

## Effects of including sweet potato (*Ipomoea batatas*) and Vitafert as additives on the nutritional value of *Cenchrus purpureus* cv. CUBA CT-169 and *Moringa oleifera* silages

### Efectos de incluir tubérculos de boniato (*Ipomoea batatas*) y Vitafert como aditivos en el valor nutritivo de ensilajes de *Cenchrus purpureus* cv. CUBA CT-169 y *Moringa oleifera*

R. Rodríguez<sup>1</sup>, F. Herrera<sup>1</sup>, S. Gómez<sup>1</sup>, N. González<sup>1</sup>, J. Alonso Galeana<sup>2</sup>, A. Elías<sup>1</sup>, O. Moreira<sup>1</sup>, L. Sarduy<sup>1</sup>, and Y. Medina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencia Animal, Carretera Central km 47 ½, San José de las Lajas, Apartado Postal 24

<sup>2</sup>Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Guerrero, Cd. Altamirano, Guerrero, México

Email: rrodriguez@ica.co.cu

The effect of including Vitafert (0 and 1 %) and sweet potato (0, 5, 10 and 15 %) on the nutritional value of mixed silages of *C. purpureus* cv. CUBA CT-169 and *M. oleifera* was evaluated. There were no differences on dry matter content, crude protein, and neutral detergent fiber of evaluated silages ( $P > 0.05$ ). Organic matter was superior to 85% and differed between control and treatment with 10% of sweet potato ( $P < 0.05$ ). Both additives increased the production of acetic acid regarding control ( $P < 0.0001$ ). Only silage with Vitafert and 15% of sweet potato reduced levels of  $\text{NH}_3$  regarding control ( $P < 0.001$ ). In gas production, there was interaction between the two factors in the first stage of fermentation ( $P < 0.05$ ). In the first three times of the initial phase, silage with Vitafert produced more gas than control, but there were no differences regarding the rest, except at 2 h. In the final stage of fermentation, there was no interaction between treatments and times. There was a tendency to increase the potential of gas production and  $V_{\text{max}}$ , with the inclusion of Vitafert and increase of tuber levels. The inclusion of additives decreased  $\text{NH}_3$  levels and increased acetic and butyric acids, as well as SCFAs, ME and OMD ( $P < 0.01$ ). The IVDDM increased with the inclusion of sweet potato ( $P < 0.0001$ ). It can be concluded that Vitafert and sweet potato additives, at the evaluated concentrations, had no significant influence on chemical composition of mixed silages but both additives improved the fermentative characteristic of silages by reducing the levels of butyric acid and increasing propionic acid levels. Likewise, its use optimized the performance of kinetic parameters of *in vitro* fermentation and increased gas production, total and individual SCFAs, IVDDM, ME and OMD, having a positive effect of sweet potato inclusion level on several of these indicators.

Key words: mixed silage, quality, additives, gas production

In tropical areas, silage production is a viable alternative for maintaining animal production and minimizing the effects of availability of grasses for ruminants due to their seasonality. *Cenchrus purpureus* is among the most promising forages of this region for silage production, with a production that ranges between 15 and 43 t of dry matter (DM)  $\text{ha}^{-1} \text{year}^{-1}$  (García *et al.* 2014 and Monteiro *et al.* 2016). In Cuba, it is the most used forage species after sugar cane due to its high biomass production, good leaf

Se evaluó el efecto de la inclusión de Vitafert (0 y 1 %) y tubérculos de boniato (0, 5, 10 y 15 %), en el valor nutritivo de ensilajes mixtos de *C. purpureus* cv. CUBA CT-169 y *M. oleifera*. No se apreció diferencias en el contenido de materia seca, proteína bruta, y fibra detergente neutro de los ensilajes evaluados ( $P > 0.05$ ). La materia orgánica fue mayor al 85% y solo difirió entre control y tratamiento con 10% de boniato ( $P < 0.05$ ). Ambos aditivos incrementaron la producción de ácido acético respecto al control ( $P < 0.0001$ ). Solo el ensilaje con Vitafert y 15% de boniato redujeron los niveles de  $\text{NH}_3$  respecto al control ( $P < 0.001$ ). En la producción de gas hubo interacción entre los dos factores en la primera fase de la fermentación ( $P < 0.05$ ). En los tres primeros horarios de la fase inicial, el ensilaje con Vitafert produjo más gas que el control, pero no mostró diferencias respecto al resto, excepto a las dos horas. En la fase final de la fermentación no hubo interacción entre tratamientos y horarios ( $P > 0.05$ ), y los aditivos mejoraron la producción de gas ( $P < 0.0001$ ). Hubo una tendencia al incremento en el potencial de producción de gas y  $V_{\text{max}}$ , al incluir Vitafert e incrementar los niveles de tubérculo. La inclusión de aditivos disminuyó  $\text{NH}_3$  e incrementó ácidos acético y butírico, así como AGCC totales, EM y DMO ( $P < 0.01$ ). Se incrementó la DIVMS al incluir boniato ( $P < 0.0001$ ). Se concluye que los aditivos Vitafert y tubérculo de boniato, a las concentraciones evaluadas, no influyeron significativamente en la composición química de los ensilados mixtos pero ambos aditivos mejoraron las características fermentativas de los ensilajes al reducir los niveles de ácido butírico e incrementar propiónico. De igual manera, su uso optimizó el comportamiento de los parámetros cinéticos de la fermentación *in vitro* e incrementó la producción de gas y AGCC individuales y totales, la DIVMS, EM y DMO, con un efecto positivo del nivel de inclusión del boniato en varios de estos indicadores.

Palabras clave: ensilajes mixtos, calidad, aditivos, producción de gas

En el trópico, la producción de ensilaje constituye una alternativa viable para mantener la producción animal y minimizar los efectos de la disponibilidad de pastos para los rumiantes debido a la estacionalidad de los mismos. Entre los forrajes más promisorios en esta región para la producción de ensilajes está *Cenchrus purpureus*, con una producción que oscila entre 15 y 43 t de materia seca (MS)  $\text{ha}^{-1} \text{año}^{-1}$  (García *et al.* 2014 y Monteiro *et al.* 2016). En Cuba es la especie forrajera más utilizada después de la caña de azúcar, debido a su alta producción de biomasa,

proportion, rusticity and adaptation to a great diversity of soils and adverse climate conditions (García *et al.* 2014). There are many studies on silages based on *C. purpureus*, including clones obtained at the Instituto de Ciencia Animal (ICA) like Cuba OM-22 (Castaño and Villa 2017) and Cuba CT-169 (Morales *et al.* 2016 and Rodríguez *et al.* 2017).

Production of mixed silages, including protein shrubs, allows the nutritional value of silage to be improved, since tropical grasses have a low nutritional quality, even without being subjected to anaerobic fermentation process for their conservation. Among the protein shrubs, *Moringa oleifera* is recognized for its high nutritional quality, high protein content and good production of green biomass (Nouman *et al.* 2014). However, the inclusion of high levels of crude protein (CP) could negatively influence on silage quality, because the higher the protein content in fresh forage, the greater will be its buffer capacity or resistance to pH change during the fermentation process (Otero and Esperance 1994). Therefore, under production conditions, it is recommended to include only between 20 and 40% of the shrub in the silages (Rodríguez *et al.* 2017).

In addition, forages of tropical grasses generally have low contents of soluble carbohydrates (Ferrerira *et al.* 2015), which are fundamental substrates for lactic acid bacteria that guarantee an adequate conservation of plant material. Therefore, the use of energy and microbial additives can help ensure a quality silage for its use in ruminant feed. Sweet potato tuber (*Ipomoea batatas*) is considered a good source of energy because it has high contents of starch (more than 20 %) and sugars (5-6 %), which generally constitute more than 80% of its DM and are generally higher than those of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) and maize (*Zea mays* L.) (Jusuf and Ginting 2017). On the other hand, Vitafert is a biological product, developed in the ICA, which is considered as an activator of fermentation because it stimulates the production of organic acids and lowers pH (Elías and Herrera 2011).

The combination of chemical composition analysis with the estimation of chemical indicators and fermentation kinetics parameters is a good research tool to predict the nutritional value of a food (Mtui *et al.* 2009). The objective of this study was to evaluate the effect of the inclusion of the biological product Vitafert and sweet potato tuber on the nutritional value of mixed silages of *C. purpureus* cv. CUBA CT-169 and *M. oleifera* for ruminants, by means of the analysis of chemical composition and *in vitro* fermentation of ensiled products.

### Materials and Methods

*Plant material.* *C. purpureus* cv. Cuba CT-169 and *M. oleifera* (moringa) forage plants, with 90 and 60 days of age, respectively, were collected in the experimental

buena proporción de hojas, rusticidad y adaptación a una gran diversidad de suelos y condiciones climáticas adversas (García *et al.* 2014). Existen muchos estudios sobre ensilajes basados en *C. purpureus*, incluyendo clones obtenidos en el Instituto de Ciencia Animal (ICA) como el Cuba OM-22 (Castaño y Villa 2017) y el Cuba CT-169 (Morales *et al.* 2016 y Rodríguez *et al.* 2017).

La producción de ensilajes mixtos en los que se incluyen arbustivas proteicas permite mejorar el valor nutritivo del alimento ensilado, ya que las gramíneas tropicales tienen baja calidad nutricional, aún sin someterse al proceso de fermentación anaeróbica para su conservación. Entre las arbustivas proteicas, *Moringa oleifera* se reconoce por su alta calidad nutricional, elevados contenidos proteicos y buena producción de biomasa verde (Nouman *et al.* 2014). Sin embargo, la inclusión de altos niveles de proteína bruta (PB) podría influir negativamente en la calidad del ensilaje pues a mayor contenido de proteína en el forraje fresco, mayor será su capacidad tampón o resistencia al cambio de pH durante el proceso fermentativo (Otero y Esperance 1994). Por ello, en condiciones de producción se recomienda incluir solo entre 20 y 40 % de la arbustiva en los ensilajes (Rodríguez *et al.* 2017).

Además, los forrajes de gramíneas tropicales generalmente tienen bajos contenidos de carbohidratos solubles (Ferrerira *et al.* 2015), sustratos fundamentales para las bacterias lácticas que son las que garantizan una adecuada conservación del material vegetal. Por ello, el uso de aditivos energéticos y microbianos puede contribuir a garantizar un producto ensilado de calidad para su empleo en la alimentación de rumiantes. El tubérculo de boniato (*Ipomoea batatas*) se considera una buena fuente energética porque tiene altos contenidos de almidón (más del 20 %) y azúcares (5-6 %), que constituyen generalmente más del 80 % de su MS y generalmente son superiores a los de la yuca (*Manihot esculenta*, Crantz) y el maíz (*Zea mays* L.) (Jusuf y Ginting 2017). Por su parte, el Vitafert es un producto biológico, desarrollado en el ICA, que se considera un activador de la fermentación porque estimula la producción de ácidos orgánicos y disminuye el pH (Elías y Herrera 2011).

La combinación de los análisis de composición química con la estimación de indicadores químicos y los parámetros de la cinética de fermentación, es una buena herramienta de investigación para predecir el valor nutritivo de un alimento (Mtui *et al.* 2009). Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inclusión del producto biológico Vitafert y tubérculo de boniato en el valor nutritivo para rumiantes de ensilajes mixtos de *C. purpureus* cv. CUBA CT-169 y *M. oleifera*, mediante el análisis de la composición química y la fermentación *in vitro* de los productos ensilados.

### Materiales y Métodos

*Material vegetal.* Las plantas forrajeras *C. purpureus* cv. Cuba CT-169 y *M. oleifera* (moringa) de 90 y 60 días de edad, respectivamente, se recolectaron en las áreas

areas of the ICA, in typical red ferralitic soil, of rapid desiccation and uniform profile (Hernández *et al.* 2015). It is located between 22° 58 N and 82° 02 W and 80 m above sea level. Grass and tree materials were obtained by manual cut. Both materials were freshly carried, chopped in a forage mill until they reached a particle size of 20-30 mm and dried in the sun one day to increase their DM up to 25-30 %.

*Silage production.* A 70:30 mixture of CT-169 and moringa was prepared, which constituted the fibrous and protein basis of the silages to be evaluated. This was considered as control treatment. As an amylaceous source and energy additive, sweet potato tuber (*Ipomoea batatas*) was used in four levels of inclusion (0, 5, 10 and 15 % of the total mixture). Sweet potatoes of small and medium size were used, without cleaning but without adhered soil, which were cut lengthwise into pieces and then into thin sheets ( $\pm 1.0$  mm wide and a diameter smaller than 20 mm).

The biological product Vitafert (1 %) was used as a microbial additive to the silage, which was obtained by fermenting a mixture of final molasses from sugar cane, soybeans, maize, urea, magnesium sulfate, mineral formulas and yogurt as microbial inoculum (Elías and Herrera 2011). For its production, a 250 L capacity stainless steel fermenter was used, with a central piece to homogenize the mixture and an automatic regulator to control the stirring and resting time at 120 and 20 minutes, respectively (Bustamante 2014).

The production of microsilos was carried out in PVC tubes (24 cm x 10 cm), with capacity for 450 g of fresh forage (Gutiérrez *et al.* 2015). The core of CT-169 and moringa was mixed according to the treatment with the corresponding level of sweet potato and then the Vitafert was sprayed to the obtained mixtures. Treatments were introduced into microsilos and the material was compacted with a tamping tool. Finally, the microsilos were hermetically sealed and kept for 64 days in a protected and dry place. Six microsilos were prepared per treatment. Formulations of evaluated silages were:

1. {CT-169 + Moringa} (100 %) (Control silage)
2. {CT-169 + Moringa} (100 %) +Vitafert (1 %) (silage+Vitafert)
3. {CT-169 + Moringa} (95 %) +Vitafert (1 %) + sweet potato (5 %) (silage+Vitafert+5 %sweet potato)
4. {CT-169 + Moringa} (90 %) +Vitafert (1 %) + sweet potato (10 %) (silage+Vitafert+10%sweet potato)
5. {CT-169 + Moringa} (85 %) +Vitafert (1 %) + sweet potato (15%) (silage+Vitafert+15%sweet potato)

At the end of the silage process, when microsilos were opened, a sample of 10 g of each was taken, 90 mL of distilled water was added and it was mixed in an orbital shaker at 250 rpm for 15 minutes at 20 °C. Then, the mixture was filtered through gauze and samples were taken from the filtrate for analysis of short

experimentales del ICA, en suelo ferralítico rojo típico, de rápida desecación y perfil uniforme (Hernández *et al.* 2015); ubicado entre el 22° 58 LN y los 82° 02 LO y a 80 m sobre el nivel del mar. Tanto la gramínea como el material arbóreo se obtuvieron por corte manual. Ambos materiales se acarrearón frescos, se trocearon en un molino forrajero hasta alcanzar un tamaño de partícula de 20–30 mm y se secaron al sol un día para incrementar su MS hasta 25-30 %.

*Elaboración de los ensilajes.* Se preparó una mezcla 70:30 de CT-169 y moringa, lo que constituyó el núcleo fibroso y proteico de los ensilados a evaluar. Este se consideró el tratamiento control. Como fuente amilácea y aditivo energético, se empleó el tubérculo de boniato (*Ipomoea batatas*) en cuatro niveles de inclusión (0, 5, 10 y 15 % de la mezcla total). Se utilizaron tubérculos de boniatos de pequeño y mediano tamaño, sin limpiar pero sin tierra adherida, los que se cortaron longitudinalmente en trozos y luego en láminas finas ( $\pm 1,0$  mm de ancho y un diámetro menor a 20 mm).

Como aditivo microbiano a los ensilados se empleó el producto biológico Vitafert (1 %), el que se obtuvo por la fermentación de una mezcla de miel final de caña de azúcar, soya, maíz, urea, sulfato de magnesio, fórmulas minerales y yogurt como inóculo microbiano (Elías y Herrera 2011). Para su elaboración se utilizó un fermentador con capacidad de 250 L, de acero inoxidable, con una paleta central para homogenizar la mezcla y un regulador automático para controlar el tiempo de agitación y reposo a 120 y 20 minutos, respectivamente (Bustamante 2014).

La elaboración de los microsilos se realizó en tubos de PVC (24 cm x 10 cm), con capacidad para 450 g de forraje fresco (Gutiérrez *et al.* 2015). El núcleo de CT-169 y moringa se mezcló según el tratamiento con el nivel de boniato correspondiente y luego se asperjó el Vitafert a las mezclas obtenidas. Los tratamientos se introdujeron en los microsilos y el material se compactó con un pisón. Finalmente, los microsilos se cerraron herméticamente y se conservaron por 64 días en un local protegido y seco. Se prepararon seis microsilos por tratamiento. Las formulaciones de ensilajes evaluadas fueron:

1. {CT-169 + Moringa} (100 %) (Ensilaje Control)
2. {CT-169 + Moringa} (100 %) +Vitafert (1 %) (Ensilaje+Vitafert)
3. {CT-169 + Moringa} (95 %) +Vitafert (1 %) + Boniato (5 %) (Ensilaje+Vitafert+5 %Boniato)
4. {CT-169 + Moringa} (90 %) +Vitafert (1 %) + Boniato (10 %) (Ensilaje+Vitafert+10%Boniato)
5. {CT-169 + Moringa} (85 %) +Vitafert (1 %) + Boniato (15 %) (Ensilaje+Vitafert+15%Boniato)

Al finalizar el proceso de ensilaje, al abrir los microsilos se tomó una muestra de 10 g de cada uno, se le añadió 90 mL de agua destilada y se mezcló en zaranda orbital a 250 rpm durante 15 minutos, a 20 °C. Luego la mezcla se filtró en gasa y del filtrado se tomaron muestras para análisis de ácidos grasos de cadena corta



chain fatty acids (SCFA) and  $\text{NH}_3$ .

Additionally, approximately 200 g were taken from each microsilos. Samples were dried for 72 h, in forced air oven, with regulated temperature (60 °C). Then, they were milled in a hammer mill until they reached a particle size of 1 mm. Later, half of the dried material from each microsilos was individually stored in sealed nylon bags until the chemical composition analysis was conducted. The rest of the dried material was homogeneously mixed by treatment and the obtained pool was also stored in sealed nylon bags until its use in *in vitro* evaluations.

*In vitro experimental procedure.* The *in vitro* technique of gas production in glass bottles, described by Theodorou *et al.* (1994), was applied. An amount of 1.0 g of DM from each treatment was incubated in 100 mL bottles, in culture medium (Menke and Steingass 1988) and an inoculum of ruminal microorganisms, in proportion of 0.20 of total incubation volume (80 mL), was also incubated.

The ruminal content of two Siboney de Cuba cows, cannulated in rumen, was used as inoculum. These cows were fed *ad libitum* with forage grasses and with free access to water and mineral salts. The ruminal content of each animal was collected before offering food in the morning and kept in closed thermos to reach the laboratory, where it was filtered through several layers of gauze and the two inocula were mixed in equal proportions. During the process, temperature of the inocula was  $39 \pm 1^\circ\text{C}$ , and the conditions of anaerobiosis by continuous flow of  $\text{CO}_2$  were maintained. Bottles were sealed and incubated in a water bath at a controlled temperature (39 °C). That moment was taken as the zero hour of the incubation.

Gas production was measured by means of an HD8804 manometer, coupled to a TP804 pressure gauge (DELTA OHM, Italy). After each measurement, the gas was released to equalize the external and internal pressures of the bottles. The volume of gas was estimated from the pressure data using a pre-established linear regression equation (Rodríguez *et al.* 2013):

$$\text{Gas (mL)} = (\text{pressure [103 Pa]} + 4.95) / 2.5858$$

(n = 132;  $R^2 = 0.9821$ )

The volume of gas was expressed per gram of incubated (OMinc) organic matter (OM).

Two *in vitro* tests were performed. In the first of the tests, gas production was measured at 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 30, 48, 72 and 96 hours of incubation to estimate kinetic parameters of fermentation of the evaluated silages, by using the single-phase Gompertz model:

$$Y = A * \text{Exp}(-B * \text{Exp}(-C * t))$$

Where:

Y- is the gas production at time t (mL g<sup>-1</sup> MOinc)

A- is the gas production potential (asymptote when  $t = \infty$ ; mL g<sup>-1</sup> OMinc).

B- is the relative gas production rate

Cuban Journal of Agricultural Science, Volume 53, Number 2, 2019.  
(AGCC) y  $\text{NH}_3$ .

Adicionalmente, se tomaron aproximadamente 200 g de cada microsilos. Las muestras se secaron durante 72 h, en estufa de aire forzado, con temperatura regulada (60 °C). Luego, se molieron en molino de martillo hasta alcanzar tamaño de partícula de 1 mm. Posteriormente, la mitad del material seco de cada microsilos se almacenó de manera individual en bolsas de nailon selladas hasta que se les hizo el análisis de composición química. El resto del material seco se mezcló homogéneamente por tratamiento y el pool obtenido también se almacenó en bolsas de nailon selladas hasta su empleo en las evaluaciones *in vitro*.

*Procedimiento experimental in vitro.* Se aplicó la técnica *in vitro* de producción de gas en botellas de vidrio, descrita por Theodorou *et al.* (1994). Se incubó 1.0 g de MS de cada tratamiento en botellas de 100 mL, en medio de cultivo (Menke y Steingass 1988) y un inóculo de microorganismos ruminales, en proporción de 0.20 del volumen total de incubación (80 mL).

Se utilizó como inóculo el contenido ruminal de dos vacas Siboney de Cuba canuladas en rumen, alimentadas *ad libitum* con forraje de gramíneas y con libre acceso a agua y sales minerales. El contenido ruminal de cada animal se recolectó antes de ofrecer el alimento en la mañana y se conservó en termos cerrados hasta llegar al laboratorio, donde se filtró a través de varias capas de gasa y los dos inóculos se mezclaron en proporciones iguales. Durante el proceso, se mantuvo la temperatura de los inóculos de  $39 \pm 1^\circ\text{C}$ , y las condiciones de anaerobiosis mediante flujo continuo de  $\text{CO}_2$ . Las botellas se sellaron y se incubaron en baño de agua a temperatura controlada (39 °C). Se tomó ese momento como la hora cero de la incubación.

La producción de gas se midió por medio de un manómetro HD8804, acoplado a un calibrador de presión TP804 (DELTA OHM, Italy). Después de cada medición, se liberó el gas hasta igualar las presiones externa e interna de las botellas. Se estimó el volumen de gas a partir de los datos de presión mediante una ecuación de regresión lineal pre-establecida (Rodríguez *et al.* 2013):

$$\text{Gas (mL)} = (\text{presión [103 Pa]} + 4.95) / 2.5858$$

(n = 132;  $R^2 = 0.9821$ )

El volumen de gas se expresó por gramo de materia orgánica (MO) incubada (MOinc).

Se realizaron dos ensayos *in vitro*. En el primero de los ensayos se midió la producción de gas a las 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 30, 48, 72 y 96 horas de incubación para estimar los parámetros cinéticos de la fermentación de los ensilajes evaluados, mediante el empleo del modelo monofásico de Gompertz:

$$Y = A * \text{Exp}(-B * \text{Exp}(-C * t))$$

Donde:

Y- es la producción de gas al tiempo t (mL g<sup>-1</sup> MOinc)

A- es el potencial de producción de gas (asíntota cuando  $t = \infty$ ; mL g<sup>-1</sup> MOinc).

B- es la tasa relativa de producción de gas

C- is a constant factor of microbial efficiency ( $h^{-1}$ )

t- is the incubation time (h)

In addition, the time at which the maximum gas production speed ( $TV_{max}$ ) was reached was estimated from the second derivative of the Gompertz model, evaluated at zero (inflection point of the sigmoidal model). Maximum gas production speed ( $V_{max}$ ,  $mL\ g^{-1}\ OMinc\ h^{-1}$ ) was also estimated, when replacing  $TV_{max}$  in the first derivative of the model (Rodríguez *et al.* 2013).

In the second trial, incubation was carried out until 24 h. At that time, fermentation was stopped and the bottles opened and their content was filtered through nylon bags (45  $\mu m$  pore size) to separate the solid phase from the incubation liquid. Samples were taken from the filtrate and preserved with a deproteinizing solution ( $H_3PO_4$  [2 %]) for the analysis of individual SCFA and with HCl (0.2 N) to determine ammonia. The preserved samples were stored at  $-20\ ^\circ C$  until analysis.

The bags with fermentation residues were dried for 72 h in a forced air oven with a regulated temperature ( $60\ ^\circ C$ ). The *in vitro* degradability of dry matter (IVDDM) was determined by gravimetry, as the difference between DM in the incubated substrate and in the solid residue of fermentation, divided by the incubated DM in each bottle (Blümmel *et al.* 1997).

The metabolizable energy (ME) and organic matter digestibility (OMD) at 24 h of mixed silages were estimated from the equations proposed by Menke *et al.* (1979):

$$DM\ (MJ\ kg^{-1}\ DM) = 2.20 + 0.136\ PG24h + 0.057\ CP$$

$$BMD\ (\%) = 14.88 + 0.889\ PG24h + 0.45\ CP$$

Where, PG24h was the volume of gas produced at 24 h ( $mL \cdot 200\ mg^{-1}$  incubated DM) and CP is expressed in percent.

*Chemical analysis.* DM, OM and CP were determined to the samples (AOAC 2016). Neutral detergent fiber (NDF) was obtained by the procedure described by Van Soest *et al.* (1991) and ammonia analyzes were performed by colorimetry (Chaney and Marbach 1962).

Concentration of individual SCFAs in the preserved samples was determined by gas chromatography, by injecting 0.5  $\mu L$ , after centrifugation of the vials at  $14,200 \times g$  (Centrifuge ECEN-205, MRC Ltd., Hagsvish, Israel) for 8 minutes. A DANI Master GC gas-liquid chromatographer (DANI Instruments S.p.A, Milan, Italy) was used, equipped with a capillary column DN-FFAP (30 m long, internal diameter 0.32 mm, film thickness 0.25  $\mu$ ) and an FID detector.  $H_2$  was used as carrier gas and  $N_2$  as auxiliary gas. Maximum temperature of the injector and the detector was set at 200 and  $250\ ^\circ C$ , respectively. Individual SCFAs determined in the case of mixed silage were expressed as percent of the DM, while the individual SCFAs obtained in the gas production tests were expressed in  $mmole\ L^{-1}$ . Total

C- es un factor constante de la eficiencia microbiana ( $h^{-1}$ )

t- es el tiempo de incubación (h)

Además, se estimó el tiempo al que se alcanzó la velocidad máxima de producción de gas ( $TV_{max}$ ), a partir de la segunda derivada del modelo de Gompertz, evaluada en cero (punto de inflexión del modelo sigmoidal). También se estimó la velocidad máxima de producción de gas ( $V_{max}$ ;  $mL\ g^{-1}\ MOinc\ h^{-1}$ ), al sustituir  $TV_{max}$  en la primera derivada del modelo (Rodríguez *et al.* 2013).

En el segundo ensayo la incubación se realizó hasta las 24 h. En ese momento se detuvo la fermentación y se abrieron las botellas y su contenido se filtró a través de bolsas de nailon (45  $\mu m$  de tamaño de poro) para separar la fase sólida del líquido de incubación. Se tomaron muestras del filtrado y se preservaron con una solución desproteinizante ( $H_3PO_4$  [2 %]) para el análisis de AGCC individuales y con HCl (0.2 N) para determinar amoníaco. Las muestras preservadas se conservaron a  $-20\ ^\circ C$  hasta su análisis.

Las bolsas con los residuos de la fermentación se secaron durante 72 h en una estufa de aire forzado con temperatura regulada ( $60\ ^\circ C$ ). Se determinó por gravimetría la degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), como la diferencia entre MS en el sustrato incubado y en el residuo sólido de la fermentación, dividido por la MS incubada en cada botella (Blümmel *et al.* 1997).

La energía metabolizable (EM) y la digestibilidad de la materia orgánica (DMO) a las 24 h de los ensilajes mixtos, se estimaron a partir de las ecuaciones propuestas por Menke *et al.* (1979):

$$EM\ (MJ\ kg^{-1}\ MS) = 2.20 + 0.136\ PG24h + 0.057\ PB$$

$$DMO\ (\%) = 14.88 + 0.889\ PG24h + 0.45\ PB$$

Donde, PG24h fue el volumen de gas producido a las 24 h ( $mL \cdot 200\ mg^{-1}$  MS incubada) y la PB se expresa en por ciento.

*Análisis químico.* A las muestras se les determinó MS, MO y PB (AOAC 2016). La fibra detergente neutro (FDN) se obtuvo mediante el procedimiento descrito por Van Soest *et al.* (1991) y los análisis de amoníaco se realizaron por colorimetría (Chaney y Marbach 1962).

La concentración de los AGCC individuales en las muestras preservadas se determinó mediante cromatografía de gases, al inyectar 0.5  $\mu L$ , después de centrifugar los viales a  $14\ 200 \times g$  (Centrifuga ECEN-205, MRC Ltd., Hagsvish, Israel) durante 8 minutos. Se utilizó un cromatógrafo gas-líquido DANI Master GC (DANI Instruments S.p.A, Milán, Italia), equipado con una columna capilar DN-FFAP (longitud 30 m, diámetro interno 0.32 mm, grosor de película 0.25  $\mu$ ) y un detector FID. Se empleó  $H_2$  como gas portador, y  $N_2$  como auxiliar. La temperatura máxima del inyector y el detector se fijó en 200 y  $250\ ^\circ C$ , respectivamente. Los AGCC individuales determinados en el caso de los ensilados mixtos se expresaron como por ciento de la MS, mientras que los AGCC individuales obtenidos en los ensayos de producción de gas se expresaron

SCFA (tSCFA) were also obtained by the algebraic sum of determined individual SCFA.

*Experimental design.* In order to evaluate indicators of chemical composition and of the fermentative process of mixed silages, a completely randomized experimental design was applied, considering silages as treatments (5) and each microsilage as an experimental unit (6).

In the case of the 96-h *in vitro* experiment, in order to facilitate the analysis of *in vitro* accumulated gas production, fermentation was divided *a priori* into two phases. The first phase (initial phase) included five sampling times between the start and 24 hours of incubation (6, 9, 12, 16 and 24 h) and the second phase (final phase) was considered from that moment until the end of incubation, and, in this case, four sampling times were analyzed (30, 48, 72 and 96 h).

As *in vitro* accumulated gas production is repeatedly measured during the time in the same experimental unit, the fulfillment of theoretical assumptions of normality for the analysis of variance was analyzed with the use of Shapiro-Wilk (Shapiro and Wilk 1965) test and Pearson correlation analysis. As the normality assumption was not fulfilled, the Mixed Generalized Linear Model was used, through the utilization of GLIMMIX of SAS procedure. Treatments, sampling times and interaction treatment per time were considered as fixed effects, the intercept as random effect and the bottle as subject. In order to know distribution for data fit, Normal, Poisson, Log normal and Gamma distributions were tested, being this last the one with the best fit and Log was the best function. To select the best fitting model, the variance-covariance structures Toeplitz (Toep), Variance Component (CV), Composite Symmetry (CS), Autoregressive of Order 1 (AR [1]) and Unstructured (UN) were tested. To select the variance matrix of best fit to the data, the information criteria [Akaike (AIC), corrected Akaike (AICC) and Bayesian (BIC)] were used, for which the smallest value was considered. The structure that met this requirement was the Toep. Means were compared through the fixed range test (Kramer 1956). For data analysis, the statistical package SAS (2013), version 9.3, was used.

In the second *in vitro* test, the indicators determined at the end of the 24 hour of incubation ( $\text{NH}_3$ , individual and total SCFA, ME, OMD and IVDDM) were analyzed according to a random block design. Treatments consisted of mixed silages (5), blocks or replicas were the weeks in which incubations were carried out (2), and bottles were considered as repetitions (4). When differences ( $P < 0.05$ ) were found, means of the treatments were compared by multiple rank test of Duncan (1955). Pearson correlation index was used to determine the linear relationship between indicators measured or estimated in the study. The statistical package InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2012) was used for these analyzes and mathematical modeling.

en  $\text{mmole L}^{-1}$ . También se obtuvieron los AGCC totales (AGCCt) por la suma algebraica de los AGCC individuales determinados.

*Diseño Experimental.* Para evaluar los indicadores de composición química y del proceso fermentativo de los ensilajes mixtos, se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado, donde se consideraron los ensilados como tratamientos (5) y cada microsilage como unidad experimental (6).

En el caso del experimento *in vitro* de 96 h, para facilitar el análisis de la producción de gas acumulada *in vitro* se dividió *a priori* la fermentación en dos fases. La primera fase (fase inicial) incluyó cinco horarios de muestreo entre el inicio y las 24 horas de incubación (6, 9, 12, 16 y 24 h) y la segunda fase (fase final) se consideró desde ese instante hasta el final de la incubación, y se analizaron en este caso cuatro horarios de muestreo (30, 48, 72 y 96 h).

Como la producción acumulada de gas *in vitro* es medida repetida en el tiempo sobre la misma unidad experimental, primero se analizó el cumplimiento de los supuestos teóricos de normalidad para el análisis de varianza, mediante la dicitima de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk 1965) y el análisis de correlación de Pearson. Como se incumplió el supuesto de la normalidad, se utilizó un Modelo Lineal Generalizado Mixto mediante el empleo del procedimiento GLIMMIX del SAS. Se consideró como efectos fijos los tratamientos, horarios de muestreo e interacción tratamiento por horario; como efecto aleatorio el intercepto y como subject la botella. Para conocer la distribución con que se ajustaron los datos se probaron las distribuciones Normal, Poisson, Log normal y Gamma; esta última fue la de mejor ajuste y la función de enlace fue Log. Para seleccionar el modelo de mejor ajuste se probaron las estructuras de varianza-covarianza Toeplitz (Toep), Componente de Varianza (VC), Simetría Compuesta (CS), Autoregresiva de Orden 1 (AR[1]) y No estructurada (UN). Para seleccionar la matriz de varianza de mejor ajuste a los datos se utilizaron los criterios de información [Akaike (AIC), Akaike corregido (AICC) y Bayesiano (BIC)] para lo cual se consideró el valor más pequeño. La estructura que cumplió con este requisito fue la Toep. Las medias se compararon a través de la dicitima de rango fijo (Kramer 1956). Para el análisis de los datos se empleó el paquete estadístico SAS (2013), versión 9.3.

En el segundo ensayo *in vitro*, los indicadores determinados al término de las 24 horas de incubación ( $\text{NH}_3$ , AGCC individuales y totales, EM, DMO y DIVMS) se analizaron según un diseño de bloques al azar. Los tratamientos consistieron en los ensilajes mixtos (5), los bloques o réplicas fueron las semanas en que se realizaron las incubaciones (2), y como repeticiones las botellas (4). Cuando se encontraron diferencias ( $P < 0.05$ ), las medias de los tratamientos se compararon por la dicitima de rangos múltiple de Duncan (1955). Se utilizó el índice de correlación de Pearson para determinar la relación lineal entre indicadores



## Results and Discussion

*Chemical composition and fermentative indicators of silage process.* In none of the open microsilos, the presence of fungi or oxygen was observed, so the storage and manufacturing process allowed an adequate fermentation and the way of sealing was successful. All treatments classified as good quality silage according to their organoleptic characteristics (color, smell and texture).

Table 1 shows the chemical composition of the mixed silages and chemical indicators of fermentation that occurred during the conservation process. No differences were observed in DM, CP and NDF content ( $P > 0.05$ ). High contents of NDF indicate an appreciable disappearance of soluble material during the anaerobic fermentation process. On the other hand, OM was higher than 85 % in all treatments and only differences were observed for this indicator between control silage and the treatment with 10 % sweet potato ( $P < 0.05$ ).

medidos o estimados en el estudio. Para estos análisis y la modelación matemática se empleó el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2012).

## Resultados y Discusión

*Composición química e indicadores fermentativos del proceso de ensilaje.* En ninguno de los microsilos abiertos se observó la presencia de hongos u otros indicios de presencia de oxígeno, por lo que el proceso de fabricación y almacenamiento permitió una adecuada fermentación y la forma de sellado tuvo éxito. Todos los tratamientos clasificaron como ensilados de buena calidad según sus características organolépticas (color, olor y textura).

En la tabla 1 se muestra la composición química de los ensilajes mixtos e indicadores químicos de la fermentación ocurrida durante el proceso de conservación. No se apreció diferencias en el contenido de MS, PB y FDN ( $P > 0.05$ ). Los elevados contenidos de FDN indican una apreciable desaparición de material soluble durante el proceso de fermentación anaeróbica. Por su parte, la

Table 1. Chemical composition and fermentative indicators of the evaluated mixed silages

Treatment	DM (%)	OM (%)	CP (%)	NDF (%)	Acetic acid (%DM)	Propionic acid (%DM)	Butyric acid (%MS)	N-NH <sub>3</sub> (% Nt)
Control silage	25.88	87.68 <sup>bc</sup>	7.19	75.95	0.36 <sup>a</sup>	0.04	0.87 <sup>d</sup>	2.81 <sup>bc</sup>
Silage +Vitaferf	28.10	88.59 <sup>c</sup>	6.89	75.44	2.25 <sup>c</sup>	0.06	0.02 <sup>a</sup>	2.40 <sup>b</sup>
Silage +Vitaferf+5% sweet potato	26.45	88.63 <sup>c</sup>	7.07	74.27	2.68 <sup>d</sup>	0.05	0.31 <sup>c</sup>	3.41 <sup>c</sup>
Silage +Vitaferf+10% sweet potato	24.77	86.27 <sup>a</sup>	6.92	75.98	1.04 <sup>b</sup>	0.07	0.26 <sup>bc</sup>	2.34 <sup>b</sup>
Silage +Vitaferf+15% sweet potato	29.51	87.17 <sup>ab</sup>	7.16	74.97	0.99 <sup>b</sup>	0.06	0.20 <sup>b</sup>	1.18 <sup>a</sup>
SE (±)	1.159	0.358	0.474	1.138	0.122	0.006	0.009	0.177
P	0.1158	0.0100	0.9860	0.8044	<0.0001	0.1738	<0.0001	0.0003

Low protein content obtained in the designed silage formulations, lower than the indicators reported for traditional silages based on sorghum (9 %) and maize (8%) forages (Ensminger *et al.* 1990) is noteworthy. This was because moringa, used as main protein source, has high levels of CP (Rodríguez *et al.* 2014). However, in the present study, it was included in a low proportion in silage mixtures, so its contribution in nitrogen was limited, to which the low protein content of the rest of the components was added. Rodríguez *et al.* (2017) observed that mixed silages of CT-169 and moringa, in similar mixtures to those used in this study (80:20 and 60:40), had similar DM values, lower in OM (78 %) and NDF (58 %), but higher in CP (18 %). Nevertheless, these authors evaluated younger forages than those used in this study, which would explain the lower fiber content and higher protein content.

It could not be appreciated that the inclusion of Vitaferf would improve the CP content of silages as observed by Gutiérrez *et al.* (2014), when evaluating

MO fue mayor al 85 % en todos los tratamientos y solo se apreció diferencias para este indicador entre el ensilaje control y el tratamiento con 10 % de boniato ( $P < 0.05$ ).

Es de destacar los bajos contenidos proteicos obtenidos en las formulaciones de ensilajes diseñadas, inferiores a los tenores reportado para ensilajes tradicionales basados en forrajes de sorgo (9%) y maíz (8%) (Ensminger *et al.* 1990). Esto se debió a que moringa, la arborea que se empleó como principal fuente proteica, tiene altos tenores de PB (Rodríguez *et al.* 2014), pero en el presente estudio se incluyó en una baja proporción en las mezclas ensiladas; por lo cual su aporte en nitrógeno fue limitado, a lo que se adicionó el bajo contenido proteico del resto de los componentes. Rodríguez *et al.* (2017) observaron que ensilajes mixtos de CT-169 y moringa, en mezclas afines a las empleadas en este estudio (80:20 y 60:40), tenían valores similares de MS, inferiores en MO (78 %) y FDN (58 %), pero mayores en PB (18 %). Sin embargo, estos autores evaluaron forrajes de menor edad a los utilizados en este estudio, lo que explicaría los menores tenores de

the effect of this microbial additive in mixed silages of *Tithonia diversifolia*, *C. purpureus* cv. Cuba CT-169, although these authors evaluated higher inclusion levels of this microbial additive (4.5, 6 and 8 %).

Regarding the fermentative indicators of the evaluated silages, it was observed that the inclusion of the microbial additive and the energy additive increased the acetic production compared to the control treatment ( $P < 0.0001$ ), obtaining the highest increase with the treatment with 5 % of sweet potato tuber inclusion. Regarding this organic acid, acetic acid levels are not so important when classifying the quality of silages since there are several types of lactobacilli that produce it and good quality silages are common, which are obtained from forages poor in proteins, and contain large amounts of this SCFA (Chalacán and Valencia 1999).

On the other hand, no effect of the treatments was observed in the production of propionic acid ( $P > 0.05$ ). The performance of propionic acid did not coincide with that reported by Rêgo *et al.* (2010), who appreciated that the inclusion of achiote (*Bixa orellana*) by-products to silages of *C. purpureus* increased the levels of this SCFA.

Regarding the production of butyric acid, all the treatments with additives reduced the production of this organic acid, with respect to the control ( $P < 0.0001$ ), although the best effect corresponded to silage with Vitafert. The presence of butyric acid in the ensiled material is related to the presence of bacteria of the Clostridium genus, with significant losses in the quality of the silage and the consequent decrease in palatability and voluntary intake (Wilkinson 1983). In the present study, only the silage with Vitafert as an additive showed values lower than the 0.1 % of DM, considered as the maximum accepted value for a silage of excellent quality (Roth and Undersander 1995). Butyric concentrations under this value are a key indicator that a desirable fermentation occurred, a result of low activity of Clostridium bacteria (Roth and Undersander 1995). In the case of the treatment where only the microbial additive was used, this could have a faster decrease of pH and favor lactic acid bacteria growth. On the other hand, the inclusion of sweet potato also contributed to reduce the levels of this SCFA compared to the control silage, although without reaching the value of 0.1 % DM. This effect could be due to the contribution of easily fermented carbohydrates that serve as a substrate for lactic acid bacteria. In any case, other authors consider that silages with concentrations of butyric lower than 0.5 % DM can also be considered as good quality silages (Kung and Shaver 2001).

Simultaneously, there were differences in the  $\text{NH}_3$  content among treatments, but only the silage with Vitafert and 15 % of sweet potato reduced the levels of this compound with respect to the control silage

fibra y mayores en proteínas.

No se pudo apreciar que la inclusión del producto Vitafert mejorara el contenido de PB de los ensilajes como sí observaron Gutiérrez *et al.* (2014), al evaluar el efecto de dicho aditivo microbiano en ensilajes mixtos de *Tithonia diversifolia*: *C. purpureus* cv. Cuba CT-169, aunque estos autores evaluaron mayores niveles de inclusión de este aditivo microbiano (4.5, 6 y 8 %).

En cuanto a los indicadores fermentativos de los ensilajes evaluados, se observó que tanto la inclusión del aditivo microbiano como el energético, incrementó la producción de acético respecto al tratamiento control ( $P < 0.0001$ ), obteniéndose el mayor incremento con el tratamiento con 5 % de inclusión de tubérculo de boniato. Respecto a este ácido orgánico, los niveles de acético no son tan importantes al clasificar la calidad de los ensilajes pues son varios los tipos de lactobacilos que lo producen y son comunes ensilajes de buena calidad obtenido a partir de forrajes pobres en proteínas, que contienen cantidades sustanciales de este AGCC (Chalacán y Valencia 1999).

Por su parte, no se observó efecto de los tratamientos en la producción de ácido propiónico ( $P > 0.05$ ). El comportamiento del ácido propiónico no coincidió con lo informado por Rêgo *et al.* (2010), quienes apreciaron que la inclusión de subproductos de bija (*Bixa orellana*) a ensilados de *C. purpureus* incrementaba los niveles de este AGCC.

En cuanto a la producción de ácido butírico, todos los tratamientos con aditivos redujeron la producción de este ácido orgánico, respecto al control ( $P < 0.0001$ ), aunque el mayor efecto correspondió al ensilaje con Vitafert. La presencia de ácido butírico en el material ensilado se relaciona con la presencia de bacterias del género Clostridium, con pérdidas significativas en la calidad del ensilaje y la consecuente disminución de su palatabilidad y el consumo voluntario (Wilkinson 1983). En el presente estudio solo el ensilaje con Vitafert como aditivo mostró valores inferiores al valor de 0.1 % MS considerado como el valor máximo aceptado para un ensilaje de excelente calidad (Roth y Undersander 1995). Concentraciones de butírico inferiores a este valor son un indicador clave de que ocurrió una fermentación deseable, resultado de una baja actividad de bacterias del género Clostridium (Roth y Undersander 1995). En el caso del tratamiento donde se empleó solo el aditivo microbiano, pudo este incidir en una más rápida disminución del pH y favorecer el crecimiento de bacterias lácticas. Por otro lado, la inclusión de boniato también contribuyó a reducir los niveles de este AGCC respecto al ensilaje control, aunque sin alcanzar el valor de 0.1 % MS. Este efecto pudo estar dado por el aporte de carbohidratos de fácil fermentación que sirven de sustrato a las bacterias lácticas. En todo caso, otros autores consideran que ensilajes con concentraciones de butírico inferior a 0.5 % de MS se pueden considerar también ensilajes de buena calidad (Kung y Shaver 2001).

Simultáneamente, hubo diferencias en el contenido de  $\text{NH}_3$  entre tratamientos, pero solo el ensilaje con



( $P < 0.001$ ). In mixed silages of *C. purpureus* and cocoa meal, Teixeira *et al.* (2008) observed ammonia values similar to those obtained in the present study (3.9 %).

A problem when using *C. purpureus* as forage is that its high humidity can affect a high decomposition of its proteins (Viana *et al.* 2013). Since ammonia is a product of fermentation, especially of clostridial fermentations, the observed levels are satisfactory because they were less than 10-12%, established limit for classifying a silage as good quality (McDonald *et al.* 1991). This confirms that the studied silages were obtained by desirable fermentations, although in the case of control silage, these results did not coincide with the previously analyzed butyric acid levels. These low ammonia values may have been caused in part to the previous pre-drying process to which forages were subjected previous to be ensiled.

*Gas production and kinetic parameters of fermentation of the evaluated silages.* For the initial phase of the fermentation, it was observed that there was interaction between treatments and sampling times ( $P < 0.0001$ ). Table 2 shows the results of this interaction. In the first three analyzed schedules, silage with Vitafert produced more gas than control silage, but did not show differences regarding the rest of the treatments, except for the two hours that it was lower than gas production of the treatment with 15 % of sweet potato. However, in the following two times (16 and 24 h), there was no difference between control silage and the rest of the treatments, except at 16 h that this treatment produced less gas than silage with 10 % of sweet potato ( $P < 0.001$ ).

Vitafert y 15% de boniato redujo los niveles de este compuesto respecto al ensilaje control ( $P < 0.001$ ). En ensilajes mixtos de *C. purpureus* y harina de cocoa, Teixeira *et al.* (2008) observaron valores de amoníaco similares a los obtenidos en el presente estudio (3.9 %).

Un problema al usar *C. purpureus* como forraje es que su alta humedad puede incidir en una alta descomposición de sus proteínas (Viana *et al.* 2013). Dado que el amoníaco es un producto de la fermentación, especialmente de las fermentaciones clostridiales, los niveles observados son satisfactorios porque fueron inferiores al 10-12%, límite establecido para clasificar un ensilaje como de buena calidad (McDonald *et al.* 1991). Esto confirma que los ensilajes estudiados se obtuvieron por fermentaciones deseables, aunque en el caso del ensilaje control estos resultados no coincidieron con los niveles de ácido butírico analizados anteriormente. Estos bajos valores de amoníaco se pudieron deber, en parte, al proceso previo de presecado al que se sometieron los forrajes a ensilar.

*Producción de gas y parámetros cinéticos de la fermentación de los ensilajes evaluados.* Para la fase inicial de la fermentación se observó que hubo interacción entre los tratamientos y los horarios de muestreo ( $P < 0.0001$ ). Los resultados de dicha interacción se muestran en la tabla 2. En los tres primeros horarios analizados, el ensilaje con Vitafert produjo más gas que el ensilaje control, pero no mostró diferencias respecto al resto de los tratamientos, excepto a las dos horas que fue menor a la producción de gas del tratamiento con 15 % de boniato. Sin embargo, en los siguientes dos horarios (16 y 24 h) no se observó diferencias entre el ensilaje control y el resto de los tratamientos, excepto a las 16 h que este tratamiento produjo menos gas que el ensilado con 10 % de boniato ( $P < 0.001$ ).

Table 2. Effect of interaction among treatments and times of *in vitro* accumulated gas production of in the initial phase of fermentation (original means appear between brackets).

Hours	Treatments					SE and Signif.
	Control silage	Silage + Vitafert	Silage +Vitafert+ 5% sweet potato	Silage +Vitafert+ 10% sweet potato	Silage +Vitafert+ 15% sweet potato	
6	1.29 <sup>m</sup> (3.62)	1.75 <sup>l</sup> (5.75)	1.83 <sup>kl</sup> (6.25)	1.98 <sup>kl</sup> (7.27)	2.05 <sup>k</sup> (7.79)	
9	2.56 <sup>i</sup> (12.95)	2.91 <sup>i</sup> (18.44)	2.88 <sup>i</sup> (17.74)	3.04 <sup>hi</sup> (20.89)	2.97 <sup>i</sup> (19.46)	
12	3.28 <sup>gh</sup> (26.45)	3.57 <sup>ef</sup> (35.54)	3.51 <sup>fg</sup> (33.30)	3.66 <sup>ef</sup> (39.02)	3.49 <sup>fg</sup> (32.78)	±0.051 P<0.0001
16	3.80 <sup>de</sup> (44.91)	4.04 <sup>cd</sup> (56.96)	3.96 <sup>cd</sup> (52.63)	4.10 <sup>bc</sup> (60.59)	3.95 <sup>cd</sup> (51.73)	
24	4.36 <sup>ab</sup> (78.46)	4.54 <sup>a</sup> (93.94)	4.49 <sup>a</sup> (89.38)	4.58 <sup>a</sup> (97.84)	4.51 <sup>a</sup> (90.69)	

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m Different letters indicate significant differences for  $P < 0.05$

In the final phase of fermentation, there was no interaction between treatments and sampling times ( $P > 0.05$ ). The individual effects of treatments and sampling times on the *in vitro* accumulated gas production are shown in tables 3 and 4, respectively. Regarding treatments, all improved gas production

En la fase final de la fermentación no hubo interacción entre los tratamientos y los horarios de muestreo ( $P > 0.05$ ). Los efectos individuales de los tratamientos y los horarios de muestreo en la producción acumulada de gas *in vitro* se muestran en las tablas 3 y 4, respectivamente. En cuanto a los tratamientos, todos

compared to control silage ( $P < 0.0001$ ), although there was no difference between silage with Vitafert and silage that also included 5% of sweet potato. The highest gas production corresponded to the silage with the highest tuber proportion in its composition. For their part, times differed among themselves, increasing gas production by increasing sampling hours ( $P < 0.0001$ ).

mejoraron la producción de gas respecto al ensilaje control ( $P < 0.0001$ ), aunque no hubo diferencias entre el ensilado con Vitafert y el ensilado que además incluyó 5% de boniato. La mayor producción de gas correspondió al ensilaje con mayor proporción de tubérculo en su composición. Por su parte, los horarios difirieron entre sí, incrementando la producción de gas al aumentar las horas de muestreo ( $P < 0.0001$ ).

Table 3. Effect of treatments on *in vitro* accumulated gas production in the final phase of fermentation (original means appear in brackets)

Treatments					
Control silage	Silage + Vitafert	Silage +Vitafert+ 5% sweet potato	Silage +Vitafert+ 10% sweet potato	Silage +Vitafert+ 15% sweet potato	SE and Signif.
4.89 <sup>d</sup> (133.02)	5.01 <sup>c</sup> (149.46)	5.01 <sup>c</sup> (150.16)	5.06 <sup>b</sup> (157.64)	5.11 <sup>a</sup> (165.29)	±0.012 P<0.0001

<sup>a,b,c,d</sup> Different letters indicate significant differences for  $P < 0.05$

Table 4. Effect of times on *in vitro* accumulated gas production in the final phase of fermentation (original means appear in brackets)

Times (h)				SE and Signif.
30	48	72	96	
4.72 <sup>d</sup> (111.82)	4.97 <sup>c</sup> (143.63)	5.14 <sup>b</sup> (169.91)	5.24 <sup>a</sup> (189.13)	±0.010 P<0.0001

<sup>a,b,c,d</sup> Different letters indicate significant differences for  $P < 0.05$

Table 5 shows the estimated kinetic parameters of the *in vitro* accumulated gas production profile of the evaluated silages. A tendency to increase gas production potential (parameter A) was observed by including Vitafert and increasing the levels of sweet potato, which may be related to the availability of growth promoting compounds and soluble carbohydrates, respectively. Regarding the use of sweet potato in silages, there are references that confirm a high *in vitro* digestibility (92.0%) of sweet potato (Backer *et al.* 1980 and Ruiz *et al.* 1981). In addition, Rendon *et al.* (2013) reported that the integral silage of sweet potato (tuber and foliage) showed ruminal degradability of 66.8% when incubated for 72 h, similar values to maize silage.

The same trend, but negative, was appreciated for the relative rate of gas production (parameter B). However, it was not appreciated that the Vitafert affected parameter C or sweet potato inclusion level in the silage mixture showed a defined trend on this parameter. On the other hand, the inclusion of additives tended to improve  $V_{max}$  values although only silage with Vitafert and silage with Vitafert and 10% of sweet potato tended to decrease  $TV_{max}$ . In the present study, all treatments reached their  $V_{max}$  between 18 and 21 h. When comparing these results with those obtained by Rodríguez *et al.* (2017), it is appreciated that the obtained  $V_{max}$  were higher than those reported by these authors, although longer incubation times were reached. Differences between both studies, despite using the same forages, could

La tabla 5 muestra los parámetros cinéticos estimados del perfil de producción acumulada de gas *in vitro* de los ensilajes evaluados. Se observó una tendencia al incremento en el potencial de producción de gas (Parámetro A) al incluir Vitafert e incrementar los niveles de tubérculo de boniato, lo cual puede estar relacionado con la disponibilidad de compuestos promotores del crecimiento y carbohidratos solubles, respectivamente. En cuanto al uso de boniato en ensilajes, existen referencias que confirman una alta digestibilidad *in vitro* (92.0%) del tubérculo de boniato (Backer *et al.* 1980 y Ruiz *et al.* 1981). Además, Rendon *et al.* (2013) informaron que el ensilaje integral de boniato (tubérculo y follaje) mostraba degradabilidad ruminal de 66.8 % al incubarlo 72 h, valores similares al ensilaje de maíz.

Igual tendencia, pero negativa, se apreció para la tasa relativa de producción de gas (Parámetro B). Sin embargo, no se apreció que el Vitafert afectara el parámetro C o el nivel de inclusión de boniato en la mezcla ensilada mostrara una tendencia definida sobre este parámetro. Por otra parte, la inclusión de los aditivos tendió a mejorar los valores de  $V_{max}$  aunque solo el ensilaje con Vitafert y el ensilaje con Vitafert y 10% de boniato tendieron a disminuir  $TV_{max}$ . En el presente estudio todos los tratamientos alcanzaron su  $V_{max}$  entre 18 y 21 h. Al comparar estos resultados con los obtenidos por Rodríguez *et al.* (2017) se aprecia que las  $V_{max}$  obtenidas fueron superiores a las reportadas por estos autores, aunque se alcanzó a mayores tiempos de incubación. Las diferencias apreciadas entre ambos estudios, a pesar de usar los mismos forrajes, pudieron

be given by the evaluated cut ages and their effects on the chemical composition of silages and on the partition of *in vitro* fermented nutrients towards gas production or microbial synthesis.

estar dadas por las edades de corte evaluadas y sus efectos en la composición química de los ensilajes y en la partición de los nutrientes fermentados *in vitro* hacia la producción de gas o la síntesis microbiana.

Table 5. Kinetic parameters according to Gompertz model of *in vitro* fermentation of the evaluated mixed silages

Treatment	Parameter A (mL g <sup>-1</sup> incOM) (±SE)	Parameter B (±SE)	Parameter C (h <sup>-1</sup> ) (±SE)	SE <sup>1</sup> curve	R <sup>2</sup>	V <sub>máx</sub> (mL g <sup>-1</sup> incOM h <sup>-1</sup> )	T <sub>Vmáx</sub> (h)
Control silage	158.16 (±2.11)	4.23 (±0.24)	0.072 (±0.003)	6.855	0.9860	4.183	20.05
Silage + Vitafert	172.22 (±2.30)	4.13 (±0.24)	0.078 (±0.004)	7.980	0.9840	4.929	18.23
Silage + Vitafert+ 5% sweet potato	178.45 (±3.27)	3.98 (±0.29)	0.070 (±0.004)	10.578	0.9735	4.622	19.63
Silage + Vitafert+ 10% sweet potato	183.23 (±3.38)	3.93 (±0.30)	0.074 (±0.005)	11.383	0.9710	5.015	18.39
Silage + Vitafert+ 15% sweet potato	201.83 (±2.87)	3.95 (±0.21)	0.065 (±0.003)	8.728	0.9854	4.834	21.11

SE of parameters were significant at P< 0.0001; 1 SE of the curve

Figures 1 and 2 show gas production and gas production speed profiles of the evaluated mixed silages, respectively. Gas production curve of silage treatment with 15 % of sweet potato tended to be higher than the rest of the treatments, which was previously associated to better availability of soluble carbohydrates, provided by the tuber. On the other hand, it was observed that silage with Vitafert and Vitafert with 5 and 10 % of sweet potato, had a similar performance of their fermentation profiles, intermediate between control silage and silage with 15 % of sweet potato.

*Indicators of fermentation up to 24 hours of evaluated mixed silages.* Table 6 shows indicators of *in vitro* fermentation of the evaluated silages. The inclusion of Vitafert and sweet potato decreased the

En las figuras 1 y 2 se observan los perfiles de producción de gas y velocidad de producción de gas de los ensilajes mixtos evaluados, respectivamente. La curva de producción de gas del tratamiento ensilado con 15 % de boniato tendió a ser mayor al resto de los tratamientos, lo cual anteriormente ya se asoció a mayor disponibilidad de carbohidratos solubles, aportados por el tubérculo. Por otra parte, se apreció que los ensilados con Vitafert y Vitafert y 5 y 10 % de boniato, tuvieron similar comportamiento de sus perfiles de fermentación, intermedios entre el ensilaje control y el ensilaje con 15 % de boniato

*Indicadores de la fermentación hasta las 24 horas de los ensilajes mixtos evaluados.* En la tabla 6 se exponen los indicadores de la fermentación *in vitro* de los ensilajes evaluados. La inclusión de Vitafert y boniato

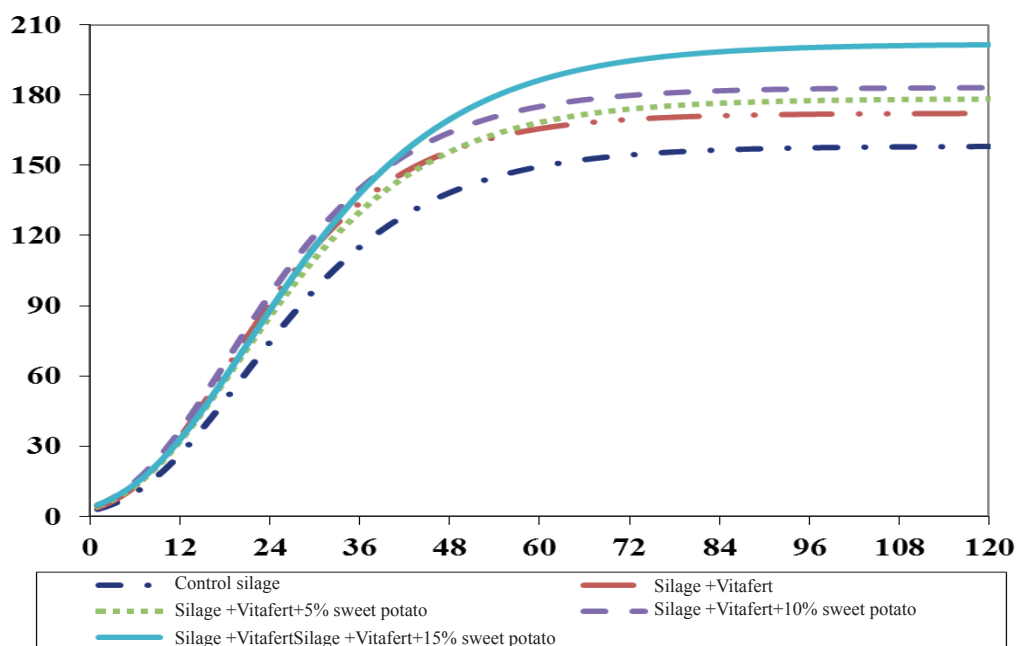


Figure 1. Profile of *in vitro* accumulated gas production (Y axis, mL g<sup>-1</sup> incOM) in the time (X axis, h) of evaluated mixed silages, estimated from the parameters obtained by Gompertz model



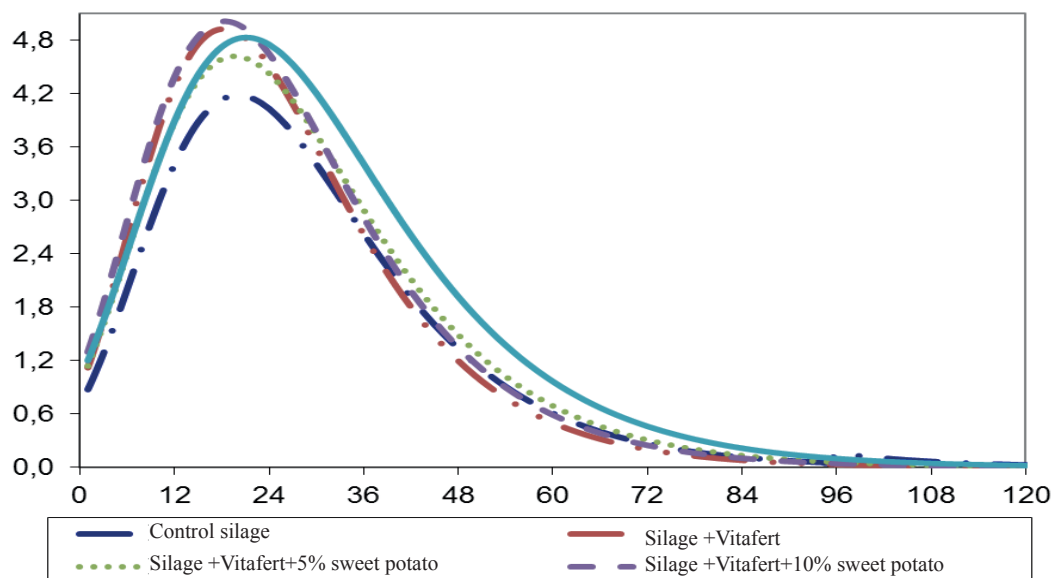


Figure 2. Profile of *in vitro* accumulated gas production speed (Y axis,  $\text{mL g}^{-1} \text{incOM h}^{-1}$ ) in the time (X axis, h) of evaluated mixed silages, estimated from the parameters obtained by Gompertz model

content of ammonia, although the lowest value of  $\text{NH}_3$  belonged to the treatment of silage with Vitafert ( $P < 0.001$ ). When correlating levels of  $\text{NH}_3$  at 24 h of incubation with CP content of the evaluated silages, there was a high linear correlation between these two variables ( $r = 0.8314$ ). It is important to state that concentrations of  $\text{NH}_3$  in all treatments surpassed the value of  $5 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ , considered as minimum for a good functioning of ruminal ecosystem (Satter and Styler 1974).

Likewise, the inclusion of Vitafert and sweet potato increased the production of acetic and butyric acids, as well as the estimated production of total SCFAs, ME and OMD ( $P < 0.01$ ), but only treatments with sweet potato improved the production of propionic acid ( $P < 0.01$ ).

When determining DM degradability by gravimetry, there were no differences between control silage and silage with Vitafert, but there was an increase of IVDDM with the inclusion of sweet potato in the composition of silages ( $P < 0.0001$ ), obtaining the best degradability with 15 % of sweet potato inclusion.

When correlating values of estimated OMD and the IVDDM determined by gravimetry, there was a high correlation between both variables ( $r = 0.7551$ ). This is an element to be taken into consideration because variable OMD may be used for estimating, using gas production and CP content, the effect of treatments on degradability and, this way, substituting gravimetric determinations, which sometimes are difficult and lead to losses of non-fermented materials, and subsequently, overestimate IVDDM.

disminuyó el contenido de amoníaco, aunque el menor valor de  $\text{NH}_3$  se apreció en el tratamiento de ensilaje con Vitafert ( $P < 0.001$ ). Al correlacionar los niveles de  $\text{NH}_3$  a las 24 h de incubación con el contenido de PB de los ensilajes evaluados se observó una alta correlación lineal entre estas dos variables ( $r = 0.8314$ ). Es de señalar que las concentraciones de  $\text{NH}_3$  en todos los tratamientos superaron el valor de  $5 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$  considerado como mínimo para un buen funcionamiento del ecosistema ruminal (Satter y Styler 1974).

Por su parte, la inclusión de Vitafert y boniato incrementó la producción de ácidos acético y butírico, así como la de AGCC totales, EM y la DMO estimada ( $P < 0.01$ ), pero solo los tratamientos con boniato mejoraron la producción de ácido propiónico ( $P < 0.01$ ).

Al determinar la degradabilidad de la MS por gravimetría, no se observó diferencias entre el ensilado control y el ensilado con Vitafert, pero sí se incrementó la DIVMS con la inclusión del boniato en la composición de los ensilajes ( $P < 0.0001$ ), obteniéndose la mayor degradabilidad con el 15 % de inclusión del tubérculo.

Al correlacionar los valores de DMO estimados y la DIVMS determinada por gravimetría, se encontró una alta correlación entre ambas variables ( $r = 0.7551$ ). Esto es un elemento a tener en cuenta porque se podría utilizar la variable DMO para estimar, a partir de la producción de gas y el contenido de PB, el efecto de los tratamientos en la degradabilidad y así sustituir las determinaciones gravimétricas, las cuales a veces resultan engorrosas y tienen pérdidas de material no fermentado y por tanto, sobrestiman la DIVMS.

Tabla 6. Indicators of *in vitro* fermentation of the evaluated mixed silages

Treatment	NH <sub>3</sub> (mg.100mL <sup>-1</sup> )	Acetic (mmole L <sup>-1</sup> )	Propionic (mmole L <sup>-1</sup> )	Butyric (mmole L <sup>-1</sup> )	Total SCFA (mmole L <sup>-1</sup> )	ME (MJ kg <sup>-1</sup> MS)	OMD (%)	IVDDM (%)
Control silage	8.47 <sup>c</sup>	31.29 <sup>a</sup>	9.76 <sup>a</sup>	3.12 <sup>a</sup>	45.32 <sup>a</sup>	3.59 <sup>a</sup>	24.55 <sup>a</sup>	20.02 <sup>a</sup>
Silage +Vitaferf	4.52 <sup>a</sup>	44.42 <sup>b</sup>	11.93 <sup>a</sup>	4.67 <sup>b</sup>	62.03 <sup>b</sup>	3.81 <sup>bc</sup>	25.93 <sup>bc</sup>	21.88 <sup>ab</sup>
Silage +Vitaferf+ 5% sweet potato	6.51 <sup>b</sup>	55.35 <sup>c</sup>	16.68 <sup>b</sup>	6.17 <sup>bc</sup>	79.80 <sup>c</sup>	3.95 <sup>c</sup>	26.84 <sup>c</sup>	23.98 <sup>c</sup>
Silage +Vitaferf+ 10% sweet potato	6.26 <sup>b</sup>	52.44 <sup>bc</sup>	15.50 <sup>b</sup>	6.23 <sup>c</sup>	75.55 <sup>bc</sup>	3.75 <sup>b</sup>	25.52 <sup>b</sup>	23.46 <sup>bc</sup>
Silage +Vitaferf+ 15% sweet potato	6.62 <sup>b</sup>	52.21 <sup>bc</sup>	16.57 <sup>b</sup>	5.59 <sup>bc</sup>	75.71 <sup>bc</sup>	3.86 <sup>bc</sup>	26.31 <sup>bc</sup>	26.27 <sup>d</sup>
SE (±)	0.332	2.809	0.987	0.039	4.284	0.022	0.464	0.6755
P	0.0005	0.0018	0.0036	0.0057	0.0025	0.0007	0.0008	<0.0001

<sup>a,b,c,d</sup> Different letters indicate significant differences for P<0.05

### Conclusions

The inclusion of Vitaferf and sweet potato, at the evaluated concentrations, had no significant influence on chemical composition of the evaluated mixed silages. However, both additives improved the fermentative characteristics of silages with the reduction of the levels of butyric acid and the increase of propionic acid. Likewise, their use improved the nutritional value of ensiled products because they optimized the performance of kinetic parameters of *in vitro* fermentation and increased gas production, individual and total SCFAs, IVDDM and estimations of ME and OMD, with a positive effect of sweet potato inclusion level on some of these indicators.

Out of these results, it is recommended to evaluate superior inclusion levels of sweet potato to increase availability of non-structural carbohydrates in the ensiled product. In addition, using the low levels of CP and NH<sub>3</sub>, it should be evaluated the increase of protein content in the mixtures to be ensiled from the use of superior proportions of the protein shrub or small amounts of urea. Finally, the use of Vitaferf is a viable option for small and medium farmers, but it should be useful to evaluate pure strains of microorganisms with potential as additives for silages, which will constitute a feasible option for developing products for large-scale farmers, who consider that rusticity of Vitaferf production is not viable.

### Conclusiones

La inclusión de los aditivos Vitaferf y tubérculo de boniato, a las concentraciones evaluadas, no influyó significativamente en la composición química de los ensilados mixtos evaluados. Sin embargo, ambos aditivos mejoraron las características fermentativas de los ensilajes al reducir los niveles de ácido butírico e incrementar propiónico. De igual manera, su uso mejoró el valor nutritivo de los productos ensilados al optimizar el comportamiento de los parámetros cinéticos de la fermentación *in vitro* e incrementar la producción de gas y AGCC individuales y totales, así como la DIVMS y las estimaciones de EM y DMO; observándose un efecto positivo del nivel de inclusión del boniato en varios de estos indicadores.

A partir de estos resultados, se recomienda evaluar niveles superiores de inclusión de tubérculo de boniato para incrementar la disponibilidad de carbohidratos no estructurales en el producto ensilado. Además, a partir de los bajos niveles de PB y NH<sub>3</sub> observados se debe valorar incrementar el contenido proteico de las mezclas a ensilar a partir del empleo de proporciones mayores de la arbustiva proteica o de pequeñas cantidades de urea. Por último, si bien el empleo del Vitaferf es una opción viable para pequeños y medianos productores, sería útil evaluar cepas puras de microorganismos con potencialidades como aditivos a ensilajes, que constituyan una opción factible para desarrollar productos para los grandes productores, a los cuales la rusticidad de la producción del Vitaferf no les es viable.

### References

- AOAC. 2016. Official methods of analysis of AOAC International. 20th ed., Rockville, MD: AOAC International, ISBN: 978-0-935584-87-5, Available: <<http://www.directtextbook.com/isbn/9780935584875>>, [Consulted: October 13, 2017].
- Backer, J., Ruiz, M. E., Muñoz, H. & Pinchinat, A. M. 1980. The use of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) in animal feeding: II beef production. Tropical Animal Production, 5(2): 152–160, ISSN: 0250-5576.
- Blümmel, M., Steingass, H. & Becker, K. 1997. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. British Journal

- of Nutrition, 77(6): 911–921, ISSN: 1475-2662, 0007-1145, DOI: 10.1079/BJN19970089.
- Bustamante, D. 2014. Efecto del aditivo biológico Vitafert en la utilización del nitrógeno en pollos de ceba alimentados con harina de forraje de *Moringa oleifera* var. Supergenius. Master. Thesis. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba, 65 p.
- Castaño, G. A. & Villa, L. M. 2017. Use of whey and molasses as additive for producing silage of Cuba OM-22 (*Cenchrus purpureus* x *Cenchrus glaucum*). Cuban Journal of Agricultural Science. 51(1): 61–70, ISSN: 2079-3480.
- Chalacán, A. & Valencia, A. 1999. Ensilaje de residuos de cosecha de la zona de cultivos del cantón Espejo mediante el proceso biotecnológico. Graduation Thesis, Administración de Granjas. ITSA “Alfonso Herrera”. El Ángel. 62 p. Available on: <<http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/386>>.
- Chaney, A.L. & Marbach, E.P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clin. Chem. 8: 130-132.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. InfoStat. version 2012, [Windows], Universidad Nacional de Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, Available on: <<http://www.infostat.com.ar/>>.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple Range and Multiple F Tests. Biometrics, 11(1): 1–42, ISSN: 0006-341X, DOI: 10.2307/3001478.
- Eliás, A. & Herrera, F. 2011. Registro de patente. no. 81/2011, La Habana, Cuba: Oficina Cubana de la Propiedad Industrial.
- Ensminger, M.E., Oldfield, J.E. & Heineman, W.W. 1990. Feeds and Nutrition. Ed. Heineman, W. W. The Ensminger Publishing Company, Clovis, Ca. USA. p. 108-110 1544 p.
- Ferreira, A.C.H., Rodríguez, N.M., Neiva, J.N.M., Pimentel, P.G., Gomes, S.P., Campos, W.E. & Lopes, F.C.F. 2015. Nutritional evaluation of elephant-grass silages with different levels of by-products from the cashew juice industry. R. Bras. Zootec., 44 (12): 434-442, ISSN 1806-9290
- García, L. M., Mesa, A. R. & Hernández, M. 2014. Potencial forrajero de cuatro cultivares de *Cenchrus purpureus* en un suelo Pardo de Las Tunas. Pastos y Forrajes, 37(4): 413–419, ISSN: 0864-0394.
- Gutiérrez, D., Borjas-Rojas, E., Rodríguez-Hernández, R., Rodríguez, Z., Stuart, R. & Sarduy, L. 2015. Evaluación de la composición química y degradabilidad ruminal in situ de ensilaje mixto con *Cenchrus purpureus* cv. Cuba CT-169: *Moringa oleifera*. Avances en Investigación Agropecuaria, 19 (3): 7–16, ISSN: 0188-7890
- Gutiérrez, D., Morales, A., Eliás, A., García López, R. & Sarduy, L. 2014. Composición química y degradabilidad ruminal in situ de la materia seca en ensilajes mixtos *Tithonia diversifolia*: *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-169, inoculados con el producto biológico VITAFERT. Cuban Journal of Agricultural Science. 48 (4): 379-385, ISSN: 2079-3480.
- Hernández, J. A., Pérez, J. J. M., Bosch, I. D. & Castro, S. N. 2015. Clasificación de los suelos de Cuba 2015. Mayabeque, Cuba: Ediciones INCA, 93 p., ISBN: 978-959-7023-77-7.
- Jusuf, M. & Ginting, E. 2017. The prospects and challenges of sweet potato as bio-ethanol source in Indonesia. Conference and Exhibition Indonesia Renewable Energy & Energy Conservation [Indonesia EBTKE CONEX 2013]. Energy Procedia 47: 173-179, ISSN: 1876-6102, DOI:10.1016/j.egypro.2014.01.211
- Kramer, C.Y. 1956. Extension of multiple range tests to group means with unequal numbers of replications. Biometrics. 12, 307 - 310.
- Kung, L. & Shaver, R. 2001. Interpretation and Use of Silage Fermentation Analysis Reports. Focus on Forage. 3 (13): 1-5.
- McDonald, P., Henderson, A.R. & Heron, S.J.E. 1991. Microorganisms. The biochemistry of silage. 2nd ed. Marlow: Chalcombe Publications, p. 81-151.
- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, A., Fitz, D. & Schneider, W. 1979. The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. J. Agric. Sci., Camb., 93: 217- 222.
- Menke, K. H. & Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Animal Research and Development, 28: 7–55, ISSN: 0340-3165.
- Monteiro, I.J.G., Abreu, J.G., Cabral, L.S., Almeida, R.G., Reis, R.H.P., Neto, A.B., Cabral, C.E.A., Barros, L.V., Avelino, A.c.D. & Penso, S. 2016. Ensiling of elephant grass with soybean hulls or rice bran. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 37,(6): 4203-4212, ISSN: 1676-546X, DOI: 10.5433/1679-0359.2016v37n6p4203
- Morales, A., Rodríguez, R., Gutiérrez, D., Eliás, A., Gómez, S. & Sarduy, L. 2016. Evaluation of the VITAFERT inclusion in the nutritive value of *Tithonia diversifolia* and *Pennisetum purpureum* silages. Cuban J. Agric. Sci. 50 (4): 619-630, ISSN: 2079-3480.
- Mtui, D. J., Lekule, F. P., Shem, M. N., Ichinohe, T., Fujihara, T. & others. 2009. Comparative potential nutritive value of grasses, creeping legumes and multipurpose trees commonly in sub humid region in the Eastern parts of Tanzania. Livestock Research for Rural Development, 21 (10), ISSN: 0121-3784, Available: <<http://www.lrrd.cipav.org.co/lrrd21/10/mtui21158.htm>>, [Accessed: July 5, 2018].
- Nouman, W., Basra, S. M. A., Siddiqui, M. T., Yasmeen, A., Gull, T. & Alcayde, M. A. C. 2014. Potential of *Moringa oleifera* L. as livestock fodder crop: a review. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38(1): 1–14, ISSN: 1300-011X
- Otero, M. & Esperance, M. 1994. Estudio de la sensibilidad de la Guinea Likoni (*Panicum maximum* Jacq) según el índice de azúcar/capacidad tampón. Pastos y Forrajes, 17(3): 277–281, ISSN: 2078-8452.
- Rêgo, M.M., Neiva, J.N., Cavalcante, M.A., Cândido, M.J., Clementino, R. & Restle, J. 2010. Bromatological and fermentative characteristics of elephant grass silages with the addition of annato by-product. R. Bras. Zootec., 39 (9): 1905-1910, ISSN 1806-9290
- Rendon, M. E., Noguera, R. R. & Posada, S. L. 2013. Cinética de degradación ruminal del ensilaje de maíz con diferentes niveles de inclusión de vinaza. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia, 8(2): 42–51, ISSN: 1900-9607, DOI: 10.21615/2737.
- Rodríguez, R., Borges, E., Gutiérrez, D., Eliás, A., Gómez, S. & Moreira, O. 2017. Evaluation of the inclusion of *Moringa oleifera* in the nutritional value of silage of *Cenchrus purpureus* cv. Cuba CT-169. Cuban J. Agric. Sci. 51 (4): 447-457, ISSN: 2079-3480.



- Rodríguez, R., González, N., Alonso, J., Domínguez, M. & Sarduy, L. 2014. Nutritional value of foliage meal from four species of tropical trees for feeding ruminants. Cuban Journal of Agricultural Science. 48 (4): 371-378, ISSN: 2079-3480.
- Rodríguez, R., Lores, J., Gutiérrez, D., Ramírez, A., Gómez, S., Elías, A., Aldana, A. I., Moreira, O., Sarduy, L. & Jay, O. 2013. Inclusion of the microbial additive Vitafert in the *in vitro* ruminal fermentation of a goat diet. Cuban Journal of Agricultural Science. 47(2): 171–178, ISSN: 2079-3480.
- Roth, G. & Undersander, D. 1995. Silage additives. In: Corn silage production management and feeding. Madison American Society of Agronomy. p.27-29.
- Ruiz, M. E., Lozano, E. & Ruiz, A. 1981. Utilization of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) in animal feeding. III. Addition of various levels of roots and urea to sweet potato forage silages. Tropical Animal Production, 6(3): 234–244, ISSN: 0250-5576.
- SAS. 2013. Sistema de análisis estadístico. Universidad de Nebraska. Versión 9.3.
- Satter, L., & Styter, L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. Br. J. Nutr. 32 (2): 199-208. doi:10.1079/BJN19740073
- Shapiro, S. & Wilk, B. (1965) An análisis of variante test for normalita (complete simples) Biométrica, 52, pp 591-611
- Teixeira, F.A., Veloso, C.M., Pires, A.J.V., Silva, F.F., Nascimento, P.V.N. 2008. Perdas na ensilagem de capim-elefante aditivado com farelo de cacau e cana-de-açúcar. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, 60 (1): 227-233.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B. & France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology, 48(3): 185–197, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/0377-8401(94)90171-6.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. Journal of Dairy Science, 74(10): 3583–3597, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.
- Viana, P., Teixeira, F.A., Pires, A.J., Carvalho, G.G., Figueiredo, M.P. & Santana Júnior, H.A. 2013. Losses and nutritional value of elephant grass silage with inclusion levels of cottonseed meal. Acta Scientiarum. Animal Sciences Maringá, 35 (2): 139-144.
- Wilkinson, J.M. 1983. Silage made from tropical and temperate crops. 2. Techniques for improving the nutritive value of silage. World Animal Review, 46: 35-40.

**Received: December 12, 2018**