

Meta-analysis to determine the effect of energy additives on the pH of tropical forage silages

Metaanálisis para determinar el efecto de aditivos energéticos en el pH de ensilajes de forrajes tropicales

Mildrey Torres Martínez, Magaly Herrera Villafranca and R. Rodríguez Hernández

Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

Email: femtorresm@ica.co.cu

Mildrey Torres Martínez: <https://orcid.org/0000-0001-7942-0195>

Magaly Herrera Villafranca: <https://orcid.org/0000-0002-2641-1815>

R. Rodríguez Hernández: <https://orcid.org/0000-0001-8254-7509>

A meta-analysis was developed to estimate the effect of energy additives on the pH of tropical forage silages. A total of 197 studies were reviewed, located in the databases EBSCO, Scielo, ScienceDirect, ResearchGate and the Cuban Journal of Agricultural Science. The selection of the articles took into account the fulfillment of the inclusion criteria, the reliability of the search and the evaluation of the methodological quality of each study. The difference in standardized means between the treated sample with the additive and the control was defined as the effect size index with its respective 95% confidence interval. The Cochran Q test was used as a heterogeneity test, and the inconsistency statistic was used to quantify the variability percentage of the results between studies. The subgroup analysis technique was applied for the analysis of qualitative moderating variables and meta-regression for quantitative variables. Using a random effects model, the results showed the global effectiveness of the energy additives evaluated $d_{(pH)} = 3.077$ (C.I 95 % (2.365–3.789)). Despite the high variability found in the literature that was consulted ($I^2 > 75$ %), the meta-analysis techniques confirmed in a non-experimental way the favorable effect of using energy additives to benefit the fermentation process of the silage and its conservation. In this study, the description of each step of the methodology can be used as a guide to extrapolate and apply the meta-analysis to other spheres from the agricultural sector.

Key words: *fermentative indicator, forage conservation, heterogeneity, subgroup analysis, meta-regression*

The contemporary scientific scene is characterized by an exponential growth in the publication of scientific articles, mainly in digital format (Rubio *et al.* 2018). In this context, there are different types of classical approximations that make it possible to summarize, interpret, and assess information, such as narrative reviews, systematic reviews, and meta-analysis (Huedo and Johnson 2010).

Authors such as Botella and Zamora (2017) describe the narratives as imprecise and subjective, since they are based on the particular opinion of the writer. However, the systematics complies with the standards of the scientific method for their elaboration (Mikolajewicz and Komorova 2019). Toledo *et al.* (2018) state that meta-analysis techniques also use all the steps of a systematic review, but include the statistical combination of the study results, with the objective of identifying

Se desarrolló un metaanálisis para estimar el efecto de aditivos energéticos en el pH de ensilajes de forrajes tropicales. Se revisaron 197 estudios, localizados en las bases de datos EBSCO, Scielo, ScienceDirect, ResearchGate y la revista Cuban Journal of Agricultural Science. La selección de los artículos tuvo en cuenta el cumplimiento de los criterios de inclusión, la fiabilidad de la búsqueda y la evaluación de la calidad metodológica de cada estudio. Se definió la diferencia de medias estandarizadas entre la muestra tratada con el aditivo y el control, como el índice del tamaño del efecto con su respectivo intervalo de confianza al 95 %. Se utilizó la prueba Q de Cochran como test de heterogeneidad, y el estadístico de inconsistencia para cuantificar el porcentaje de variabilidad de los resultados entre estudios. Se aplicó la técnica de análisis de subgrupo para el análisis de las variables moderadoras cualitativas y la metaregresión para las cuantitativas. Mediante un modelo de efectos aleatorios, los resultados mostraron la efectividad global de los aditivos energéticos evaluados $d_{(pH)} = 3.077$ (I.C 95 % (2.365–3.789)). A pesar de la alta variabilidad encontrada en la literatura que se consultó ($I^2 > 75$ %), las técnicas de metaanálisis confirmaron de forma no experimental el efecto favorable de emplear aditivos energéticos para beneficiar el proceso fermentativo del ensilaje y su conservación. En este trabajo, la descripción de cada paso de la metodología puede servir de guía para extrapolar y aplicar el metaanálisis hacia otras esferas del sector agropecuario.

Palabras clave: *indicador fermentativo, conservación de forraje, heterogeneidad, análisis de subgrupo, metaregresión*

El escenario científico contemporáneo se caracteriza por un crecimiento exponencial de la publicación de artículos científicos, principalmente en formato digital (Rubio *et al.* 2018). En este contexto, existen diferentes tipos de aproximaciones clásicas que posibilitan resumir, interpretar y valorar la información, como son las revisiones narrativas, las revisiones sistemáticas y el metaanálisis (Huedo y Johnson 2010).

Autores como Botella y Zamora (2017) describen las narrativas como imprecisas y subjetivas, ya que se basan en la opinión particular de quien escribe. Sin embargo, las sistemáticas cumplen para su elaboración con normas propias del método científico (Mikolajewicz y Komorova 2019). Toledo *et al.* (2018) plantean que las técnicas del metaanálisis también utilizan todos los pasos de una revisión sistemática, pero incluyen la combinación estadística de los resultados de los estudios,

consistent patterns in the data and the variation sources between them.

According to Sánchez *et al.* (2011), meta-analysis has its beginnings in the medical, social and behavioral sciences. However, at present this type of technique is also beginning to be applied in the context of agricultural sciences, since it makes possible to reach new conclusions without the need for any experimentation.

In the agricultural sphere, the forages conservation through silage production allows supplying food of nutritional quality to cattle during the dry period (Espinoza 2016). Specifically, in the scientific literature there is extensive information about the use of this conservation method, in which energy additives with high levels of fermentable carbohydrates are used, such as molasses, grains and tubers (Rodríguez *et al.* 2017) with the objective of to favor lactic acid activity, achieve pH values below 4.0 and, finally, guarantee adequate forage conservation (Espinoza 2016). In some studies it is possible to verify the improvement of the ensiled product, while in others no significant results are reported with the use of additives.

The objective of this study was to apply meta-analysis techniques to estimate the average effect of energy additives on the fermentative indicator pH, when ensiling tropical forages as a case study.

Materials and Methods

To perform the meta-analysis, the following steps, described by Shah *et al.* (2020) were fulfilled:

1. *Information search sources and established inclusion / exclusion criteria.* To search for information from the scientific literature, the Cuban Journal of Agricultural Science (CJAS) and the electronic databases EBSCO, ScienceDirect, Scielo and ResearchGate were consulted, without defining a specific time period to cover as many publications as possible.

Articles in Spanish, English and Portuguese were selected and the search terms were defined as silage/silage/silagem and additive/additive, which were combined with the Boolean operator “AND” or “OR”. Titles and abstracts were screened to exclude irrelevant reports, duplicate studies were deleted, the full text was recovered for relevant studies, papers were reviewed in their entirety to verify the degree of compliance with the established inclusion criteria, and finally, the necessary statistical data were obtained from each article.

The experimental studies that had the objective of ensiling tropical forages; researches where energy additives (molasses, cereal grains or industrial by-products: meal and citrus pulp) were used as treatment/s and studies in which the efficacy of the treatment was compared in the experimental groups were stated

con el objetivo de identificar patrones consistentes en los datos y las fuentes de variación entre ellos.

Según Sánchez *et al.* (2011), el metaanálisis tiene sus inicios en las ciencias médicas, sociales y del comportamiento. Sin embargo, en la actualidad este tipo de técnica también se comienza a aplicar en el contexto de las ciencias agropecuarias, pues posibilita arribar a nuevas conclusiones sin necesidad de experimentación alguna.

En la esfera agropecuaria, la conservación de forrajes mediante la producción de ensilaje permite suministrar alimento de calidad nutritiva al ganado durante el período seco (Espinoza 2016). Específicamente, en la literatura científica se encuentra una amplia información acerca del empleo de este método de conservación, en el que se emplean aditivos energéticos con elevados niveles de carbohidratos fermentables, como melaza, granos y tubérculos (Rodríguez *et al.* 2017) con el objetivo de favorecer la actividad ácido láctica, lograr valores de pH inferiores a 4.0 y, finalmente, garantizar la conservación adecuada del forraje (Espinoza 2016). En algunos trabajos se logra comprobar la mejoría del producto ensilado, mientras que en otros no se informan resultados significativos con el empleo de los aditivos.

El objetivo de este trabajo fue aplicar las técnicas del metaanálisis para estimar el efecto promedio de los aditivos energéticos en el indicador fermentativo pH, al ensilar forrajes tropicales como caso de estudio.

Materiales y Métodos

Para realizar el metaanálisis se cumplieron con los siguientes pasos, descritos por Shah *et al.* (2020):

1. *Fuentes de búsqueda de la información y criterios de inclusión/exclusión establecidos.* Para la búsqueda de información de la literatura científica se consultó la revista Cuban Journal of Agricultural Science (CJAS) y las bases de datos electrónicas EBSCO, ScienceDirect, Scielo y ResearchGate, sin definir un período de tiempo específico para abarcar la mayor cantidad de publicaciones posibles.

Se seleccionaron artículos en español, inglés y portugués y se definieron como términos de búsqueda ensilaje/silage/silagem y aditivo/additive, los que se combinaron con el operador booleano “AND” o “OR”. Los títulos y resúmenes se examinaron para excluir los informes irrelevantes, se eliminaron los estudios duplicados, se recuperó el texto completo para los estudios relevantes, se revisaron los trabajos en su totalidad para verificar el grado de cumplimiento de los criterios de inclusión establecidos y finalmente, se obtuvieron los datos estadísticos necesarios de cada artículo.

Se platearon como criterios de inclusión los estudios experimentales que tuvieron como objetivo ensilar forrajes tropicales; investigaciones donde se utilizó como tratamiento/s aditivos energéticos (melaza, granos de cereales o subproductos industriales: harinas y pulpa cítrica) y estudios en los que se comparó la eficacia del tratamiento en los grupos experimentales. Se tomó como medida resultante la variable pH y se informaron

as inclusion criteria. The variable pH was taken as the resulting measure and the position (mean) and dispersion statistics (standard deviation, standard error or coefficient of variation) were reported.

2. *Reliability between reviewers.* In accordance with the methodology, two reviewers were selected to independently identify and select the titles and abstracts derived from the search sources based on the fulfillment of the inclusion criteria. The Kappa index (Cortés and Guerra 2020) was used to measure the degree of agreement between the reviewers.

3. *Evaluation of the methodological quality of the studies.* For the methodological assessment of the selected studies, the specific quality scale on chemical composition and nutritional value of forage silages, proposed by Torres *et al.* (2018) was used.

4. *Data extraction. Coded moderating variables of the studies.* For each of the studies, the data reported for the pH variable, with its position and deviation statistics, were tabulated. In addition, moderating variables were extracted and coded, and grouped into three categories: substantive, methodological, and extrinsic. The type of tropical grass used for ensiling, the grass age, the type of energy additive, the inclusion level of the additive and the days the silo was opened were considered as substantive. As methodological, the sample size, the applied experimental design and the methodological quality of the study were considered. The publication year of the research was selected as an intrinsic variable.

5. *Statistical analysis of the meta-analysis.* Effect size. The statistic effect size (ES) was calculated in all the studies and for each experimental group individually, using the equations proposed by Sánchez *et al.* (2011):

$$d = c(m) * \frac{Y_e - Y_c}{S} \quad (\text{Equation 1})$$

$$c(m) = 1 - \frac{3}{4 * (n_e + n_c - 2)} \quad (\text{Equation 2})$$

$$S = \sqrt{\frac{(n_e - 1) * S_e^2 + (n_c - 1) * S_c^2}{n_e + n_c - 2}} \quad (\text{Equation 3})$$

Where:

d - ES index that is used for the difference of standardized means

Y_e - mean value of the dependent variable in the experimental group

Y_c - mean in the control group

S - standard deviation of both groups

c(m) - correction factor for small samples

The variances for treatment and control are defined as S_e^2 and S_c^2 , respectively. Similarly, the acronyms n_e and n_c show the sample sizes in the experimental and control groups, respectively.

los estadísticos de posición (media) y de dispersión (desviación estándar, error estándar o coeficiente de variación).

2. *Fiabilidad entre revisores.* De acuerdo con la metodología, se seleccionaron dos revisores para identificar y seleccionar de manera independiente los títulos y resúmenes derivados de las fuentes de búsqueda a partir del cumplimiento de los criterios de inclusión. Para medir el grado de concordancia entre los revisores se utilizó el índice Kappa (Cortés y Guerra 2020).

3. *Evaluación de la calidad metodológica de los estudios.* Para la valoración metodológica de los estudios seleccionados, se empleó la escala de calidad específica sobre composición química y valor nutritivo de ensilajes de forrajes, propuesta por Torres *et al.* (2018).

4. *Extracción de datos. Variables moderadoras codificadas de los estudios.* Para cada uno de los estudios se tabularon los datos reportados de la variable pH, con sus estadísticos de posición y desviación. Además, se extrajeron y se codificaron las variables moderadoras, y se agruparon en tres categorías: sustantivas, metodológicas y extrínsecas. Se consideraron como sustantivas el tipo de pasto tropical utilizado para ensilar, la edad del pasto, el tipo de aditivo energético, el nivel de inclusión del aditivo y los días en que se abrió el silo. Como metodológicas, se consideró el tamaño de muestra, el diseño experimental aplicado y la calidad metodológica del estudio. Se seleccionó como variable intrínseca el año de publicación de la investigación.

5. *Análisis estadístico del metaanálisis. Tamaño del efecto.* El estadístico tamaño del efecto (TE) se calculó en todos los estudios y por cada grupo experimental individualmente, mediante las ecuaciones propuestas por Sánchez *et al.* (2011):

Donde:

d - índice del TE que se utiliza para la diferencia de medias estandarizadas

Y_e - valor promedio de la variable dependiente en el grupo experimental

Y_c - media en el grupo control

S - desviación típica de ambos grupos

c(m) - factor de corrección para muestras pequeñas

Las varianzas para el tratamiento y el control se definen como S_e^2 y S_c^2 , respectivamente. De igual manera, las siglas n_e y n_c indican los tamaños de muestra en el grupo experimental y el control, respectivamente.

Then, with all the individual indices of the ES, an average ES was estimated using a random effects model to obtain a summary result of the treatments efficacy, as well as its 95 % confidence interval to inform the precision of the effect (Borenstein *et al.* 2010).

$$ES_j = \theta + e_j + \xi_j \quad (\text{Equation 4})$$

Where:

ES_j -estimates around the parametric ES (θ) for each study ($j = 1, 2, \dots, k$)

e_j - error given by intrastudy variability, which normally and independently distributes with zero mean and variance σ_j^2 ;

ξ_j product of the inter-study variability and normally and independently distributed with zero mean and variance U_j^2 .

Heterogeneity analysis. According to Rubio *et al.* (2018), to verify the presence of heterogeneity between studies, the Cochran Q test was performed, whose result was complemented with the inconsistency (I^2) statistic. In case of showing inter-study variability, the subgroup analysis technique was used to analyze the qualitative moderating variables (Borenstein *et al.* 2010), and for the quantitative variables, the regression model (meta-regression), proposed by Huedo and Johnson (2010) was applied. The linear model was estimated using the weighted least squares method, where the selected moderating acts as independent variables and the ES as the dependent variable, according to the expression:

$$d(ES) = \beta_0 + \beta_1 * (\textit{grass age}) + \beta_2 * (\textit{additive inclusion}) + \beta_3 * (\textit{silos opening}) + \beta_4 * (\textit{methodological quality}) + \beta_5 * (\textit{sample size}) + \beta_6 * (\textit{publication year}) + \varepsilon$$

(Equation 5)

Publication bias. To verify the presence of publication bias, the rank correlation methods, described by Begg and Mazumdar (1994), and linear regression analysis, proposed by Egger *et al.* (1997) were performed. Finally, to correct the bias, the trim & fill method (Duval and Tweedie 2000) was implemented.

Statistical packages used. Data from studies for meta-analysis were tabulated in Excel (2010) in matrix form. Each row corresponds to a study and the columns to the moderating variables that characterize them. To determine the agreement between the reviewers, the information was processed in the statistical package IBM-SPSS version 22 (2013). The calculation of the individual ES, the estimation using a random effects model, the heterogeneity inter- studies, the specific analyzes of the moderating variables and of the publication bias were carried out using the statistical package Comprehensive Meta-Analysis version 3.0 (Borenstein *et al.* 2014).

Luego, con todos los índices individuales de los TE se estimó mediante un modelo de efectos aleatorios un TE promedio para obtener un resultado resumen de la eficacia de los tratamientos, así como su intervalo de confianza al 95 % para informar la precisión del efecto (Borenstein *et al.* 2010).

Donde:

TE_j -estimaciones en torno al TE paramétrico (θ) para cada estudio ($j = 1, 2, \dots, k$)

e_j -error dado por la variabilidad intraestudios, que distribuye normalmente y de forma independiente con media cero y varianza σ_j^2 ;

ξ_j producto de la variabilidad entre-estudios y distribuye normalmente y de forma independiente con media cero y varianza U_j^2 .

Análisis de heterogeneidad. De acuerdo con Rubio *et al.* (2018), para comprobar la presencia de heterogeneidad entre-estudios se realizó la prueba Q de Cochran, cuyo resultado se complementó con el estadístico de inconsistencia (I^2). En caso de demostrar variabilidad entre-estudios, se utilizó la técnica de análisis de subgrupos para el análisis de las variables moderadoras cualitativas (Borenstein *et al.* 2010), y para las cuantitativas se aplicó el modelo de regresión (metaregresión), propuesto por Huedo y Johnson (2010). El modelo lineal se estimó mediante el método de los mínimos cuadrados ponderados, donde las moderadoras seleccionadas actúan como variables independientes y el TE como la variable dependiente, según la expresión:

Sesgo de publicación. Para verificar la presencia de sesgo de publicación se realizaron los métodos de correlación de rangos, descritos por Begg y Mazumdar (1994), y el análisis de regresión lineal, propuesto por Egger *et al.* (1997). Finalmente, para corregir el sesgo presente se implementó el método de trim & fill (Duval y Tweedie 2000).

Paquetes estadísticos empleados. Los datos de los estudios para el metaanálisis se tabularon en Excel (2010) en forma de matriz. Cada fila corresponde a un estudio y las columnas, a las variables moderadoras que los caracterizan. Para determinar la concordancia entre los revisores, se procesó la información en el paquete estadístico IBM-SPSS versión 22 (2013). El cálculo de los TE individuales, la estimación mediante un modelo de efectos aleatorios, la heterogeneidad entre-estudios, los análisis específicos de las variables moderadoras y del sesgo de publicación se ejecutaron mediante el paquete estadístico Comprehensive Meta-Analysis versión 3.0 (Borenstein *et al.* 2014).

Results and Discussion

Resultados y Discusión

The search by the information sources allowed locating a total of 197 studies. Once the inclusion criteria were verified in the full texts, a total of 16 studies were selected that were derived from 44 researchers and 194 observations, since sometimes the same study evaluated different energy sources with different inclusion levels. For the meta-analysis, the researchers were analyzed independently and each treatment was compared vs. the control. It is important to note that the minimum possible number of studies for meta-analysis is 10, since the methods for detecting publication bias are unreliable for lower values.

The values of the Kappa statistic for each information source were: 0.64; 0.68; 0.82; 0.80; 0.79, for Scielo, ResearchGate, EBSCO, ScienceDirect and CJAS, respectively. These results were higher than 0.60 in all cases, so the concordance is classified between adequate and excellent agreement, according to the scale proposed by Huedo and Johnson (2010).

In the evaluation of the methodological quality of the studies, it was observed that the researchers selected to carry out the meta-analysis fulfilled 9 or more of the 12 total criteria of the scale proposed by Torres *et al.* (2018), so the evaluation was considered of good methodological quality.

In the analysis of the average ES for the pH variable, it was observed (figure 1) that the weighted mean was $d=3.077$, with a confidence interval between 2.365 and 3.789, which shows that the mean ES was statistically significant, as it did not contain the null value in the interval (Huedo and Johnson 2010). In figure 1 it is important to show that most of the studies showed significant results in favor of the treatment (addition

La búsqueda por las fuentes de información permitió localizar un total de 197 estudios. Una vez verificados los criterios de inclusión en los textos completos, se seleccionaron 16 estudios que derivaron en 44 investigaciones y 194 observaciones, pues en ocasiones un mismo estudio evaluó diferentes fuentes energéticas con diferentes niveles de inclusión. Para el metaanálisis, las investigaciones se analizaron de forma independiente y se comparó cada tratamiento vs. el control. Es importante señalar que el número mínimo posible de estudios para el metaanálisis es de 10, pues los métodos de detección del sesgo de publicación son poco fiables para valores menores.

Los valores del estadístico Kappa por cada fuente de información fueron de: 0.64; 0.68; 0.82; 0.80; 0.79, para Scielo, ResearchGate, EBSCO, ScienceDirect y CJAS, respectivamente. Estos resultados fueron superiores a 0.60 en todos los casos, por lo que la concordancia se clasifica entre un acuerdo adecuado y excelente, según la escala propuesta por Huedo y Johnson (2010).

En la evaluación de la calidad metodológica de los estudios se observó que las investigaciones seleccionadas para realizar el metaanálisis cumplieron con 9 o más de los 12 criterios totales de la escala propuesta por Torres *et al.* (2018), por lo que la evaluación se considera de buena calidad metodológica.

En el análisis del TE promedio para la variable pH se observó (figura 1) que la media ponderada fue de $d=3.077$, con un intervalo de confianza entre 2.365 y 3.789, lo que indica que el TE medio fue estadísticamente significativo, al no contener el valor nulo en el intervalo (Huedo y Johnson 2010). En la figura 1 es importante señalar que la mayor parte de los estudios mostraron

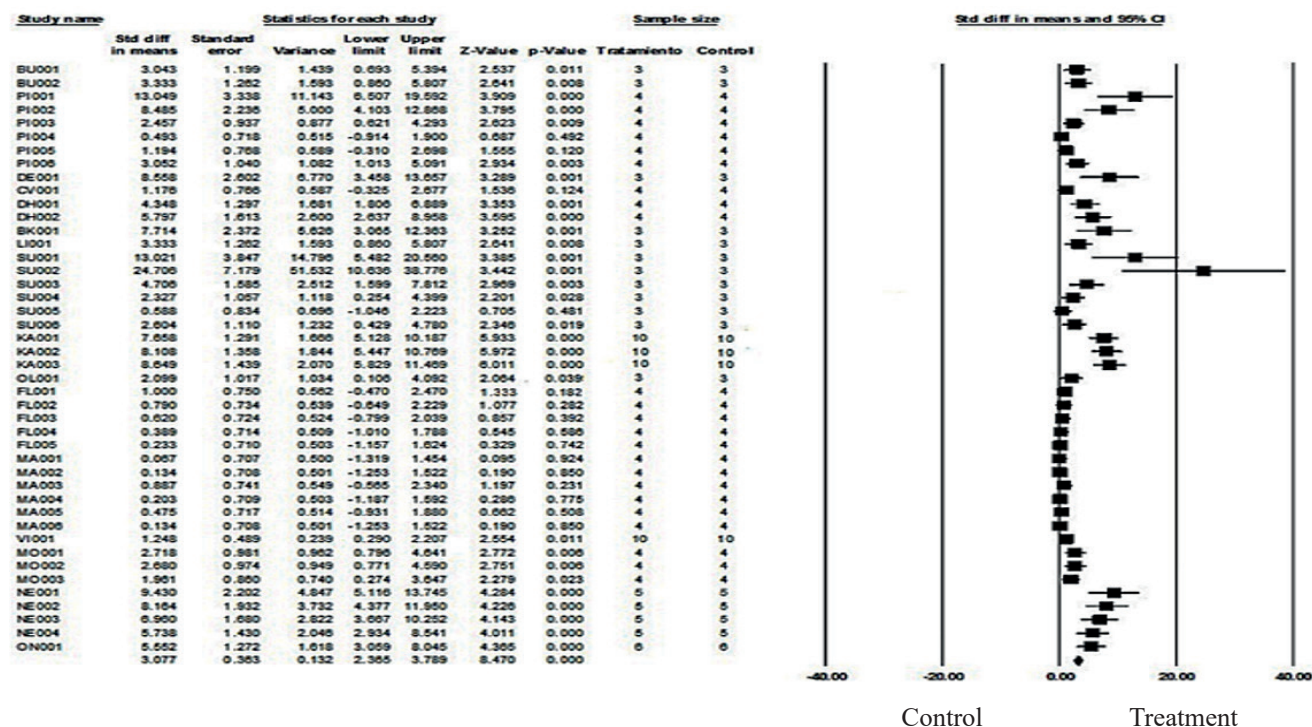


Figure 1. ES for the response variable p

of the energy additive) compared to the control, since the individual ES values were positive (right part of the graph). In this sense, it is corroborated that the addition of energy additives in the silage favors the decrease in pH (Rodríguez *et al.* 2017).

The heterogeneity analysis showed variability in the data with respect to pH, since the Q statistic showed significant differences with $P = 0.000$. The value of $I^2 = 82.8\%$ quantified the existing variability. In accordance with what was stated by Zimmermann *et al.* (2016), when this value is above 75 %, heterogeneity is classified as high. In addition, Rubio *et al.* (2018) suggest that when this index exceeds 50 %, it is necessary to analyze the moderating variables and determine how much they influence on the variability.

The subgroup analysis was carried out for the three qualitative moderating variables selected (type of additive, type of grass and experimental design) with their respective levels found in the literature. These levels correspond to rice meal, cassava meal, molasses and citrus pulp for the type of additive. The type of grass was fragmented into: *Cynodon nlemfuensis*, *Brachiaria decumbens*, *Manihot esculenta* (Leaves), *Panicum maximum* and *Cenchrus purpureus*. The experimental design was divided into: random block design (RBD), completely random design (CRD) and completely randomized with factorial arrangement. For the heterogeneity test of this type of analysis, the Q statistic was represented as Q_{between} (QB), and tested the homogeneity between the levels of each qualitative moderating variable analyzed (Villasís *et al.* 2020).

Table 1 shows how each moderating influences on the variability of the pH results. For each level of the variables, the mean ES, confidence intervals, amount of variability that it contributes in percentage (I^2), Q test and its significance were determined.

The results of table 1 showed that for the three moderating variables there are significant differences ($P = 0.000$) between the different levels, which allows us to analyze each one separately. In the case of type of additive variable, there was not substantial heterogeneity, since at all of the additive levels the values of the I^2 statistic are less than 50 % (Borenstein *et al.* 2010), so that the moderating variable type of additive did not influence on the all variability of the meta-analytic analysis.

For the type of grass variable, it was observed that *C. purpureus* showed more homogeneous results between the studies, since the I^2 index was less than 50 % (Borenstein *et al.* 2010). However, the rest of the grass showed high variability, with index higher than 75 % (Zimmermann *et al.* 2016), which could be related to the sample size. Alvarado and Butanero (2008) state that when the sample size is large enough, the distribution of means approximately follows a normal distribution with zero mean and constant variance (central limit theorem).

resultados significativos a favor del tratamiento (adición del aditivo energético) respecto al control, ya que los valores de los TE individuales fueron positivos (parte derecha del gráfico). En este sentido, se corrobora que la adición de aditivos energéticos en el ensilado favorece la disminución del pH (Rodríguez *et al.* 2017)

El análisis de heterogeneidad evidenció variabilidad en los datos con respecto al pH, pues el estadístico Q mostró diferencias significativas con $P=0.000$. El valor de $I^2=82.8\%$ cuantificó la variabilidad existente. De acuerdo con lo planteado por Zimmermann *et al.* (2016), cuando este valor se encuentra por encima de 75 %, la heterogeneidad se clasifica como alta. Además, Rubio *et al.* (2018) sugieren que cuando este índice supera 50 % es necesario analizar las variables moderadoras y determinar cuánto estas influyen en la variabilidad.

El análisis de subgrupo se realizó para las tres variables moderadoras cualitativas seleccionadas (tipo de aditivo, tipo de pasto y diseño experimental) con sus respectivos niveles encontrados en la literatura. Estos niveles corresponden a harina de arroz, harina de yuca, melaza y pulpa cítrica para el tipo de aditivo. La moderadora tipo de pasto se fragmentó en: *Cynodon nlemfuensis*, *Brachiaria decumbens*, *Manihot esculenta* (Hojas), *Panicum maximum* y *Cenchrus purpureus*. El diseño experimental se dividió en: diseño de bloques al azar (DBA), completamente aleatorizado (DCA) y completamente aleatorizado con arreglo factorial. Para la prueba de heterogeneidad de este tipo de análisis, el estadístico Q quedó representado como Q_{between} (QB), y probó la homogeneidad entre los niveles de cada variable moderadora cualitativa analizada (Villasís *et al.* 2020).

En la tabla 1 se muestra cómo influye cada moderadora en la variabilidad de los resultados del pH. Para cada nivel de las variables, se determinaron los TE medios, intervalos de confianza, cantidad de variabilidad que aporta en porcentaje (I^2), Q test y su significación.

Los resultados de la tabla 1 mostraron que para las tres variables moderadoras existen diferencias significativas ($P = 0.000$) entre los distintos niveles, lo que permite analizar cada una por separado. En el caso de la variable tipo de aditivo, no se encontró una heterogeneidad sustancial, ya que en todos los niveles del aditivo los valores del estadístico I^2 son inferiores a 50 % (Borenstein *et al.* 2010), por lo que la variable moderadora tipo de aditivo no influyó en la variabilidad general del análisis metaanalítico en cuestión.

Para la variable tipo de pasto se apreció que *C. purpureus* mostró resultados más homogéneos entre los estudios, pues el índice I^2 fue inferior a 50 % (Borenstein *et al.* 2010). Sin embargo, el resto de los pastos presentaron alta variabilidad, con índices superiores al 75 % (Zimmermann *et al.* 2016), lo que pudiera estar relacionado con el tamaño de muestra. Alvarado y Butanero (2008) plantean que cuando el tamaño de muestra es lo suficientemente grande, la distribución de las medias sigue aproximadamente una distribución

Table 1. Subgroup analysis for the moderating variables type of additive, type of grass and experimental design in pH

Moderating variables	Leves of moderating variables	Number of studies	d ₊	95 % CI		I ²	Q test and its significance
				D _{lower}	D _{upper}		
Type of additive	Rice meal	6	5.118 ± 0.619	3.905	6.331	30 %	Q _B =44.58 P=0.000
	Cassava meal	12	1.212 ± 0.224	0.773	1.650	24 %	
	Molasses	12	4.003 ± 0.433	3.153	4.852	15 %	
	Citrus pulp	8	0.589 ± 0.264	0.072	1.106	13 %	
Type of grass	<i>C. nlemfuensis</i>	6	3.318 ± 1.052	1.256	5.380	80 %	Q _B =10.137 P=0.000
	<i>B. decumbens</i>	4	7.138 ± 0.871	5.431	8.846	80 %	
	<i>M. esculenta</i> (leaves)	7	4.332 ± 1.247	1.888	6.777	79 %	
	<i>P. maximum</i>	4	5.863 ± 0.621	4.646	7.080	86 %	
	<i>C. purpureus</i>	20	1.115 ± 0.245	0.636	1.594	45 %	
Experimental design	RBD	5	0.596 ± 0.325	0.040	1.232	0 %	Q _B =28.19 P=0.000
	CRD	28	2.059 ± 0.187	1.693	2.425	85 %	
	CRD with factorial arrangement	9	1.903 ± 0.337	1.243	2.564	76 %	

In the analysis of the moderating variable experimental design, there were significant differences between the designs used in the research, the CRD with the greatest application with 28 studies. In addition, this simple classification design, as well as the factorial arrangement, showed high variabilities in the analysis, which could be associated with the differences between the experimental conditions of each of the studies. However, the RBD was only applied in five studies, and did not contribute to the variability of analysis (I² = 0 %) (Borenstein *et al.* 2010).

For the meta-regression analysis, a multiple linear regression was used, which allowed estimating the ES of the pH as a function of the quantitative variables. In the analysis, only the moderating that were significant in the model (P < 0.05) were taken into account (table 2).

normal con media cero y varianza constante (teorema central del límite).

En el análisis de la variable moderadora diseño experimental, se observaron diferencias significativas entre los diseños empleados en las investigaciones, con mayor aplicación el DCA con 28 estudios. Además, este diseño de clasificación simple, así como en arreglo factorial, presentó altas variabilidades en el análisis, lo que pudiera estar asociado a las diferencias entre las condiciones experimentales de cada uno de los estudios. Sin embargo, el DBA solo se aplicó en cinco estudios, y no aportó a la variabilidad de análisis (I² = 0 %) (Borenstein *et al.* 2010).

Para el análisis de metaregresión se utilizó una regresión lineal múltiple, que permitió estimar el TE del pH en función de las variables cuantitativas. En el análisis solo se tuvieron en cuenta las moderadoras que fueron significativas en el modelo (P < 0.05) (tabla 2).

Table 2. Values and significance of the regression parameters

Dependent variable	Intercept (β ₀)	Grass age (β ₁)	Additive inclusion (β ₂)	Silo opening (β ₃)	Sample size (β ₅)
pH	5.38	-0.06	-0.14	-0.02	0.87
	± 1.559	± 0.021	± 0.063	± 0.009	± 0.201
	P = 0.001	P = 0.005	P = 0.030	P = 0.024	P = 0.000

When considering equation 5, the parameters that were significant are substituted (table 2) and the

Al considerar la ecuación 5, se sustituyen en ella los parámetros que fueron significativos (tabla 2) y la

expression to estimate the ES of the dependent variable pH was as follows:

$$d([ES]_{pH}) = 5.38 - 0.06 * (Grass\ age) - 0.14 * (Additive\ inclusion) - 0.02 * (Silo\ opening) + 0.87 * (Sample\ size) + \varepsilon \quad (\text{Equation 6})$$

Equation 6 shows the linear relation between pH and the independent variables. In this way, to achieve adequate pH values in the silage, the grass age used for ensiling, the amount of additive that is added, as well as the days on which the silo is opened for use, must be taken into account. The sample size had a positive influence on the estimate.

Regarding the dependence between the pH and the grass age, it is suggested that the most common thing in tropical grasses is that as it ages, its content of structural carbohydrates increases and the CHS decreases. The latter constitute the fundamental substrate for the silage fermentation process, from which lactic acid is obtained, which then contributes to decrease the pH for the conservation of the material (Espinoza 2016).

Respect to the additive inclusion, it is important to point out that if the amount of fermentable substrate, necessary for adequate lactic fermentation, decreases, not enough lactic acid bacteria capable of producing the required lactic acid will develop and, therefore, the pH of the ensiled product increases (Valencia 2016).

For the days of silo opening, it must be taken into account that the stabilization process of the fermentative processes in the silage is achieved between 15 and 21 d, moment in which the microbial processes are attenuated and the accumulation of necessary lactic acid occur, able of obtaining a pH with optimal values for the conservation of the product with its nutritional properties (Espinoza 2016).

According to Rodríguez *et al.* (2017), for practical purposes, it must wait a month to proceed to its opening, although for experimental purposes it is recommended to wait between 45 and 60 d to evaluate the quality of the ensiled product. That is why, if the days required to open the silo decrease, an ensiled material that does not have the necessary quality could be obtained. In the studies for the meta-analysis, the average opening values were approximately 58 d, which are in the interval suggested by the literature.

Table 3 shows the statistical criteria of the multiple linear regression analysis for the variable pH. According to Sánchez *et al.* (2011), the Q statistic was represented as $Q_{\text{Regression}}$ (Q_R) and Q_{Error} (Q_E).

expresión para estimar el TE de la variable dependiente pH quedó de la siguiente forma:

La ecuación 6 muestra la relación lineal entre el pH y las variables independientes. De esta forma, para lograr valores adecuados de pH en el ensilado, se debe tener en cuenta la edad del pasto empleado para ensilar, la cantidad del aditivo que se adiciona, así como los días en los que se abre el silo para su utilización. El tamaño de muestra influyó de manera positiva en la estimación.

En cuanto a la dependencia entre el pH y la edad del pasto, se plantea que lo más común en las gramíneas tropicales es que en la medida que este envejece, aumenta su contenido de carbohidratos estructurales y disminuyen los CHS. Estos últimos constituyen el sustrato fundamental para el proceso de fermentación del ensilaje, de lo cual se obtiene el ácido láctico, que luego contribuye a disminuir el pH para la conservación del material (Espinoza 2016).

Con respecto a la inclusión del aditivo, es importante señalar que si disminuye la cantidad de sustrato fermentable, necesario para una adecuada fermentación láctica, no se desarrollarán suficientes bacterias ácido lácticas capaces de producir el ácido láctico que se requiere y, por tanto, aumenta el pH del producto ensilado (Valencia 2016).

Para los días de apertura del silo, se debe tener en cuenta que el proceso de estabilización de los procesos fermentativos en el ensilaje se logra entre los 15 y 21 d, momento en que se atenúan los procesos microbianos y se produce la acumulación del ácido láctico necesario, capaz de obtener un pH con valores óptimos para la conservación del producto con sus propiedades nutritivas (Espinoza 2016). Según Rodríguez *et al.* (2017), a efectos prácticos, se debe esperar un mes para proceder a su apertura, aunque con fines experimentales se recomienda esperar entre 45 y 60 d para evaluar la calidad del producto ensilado. Es por ello que, si disminuyen los días requeridos para abrir el silo, se pudiera obtener un material ensilado que no tiene la calidad necesaria. En los estudios para el metaanálisis, los valores promedios de apertura fueron aproximadamente a los 58 d, los cuales se encuentran en el intervalo sugerido por la literatura.

En la tabla 3, se muestran los criterios estadísticos del análisis de regresión lineal múltiple para la variable pH. De acuerdo con Sánchez *et al.* (2011), el estadístico Q quedó representado como $Q_{\text{Regression}}$ (Q_R) y Q_{Error} (Q_E).

Table 3. Statistical criteria of the regression model for the dependent variable pH

Dependent variable	Q_R	P	Q_E	P	R ²
pH	25.33	0.000	183.71	0.000	11 %

Table 3 shows that the Q_R statistic was significant ($P = 0.000$), which showed that the estimated variable with its predictor variables had a correct linear relation. The Q_E statistic was also significant ($p = 0.000$), which showed that there must be other moderating variables in addition to those analyzed, which influence on the variability of the estimated ES, results that coincide with what was reported by Sánchez *et al.* (2011).

In the analysis, a determination coefficient ($R^2=11\%$) was obtained, which corroborated the existence of other sources not studied, which may explain part of the variability of the data. Regarding this statistic, Huedo and Johnson (2010) report that these values will always be low or lower than the expected and it may even seem that the model does not have a good fit, but this type of result is something common in meta-analyses, due to the great source of variability associated with the different studies that were selected.

Fernández *et al.* (2019) consider that publication bias represents a risk for the validity of any meta-analysis due to the selective publication of articles, so it should always be assessed. Egger and Begg tests showed significance values with $p = 0.000$, which indicated the presence of bias. Subsequently, the trim and fill method allow to identify the number of missing studies and estimated a new fitted ES (table 4).

En la tabla 3 se muestra que el estadístico Q_R fue significativo ($P = 0.000$), lo que indicó que la variable estimada con sus variables predictoras presentaron una correcta relación lineal. El estadístico Q_E también fue significativo ($p = 0.000$), lo cual demostró que deben existir otras variables moderadoras además de las analizadas, que influyen en la variabilidad del TE estimado, resultados que coinciden con lo informado por Sánchez *et al.* (2011).

En el análisis se obtuvo un coeficiente de determinación ($R^2 = 11\%$), que corroboró la existencia de otras fuentes no estudiadas, que pueden explicar parte de la variabilidad de los datos. Con respecto a este estadístico, Huedo y Johnson (2010) informan que estos valores siempre serán bajos o menores a lo esperado e incluso, puede parecer que el modelo no presenta un buen ajuste, pero este tipo de resultado es algo común en los metaanálisis, por la gran fuente de variabilidad asociada a los diferentes estudios que se seleccionaron.

Fernández *et al.* (2019) consideran que el sesgo de publicación representa un riesgo para la validez de cualquier metaanálisis por la publicación selectiva de artículos, por lo que siempre se debe valorar. Las pruebas de Egger y Begg mostraron valores de significación con $p = 0.000$, lo cual indicó presencia de sesgo. Posteriormente, el método de trim y fill permitió identificar la cantidad de estudios faltantes y estimó un nuevo TE ajustado (tabla 4).

Table 4. Trim and fill method, applied to treat publication bias

Dependent variable	Number of missing studies to eliminate bias	d+	95 % CI	
			D _{lower}	D _{higher}
pH	8	2.379	1.631	3.126

Table 4 shows the result of the new estimated value of the ES fitted for bias ($d+ = 2.379$). The difference between the estimate of the original ES and its value corrected for significance was examined and it was analyzed if the original estimate remained within the confidence limits of the corrected ES. According to van Driel *et al.* (2009), the most important thing at this stage of the meta-analysis is not only knowing the existence of publication bias, but also its true impact on the conclusions of the study, so that its initial meaning does not change. Finally, the fitted result corroborates the effectiveness of the use of energy additives with respect to the control.

Conclusions

Despite the high variability found in the literature that was consulted ($I^2 > 75\%$), the meta-analysis techniques confirmed in a non-experimental way the favorable effect of using energy additives to benefit the fermentative process of silage, since these additives make possible to reduce the pH to suitable values for the conservation of the final product. These results had an impact on two important elements in the research process, saving time

En la tabla 4 se puede observar el resultado del nuevo valor estimado del TE ajustado para el sesgo ($d+=2.379$). Se examinó la diferencia entre la estimación del TE original y su valor corregido para la significancia y se analizó si la estimación original se mantenía en los límites de confianza del TE corregido. Según van Driel *et al.* (2009), lo más importante en esta etapa del metaanálisis no es solo conocer la existencia del sesgo de publicación, sino su verdadero impacto en las conclusiones del estudio, de modo que no cambie su sentido inicial. Finalmente, el resultado ajustado corrobora la efectividad del empleo de los aditivos energéticos con respecto al control.

Conclusiones

A pesar de la alta variabilidad encontrada en la literatura que se consultó ($I^2 > 75\%$), las técnicas de metaanálisis confirmaron de forma no experimental el efecto favorable de emplear aditivos energéticos para beneficiar el proceso fermentativo del ensilaje, ya que estos aditivos posibilitan disminuir el pH a valores adecuados para la conservación del producto final. Estos resultados tuvieron un impacto en dos elementos

and material and human resources. In this study, the description of each step of the methodology can be used as a guide to extrapolate and apply the meta-analysis to other spheres from the agricultural sector.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest among them.

Contribution of authors

Contribución de los autores

Mildrey Torres Martínez: Original idea, statistical analysis, paper writing

Magaly Herrera Villafranca: Statistical analysis, paper revision

Rafael Rodríguez Hernández: Data bases, paper revision

importantes en el proceso de investigación, el ahorro de tiempo y de recursos materiales y humanos. En este trabajo, la descripción de cada paso de la metodología puede servir de guía para extrapolar y aplicar el metaanálisis hacia otras esferas del sector agropecuario.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses entre ellos

Contribución de los autores

Mildrey Torres Martínez: Idea original, análisis estadístico y escritura del manuscrito

Magaly Herrera Villafranca: Análisis estadístico y revisión del manuscrito

Rafael Rodríguez Hernández: Base de datos y revisión del manuscrito

References

- Alvarado, H. & Batanero, C. 2008. "Significado del Teorema central del Límite en textos universitarios de probabilidad y estadística". *Estudios Pedagógicos*, 24(2): 7-28, ISSN: 0718-0705. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07052008000200001>.
- Begg, C.B & Mazumdar, M. 1994. "Operating characteristics of a rank correlation test for publication bias". *Biometrics*, 50(4): 1088-1101, ISSN: 1541-0420. <https://doi.org/10.2307/2533446>.
- Borenstein, M., Hedges, L.V., Higgins, J.P. & Rothstein, H. 2010. *Introduction to meta-analysis*. Ed. John Wiley & Sons. London, United Kingdom, p. 407, ISBN: 978-0-470-05724-7, Available: <https://www.meta-analysis-workshops.com/download/bookChapterSample.pdf>, [Consulted: September 21, 2020].
- Borenstein, M., Hedges, L.V., Higgins J.P. & Rothstein, H. 2014. *Comprehensive Meta-Analysis*. Versión 3.0. Biostat. New Jersey, USA.
- Botella, J. & Zamora, A. 2017. "El meta-análisis: una metodología para la investigación en educación". *Educación XXI*, 20(2): 17-38. ISSN: 1139-613x. <http://doi.org/10.5944/educXXI.18241>.
- Cortés, L.J. & Guerra, A.P. 2020. "Análisis de concordancia de tres pruebas para el diagnóstico de malaria en la población sintomática de los municipios endémicos de Colombia". *Biomédica*, 40(1): 117-128, ISSN: 2590-7379. <http://doi.org/10.7705/biomedica.4893>.
- Duval, S. & Tweedie, R. 2000. "Trim and fill: a simple funnel plot based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis". *Biometrics*, 56(2): 455-463, ISSN: 1541-0420. <https://doi.org/10.1111/j.0006-341x.2000.00455.x>.
- Egger, M., Smith, G.D., Schneider, M. & Minder, C. 1997. "Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test". *BJM*, 315: 629-634, ISSN: 1468-5833. <https://doi.org/10.1136/bjm.315.7109.629>.
- Espinoza, I.F. 2016. Características fermentativas y nutritivas de ensilajes de forrajes tropicales con diferentes niveles de inclusión de residuos agroindustriales de cáscara de maracuyá (*Pasiflora edulis*). PhD Thesis. Universidad de Córdoba, Córdoba, España.
- Huedo, T. & Johnson, B.T. 2010. Modelos estadísticos en meta-análisis. Bello, L. (ed.). Ed. NETBIBLO. Madrid, España, p. 74, ISBN: 978-84-9745-525-1, Available: <<https://www.agapea.com/libros/modelos-estadisticos-en-meta-analisis-9788497455251-i.htm>>, [Consulted: August 10, 2020].
- IBM-SPSS. 2013. *Statistical Package for the Social Sciences*. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. IBM Corporation, Armonk, New York, USA.
- Microsoft Excel, Version 14.0. 2010. Microsoft Corporation. USA.
- Mikolajewicz, N. & Komorova, S.V. 2019. "Meta-analytic methodology for basic research: a practical guide". *Frontiers in Physiology*, 10(203): 1-20, ISSN: 1664-042x. <http://doi.org/10.3389/fphys.2019.0020>.
- Rodríguez, R., Michelena, J.B., Torres, M., Elías, A., Gutiérrez, D. & Iraola, J. 2017. *Ensilajes de calidad con forrajes tropicales. Alternativas para el ganadero en Cuba*. Ed. EDICA. Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba, p. 59.
- Rubio, M., Sánchez, J., Marín, F. & López, J.A. 2018. "Recomendaciones para el reporte de revisiones sistemáticas y meta-análisis". *Anales de Psicología*, 34(2): 412-420, ISSN: 1695-2294. <http://dx.doi.org/10.6018/analesps.34.2.320131>.
- Sánchez, J., Marín, F. & López, J.A. 2011. "Meta-analysis and Evidence-Based Psychosocial Intervention". *Psychosocial Intervention*, 20(1): 95-107, ISSN: 1132-0559. <http://doi.org/10.5093/in2011v20n1a9>.
- Shah, A., Jones, M.P. & Holtman, G.J. 2020. "Basics of meta-analysis". *Indian Journal of Gastroenterology*, 39(6): 503-513, ISSN: 0254-8860. <https://doi.org/10.1007/s12664-020-01107-x>.
- Toledo, A., Frizzo, L., Signorini, M., Bossier, P. & Arenal, A. 2018. "Impact of probiotics on growth performance and shrimp survival: a meta-analysis". *Aquaculture*, 500: 196-205, ISSN: 0044-8486. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.018>.
- Torres, M., Rodríguez, R. & Herrera, M. 2018. "Diseño de escala para evaluar la calidad metodológica de estudios relacionados con el valor nutritivo de ensilajes para rumiantes. Estudio piloto". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 54 (4): 383-388, ISSN: 2079-3480.
- Valencia, A.F. 2016. Los ensilajes: una mirada a esta estrategia de conservación de forraje para la alimentación animal en el

- contexto colombiano. Diploma Thesis. Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia.
- Villasís, M.A., Rendón, M.E., García, H., Miranda, M.G. & Escamilla, A. 2020. "La revisión sistemática y el meta-análisis como herramientas de apoyo para la clínica y la investigación". *Revista Alergia México*, 67(1): 62-72, ISSN: 2448-9190. <http://dx.doi.org/10.29262/ram.v67I1.733>.
- van Driel, M.L., de Sutter, A., de Maeseneer, J. & Christiaens, T. 2009. "Searching for unpublished trials in Cochrane reviews may not be worth the effort. *Journal of Clinical Epidemiology*, 62(8): 838-844, ISSN: 1878-5921. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2008.09.010>.
- Zimmermann, J.A., Fusari, M.L., Rossler, E., Blajman, J.E., Romero, A., Astesana, D.M., Olivero, C.R., Berisvil, A.P., Signorini, M.L., Zbrun, M.V., Frizzo, L.S. & Soto, L.P. 2016. "Effects of probiotics in swines growth performance: a meta-analysis of randomized controlled trials". *Animal Feed Science and Technology*, 219: 280-293, ISSN: 0377-8401. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.06.021>.

Received: May 25, 2021

Accepted: November 24, 2021