

**Artículo de investigación**<https://doi.org/10.61767/mjte.003.2.3239>

Valdez-Muñoz et al., 2024

Recibido: 24-06-2024

Revisado: 09-08-2024

Aceptado: 04-09-2024

Publicado: 10-09-2024

Degradación microbiológica y enzimática de forraje de alfalfa para consumo de ganado lechero y rumiantes

Microbiological and enzymatic degradation of alfalfa forage for consumption of dairy cattle and ruminants

L.A. Valdez-Muñoz¹, P.M. Garza-López¹, B. Flores-Chávez¹, A. Quintero-Lira¹, J. Piloni-Martini^{1*} y J. Espitia-López^{1*}

¹Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, CP 43775, Ex. Hacienda de Quetzalpa, Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero, Hidalgo, México.

* Corresponding author: javier_piloni7632@uaeh.edu.mx, josefa_espitia1153@uaeh.com.mx

Resumen

Este trabajo presenta la degradación de los forrajes mediante una digestión microbiológica y enzimática para la obtención de azúcares reductores y la producción de enzimas, se utilizaron medios enriquecidos con urea para la producción de biomasa y se evaluaron las diferentes concentraciones en un medio adicionado con melaza. Se empleó alfalfa forrajera variedad San Miguelito procedente del valle de Tulancingo de Bravo, Hidalgo. Esta fue separada en tres silos bunker para preparar diferentes tratamientos; en el primer tratamiento (T1) se agregó levadura *Saccharomyces cerevisiae* (NEVADA[®]), en el segundo (T2) melaza de caña y en el tercero (T3) fueron adicionadas ambas, a cada uno se les realizaron análisis de peso seco, humedad y determinación de fibra. Los diferentes tratamientos no presentaron diferencias significativas en contenido de humedad y fibra (ANOVA, $\alpha=0.05$). La adición de levaduras y melaza al ensilaje no afectó negativamente el producto final, permitiendo un adecuado almacenamiento y además contribuye al mantenimiento de los nutrientes requeridos por el ganado lechero y rumiantes.

Palabras clave: Silo, forraje, degradación microbiológica, degradación enzimática, ganado.

Abstract

This work presents the degradation of forages through microbiological and enzymatic digestion to obtain reducing sugars and enzyme production. Urea-enriched media were used for biomass production and different concentrations were evaluated in a medium added with molasses. Forage alfalfa variety San Miguelito from the valley of Tulancingo de Bravo, Hidalgo was used. It was separated into three bunker silos to prepare different treatments; in the first treatment (T1)



Artículo de investigación

Valdez-Muñoz et al., 2024

Saccharomyces cerevisiae (NEVADA[®]) yeast was added, in the second (T2) cane molasses and in the third (T3) both were added. Dry weight, moisture and fiber analysis were performed on each one. The different treatments no present significant differences in moisture and fiber content. The addition of yeasts and molasses to the silage did not negatively affect the final product, allowing adequate storage and contributes to the maintenance of the nutrients required by dairy cattle and ruminants.

Keywords: Silo, forage, microbiological degradation, enzymatic degradation, livestock.

1. Introducción

El Estado de Hidalgo forma parte de la zona centro del país, con una superficie total de 2'090,512 hectáreas (ha), equivalente a 1.6 % del territorio nacional, y cuenta con cerca de 2.4 % de la población del país. Se localiza entre los 19° 35' 52" y 21° 25' 00" de latitud Norte y los 97° 57' 27" y 99° 51' 51" de longitud Oeste. Limita al norte con el estado de San Luis Potosí, al noroeste con Veracruz, al este y sureste con Puebla, al sur con Tlaxcala y el Estado de México, y al oeste con Querétaro. La agricultura del estado es principalmente de temporal, con una superficie sembrada del 75 %, mientras que el 25 % restante corresponde a la modalidad de riego (INIFAP, 2017). Aproximadamente un 62 % (2,054.01 km²) de los terrenos de esta región se dedican a las actividades agrícolas, las cuales se llevan a cabo principalmente en las zonas planas (llanuras, valles y mesetas) y en las porciones menos abruptas de los lomeríos y sierras. Los rendimientos que se obtienen van de regulares a bajos, ya que la mayor parte del área (2,031.44 km²) está sujeta al temporal, pues sólo 22.57 km², que representan el 0.68 % cuentan con agua para riego. Por tanto, es de interés intensificar al máximo la alternativa forrajera y asegurar la conservación del forraje producido durante el temporal, para que al ser cosechado pueda proporcionarse al ganado en aquellas épocas en que no se dispone de forrajes frescos (Urrutia, 2020). Además, aumentar la producción ganadera por hectárea constituye un importante objetivo que es preciso alcanzar con unos gastos de explotación bajos. Para ello es fundamental disponer, a lo largo de todo el año, de una alimentación base para el ganado constituida principalmente por forraje. La implementación de

silos es una alternativa económica de alimento para animales que permite mejorar la producción y condiciones corporales, dando un aumento de peso y grasa para la ganadería, esta práctica se inició hace aproximadamente 3,000 años y es un método de conservación de forrajes o subproductos agrícolas con alto contenido de humedad (60-70 %). Jarvis (1999), señala que es un método de preservación de forrajes en el cual el forraje es colocado en un depósito llamado silo, acomodado por capas, eliminando el aire mediante la compactación y cubriéndolo con plástico, con el objetivo de producir una fermentación ácido-láctica e inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de materia orgánica.

Entre los distintos procedimientos utilizados para la conservación del forraje, el ensilaje es en la actualidad, el de mayor interés ya que reduce las pérdidas (por lluvia, caída de hojas, respiración, etc.) en comparación con otros métodos, este deja el terreno libre y listo para el siguiente cultivo, asegura la disponibilidad de alimentos para el ganado lechero y rumiantes durante una larga temporada en la que frecuentemente las condiciones climatológicas son adversas y al ser cosechado en el momento óptimo, se obtiene la máxima producción y calidad por unidad de superficie (Urrutia, 2020). Además, existen investigaciones indican que contiene un aporte importante de proteína del 14 % y de energía metabolizable del 2.6 % cal/kg de materia seca, logrando un ensilaje de alta calidad y excelente digestibilidad, que le aporta al ganado más energía por día al haber un mayor consumo (Viresa, 2021).



Artículo de investigación

Valdez-Muñoz et al., 2024

Por otro lado, la aplicación de técnicas apropiadas durante la cosecha y el ensilado no son suficientes para impedir que la fermentación inicial del ensilaje se realice en forma inadecuada. Esto puede ocurrir por una presencia escasa de microorganismos productores de ácido láctico (BAC) apropiados o por una baja concentración de carbohidratos hidrosolubles (CHS), o ambos, es por ello que a partir de la década de 1990, el uso de aditivos para mejorar las condiciones del proceso de ensilaje comenzó a hacerse muy común, ya que mejora el valor nutritivo y el consumo voluntario de los ensilados, por ejemplo, el uso de urea origina incrementos en la concentración de solutos, la estabilidad aeróbica de los ensilajes, el contenido de nitrógeno del producto final, el consumo, y la digestibilidad de la materia seca y de la energía y los aumentos de peso (Moreno, 1977) y la incorporación de melaza al ensilaje proporciona más azúcares, lo que facilita la fermentación y puede ser importante en el caso de ensilajes muy húmedos, con poco contenido de grano o bien en silos donde el forraje ha madurado demasiado (Pietrosemoli, 1997). El objetivo de la presente investigación es hidrolizar alfalfa forrajera mediante el proceso de ensilado empleando una degradación microbiológica y enzimática para generar alimento de calidad destinado al consumo de ganado lechero y rumiantes.

2. Materiales y métodos

2.1 Propagación de la levadura

Se prepararon 300 mL de una solución de glucosa con levadura *Saccharomyces cerevisiae* (NEVADA[®]) para la identificación de las cepas empleadas en el ensilado, el procedimiento que se realizó fue, colocar en un matraz de 500 mL, 12 g de glucosa $C_6H_{12}O_6$, posteriormente se adicionó 1.5 g de extracto de levadura, 0.03 g de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (NEVADA[®]) y 0.9 g de extracto de malta, finalmente se cubrió con papel aluminio y cinta adhesiva.

Se colocó la solución en la parrilla de agitación para disolver el extracto de malta, y posteriormente se ajustó el pH a 6, después se

esterilizó para inocular con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (NEVADA[®]).

2.2 Obtención de la enzima

La levadura de la cual se extrajeron las enzimas se propagó empleando la misma levadura *Saccharomyces cerevisiae* (NEVADA[®]). Para la obtención de las enzimas se sometió a la biomasa propagada a una agitación mediante el uso de un vórtex, con lo cual la fuerza centrífuga separó sus componentes o fases (generalmente una sólida y una líquida), en función de su densidad (Suárez-Machín y Garrido-Carralero, 2016).

Se utilizó la mezcla que contenía las levaduras activas, se colocó en vórtex por 1 min y posteriormente a la centrifuga durante 5 min a 3,000 rpm, se obtuvieron 3 muestras de fase acuosa, las cuales fueron colocadas en tres diferentes tubos de ensayo A, B, C; en el tubo A se colocó 1 mL de la solución que contenía las enzimas y se adicionaron 9 mL de agua destilada, en el B se tomó 1 mL del tubo A y 9 mL más de agua destilada y en el C se agregó 1 mL del tubo B y 9 mL de agua destilada. Posteriormente, se tomó una muestra del tubo C, la cual fue llevada a la cámara Neubauer y posteriormente al microscopio para su análisis, conteo y estandarización. Al finalizar, las muestras se congelaron (-20 °C).

2.3 Hidrolización de melaza

Se preparo una solución de melaza, en un recipiente de 4 L, donde se agregaron 2,850 mL de agua destilada y 150 mL de melaza, y se esterilizó la solución.

Para poder realizar el conteo de azúcares reductores, se empleó la determinación de DNS en un rango de 540 nm, empleando dextrosa como patrón de referencia en concentraciones de 0 a 2 mg/L (Ning, 2017). Se realizó una curva patrón entre las concentraciones de 1 a 2 g de dextrosa $C_6H_{12}O_6$.

2.4 Preparación de los silos

La alfalfa forrajera (*Medicago sativa*) marca San Miguelito empleada en esta investigación fue



Artículo de investigación

Valdez-Muñoz et al., 2024

recolectada en el valle de Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México. Se realizó el picado del forraje manualmente de un 1 cm de grosor, hasta quedar homogéneo, éste fue separado en microsilos con un volumen de 500 mL cada uno, se realizaron tres tratamientos y cada uno se efectuó por triplicado; en el Tratamiento 1 (T1) se le agregó levadura *Saccharomyces cerevisiae* (NEVADA®) a una concentración de 1.6×10^8 UFC/mL, en el Tratamiento 2 (T2) se le agregó melaza de caña a una concentración de 0.3 mg/L y en el Tratamiento 3 (T3) se agregaron levadura *Saccharomyces cerevisiae* a una concentración de 1.6×10^8 UFC/mL y melaza de caña a una concentración de 0.3 mg/L.

2.5 Determinación de Humedad

Para determinar el contenido de humedad de los tratamientos, se utilizó el método termogravimétrico, el cual se basa en la pérdida de peso por calentamiento y los resultados se calcularon por diferencia de peso Díaz (2021). Se utilizaron charolas de aluminio previamente sometidas a peso constante y se colocó en cada una de ellas una muestra de 5 g de cada tratamiento T1, T2 y T3. Se introdujeron en una estufa marca BioBase® a una temperatura de 105 °C por 4 h y/o a peso constante, esto se realizó por triplicado para cada tratamiento. Al realizar la extracción de toda el agua posible, desaparecieron de la muestra los compuestos orgánicos volátiles como el amoníaco y el alcohol (Carillanca, 2005).

2.6 Determinación de Fibra

Para realizar la determinación de la fibra, se tomaron 5 g de muestra de cada tratamiento T1, T2 y T3 por triplicado, éstas fueron colocadas en el sistema de extracción de grasas marca BUCHI®, durante 3 h y 45 min, una vez desengrasadas, se retiraron del cartucho de celulosa y fueron puestas en los vasos Berzelius donde se les agregó la solución A, la cual se preparó con 200 mL de H₂SO₄ 0.255 N. Posteriormente, se pasaron las muestras al determinador de fibra marca LABCONCO® y se dejó en ebullición durante 30 min, al terminar el tiempo, se retiraron las muestras para proceder a separar mediante una

filtración utilizando una tela y se agregó agua destilada a 80 °C, hasta obtener un pH neutro, después se repitió el mismo proceso, se obtuvieron las muestras de cada repetición por tratamientos y se transfirieron nuevamente al vaso Berzelius en donde se les adicionó la solución B, la cual contenía 200 mL de NaOH 0.313 N, permanecieron en ebullición por 30 min en el determinador de fibra, después del tiempo transcurrido, se tomaron las muestras y se filtraron nuevamente con tela, se les adicionó 25 mL H₂SO₄ 0.255 N, 150 mL de agua destilada caliente a 80 °C y 25 mL de etanol y se dejó secar durante 2 h en un crisol en la estufa de secado marca BioBase® a 130 ± 1 °C.

Finalmente, se retiraron las muestras y se colocaron en un desecador por 10 min, se procedió a pesar los crisoles, después se calcinaron las muestras en una mufla a 550 °C durante 30 min, una vez que las muestras enfriaron y se pesaron (Cruz, 2022).

2.7 Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de un factor equilibrado por el número de repeticiones ($\alpha=0.05$). para conocer si existían diferencias significativas entre el tratamiento enzimático (T1) y el tratamiento microbiológico (T2), así como la sinergia de ambos tratamientos (T3), también se realizó una prueba de comparación de medias para determinar cuál es el mejor tratamiento, esto se ejecutó en el programa XLSTAT® por Lumivero™ versión 2023.3.1 (Terrádez, 2019).

3. Resultados y discusión

De acuerdo con la metodología descrita anteriormente se obtuvieron datos cuantitativos, el resultado final para cada parámetro corresponde al promedio de los valores obtenidos del triplicado por cada tratamiento T1, T2 y T3.

3.2 Azúcares reductores

Para la cuantificación de los azúcares reductores se obtuvo una curva patrón (Figura 1), con estándar de dextrosa (0-2 g/L), la cual arroja la ecuación lineal $y=0.5975x+0.231$ ($R^2=0.9903$),



Artículo de investigación

Valdez-Muñoz et al., 2024

donde “y” es la absorbancia de la muestra al realizar la metodología de DNS y “x” es la concentración de los azúcares reductores en la muestra (g/L). Al emplear a la melaza como aditivo, su alto contenido de azúcares permitió

que la fermentación eliminara las bacterias que descomponen el forraje, y a la vez, mejora su sabor y valor nutritivo (CONADESUCA, 2016).

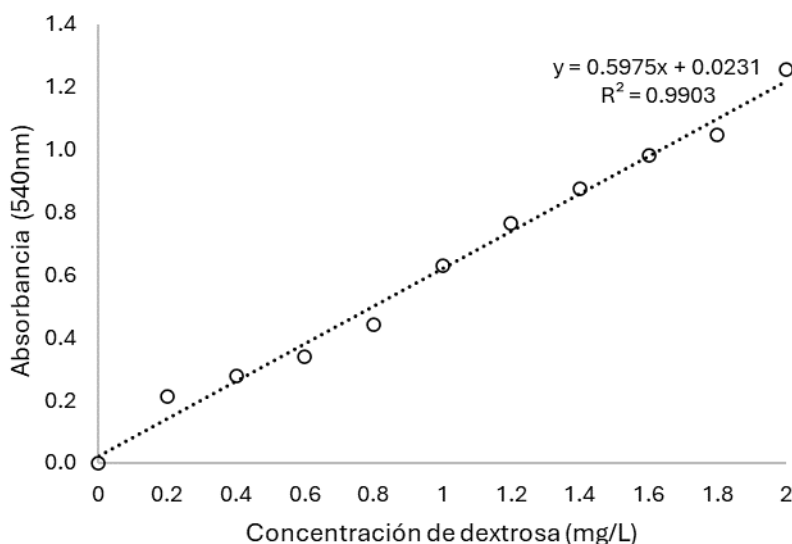


Figura 1. Curva patrón de concentración de dextrosa.

Tabla 1. Cuantificación de azúcares reductores (g/L).

Solución de melaza (% p/v)	Azúcares reductores (g/L)
0	2.63
1	3.95
2.5	10.81
5	11.90

Los resultados obtenidos de la medición de azúcares reductores se muestran en la Tabla 1, estos resultados pueden ser comparables con los obtenidos por Stokes (1992) quien reporta una evaluación de proteínas, carbohidratos y azúcares reductores que se evaluaron en un tratamiento de ensilado de alfalfa, los cuales son 0.79667 g/L, 1.01670 g/L y 1.51167 g/L. y esta determinación también se realizó con la metodología de DNS. Las concentraciones de azúcares reductores encontradas en el presente estudio indican que

las levaduras fermentaron de manera mínima los azúcares y, por lo tanto, la producción de etanol (C₂H₆O) no fue notoria, mostrando que el forraje de alfalfa fue cosechado en su estado óptimo para ensilar y el proceso fermentativo se produjo de manera óptima. Por lo tanto, el forraje evaluado cumple ampliamente este requerimiento, lo que beneficia el ensilaje, ya que el C₂H₆O no sólo disminuye el azúcar disponible para producir ácido láctico, sino que también produce un mal gusto en la leche, según lo



Artículo de investigación

Valdez-Muñoz et al., 2024

descrito por Randby, et al. (1999) y concuerda con lo mencionado por McDonald et al. (1991), quienes aseguran que bajo condiciones aeróbicas, muchas especies de levaduras degradan el ácido láctico en CO₂ y H₂O y la degradación del ácido láctico eleva el valor del pH del ensilaje, lo cual a su vez permite el desarrollo de otros organismos indeseables.

3.3 Humedad

En la Tabla 2 se presenta la caracterización de humedad del ensilaje de alfalfa forrajera, el T1 obtuvo un peso promedio de 2.8578 g, el T2 de 2.7858 g y el T3 de 2.7803 g, y después de realizar el análisis estadístico de ANOVA no se mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($\alpha > 0.05$), la cantidad de biomasa que se tiene y el agua que las muestras pierden es muy similar independientemente del tipo de tratamientos, al ser homogénea la extracción de humedad se beneficia todo el proceso del ensilaje como lo describe Ramos (2018), quien menciona que cuanto menor es el nivel de humedad del forraje mayor es el valor de pH a la que se alcanza la estabilidad anaeróbica, los ácidos orgánicos se pierden en este proceso de secado y ello reduce el poder tampón del forraje, lo que ayuda al proceso de ensilado. Por otra parte, cuanto mayor es la humedad del forraje que se ensila mayor es la producción de efluentes, de elevado potencial contaminante por su alto contenido en nutrientes, lo que puede suponer una importante pérdida de valor nutritivo del silo.

3.4 Fibra

En la Tabla 2 se muestra el análisis proximal de fibra en donde se puede observar que existe un margen de diferencia mínimo del 0.044 g al 0.206 g, el cual no es estadísticamente significativo ($\alpha > 0.05$), esto corrobora que los nutrientes contenidos en el ensilado no se vieron afectados de manera negativa, en cambio permiten que estos sean almacenados de manera digerible para el ganado. Estos resultados son análogos a los reportados por Aguirre L et al. (2016), quienes mencionan que la inclusión de alfalfa forrajera en silos genera pequeñas variaciones en la composición química del ensilaje con inóculos

microbianos anaerobios y que el contenido de materia seca puede verse ligeramente disminuido, siendo no significativas estadísticamente, lo que demuestra que las levaduras presentes en cantidades mínimas en el proceso de ensilado no alteran el producto final de forma importante y que la melaza de caña en la fase de almacenamiento, ayuda a fermentar el ácido láctico producido y lo convierten en etanol, haciendo que el pH se eleve, es cuando las bacterias clostridiales utilizan los nutrientes en el forraje para crecer y producir ácido butírico, lo cual reduce la palatabilidad y el valor de alimentación del ensilaje. Además Weiss (2000), menciona que la fibra juega un papel muy importante dentro de la alimentación del ganado y rumiantes en general, es indispensable para mantener la funcionalidad ruminal, estimular el masticado y la rumia y mantener un pH ruminal adecuado que permita una buena salud y digestión en la alimentación del ganado, de igual forma, el contenido de fibra en la dieta asocia con la composición de la leche, ya que por medio de su digestión se producen los principales precursores de la grasa láctea. Además, la calidad y cantidad de fibra consumida afectan la capacidad de consumo voluntario y la cantidad de energía que pueda aportar una ración, con esto se comprueba que la fibra tiene implicaciones importantes en las prácticas de alimentación del ganado al afectar la salud, la producción y sirve para estimar el contenido de energía de los forrajes y alimentos, así como el consumo voluntario de éste.

4. Conclusión

Se concluye, que es factible alimentar con dietas basadas en ensilaje de alfalfa forrajera complementada con melaza de caña (T2), ya que ésta aporta elementos que sirven tanto para mejorar la fermentación y la actividad microbiana de bacterias probióticas, como aporte nutrimental en el propio ensilado. Por otro lado, a pesar de que el ensilaje contenga bajas cantidades de levaduras (T1), éstas no afectan de manera trascendental y esto se demostró al realizar la comparación de los resultados obtenidos de la medición de los parámetros de



Artículo de investigación

Valdez-Muñoz et al., 2024

humedad y fibra los cuales no presentaron diferencias significativas, lo que sugieren que habrían sido funcionalmente equivalentes, el tratamiento que contenía la melaza y la levadura (T3) no generó una simbiosis favorable, de hecho los resultados fueron semejantes entre todos los tratamientos empleados en este estudio. Se logró hidrolizar la alfalfa forrajera mediante una

digestión microbológica y enzimática, con la que se generaron los azúcares reductores, lo cual mejoró las condiciones del material final y la producción de enzimas para la digestión del ensilaje en todos los tratamientos.

Tabla 2. Contenido de humedad y fibra en silos tratados.

Tratamiento	Contenido de humedad (%)	Contenido de fibra (%)
T1	2.8578 ± 0.0497	2.9402 ± 0.0576
T2	2.7858 ± 0.0428	3.1322 ± 0.1895
T3	2.7803 ± 0.0126	2.7615 ± 0.1482

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) por las facilidades proporcionadas para la realización de este estudio. Asimismo, se agradece a las egresadas del PE de IAPs Yareli Aguilar Hernández y Ximena Aldana García, por su colaboración a este proyecto durante la estadía de Servicio Social y Prácticas Profesionales.

6. Referencias

1. Aguirre L, C. R. (26 de Agosto de 2016). *CEDAMAZ*. Obtenido de CEDAMAZ: <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/64/63>
2. Carillanca, I. (31 de Mayo de 2005). *Instituto de Investigaciones Agropecuarias*. Obtenido de Instituto de Investigaciones Agropecuarias : <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/3982/Informativo%20INIA%20N%C2%B0%20119?sequence=1>
3. CONADESUCA. (06 de 12 de 2016). *Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural*. Obtenido de Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment_data/file/171888/Nota_Informativa_Noviembre_Melazas.pdf
4. Cruz, R. B. (06 de Julio de 2022). *FMVZ-UAS*. Obtenido de FMVZ-UAS: <https://fmvz.uas.edu.mx/MyP/MANUAL%20E%20PRACTICAS%20LAB%20INVESTIGACION.pdf>
5. Díaz, F. E. (17 de 09 de 2021). *Universidad Autónoma de Nuevo León*. Obtenido de Universidad Autónoma de Nuevo León: <http://eprints.uanl.mx/22311/1/1080315355.pdf>
6. INIFAP. (05 de Septiembre de 2017). *Agenda Técnica Agrícola de Hidalgo*. Obtenido de Agenda Técnica Agrícola de Hidalgo: https://vun.inifap.gob.mx/VUN_MEDIA/BibliotecaWeb/media/agendas/4131_4828_Agenda_T%C3%A9cnica_Hidalgo_2017.pdf
7. Jarvis, M. (20 de Junio de 1999). *Nitrogen flows and losses in grasslands*. Obtenido de Nitrogen flows and losses in grasslands.: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2494.1995.tb02320.x>
8. McDonald P., H. A. (19 de Febrero de 1991). *Food and Agriculture Organization*. Obtenido de Food and Agriculture Organization: <https://www.fao.org/4/x8486s/x8486s04.htm>



Artículo de investigación

Valdez-Muñoz et al., 2024

9. Moreno, A. H. (02 de Marzo de 1977). *Universidad de Costa Rica*. Obtenido de Universidad de Costa Rica: https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/3967/evaluacion_de_ensilaje_de_pasto_panama.pdf?sequence=1&isAllowed=y
10. Ning, T. W. (22 de Abril de 2017). *National Library of Medicine*. Obtenido de National Library of Medicine: <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0046>
11. Pietrosevoli, S. (22 de Marzo de 1997). *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. Obtenido de Archivos Latinoamericanos de Producción Animal: [file:///C:/Users/Benito/Downloads/129-Article%20Text-225-1-10-20050216%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Benito/Downloads/129-Article%20Text-225-1-10-20050216%20(1).pdf)
12. Ramos, A. C. (06 de Marzo de 2018). *UPM*. Obtenido de UPM: https://oa.upm.es/53336/1/INVE_MEM_2018_286059.pdf
13. Randby, A. S.-O. (28 de Mayo de 1999). *Food and Agriculture Organization*. Obtenido de Food and Agriculture Organization: <https://www.fao.org/4/x8486s/x8486s04.htm>
14. Stokes. (1992). Efecto de una mezcla de enzimas, un inoculante y su interacción en la fermentación del ensilaje y la producción de lácteos. *J.Ciencia láctea.*, 75:764-773.
15. Suárez-Machín, C., & Garrido-Carralero, N. A. (28 de Noviembre de 2016). *ICIDCA*. Obtenido de ICIDCA: <https://www.redalyc.org/revista.oa?id=2231>
16. Terrádez, M. (16 de Octubre de 2019). *Universidad Oberta de Catalunya*. Obtenido de Universidad Oberta de Catalunya: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60309250/ANOVA20190816-82517-sn30if-libre.pdf?1565964567=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAnalysis_d_e_la_varianza_ANOVA_ANALISIS_D.pdf&Expires=1712966323&Signature=L4A8Pok-GNcgDuPzbYBr5KyJBsTwtSdFFdu
17. Urrutia, J. M. (08 de Octubre de 2020). *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*. Obtenido de Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.: <https://proain.com/blogs/notas-tecnicas/que-es-el-ensilaje-y-cual-es-el-proceso-de-elaboracion>
18. Urrutia, J. M. (08 de Octubre de 2020). *Proain Tecnología Agrícola*. Obtenido de Proain Tecnología Agrícola: <https://proain.com/blogs/notas-tecnicas/que-es-el-ensilaje-y-cual-es-el-proceso-de-elaboracion>
19. Viresa. (19 de Abril de 2021). *Viresa Laboratorio*. Obtenido de Viresa Laboratorio: https://viresa.com.mx/blog_hornos_incubadoras#:~:text=Una%20incubadora%20es%20un%20dispositivo,ox%C3%ADgeno%20en%20su%20atm%C3%B3sfera%20interior.
20. Weiss, w. (17 de Septiembre de 2000). *LANCE Nutrition and management of periparturient-cows*. Obtenido de LANCE Nutrition and management of periparturient-cows.: <file:///C:/Users/Benito/Downloads/Dialnet-LaFibraEnLaAlimentacionDelGanadoLechero-5166275.pdf>