiza en medio específico (Agar Sabouraud) para el crecimiento de hongos, levaduras y otros microorganismos. También se debe tener en cuenta que el material vegetal ensilado posee una flora microbiana rica en diferentes géneros y especies.

Este resultado fue corroborado además, con la evaluación organoléptica realizada en este estudio y cuyos resultados se presentan en la tabla 6. Se resume que los ensilados tratados con ambos inóculos (PROBIOLACTIL® y suero de leche) se evalúan de excelente calidad, para los parámetros color, olor y humedad. En cuanto a la textura no hubo diferencias entre los tres tratamientos. Sin embargo, el ensilado no tratado (control) resultó ser de regular calidad, en correspondencia con los parámetros establecidos por Demanet (2017) y Ojeda (2018).

Según Ramírez (2011) la presencia de BAL, además de contribuir en la biopreservación de los alimentos, mejora las características sensoriales como el sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva, por lo que se usan en la elaboración de productos fermentados. Refiere el autor que en el área pecuaria tienen múltiples aplicaciones para mejorar la alimentación en la producción animal.

Los resultados de la presente investigación estiman que el ensilado de *Tithonia diversifolia*, tratado específicamente con PROBIOLACTIL®, contribuya a la inhibición de muchos microorganismos patógenos al ser suministrado al animal. Según estudios realizados por Rondón *et al.* (2018) este biopreparado probiótico le confiere a los individuos que lo consumen ácidos como láctico y acético, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y productos secundarios generados por la fermentación. Todo lo cual se traduce en salud y productividad animal.

**Tabla 6:** Resultados de la evaluación organoléptica realizada a los ensilajes.

Indicador	Tratamientos	15 (días)	30 (días)	45 (días)	60 (días)
<b>Color</b>	<b>Control</b>	Verde característico	Verde oscuro un poco más que en el muestreo de los 15 días	Verde oscuro	Verde oscuro
	<b>Suero de leche</b>	Verde característico	Verde oscuro un poco más que en el muestreo de los 15 días	Verde oscuro	Verde oliva
	<b>PROBIOLACTIL</b>	Verde característico	Verde oscuro un poco más que en el muestreo de los 15 días	Verde oscuro	Café claro
<b>Olor</b>	<b>Control</b>	Hierba	ácido a fermentación	Ácido fuerte	Putrefacto con olor desagradable en manos
	<b>Suero de leche</b>	Una mezcla entre hierba mojada y leche	Ligero olor ácido	Olor a fruta	fruta madura
	<b>PROBIOLACTIL</b>	Mezcla de olores hiervas y azúcares	Olor fuerte a azúcares, un poco más fuerte que en el muestreo de los 15 días	Olor parecido a fruta madura	fruta madura
<b>Textura</b>	<b>Control</b>	contornos definidos, hojas no transparente	contornos definidos hojas no transparente	contornos definidos hojas no transparente	contornos definidos hojas no transparente
	<b>Suero de leche</b>	contornos definidos	contornos definidos hojas no transparente	contornos definidos hojas no transparente	contornos definidos hojas no transparente
	<b>PROBIOLACTIL</b>	hojas no transparente	contornos definidos hojas no transparente	contornos definidos hojas no transparente	contornos definidos hojas no transparente
<b>Humedad</b>	<b>Control</b>	Alta humedad	humedece las manos	poca humedad	Humedece las manos
	<b>Suero de leche</b>	Alta humedad	Humedece poco las manos	humedad media	No humedad
	<b>PROBIOLACTIL</b>	Alta humedad	Humedece poco las manos	humedad media	No humedad

### **III. 3 Análisis de los costos de la aplicación de los inóculos suero de leche y PROBIOLACTIL® durante el experimento.**

Al finalizar la etapa experimental se realizó un análisis de los costos de producción de los aditivos microbianos empleados en la elaboración de ensilajes. En el caso del suero de leche es necesario precisar que este no se produce, constituye el producto final de la elaboración de quesos, por lo que resulta un subproducto de la industria láctea. Esta empresa aportó los datos necesarios para el análisis económico.

A través de los años el suero de leche que produce lácteos Matanzas, se ha conveniado con la Empresa Porcina de dicho territorio, para emplearlo como alimento animal. Este tiene un costo de venta de 0,07 ¢/L, lo que equivale a 70 CUP/t. Como una estrategia productiva de esta Empresa, durante el primer semestre del presente año, este residual ha sido empleado para producir dos nuevos productos alimenticios; Miragurt y Suero Saborizado con costos de producción de 0,90 y 0,14 ¢/L. Este análisis permite estimar la factibilidad de empleo del suero lácteo para ensilar alimento animal, sin embargo tiene como inconveniente su aprovechamiento y destino para la alimentación humana.

En la tabla 7 se muestra de manera detallada todos los insumos necesarios para la elaboración de PROBIOLACTIL®. Es necesario aclarar que los costos de este bioproducto fueron realizados a escala de laboratorio.

Como se puede apreciar en la tabla, los medios de cultivo empleados inciden en los bajos costos de los biopreparados a escala de laboratorio. Se debe recordar que el medio MCLs se formula con miel final de caña de azúcar e hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, como fuentes de carbono y nitrógeno. Con la inclusión de estos componentes se sustituye la glucosa, extracto de levadura, peptona y extracto de carne, que son productos más costosos y de menor disponibilidad en el mercado.

**Tabla 7.** Costo de producción del biopreparado PROBIOLACTIL®. a escala de laboratorio (5L).

Descripción		UM	Precio MN	Precio USD	Cantidad	UM	Importe MN	Importe USD
Componentes de los biopreparados								
Miel final	1000	Kg	60,00	-	0,15	kg	0,009	-
HELSc	1	L	0,03	0,05	1,050	L	0,031	0,0525
Fosfato de potasio	500	G	-	2,79	10	g	-	0,061
Citrato de amonio	500	G	-	2,79	25	g	-	0,153
Acetato de sodio	1	Kg	-	1,27	0,025	kg	-	0,034
Sulfato de Manganeso	1	Kg	-	0,66	0,0010	kg	-	0,0007
Sulfato de Magnesio	1	Kg	-	0,62	0,00020	kg	-	0,00013
TOTAL							0,04	0,30
Elementos del proceso								
Energía	-	-	-	-	-	-	0,83	
Salario	-	-	-	-	-	-	9,52	
Depreciación	-	-	-	-	-	-	-	0,33
Seguridad social	-	-	-	-	-	-	1,02	
Total (5 L)	-	-	-	-	-	-	11,41	0,63
Total (1 L)							2,28	0,13

Según los cálculos realizados se requieren para elaborar un litro de PROBIOLACTIL® 2,28 MN y 0,13 USD. Este análisis infiere la factibilidad de su empleo tanto como aditivo probiótico en la alimentación animal o como inoculante microbiano para ensilar o conservar diferentes forrajes.

# *Conclusiones*

#### **IV. CONCLUSIONES**

- ✓ Los inóculos microbianos, suero de leche y PROBIOLACTIL<sup>®</sup>, presentan una composición química y microbiológica adecuada para activar la fermentación durante el proceso de ensilaje.
- ✓ Los ensilajes inoculados con aditivos microbianos mostraron mejores resultados en los indicadores químicos, microbiológicos y organolépticos que el ensilaje natural.
- ✓ El ensilaje inoculado con PROBIOLACTIL<sup>®</sup> mostró las mayores concentración de bacterias lácticas, a los 60 días, al finalizar el proceso.
- ✓ Es factible el empleo de PROBIOLACTIL<sup>®</sup> y suero de leche en la elaboración de ensilajes debido a los bajos costos de producción.

## *Recomendaciones*



## V. RECOMENDACIONES

- ✓ Suplementar los aditivos microbianos (suero de leche y PROBIOLACTIL®) con una fuente de azúcares solubles para mejorar la base energética de la fermentación.
- ✓ Emplear los aditivos, suero de leche y PROBIOLACTIL®, con un mayor porcentaje de inoculación en el ensilaje.
- ✓ Elaborar una mayor cantidad de ensilajes y evaluar otros indicadores como N-amoniaco, AGV, contenido de fibra.
- ✓ Suministrar los ensilajes, inoculados con bacterias lácticas, en la alimentación y evaluar su efecto en animales.
- ✓ Determinar la presencia de clostridium al finalizar el proceso como indicativo de putrefacción o deterioro del ensilado.
- ✓ Continuar los estudios en esta temática.

## *Referencias bibliográficas*

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. 2010. Official methods of analysis.15th ed. AOAC, Washington, D. C p: 935-955.
- ACN. Agencia Cubana de Noticias. 2019. Ganadería cubana. Disponible. <http://www.acn.cu/cuba/38876> [Consultado: 30 de abril 2019].
- Agboola D.A.; Idowu W.F.; Kadiri, M. 2006. Seed germination and seedling growth of the Mexican Sunflower *Tithonia diversifolia* (Compositae) in Nigeria, Africa. *Revista de biología tropical*. 54 (2): 395-402.
- Almeida, K.E.; Tamime, A.Y.; Oliveira, M.N. (2009). Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. *Food Science and Technology* 42: 672–678.
- Alsaed, A.; Ahmad, R.; Aldoomy, H.; El-Qader, S. A.; Saleh, D.; Sakejha, H. y Mustafa, L. 2013. Characterization, Concentration and Utilization of Sweet and Acid Whey. *Pakistan Journal of Nutrition*, 12(2):172-177.
- Arango, J.; Gutiérrez, J. F.; Mazabel, J.; Pardo, P.; Enciso, K. y Burkart, S. 2016. Estrategias tecnológicas para mejorar la productividad y competitividad de la actividad ganadera. Herramientas para enfrentar el cambio climático. Cali, Colombia: CIAT.
- Bautista, G.; Cobos, M.; Ventura, L.; Ayora, T.; Abud, M.; Olivia, M.; Dendooven, L. y Gutier, F. 2009. Effect of sugarcane molasses and whey on silage quality of maize. *Asian J. CropSci.* 1 (1): 34-39.
- Bernal, L.C.; Cuchillo, H.M.; Jiménez, H.R. y Martens, S.D. 2015. Nutritive value evaluation of sorghum-soybean ensiled with biological additives in Colombia. XVII International Silage Conference. Piracicaba, Brazil. p. 84-85.
- Borges, Y. 2013. Efecto de una mezcla probiótica en indicadores productivos y de salud de gallinas ponedoras a escala de producción. Tesis presentada en opción al Título Académico de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas. Matanzas, Cuba.

- Cárdenas, J.; Solorio, F. y Sandoval, C. (2004). Ensilaje de forrajes. Alternativa para la alimentación de rumiantes en el trópico. Edit Universidad Autónoma de Yucatán. México. 1(1): 13.
- Conde, A. 2009. Calidad nutricional de los subproductos agroindustriales del mango (*Mangifera inidca*), optimización de un proceso para su conservación por ensilaje y su potencial en la alimentación de rumiantes. Maestría en Diseño y Gestión de Procesos. Universidad de la Sabana, Chia, Colombia.
- Crestani, S.; Ribeiro-Filho, H. M. N.; Miguel, M. F.; Almeida, E. X. y Santos, F. A. P. 2013. Steers performance in dwarf elephant grass pastures alone or mixed with *Arachis pintoi*. *Trop. Anim. Health Prod.* 45 (6):1369-1374. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s11250-013-0371>. Consultado marzo, 2019.
- Cuartas, C. A.; Naranjo, J. F.; Tarazona, A. M.; Murgueitio, E.; Chará, J. D.; Ku, J. 2014. Contribution of intensive silvopastoral systems to animal performance and to adaptation and mitigation of climate change. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 27 (2):76-94.
- Cubero J.; Rojas A. y Ching, R. (2010). Uso del inóculo microbial elaborado en finca en ensilaje de maíz (*zea mays*), valor nutricional y fermentativo. *Agron. Costarricense.* 34(2):3.
- De Mann, J.C.; Rogosa, M. y Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Bacteriol.* 23:130-135.
- Del Valle, P. 2017. Obtención de un biopreparado simbiótico, a partir de la mezcla de pulpa de *Agave fourcroydes* Lem. y PROBIOLACTIL<sup>®</sup>, para su aplicación en terneros. Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba, 50 p.
- Demanet, R. 2017. Aditivos biológicos para ensilajes. *Boletín Plan Lechero Watt's.* N° 6.
- Díaz, B.; Elías, A. y Valiño, E. 2014. Impacto de la Biotecnología convencional en la Seguridad alimentaria a través de la Producción animal en el Ecuador. Estudio de caso: Producto BIORÉS. En imprenta. *Revista Internacional de Ciencia y Sociedad.*

- Díaz, L. 2014. Evaluación de residuos agrícolas post cosecha en ensilajes. Inoculados con preparados microbianos nativos para alimentación de vacas lecheras en Ecuador. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Escuela superior politécnica de Chimborazo. Ecuador.
- Duncan, B. 1955. Multiple ranges and multiple F. Test Biometrics 11:1.
- Elías, A.; Lezcano, O.; Lezcano, P.; Cordero, J. y Quintana, L. 1990. Reseña descriptiva sobre el desarrollo de una tecnología de enriquecimiento proteico de la caña de azúcar mediante fermentación en Estado sólido (Saccharina). Rev. Cubana de Ciencias. Agrícolas. 24 (1): 3-11.
- Elizalde, H. y Méndez, A. 2005. Evaluación de ensilajes de cereales de grano pequeño, sobre la producción de leche de vacas Overo colorado. Agro Sur. Chile. 32 (2): 54-59.
- Elizalde, H.; Hargreaves, A. y Goic, L. 1995. Evaluación de ensilajes de cereales de grano pequeño sobre la ganancia de peso de toretes. Memorias XIV Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA) - 19° Congreso de la Asociación Argentina de Producción Animal (AAPA), Mar del Plata, Argentina. Revista Argentina de Producción Animal (15): 431-432.
- FAO. 2017. El trabajo de la FAO sobre el cambio climático. Conferencia de las Naciones Unidas sobre el cambio climático. Roma: FAO. (En línea). Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i8037s.pdf>. Consultado abril, 2019.
- Fasuyi, A.O.; Dairo, F.A.S. y Ibitayo, F.J. 2010. Ensiling wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) leaves with sugar cane molasses. Livestock Research for Rural Development. 22 (3).
- Figueroa, V. y Ly, J. 1990. Alimentación porcina no convencional. Diversificación. EPLACEA. PNUD. p. 215.
- Filya, I.; Muck, R. E. y Contreras–Govea F. 2007. Inoculant effects on alfalfa silage: Fermentation products and nutritive value. J. Dairy Sci. 90: 5108–5114.
- Galindo, J. L.; Rodríguez I.; González, N.; García, R. y Herrera, M. 2018. Sistema silvopastoril con *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray: efecto en la

población microbiana ruminal de vacas. *Revista Pastos y Forrajes*. 41 (4): 273-280.

- Galindo, J. L.; González, N.; Scull, I.; Marrero, Y.; Moreira, O. y Ruiz, T. R. 2017. *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray and its effect on the rumen population and microbial ecology. In: L. Savón, O. Gutiérrez and G. Febles, eds. *Mulberry, moringa and tithonia in animal feed, and other uses. Results in Latin American and the Caribbean*: FAO, EDICA, ICA.
- Gallego, L. A. 2016. Evaluación agronómica y análisis productivo del botón de oro (*Tithonia diversifolia* Hemsl. A Gray) como suplemento alimenticio de vacas lecheras en trópico alto. Tesis en opción al título de M.Sc. *Sistemas de producción animal*. Antioquía, Colombia: Universidad de Antioquía.
- Gallego, L. A.; Mahecha, L. Y Angulo, J. 2017. Calidad nutricional de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A Gray bajo tres sistemas de siembra en el trópico alto. *Agron. Mesoam.* 28 (1):213-222. Disponible en: <http://10.15517/am.v28i1.21671>. Consultado abril 2019.
- Garcés, A.M.; Berrio, L.; Ruiz, S.; Serna, J. y Builes, G. 2014. Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado. *Revista Lasallista de Investigación*. 1 (1): 66-71.
- García, D.; Medina, M.; Cova, L.; Torres, A.; Soca, M.; Pizzani, P.; Baldizán A. y Domínguez, C. 2008. Preferencia de vacunos por el follaje de doce especies con potencial para sistemas agrosilvopastoriles en el Estado Trujillo, Venezuela. *Pastos y Forrajes*. 31:255-270.
- García, R.; Rodríguez, I. y González, M. R. 2016. Opción de pastoreo con *Tithonia diversifolia* en vacas lecheras. *Memorias de la IV Convención Internacional Agrodesarrollo 2016*. Matanzas, Cuba: EE PF Indio Hatuey. pp. 1467-1469.
- Gutierrez, L. y Viviani-Rossi, E. 2008. Efecto de la aplicación de un inoculante bacteriano en la calidad nutricional y fermentativa: ensilaje de avena. Chile. INTA.

- Gutiérrez, D.; Morales, A.; Elías, A.; García, R. y Sarduy, L. (2014). Chemical composition and in situ ruminal degradability of dry matter in mixed silages of *Tithonia diversifolia*: *Pennisetum purpureum* cv. Cuba CT-169, inoculated with VITAFERT. *Cuban J. Agric. Sci.* 48:379.
- Herrera, R.; Pérez, A.; Arece, J.; Hernández, A. y Iglesias, J.M. 2013. Utilización de grano de sorgo y forraje de leñosas en la ceba porcina. *Pastos y Forrajes*, 36 (1): 56-63.
- Hess, H.D.; Gómez, J. y Lascano, C.E. 2006. Segundo taller taninos en la nutrición de rumiantes en Colombia. Producción de leche de vacas en pastoreo suplementadas con mezclas de leguminosas con y sin taninos. 30 de noviembre a 1 de diciembre de 2006.
- Inayat, A. y Gordon, O., 2009.- Influencia de las fases lunares (Menguante y Luna llena) sobre la propagación vegetativa del botón de oro *Tithonia diversifolia* para la formación de un banco de proteína: Tesis, Sede el Prado, Quito, Facultad de Ingeniería de Ciencias Agropecuarias, Ecuador.
- Ipou, J.; Toure, A.; Adou, L.M.; Kouame, K.F. y Gue, A. 2011. A new invasive species of the agrosystems in the south of Côte d'Ivoire: *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae). *African Journal of Food Science and Technology*. 1 (6): 146-150.
- Kayouli, C. y Lee, S. 2001. Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. Memorias de la conferencia electrónica de la FAO sobre el ensilaje en los trópicos. Estudio 6-Ensilaje de subproductos agrícolas como opción para los pequeños campesinos. Serie Estudios FAO. Producción y protección vegetal 161. FAO, Roma. 171 p.
- Kung, L. M.; Stokes, R. y Lin, C. 2003. Silage additives. In *Silage Science and Technology*. Madison, USA. Pages 31305–3060.
- Lee, M. A.; Davis, A. P.; Chagunda, M. G. y Manning, P. 2017. Forage quality declines with rising temperatures, with implications for livestock production and methane emissions. *Biogeosciences*.14: 1403-1417. Disponible en: <https://doi.org/10.5194/bg>. Consultado en marzo 2019.

- Lezcano, P. y Castañeda, S. 2000. Una nota sobre la sustitución parcial del pienso por residuos de las destilerías de alcohol para cerdos en preceba. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 34:37.
- Lezcano, P., Berto, D.A., Bicudo, S.J., Curcelli, F., González, Priscila y Valdivié, M. 2014. Yuca ensilada como fuente de energía para cerdos en crecimiento. Rev. Avances en Investigación Agropecuaria. 18:41.
- Lezcano, P.; Vázquez, A. y Bolaños, A. 2015. Ensilado de alimentos alternativos, de origen cubano, una alternativa técnica, económica y ambiental para la producción de carne de cerdo. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 49 (1): 65-69.
- López, O.; Montejo, I.L. y Lamela, L. 2012.- Evaluación del potencial nutricional de cuatro plantas forrajeras para la alimentación de reproductoras cunículas (Nota técnica). Pastos y forrajes, 35 (3): 293-300.
- López, A.L.; Barriga, D.; Jara, C. 2015. Manual de determinaciones analíticas en leche. JUNTA DE ANDALUCÍA. Instituto de Investigaciones y formación Agraria y Pesquería. Consejería de Agricultura y Pesca. Córdoba. Disponible en: [www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa](http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa).
- Lowry O., Rosenbrough N., Farr A. Randall. 1951. "Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- Martínez, G.; Peri, P. L.; Huertas, A.; Schindler, S.; Díaz, R.; Lencinas. y María V. Linking potential biodiversity and three ecosystem services in silvopastoral managed forest landscapes of Tierra del Fuego, Argentina. Int. J. Biodivers. Sci. Ecosyst. Serv. Manage. 13 (2):1-11, 2017. DOI: <https://10.1080/21513732.2016.1260056>. Consultado junio, 2019.
- Mahecha, L.; Escobar, J.; Suárez, J. y Restrepo, L. 2007. Tithonia diversifolia (hemsl.) Gray (botón de oro) como suplemento forrajero de vacas F1 (Holstein por Cebú). Livestock Res. Rural Dev. 19(2):16. <http://www.lrrd.org/lrrd19/2/mahe19016.htm>. Consultado mayo, 2019.
- Mahecha, L., y Rosales, M. 2005. Valor nutricional del follaje de botón de oro Tithonia diversifolia (Hemsl.) Gray, en la producción animal en el trópico.



Livestock Res. Rural Dev. 17(9):100. <http://www.lrrd.org/lrrd19/2/mahe19016.htm> (Consultado 9 de mayo 2019).

- Medina, M.; García, D.; González, M.; Cova, L.J. y Moratinos, P. 2009. Variables morfo-estructurales y de calidad de la biomasa de *Tithonia diversifolia* en la etapa inicial de crecimiento. *Zootecnia Tropical*. 27 (2): 121-134.
- Mejías, E.; Mahecha, L. y Angulo, J. 2017. Consumo de materia seca en un sistema silvopastoril de *Tithonia diversifolia* en trópico alto. *Agron. Mesoam.* 28 (2):389-403. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15517/ma.v28i2.23561>. Consultado 20 marzo 2019.
- Menchón, C. 2016. Caracterización físico-química y microbiológica de suero de queso en polvo desmineralizado y evaluación del impacto de microorganismos esporulados. Tesis presentada en opción al título de Licenciatura en Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias veterinarias.
- Mesa, J. A. 2018. Empleo del aditivo zootécnico SULTILPROBIO® en la prevención y control de la mastitis bovina. Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Matanzas. Matanzas, Cuba.
- Mier, M. 2009. Caracterización del valor nutritivo y estabilidad aeróbica de ensilados en forma de microsilos para maíz forrajero. Trabajo de fin de Master. Universidad de Córdoba, Departamento de Producción animal.
- Milián, G; Rondón, A.J.; Pérez, M.; Arteaga, F.; Boucourt, R.; Portilla Y.; Rodríguez; M., Pérez, Y.; Laurencio, M.E. 2017. Effect of zootechnical additives on productive and health indicators in broilers. *Pastos y Forrajes* 40 (4): 315-322.
- Ministerio de la Agricultura. 2017. Balance Anual del Grupo Ganadero. La Habana. Cuba. p.10.
- Ministerio de la Agricultura. 2018. Balance Anual del Grupo Ganadero. La Habana. Cuba. p.14.

- Mora, L.M.; Hidalgo, K. y Rodríguez, Y. 2013. Utilización de vinazas de destilerías concentradas en la alimentación de cerdos en Cuba. Rev. Comp. Prod. Porcina. 20:3.
- Mora, D. 2010. Consumo de Morera (*Morus alba*) fresca mezclada con ensilaje de Maíz por el ganado Jersey en crecimiento. Agronomía mesoamericana. 21(2):337-341.
- Morales, M.A. 2013. Efecto del aditivo Vitafert en la composición química, degradabilidad ruminal *in situ* y potencial fermentativo *in vitro*, en ensilados de *Tithonia diversifolia* y *Penisetum purpureum*. Tesis presentada en opción al grado científico de Master en ciencias en producción animal para la zona tropical. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba. p. 26-28.
- Muñi, A.; Paez, G.; Faría, J.; Ferrer, J.; Ramones, E. (2005). Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. Revista Científica. 15: 361–367.
- Murgueito, E., Ospina, S., 2002.- Tres especies vegetales promisoras: Nacedero (*Trichanthera gigantea*), Botón de oro (*Tithonia diversifolia*) y Bore (*Alocasia macrorrhiza*). COLCIENCIAS-CAB-CIPAV. Cali, Colombia.
- Murgueito, E.; Rosales, M. y Gómez, M.E. 2003. Agroforestería para la producción animal sostenible.3. Ed. CIPAV. Cali, Colombia.
- Murgueito, R., E.; Calle, Z.; Uribe, F.; Calle, A. y Solorio, B. 2011. Native trees and shrubs for the productive rehabilitation of tropical cattle ranching lands. Forest Ecol. Manag. 261:1654-1663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2010.09.027>. Consultado 9 de abril 2019.
- Nieves, D.; Terán, O.; Cruz, L.; Mena, M.; Gutiérrez, F. y Ly, J. 2011. Digestibilidad de nutrientes en follaje de árnica (*Tithonia diversifolia*) en conejos de engorde. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 14:309–314. Disponible en: [http:// www.redalyc.org/articulo.oa?id=93915703030](http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93915703030). Consultado mayo, 2019.

- Nhan, N.T.; Hon, N.V. y Preston, T. R. 2011. Studies on ensiling of *Tithonia diversifolia* and Taro (*Colocasia esculenta*) and feeding the silage to fattening pigs as partial replacement of a basal diet of rice bran, broken rice, soybean meal and fish meal. *Livestock Research for Rural Development*, 23 (5).
- Ojito, Y. 2012. Evaluación de la actividad probiótica de *Lactobacillus salivarius* en indicadores productivos y de salud en cerdos lactantes. Tesis presentada en opción al Título Académico de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas. Matanzas, Cuba.
- Ojeda, F. y Montejo, I. 2001. Conservación de la Morera (*Morus alba*) como ensilaje. Efecto sobre los compuestos nitrogenados. *Rev. Pastos y Forrajes*. 24 (2): 147-154.
- Ojeda, F. 2018. Sistema de evaluación para ensilajes tropicales. Matanzas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Material digital, 2 h.
- Olabode, O.S.; Ogunyemi, S.; Akanbi, W.B.; Adesina, G.O. y Babajide, P.A. 2007. Evaluation of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A Gray for soil improvement. *World Journal of Agricultural Sciences*. 3 (4): 503-507.
- Olabanji, R.O.; Farinu, G.O.; Akinlade, J.A. y Ojebiyi, O.O. 2007. Growth performance, organ characteristics and carcass quality of weaner rabbits fed different levels of wild sunflower (*Tithonia diversifolia* Hemsl A. Gray) leaf-blood meal mixture. *International Journal of Agricultural Research*. 2 (12): 1014-1021.
- Olayeni, T.B.; Farinu, G.O.; Togun, V.A.; Adedeji, O.S. y Aderinola, A.O. 2006. Performance and Haematological characteristics of weaner pigs fed wild Sunflower (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray) leaf meal. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 5 (6): 499-502.
- Olafadehan, O. A. y Okunade, S. A. 2018. Fodder value of three browse forage species for growing goats. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 17:43-50. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jssas>. Consultado marzo 22, 2019.

- ONEI. 2018. Oficina Nacional de Estadísticas e Información de Cuba. Sector Agropecuario. Indicadores Seleccionados Enero - septiembre 2018. Disponible <http://www.onei.cu> [Consultado: 9 de abril de 2019].
- Palma, J.M. 2006. Los sistemas silvopastoriles en el trópico seco mexicano. Archivos latinoamericanos de producción animal 14 (3): 95-104.
- Parra Huertas, R. (2009). Lactosuero: Importancia en la Industria de Alimentos. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 62, 4967-4982.
- Pérez, A.; Montejo, I.; Iglesias, J.M. 2009. *Tithonia diversifolia* (Helms.) A. Gray. Rev. Pastos y Forrajes. 32 (1): 10-15.
- Pérez, M.; Milián, G.; Rondón, A.J.; Bocourt-Salabarría, R.; Torres, V. 2015. Efecto de endosporas de *Bacillus subtilis* E-44 con actividad probiótica sobre indicadores fermentativos en órganos digestivos e inmunológicos de pollos de engorde. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 35 (2):89-94.
- Pérez, M. Q.; Milián, G.; Piad. R. B.; González, R.C.; Bocourt, R. S. y Savón, V. 2006. Hidrolizado de fondaje de cubetas de destilerías de alcohol con un crudo enzimático de la cepa de *Bacillus licheniformis* E-44 y su procedimiento de obtención. Patente concebida. No.23179. (Int.cl.8) A 23 J 1/00,3/30, C 12N 9/56.
- Peters, M.; Franco, L.H.; Schmidt, A. y HINCAPIÉ, B. 2002. Especies forrajeras multipropósito: opciones para productores de Centroamérica. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia.
- Pinzón, J. C.; Lemus, J. F. 2017. Valoración nutricional y parámetros de fermentación del ensilaje de Yacón y Cáscara de naranja. Tesis presentada en opción al título de Zootecnista. Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia.
- Ramírez, A. 2011. Utilización de *Sambucus nigra* y *Smallanthus sonchifolius* sobre los parámetros productivos y la digestibilidad fecal aparente de la materia seca en el levante de conejos. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 24 (3). Pp. 498.

- Ramírez, R.U.; Sanginés, G.J.R.; Escobedo, M.J.G.; Cen, F.; RIVERA, L.J.A. y Lara, L.P.E. 2010. Effect of diet inclusion of *Tithonia diversifolia* on feed intake, digestibility and nitrogen balance in tropical sheep. *Agroforestry Systems*. 80 (2): 295-302.
- Recinos, L. A. y Saz, O. A. 2006. Caracterización del suero lácteo y diagnóstico de alternativas de sus usos potenciales en el Salvador. Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Químico. Universidad de El Salvador. Facultad de Química. El salvador, 120 p.
- Riboulet-Bisson, E.; Sturme, M.H.J.; Jeffery, I.B.; O'Donnell, M.M.; Neville, B.A.; Forde, B.M.; Claesson, M.J.; Harris, H.; Gardiner, G.E.; Casey, P.G.; Lawlor, P.G.; O'Toole, P.W. y Ross, R.P. 2012. Effect of *Lactobacillus salivarius* bacteriocin Abp118 on the mouse and pig intestinal microbiota. *PLoS One*. 7(2): 31-113.
- Rodríguez, M.; Milián, G.; Rondón, A. J.; Boucourt, R.; Beruvidez, A. & Crespo, E. 2015. Evaluación de una mezcla probiótica en la alimentación de aves de inicio de líneas puras pesadas B4 en una unidad de producción. *Cuban Journal of Agricultural Science* 49 (4): 497 – 502.
- Rodríguez, R.G. 2018. Producción de alimentos en Cuba. Entrevista al Ministro de Agricultura. Disponible: <http://www.acn.cu/cuba>. [Consultado: 3 abril de 2019].
- Rodríguez, Z. 2004. Uso del boniato (*Ipomoea batata* Lam) en la tecnología de fermentación en estado sólido de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal, La Habana. Cuba
- Roig, J.T. y Mesa, A., 1974.- Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. *La Habana*.3 (4): 237-246.
- Rondón, A.J.; Milián, G; Arteaga, F.; Samaniego, L. M.; Boucourt, R.; Laurencio, M. E.; Rodríguez, M. y Pérez, M. 2018. Probiotic effect of *Lactobacillus salivarius* on microbiological and immune indicators in chickens.

Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 38(1): 21-26. ISSN: 1315-2556. Grupo II.

- Rondón, A. 2009. Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación integral de las respuestas de tipo probióticas provocadas en estos animales. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba.
- Ruíz, B. O.; Castillo, A.; Anchondo, C.; Rodríguez, R.; Beltran, O.; la O y Payan, J. 2009. Efecto de enzimas inoculantes sobre la composición del ensilaje de maíz. Archivos de zootecnia. 58(222): 163-171.
- Sao, N.V.; Mui, N.T. y Binh, D.V. 2010. Biomass production of *Tithonia diversifolia* (Wild Sunflower), soil improvement on sloping land and use as high protein foliage for feeding goats. Livestock Research for Rural Development. 22 (8).
- Savón, L.; Mora, L.M.; Rodríguez, V.; Rodríguez, Y.; Scull, I.; Hernández, Y. y Ruíz, T.E. 2008. Efecto de la harina de follaje de *Tithonia diversifolia* en la morfometría del tracto gastrointestinal de cerdos en crecimiento-ceba. Zootecnia Tropical. 26 (3): 387-390.
- Sarría, P. y Serrano, C.V. 2010. Valor nutricional para cerdos de la vinaza generada en la producción de alcohol carburante de caña de azúcar en Colombia. Rev. Comp. Prod. Porcina. 17:4.
- Sarría, P. 2003. Forrajes Arbóreos en la Alimentación de Monogástricos. II Conferencia Electrónica sobre Agroforestería para la Producción Animal en América Latina.
- Silveria, P.; Franco F.R. 2006. Conservación de forrajes, segunda parte. Revista electrónica de veterinaria REDVET. 7 (11). Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111106.html>. Consultado mayo, 2019.
- Schaller, A. 2009. Sueros de Lechería. Cadenas alimentarias. Alimentos Argentinos. Dirección nacional de agroindustria. Pp 20-24.

- Socorro, M. 2016. Efecto probiótico del PROBIOLACTIL®, SUBTILPROBIO® y su mezcla, en indicadores productivos y de salud en cerdos lactantes y preceba. Tesis en opción al Título Académico de Master en Ciencias Agrícolas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Matanzas. Cuba.
- Stefanie J.W.H.; Elferink, O.; Driehuis, F.; Gottschal, J. C. y Spoelstra, S. F. 2001. Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. Memorias de la conferencia electrónica de la FAO sobre el ensilaje en los trópicos. Estudio 2-Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. Serie Estudios FAO. Producción y protección vegetal 161. FAO, Roma. 68 p.
- Suárez, M. I. 2013. Evaluación a escala de producción del efecto probiótico del biopreparado PROBIOLACTIL® en pollos de inicio de reproductor pesado. Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Matanzas, Cuba.
- Togun, V.A.; Farinu, G.O. y Ojebiyi, O.O. 2006. Performance of Brown egg-type pullets fed diets containing graded levels of wild Sunflower (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray) forage meal as replacement for maize. *World Journal of Agriculture Sciences*, 2 (4): 443-449.
- Vargas, J. E. 1994. Caracterización de recursos forrajeros disponibles en tres agroecosistemas del Valle del Cauca. Memoria. II Seminario Internacional Desarrollo sostenible de Sistemas Agrarios. Cali, Colombia.
- Vázquez, A.; Lezcano, P.; Cobo, R.; Pérez, O.; Pérez, D.; García, Y.; Boucourt, R. y Sosa, D. Rodríguez, A. y Díaz, E. 2016. Alimento ensilado cubano (AEC). Una alternativa industrial para la producción animal. Mayabeque, Cuba.
- Valdivié, M. 2012. Utilización de la raíz y follaje de batata (camote o boniato). En: Alimentación de aves, cerdos y conejos con yuca, batata, banano, arroz, caña, DDGS y amaranto. Capítulo III. M. Valdivié y H. Bernal (comps.).

Universidad Autónoma de Nuevo León, México. Instituto de Ciencia Animal, República de Cuba. p.p. 45-60.

- Ventura, L.; Mendoza, J.; Abud, M.; Oliva, M.; Dendooven, L. y Gutiérrez, F. 2012. Melaza de caña de azúcar y suero de leche como aditivos en el ensilaje de hojas de zacate de limón (*Cymbopogon citratus* [DC.] Stapf). 72(1): 87-91.
- Villegas, G. H.; Montoya, S.; Rivera, J. E. y Charrá, J. 2017. Implantación del ensilaje de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray en vacas de mediana producción t su efecto en la producción y composición de la leche. <https://www.researchgate.net> .Consultado mayo, 2019.
- Wang, S.; Weibang, S. y Xiao, C., 2004. Attributes of plant proliferation, geographic spread and the natural communities invaded by the naturalized alien plant species *Tithonia diversifolia* in Yunnan China. *Sheng Tai Xue Bao*. 24 (3): 444-449.
- Westergaard, V. (2004) Tecnología de la Leche en Polvo. Evaporación y Secado por Atomización. Niro A/S. Copenhague, Dinamarca. Pp 247-295.
- Yalçin, S.; Özsoy, B. y Erol, H. 2008. Yeast culture supplementation to laying hen diets containing Soybean meal or Sunflower seed meal and its effect on performance, egg quality traits and Blood chemistry. *Journal of Applied Poultry Research*, 15 (2): 229-236.
- Zhang, T.; Yan, S.; Li, Z.; Wei, S.; Qin, G. y Kuan, W. (2014). Whole soybean as probiotic lactic acid bacteria carrier food in solid-state fermentation. *Food Control*. (41): 1-6.