

## Use of two additives for improving nutritional value of mixed silages of *Cenchrus purpureus* x *C. glaucum* (OM-22 hybrid) and *Moringa oleifera*

### Uso de dos aditivos para mejorar el valor nutritivo de ensilajes mixtos de *Cenchrus purpureus* x *C. glaucum* (híbrido OM-22) y *Moringa oleifera*

R. Rodríguez<sup>1</sup>, Yadiana Ontivero<sup>2</sup>, Sarai Gómez<sup>1</sup>, Yaneisy García<sup>1</sup> and Dailyn Sosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

<sup>2</sup>Facultad de Biología, Universidad de la Habana, La Habana, Cuba

Email: rrodriguez@ica.co.cu

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

Yaneisy García: <http://orcid.org/0000-0002-7055-4880>.

Dailyn Sosa: <http://orcid.org/0000-0003-3933-1176>

Sarai Gómez : <https://orcid.org/0000-0001-9248-8143>

The objective of the current study was to evaluate the effect of inclusion of sweet potato tubers (*Ipomoea batatas*) and *Pediococcus pentosaceus* LB-25 on the nutritional value of mixed silages of *Cenchrus purpureus* x *Cenchrus glaucum* (OM-22 hybrid) and *Moringa oleifera*, by analyzing its chemical composition and indicators of its *in vitro* fermentation. A completely randomized experimental design with a factorial arrangement (3x2) was used, in which the main factors were the 3 levels of sweet potato inclusion (0, 25 and 50%) and the inclusion or not of *Pediococcus*. DM yield of the silage was decreased by 50% of tubers. Sweet potato inclusion level decreased pH, DM, NDF and ADF, while the inclusion of LB-25 only increased NDF from 61.5 to 64.5% (P < 0.05). Neither of the two factors affected protein content of silages (P > 0.05). A tendency to increase potential and fractional rate of gas production was observed as sweet potato level increased, reaching the highest potential in the silage forage + 50 % sweet potato + LB-25 (662.69 mL g incOM<sup>-1</sup>). DAIVMS increased with 50% of sweet potato (P = 0.2101). It is concluded that the inclusion of sweet potato tubers in mixed silages of *C. purpureus* x *C. glaucum* (OM-22 hybrid) and *M. oleifera* improved the nutritional value of conserved materials, with the best results when 50 % was included. On the other hand, the use of *P. pentosaceus* LB-25 strain, at 5% (v/w), did not influence the nutritional quality of evaluated silages, except that NDF content increased.

Key words: *fermentation, in vitro technique, sweet potato tuber, Pediococcus pentosaceus LB-25*

Silage is a method for preserving forage nutrients from their lactic acid fermentation, carried out by epiphytic bacteria under anaerobic conditions (Liu *et al.* 2016). It is used to segregate the excess forage that occurs during rainy season and to have this food to cover part of the deficit of pastures in dry season. Silages produced in tropical areas are generally composed of forage grasses with low nutritional value but high biomass production, good leaf proportion, rusticity and adaptation to a great diversity of soils and adverse climatic conditions, highlighting the species of *Cenchrus* genus (García *et al.* 2014).

For several decades, the Institute of Animal Science

El objetivo fue evaluar el efecto de la inclusión de tubérculos de boniato (*Ipomoea batatas*) y *Pediococcus pentosaceus* LB-25 en el valor nutritivo de ensilajes mixtos de *Cenchrus purpureus* x *Cenchrus glaucum* (híbrido OM-22) y *Moringa oleifera*, mediante el análisis de su composición química e indicadores de su fermentación *in vitro*. Se usó un diseño experimental completamente aleatorizado con arreglo factorial (3x2), donde los factores principales fueron los 3 niveles de inclusión de boniato (0, 25 y 50%) y la inclusión o no del *Pediococcus*. El 50% de tubérculos disminuyó el rendimiento de MS del ensilado. El nivel de inclusión del boniato disminuyó pH, MS, FDN y FDA, mientras la inclusión de LB-25 solo incrementó FDN de 61.5 a 64.5% (P < 0.05). Ninguno de los dos factores afectó el contenido proteico de los ensilajes (P > 0.05). Se observó tendencia al aumento del potencial y la tasa fraccional de producción de gas al incrementarse el nivel de boniato, alcanzándose el mayor potencial en el ensilado Forraje+50 % boniato+LB-25 (662.69 mL g MOinc<sup>-1</sup>). La DAIVMS se incrementó con 50% de boniato (P=0.2101). Se concluye que la inclusión de tubérculos de boniato en ensilajes mixtos de *C. purpureus* x *C. glaucum* (híbrido OM-22) y *M. oleifera* mejoró el valor nutritivo de los materiales conservados, con los mejores resultados cuando se incluyó al 50 %. Por su parte, el empleo de la cepa *P. pentosaceus* LB-25, al 5 % (v/p), no influyó en la calidad nutritiva de los ensilajes evaluados, excepto que aumentó el contenido de FDN.

Palabras clave: *fermentación, técnica in vitro, tubérculo de boniato, Pediococcus pentosaceus LB-25*

El ensilaje es un método de conservación de los nutrientes de los forrajes a partir de su fermentación ácido láctica que realizan bacterias epifitas en condiciones anaerobias (Liu *et al.* 2016). Se emplea para segregarse el exceso de forrajes que se produce en el período lluvioso y poder disponer de este alimento para cubrir parte del déficit de pastos en el período poco lluvioso. Los ensilajes que se producen en el trópico generalmente son de gramíneas forrajeras de bajo valor nutritivo pero alta producción de biomasa, buena proporción de hojas, rusticidad y adaptación a gran diversidad de suelos y condiciones climáticas adversas, destacando las especies del género *Cenchrus* (García *et al.* 2014).

(ICA) has been accumulating experience in methods to improve the fermentation process and nutritional value of tropical forage silages, including varieties and hybrids of *Cenchrus*. In this sense, the effect of pre-drying has been evaluated (Michelena and Molina 1990), the inclusion of protein scrubs such as *Moringa oleifera* and *Tithonia diversifolia* to increase protein level and improve mixed silage quality (Gutiérrez *et al.* 2014 and Morales *et al.* 2016), the use of energy additives such as molasses (Domínguez *et al.* 1982) and sweet potato tubers (*Ipomoea batatas*) (Rodríguez *et al.* 2019 and Rodríguez *et al.* 2020) to improve availability of easily fermented carbohydrates, and the use of biotechnological products such as VITAFERT that provides lactic bacteria, organic acids and microbial growth factors that favor the fermentation process (Gutiérrez *et al.* 2014, Morales *et al.* 2016 and Rodríguez *et al.* 2019). Recently, it was described the effect of including higher levels of sweet potato tubers (up to 50 %, humid base) in association with the use of pure *Lactobacillus pentosus* LB-31 strain (Rodríguez *et al.* 2020) on the nutritional value of mixed silages.

Microbial additives obtained from pure strains of lactic acid bacteria are safe inoculants, easy to use, not corrosive to agricultural machinery, and do not pollute the environment (Ozduven *et al.* 2017). The most widely used to stimulate lactic fermentation and improve the quality of silages have been homofermentative bacteria (McDonald *et al.* 1991), including several species of *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Pediococcus* (Muck *et al.* 2018) genera, that have demonstrated potential to improve fermentation processes and guarantee good quality of the obtained product (Porto *et al.* 2017).

Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effect of the inclusion of sweet potato tubers and *P. pentosaceus* LB-25 on the nutritional value of mixed silages of *C. purpureus* x *C. glaucum* (OM-22 hybrid) and *M. oleifera*, by analyzing its chemical composition and indicators of its *in vitro* fermentation.

### Materials and Methods

**Silage obtaining.** Forages used for silage production. Plants were collected in experimental areas of the Institute of Animal Science (ICA) of Cuba. Plants of *C. purpureus* x *C. glaucum* (OM-22 hybrid) and *M. oleifera* (moringa) of 90 and 60 days of age, respectively, were collected by manual cut. They were established in typical red ferralitic soil, fast drying and uniform profile (Hernández *et al.* 2015). Both forages were passed through a forage mill until they reached a particle size of 20–30 mm and ground material was spread for pre-drying under the sun on a flat surface with drainage until reaching a DM superior to 30 %.

Additives used for silage production. Sweet potato

Desde hace varias décadas el Instituto de Ciencia Animal (ICA) viene acumulando experiencia en métodos para mejorar el proceso fermentativo y el valor nutritivo de ensilajes de forrajes tropicales, incluyendo variedades e híbridos de *Cenchrus*. En tal sentido, se ha evaluado el efecto del presecado (Michelena y Molina 1990), la inclusión de arbustivas proteicas como *Moringa oleifera* y *Tithonia diversifolia* para incrementar el nivel proteico y mejorar la calidad del ensilado mixto (Gutiérrez *et al.* 2014 y Morales *et al.* 2016), el uso de aditivos energéticos como melazas (Domínguez *et al.* 1982) y tubérculos de boniato (*Ipomoea batatas*) (Rodríguez *et al.* 2019 y Rodríguez *et al.* 2020) para mejorar la disponibilidad de carbohidratos de fácil fermentación, y el empleo de productos biotecnológicos como el VITAFERT que aporta bacterias lácticas, ácidos orgánicos y factores de crecimiento microbiano que favorecen el proceso fermentativo (Gutiérrez *et al.* 2014, Morales *et al.* 2016 y Rodríguez *et al.* 2019). Recientemente se describió el efecto en el valor nutritivo de ensilajes mixtos al incluir niveles mayores de tubérculos de boniato (hasta 50 %, base húmeda) en asociación con el empleo de la cepa pura de *Lactobacillus pentosus* LB-31 (Rodríguez *et al.* 2020).

Los aditivos microbianos que se obtienen a partir de cepas puras de bacterias ácido lácticas son inoculantes seguros, fácil de usar, no son corrosivos para la maquinaria agrícola y no contaminan el ambiente (Ozduven *et al.* 2017). Los más utilizados para estimular la fermentación láctica y mejorar la calidad de los ensilados han sido las bacterias homofermentativas (McDonald *et al.* 1991), entre ellas se encuentran varias especies de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Pediococcus* (Muck *et al.* 2018), que han mostrado potencialidades para mejorar los procesos fermentativos y garantizar buena calidad del producto obtenido (Porto *et al.* 2017).

Por ello, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la inclusión de tubérculos de boniato y *P. pentosaceus* LB-25 en el valor nutritivo de ensilajes mixtos de *Cenchrus purpureus* x *Cenchrus glaucum* (híbrido OM-22) y *Moringa oleifera*, mediante el análisis de su composición química e indicadores de su fermentación *in vitro*.

### Materiales y Métodos

**Obtención de los ensilajes** Forrajes utilizados en la elaboración de los ensilajes. Las plantas se recolectaron en áreas experimentales del Instituto de Ciencia Animal (ICA) de Cuba. Se recolectaron por corte manual plantas de *C. purpureus* x *C. glaucum* (híbrido OM-22) y *M. oleifera* (moringa) de 90 y 60 días de edad, respectivamente; establecidas en suelo ferralítico rojo típico, de rápida desecación y perfil uniforme (Hernández *et al.* 2015). Ambos forrajes se pasaron por un molino forrajero hasta alcanzar tamaño de partícula de 20–30 mm y el material molido se extendió para su presecado al sol en una superficie plana con escurrimiento hasta alcanzar MS superior al 30 %.

Aditivos utilizados en la elaboración de los ensilajes.

tubers were used as energy additives to increase the content of easily fermented carbohydrates. Small and medium-sized sweet potatoes were used, without washing, but without adhering soil. Tubers were cut lengthwise into pieces, and, then, they were reduced in size by thinly laminating them. This process was carried out at the time silages were prepared to avoid starch oxidation as much as possible.

The pure culture of the strain of lactic acid bacteria *P. pentosaceus* LB-25 was used as microbial additive, obtained from the ICA Bank of Microorganisms. This strain was identified by sequencing the ribosomal RNA 16S gene and its sequence is deposited at GenBank (access number: FR717465). The strain was grown in Rogosa broth (Oxoid, UK), at 37 °C, for 18-24 h. After incubation period, its purity was verified and concentrations of 109 cells·mL<sup>-1</sup> were guaranteed, determined by counting in a Neubauer chamber.

*Microsilos preparation.* Microsilos preparation was carried out according to the methodology proposed by Rodríguez *et al.* (2016) in hermetically sealed glass tubes (120 mm height x 70 mm diameter). First, a mixture was prepared with the forages to be ensiled (OM-22 and moringa, 50:50 in humid base), which constituted the fiber and protein core of silages to be evaluated. Later, this core was mixed with the three levels of sweet potato tubers (0, 25 and 50 %) and then, all treatments were uniformly sprayed with urea (1 %) and ammonium sulfate (0.2 %), diluted in water at a proportion of 1: 2, also on a humid base. After mixing with urea and ammonium sulfate, it was left to rest for 30 minutes before adding the microbial inoculum to treatments. For this inoculation, 75 mL of medium with the corresponding inoculum for each 1.5 kg of the material to be ensiled were sprayed for each combination of forage and sweet potato (5% v/w). Treatments without microbial inoculum were sprayed with the same amount of distilled water to ensure that all treatments were homogeneously moistened.

After a last mixing, treatments were introduced into glass containers, in layers that were compacted with a tamper tool. At the end, containers were hermetically sealed. Microsilos, with approximately 300 g of fresh matter, were kept under anaerobic conditions for a period of 64 days. The evaluated treatments were:

- Forage of OM-22: moringa (F)
- Forage of OM-22: moringa+25 % of sweet potato tubers (F+25% B)
- Forage of OM-22: moringa+50 % of sweet potato tubers (F+50% B)
- Forage of OM-22: moringa+*P. pentosaceus* LB-25 (F+LB-25)
- Forage of OM-22: moringa+25 % of sweet potato tubers+*P. pentosaceus* LB-25 (F+25 % B+LB-25)
- Forage of OM-22: moringa+50 % of sweet potato tubers+*P. pentosaceus* LB-25 (F+50 % B+LB-25)

At the end of silage process, microsilos were opened

Como aditivo energético para incrementar el contenido de carbohidratos de fácil fermentación se empleó tubérculos de boniato. Se utilizaron boniatos de pequeño y mediano tamaño, sin lavar, pero sin tierra adherida. Los tubérculos se cortaron longitudinalmente en trozos y luego se redujo su tamaño lasqueándolos en láminas finas. Este proceso se realizó en el momento en que se prepararon los ensilajes para evitar en lo posible la oxidación de los almidones.

Como aditivo microbiano se utilizó el cultivo puro de la cepa de bacterias ácido-lácticas *P. pentosaceus* LB-25, obtenida del Banco de Microorganismos del ICA. Esta cepa se identificó por secuenciación del gen 16S ARN ribosomal y su secuencia se encuentra depositada en el GenBank (número de acceso: FR717465). La cepa se cultivó en caldo Rogosa (Oxoid, UK), a 37 °C, durante 18 a 24 h. Después del período de incubación, se verificó su pureza y se garantizó concentraciones de 109 células·mL<sup>-1</sup>, determinadas por conteo en cámara de Neubauer.

*Elaboración de los microsilos.* La elaboración de los microsilos se realizó según la metodología propuesta por Rodríguez *et al.* (2016) en tubos de vidrio (120 mm altura x 70 mm diámetro) herméticamente cerrados. Primero se preparó una mezcla con los forrajes a ensilar (OM-22 y moringa, 50:50 en base húmeda), que constituyó el núcleo fibroso y proteico de los ensilados a evaluar. Posteriormente se mezcló este núcleo con los tres niveles de tubérculos de boniato (0, 25 y 50%) y a continuación a todos los tratamientos se les asperjó uniformemente urea (1%) y sulfato de amonio (0.2%), diluidos en agua en una proporción (1:2), también en base húmeda. Terminado el mezclado con la urea y el sulfato de amonio, se dejó reposar 30 minutos antes de añadir el inóculo microbiano a los tratamientos. Para dicha inoculación, se asperjaron 75 mL de medio con el inóculo correspondiente por cada 1.5 kg del material a ensilar para cada combinación de forraje y boniato (5 % v/p). A los tratamientos sin inóculo microbiano se le asperjó la misma cantidad de agua destilada para garantizar que todos los tratamientos se humedecieran homogéneamente.

Luego de un último mezclado, los tratamientos se introdujeron en los recipientes de vidrio, por capas que se compactaron con un pisón. Al finalizar, los recipientes se sellaron herméticamente. Los microsilos, con aproximadamente 300 g de materia fresca, se mantuvieron en condiciones de anaerobiosis por un período de 64 días. Los tratamientos evaluados fueron:

- Forraje de OM-22: moringa (F)
- Forraje de OM-22: moringa + 25 % tubérculos de boniato (F+25%B)
- Forraje de OM-22: moringa + 50 % tubérculos de boniato (F+50%B)
- Forraje de OM-22: moringa + *P. pentosaceus* LB-25 (F+LB-25)
- Forraje de OM-22: moringa+ 25 % tubérculos de boniato+ *P. pentosaceus* LB-25 (F+25 %B+ LB-25)
- Forraje de OM-22: moringa + 50 % tubérculos de boniato + *P. pentosaceus* LB-25 (F+50 %B+ LB-25)

and a sample of 10 g was taken from each, 90 mL of distilled water was added and it was mixed in orbital shaker at 250 rpm for 15 minutes, at 20 °C. Then, the mixture was filtered through gauze and pH was measured to the filtrate (Everich pH meter, PHSJ-3F, China). Additionally, approximately 200 g were taken from each microsilos, they were dried to constant weight in a forced air oven, with regulated temperature (60 °C) and then they were ground in a hammer mill until reaching a particle size of 1 mm. Subsequently, half of the dry material from each microsilos was individually stored in sealed nylon bags for chemical composition analysis. The rest of dry material was homogeneously mixed by treatment and the obtained pool was also stored in sealed nylon bags until it was used for *in vitro* evaluations.

*In vitro* evaluation of the fermentative capacity of the obtained silages. Two *in vitro* tests were performed to evaluate the nutritional value of the obtained mixed silages, in which gas production technique described by Theodorou *et al.* (1994) was used. An amount of 1.0 g of each treatment was incubated in 100 mL glass bottles, with culture medium (Menke and Steingass 1988) and an inoculum of ruminal microorganisms in a proportion of 0.20 mL of the total incubation volume (80 mL).

Ruminal content of two stabulated adult Siboney cows, fed ad libitum with grass forage and free access to water and mineral salts, was used as inoculum. Rumen content was collected through the rumen cannula, before offering food in the morning, and it was kept in independent closed thermoses until reaching the laboratory, where they were filtered through gauze and mixed in equal proportions. During the process, inocula temperature was maintained at  $39 \pm 1^\circ\text{C}$ , and anaerobic conditions by continuous flow of  $\text{CO}_2$ . Bottles were sealed and incubated in a bath, at controlled temperature (39 °C). This moment was taken as zero hour of incubation. In both tests, bottles without substrate were incubated as control.

In the first test, to determine *in vitro* fermentation kinetics of obtained silages, gas production was measured up to 144 h, using an HD8804 manometer coupled to a TP804 pressure calibrator (DELTA OHM, Italy). After each measurement, gas was released to equalize the external and internal pressures of bottles. Gas volume was estimated from pressure data, using a pre-established linear regression equation (Rodríguez *et al.* 2013). Gas volume was expressed per gram of incubated organic matter (incOM). To estimate gas production kinetics, the exponential model described by Krisnamoorthy *et al.* (1991) was used:

$$Y = D [1 - \text{Exp}(-c(t - L))]$$

Where Y is accumulated gas production ( $\text{mL g}^{-1}$  incOM) at an incubation time t (h), D is fermentation potential of the substrate under incubation conditions (asymptote of the curve,  $\text{mL g}^{-1}$  incOM), c is fermentation

Al finalizar el proceso de ensilaje, se abrieron los microsilos y 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 al filtrado se le midió pH (pHmetro Everich, PHSJ-3F, China). Adicionalmente, se tomaron aproximadamente 200 g de cada microsilos, se secaron hasta peso constante en estufa de aire forzado, con temperatura regulada (60 °C) y 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 para 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*.

*Evaluación in vitro de la capacidad fermentativa de los ensilados obtenidos.* Para evaluar el valor nutritivo de los ensilados mixtos obtenidos se realizaron dos ensayos *in vitro*, en los cuales se utilizó la técnica de producción de gas descrita por Theodorou *et al.* (1994). Se incubó 1.0 g de cada tratamiento en botellas de vidrio de 100 mL, con medio de cultivo (Menke y Steingass 1988) e inóculo de microorganismos ruminales en proporción de 0.20 mL del volumen total de incubación (80 mL).

Se utilizó como inóculo el contenido ruminal de dos vacas de raza Siboney, adultas, estabuladas, alimentadas ad libitum con forraje de gramíneas y con libre acceso a agua y sales minerales. El contenido ruminal se recolectó a través de la cánula ruminal, antes de ofrecer el alimento en la mañana, y se conservó en termos cerrados independientes hasta llegar al laboratorio, donde se filtraron a través de gasa y se mezclaron en proporciones iguales. Durante el proceso, se mantuvo la temperatura de los inóculos a  $39 \pm 1^\circ\text{C}$ , y condiciones anaeróbicas mediante flujo continuo de  $\text{CO}_2$ . Las botellas se sellaron y se incubaron en baño, a temperatura controlada (39 °C). Se tomó ese momento como la hora cero de la incubación. En ambos ensayos se incubaron botellas sin sustrato como blancos.

En el primer ensayo, para determinar la cinética de fermentación *in vitro* de los ensilados obtenidos se midió la producción de gas hasta las 144 h, por medio de un manómetro HD8804 acoplado a un calibrador de presión TP804 (DELTA OHM, Italia). 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). El volumen de gas se expresó por gramo de materia orgánica (MO) incubada (MOinc). Para estimar la cinética de producción de gas, se utilizó el modelo exponencial descrito por Krisnamoorthy *et al.* (1991):

$$Y = D [1 - \text{Exp}(-c(t - L))]$$

Donde, Y es la producción de gas acumulada ( $\text{mL g}^{-1}$  MOinc) a un tiempo de incubación t (h), D es el potencial de fermentación del sustrato en las condiciones

fractional rate of ( $h^{-1}$ ) and L is the Lag phase of fermentation (h).

In the second test, gas production was measured only up to 24 hours of incubation (3, 6, 9, 12, 18, and 24 h). At the end of incubation, bottles were opened and their contents were filtered to nylon bags (50  $\mu$ m of porosity and 28 cm<sup>2</sup> of surface area), previously tared in an analytical balance (Sartorius BL 1,500  $\pm$  0.0001). Bags with fermentation residues were dried up through constant weight in a forced air oven with regulated temperature at 60°C, for 72 hours. By this means, apparent *in vitro* degradability of DM (DAIVMS) of evaluated silages was determined by gravimetry, as the difference between incubated substrate and fermentation residue, expressed as a proportion of incubated substrate and multiplied by 100 (%).

In addition, 5 mL of sample were taken from the filtrate to determine the NH<sub>3</sub> content, which were preserved until the time of their analysis.

**Chemical analysis.** To determine the chemical composition of silages, DM, OM and crude protein (CP) were determined (AOAC 2016). Neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) were quantified by the procedure described by Van Soest *et al.* (1991). To obtain ammonia concentration in the *in vitro* test, the colorimetric technique proposed by Chaney and Marbach (1962) was used.

**Statistical analysis.** For the analysis of chemical composition of evaluated silages, a completely randomized experimental design, with a factorial arrangement (3x2), was used, in which the main factors were the 3 levels of sweet potato inclusion (0, 25 and 50 %) and the inclusion of microbial additive (without additive and with *P. pentosaceus* LB-25). Microsilos were considered as an experimental unit (5).

In the 24 h *in vitro* trial, a randomized block design with a factorial arrangement (3x2) was used, where analyzed factors were the same as in the previous case and incubations were considered as a block (4). In this experiment, bottles were considered as an experimental unit (3 bottles per treatment).

In both cases, variables were analyzed by ANOVA. In case differences were found ( $P < 0.05$ ), means of treatments were compared by Duncan (1955) test. InfoStat statistical package (Di Rienzo *et al.* 2012) was used for these analyzes.

In the case of the variable *in vitro* accumulated gas production, the fermentation was divided a priori into two phases. The first phase included three sampling times between the start and the 9 hours of incubation (3, 6 and 9 h) and the second phase was considered from that moment to the end of incubation (12, 16 and 24 h). Since *in vitro* accumulated gas production is measured over time on the same experimental unit, the methodology proposed by Gómez *et al.* (2019) was applied. For the

de incubación (asíntota de la curva, mL g<sup>-1</sup> MOinc), c es la tasa fraccional de fermentación ( $h^{-1}$ ) y L es la fase Lag de la fermentación (h).

En el segundo ensayo, la producción de gas se midió solo hasta las 24 horas de incubación (3, 6, 9, 12, 18 y 24 h). Al finalizar la incubación se abrieron las botellas y su contenido se filtró a través de bolsas de nailon (50  $\mu$ m de porosidad y área superficial de 28 cm<sup>2</sup>), taradas previamente en balanza analítica (Sartorius BL 1500,  $\pm$  0,0001). Las bolsas con los residuos de la fermentación se secaron hasta peso constante en una estufa de aire forzado con temperatura regulada a 60°C, durante 72 horas. Por este medio se determinó por gravimetría la degradabilidad aparente *in vitro* de la MS (DAIVMS) de los ensilajes evaluados, como la diferencia entre el sustrato incubado y el residuo de la fermentación, expresado como proporción del sustrato incubado y multiplicado por 100 (%).

Además, del filtrado se tomaron 5 mL de muestra para determinar el contenido de NH<sub>3</sub>, los que se preservaron y conservaron hasta el momento de su análisis.

**Análisis químico.** Para determinar la composición química de los ensilados, se les determinó MS, MO y proteína bruta (PB) (AOAC 2016). La fibra detergente neutro (FDN) y la fibra detergente ácido (FDA) se cuantificaron por el procedimiento descrito por Van Soest *et al.* (1991). Para obtener la concentración de amoníaco en el ensayo *in vitro*, se utilizó la técnica colorimétrica propuesta por Chaney y Marbach (1962).

**Análisis estadístico.** Para el análisis de la composición química de los ensilajes evaluados, se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado con arreglo factorial (3x2), donde los factores principales fueron los 3 niveles de inclusión de boniato (0, 25 y 50 %) y la inclusión de aditivo microbiano (sin aditivo y con *P. pentosaceus* LB-25). Los microsilos se consideraron como unidad experimental (5).

En el ensayo *in vitro* de 24 h se empleó un diseño de bloques al azar con arreglo factorial (3x2), donde los factores analizados fueron los mismos que en el caso anterior y las incubaciones se consideraron como bloque (4). En este experimento las botellas se consideraron como unidad experimental (3 botellas por tratamiento).

En ambos casos, las variables se analizaron por ANOVA. Cuando se hallaron diferencias ( $P < 0.05$ ), las medias de los tratamientos se compararon por la dócima de rangos múltiple de Duncan (1955). Para estos análisis se empleó el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2012).

En el caso de la variable producción de gas acumulada *in vitro* se dividió a priori la fermentación en dos fases. La primera fase incluyó tres horarios de muestreo entre el inicio y las 9 horas de incubación (3, 6 y 9 h) y la segunda fase se consideró desde ese instante hasta el final de la incubación (12, 16 y 24 h). Como la producción acumulada de gas *in vitro* es medida repetida en el tiempo sobre la misma unidad experimental, se empleó la metodología propuesta por Gómez *et al.* (2019). Para

analysis of these data, SAS (2013) statistical package, version 9.3, was used.

### Results and Discussion

The chemical composition of forages and sweet potato tuber used in silage production was previously reported (Rodríguez *et al.* 2020). In all cases, forage DM values were higher than 30% as suggested by Michelena and Molina (1990).

When evaluating the effect of additives on DM yield, estimated as the proportion between obtained silage DM and the DM of materials to be conserved and expressed as percent, there was no interaction among factors nor effect of microbial additive LB-25 ( $P > 0.05$ ). However, sweet potato inclusion level affected this indicator ( $P < 0.05$ ) by decreasing with 50 % inclusion of the tuber (figure 1). In all the treatments, DM yield showed values higher than 96.6 %, which could be related to the high DM levels of the preserved forage mix and to the type of microsilos used in the study, which does not have losses due to lixiviation.

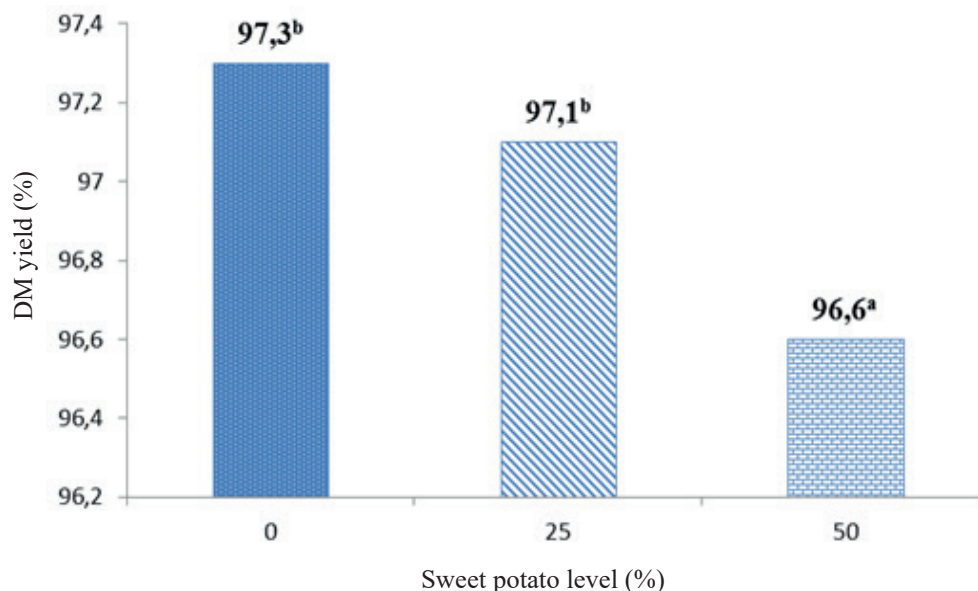


Figure 1. Effect of inclusion level of the energy additive on DM yield (%) of evaluated silages (SE = ± 3.12)

Regarding pH, there was no interaction between the effects of the two evaluated additives nor the effect of LB-25 microbial additive ( $P > 0.05$ ). However, the inclusion of sweet potato influenced on this indicator of fermentation ( $P = 0.003$ ) although no differences were observed between 25 and 50 % of tubers (figure 2).

High pH values observed in the treatments without sweet potato did not affect the organoleptic characteristics of microsilos nor were there signs of putrefaction or the presence of filamentous fungi. The maximum pH value for obtaining quality silage is between 3.8 and 4.2 (McDonald *et al.* 1991). However, other research has also found that, at high DM content of forage to be ensiled, good products preserved at higher pH can be obtained (Castle and Watson 1984 and

el análisis de estos datos se empleó el paquete estadístico SAS (2013), versión 9.3.

### Resultados y Discusión

La composición química de los forrajes y el tubérculo de boniato utilizados en la producción de los ensilajes se informó previamente (Rodríguez *et al.* 2020). En todos los casos, los valores de MS de los forrajes fueron superiores al 30% según sugieren Michelena y Molina (1990).

Al evaluar el efecto de los aditivos en el rendimiento de MS, estimado como la proporción entre la MS de los ensilajes obtenidos y la MS de los materiales a conservar y expresado como por ciento, no se apreció interacción entre los factores ni efecto del aditivo microbiano LB-25 ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, el nivel de inclusión de boniato sí afectó este indicador ( $P < 0.05$ ) al disminuir con el 50 % de inclusión del tubérculo (figura 1). En todos los tratamientos el rendimiento de MS mostró valores superiores al 96.6 %, lo cual pudo estar relacionado con los altos niveles de MS de la mezcla de forrajes conservada y al tipo de microsilos utilizado en el estudio, que no tiene pérdidas por lixiviación.

En cuanto al pH, no hubo interacción entre los efectos de los dos aditivos evaluados ni efecto del aditivo microbiano LB-25 ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, la inclusión del boniato influyó en este indicador de la fermentación ( $P = 0.003$ ) aunque no se apreció diferencias entre 25 y 50 % de tubérculos (figura 2).

Los valores elevados de pH observados en los tratamientos sin boniato no afectaron las características organolépticas de los microsilos ni se hallaron indicios de putrefacción o presencia de hongos filamentosos. El valor máximo de pH para obtener un ensilaje de calidad se plantea entre 3.8 y 4.2 (McDonald *et al.* 1991). Sin embargo, otras investigaciones también han observado que a altos contenidos de MS de los forrajes a ensilar se pueden obtener buenos productos conservados a pH más

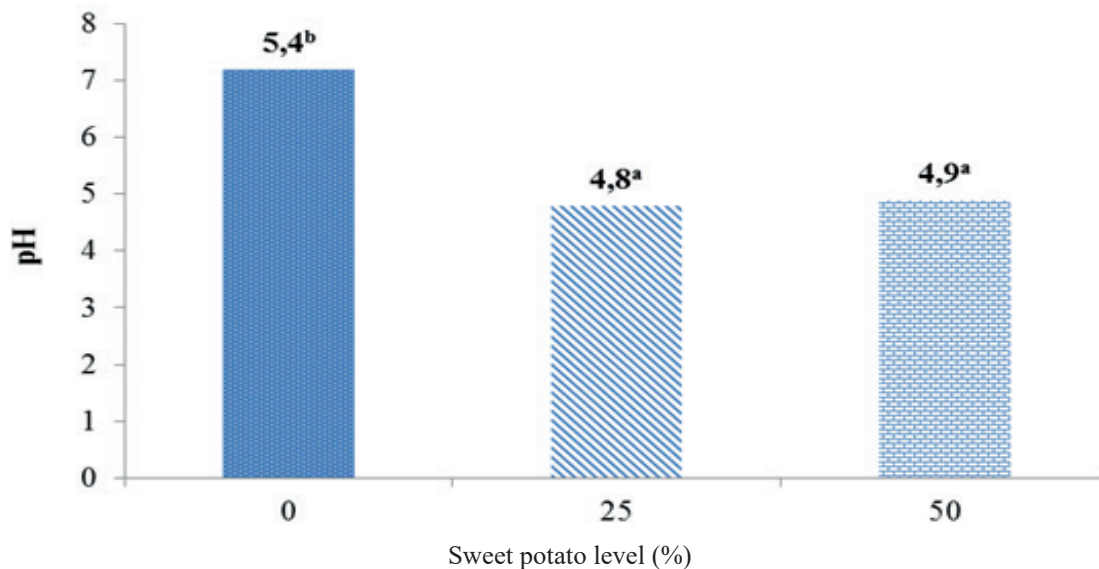


Figure 2. Effect of inclusion level of the energy additive on pH of evaluated silages (SE=± 0.11)

Dumont 1994). In fact, it is argued that it is common to find silages with higher pH values when they have been produced with pre-dried forages (dos Santos *et al.* 2013).

There was also no interaction of evaluated factors on indicators of chemical composition ( $P > 0.05$ ). After analyzing individual factors, it was observed that sweet potato level affected DM, OM, NDF and ADF ( $P < 0.0001$ ), while the inclusion of LB-25 strain increased NDF ( $P = 0.048$ ). None of the additives had an effect on CP content of evaluated silages ( $P > 0.05$ ) and the values obtained for this indicator were superior to 10.0 % for all treatments.

Table 1 shows the effect of sweet potato inclusion level and the inclusion of LB-25 on indicators of chemical composition of the evaluated silages. DM and NDF contents decreased with the increase of tuber level because the pre-dried forage core was replaced by a fresh material with a lower content of DM and fiber ( $P < 0.0001$ ). However, OM content increased

elevados (Castle y Watson 1984 y Dumont 1994). De hecho, se plantea que es común encontrar ensilajes con valores de pH más altos cuando se han confeccionado con forrajes presecados (dos Santos *et al.* 2013)

Tampoco hubo interacción de los factores evaluados en los indicadores de la composición química ( $P > 0.05$ ). Al analizar los factores individuales, se observó que el nivel de boniato incidió en MS, MO, FDN y FDA ( $P < 0.0001$ ), mientras que la inclusión de la cepa LB-25 incrementó la FDN ( $P = 0.048$ ). Ninguno de los aditivos tuvo efecto en el contenido de PB de los ensilajes evaluados ( $P > 0.05$ ) y los valores obtenidos para este indicador fueron superiores al 10.0 % para todos los tratamientos.

En la tabla 1 se muestra el efecto del nivel de inclusión de boniato y de la inclusión de LB-25 en los indicadores de composición química de los ensilados evaluados. Los contenidos de MS y FDN disminuyeron al incrementar el nivel de tubérculo debido a que se sustituyó el núcleo de forrajes preseco por un material fresco con menor contenido de MS y fibra ( $P < 0.0001$ ).

Table 1. Effects of sweet potato and LB-25 strain inclusion on the chemical composition of the evaluated silages

Sweet potato level					
Tuber (%)	DM (%)	OM (%)	NDF (%)	ADF (%)	CP (%)
0	45.4 <sup>c</sup>	89.0 <sup>a</sup>	70.2 <sup>c</sup>	51.0 <sup>b</sup>	10.6
25	38.7 <sup>b</sup>	89.8 <sup>b</sup>	62.3 <sup>b</sup>	44.3 <sup>a</sup>	10.9
50	32.2 <sup>a</sup>	90.0 <sup>b</sup>	55.8 <sup>a</sup>	41.5 <sup>a</sup>	11.4
SE	0.52	0.12	1.14	1.13	0.30
P	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.2404
Inclusion of LB-25					
LB-25	DM (%)	OM (%)	NDF (%)	ADF (%)	CP (%)
Without LB-25	39.0	89.5	61.5	44.7	11.0
With LB-25	39.0	89.7	64.6	46.8	10.9
SE ±	0.41	0.09	0.90	0.90	0.24
P	0.3996	0.2898	0.0480	0.1695	0.7224

<sup>Abc</sup>Values with different letters per row differ at  $P < 0.05$  (Duncan 1955)

and ADF content decreased with the inclusion of 25 % of the tuber ( $P < 0.0001$ ), but, in both cases, there was no difference between silages with 25 and 50 % of this additive.

Even though differences in DM content were observed, all evaluated treatments showed DM superior to 30%, which is the minimum recommended value to obtain quality silages (Michelena and Molina 1990). The high levels obtained of NDF could be associated to cutting age of forages and the disappearance of soluble material during anaerobic fermentation (Rodríguez *et al.* 2016 and Rodríguez *et al.* 2019). On the other hand, increase of OM can be related to the higher OM content of sweet potato.

Due to the low protein content of sweet potato tubers, a decrease of CP content was expected with the increase of this additive in silage, as found by Neiva *et al.* (2001) by increasing sugarcane levels as a source of soluble carbohydrates. However, the fact that there were no differences could be related to the availability of nonstructural carbohydrates provided by the tuber, that could favor nitrogen retention processes through microbial protein synthesis. In any case, CP values found were higher than the 6-8 % PB suggested by Mertens (1994), as a minimum content so that this nutrient does not limit the fermentation of carbohydrates by the rumen microorganisms.

Regarding the effect of the inclusion of LB-25 microbial additive on NDF content, similar results were found by Junges *et al.* (2013) when evaluating a mixture of *L. plantarum*, *L. brevis* and *E. faecium* as a microbial additive. These authors related this increase of NDF content by including microbial additives, with the fermentation of part of the soluble components of forage to be preserved by the inoculated bacteria, which leads to the proportional increase of insoluble components. However, Ozduven *et al.* (2017), when inoculating with *L. buchneri* and *P. acidilactici* observed that these microorganisms improved the fermentation characteristics and decreased NDF and ADF content of silages of sunflower plants.

*In vitro* fermentation of silages. Table 2 shows the parameters of equations of the best fit to the experimental data obtained according to the exponential model of Krishnamoorthy *et al.* (1991), which was able to explain a high percent of the variability of data of accumulative *in vitro* gas production for all treatments ( $R^2 > 0.9783$ ).

It was observed that gas production potential (parameter D) tended to increase with sweet potato inclusion level. The same trend was show by the microbial additive when used with forages alone and 50 % of sweet potato. Regarding the fractional rate or parameter c, there was also a tendency to increase when including sweet potato, but, at the same inclusion level of the tuber, there were no differences in the magnitudes of this parameter when including the

Sin embargo, el contenido de MO se incrementó y el de FDA disminuyó cuando se incluyó 25 % del tubérculo ( $P < 0.0001$ ), pero en ambos casos no se apreció diferencia entre los ensilajes con 25 y 50 % de este aditivo.

Aun cuando se apreciaron diferencias en el contenido de MS, todos los tratamientos evaluados mostraron MS superiores al 30% que es el valor mínimo recomendado para obtener ensilajes de calidad (Michelena y Molina 1990). Los altos tenores de FDN obtenidos podrían estar asociados a la edad de corte de los forrajes y a la desaparición de material soluble durante la fermentación anaeróbica (Rodríguez *et al.* 2016 y Rodríguez *et al.* 2019). Por su parte, el incremento en la MO se puede relacionar con el mayor contenido de MO del boniato.

Dado el bajo contenido proteico de los tubérculos de boniato, se esperaba una disminución del contenido de PB con el incremento de este aditivo en el ensilaje, tal como hallaron Neiva *et al.* (2001) al aumentar los niveles de caña de azúcar como fuente de carbohidratos solubles. Sin embargo, el que no hubiera diferencias pudo estar asociado a que la disponibilidad de carbohidratos no estructurales aportados por el tubérculo pudo favorecer procesos de retención del nitrógeno a través de síntesis de proteína microbiana. En todo caso, los valores de PB encontrados fueron superiores a los 6-8 % PB que sugirió Mertens (1994) como contenido mínimo para que este nutriente no limite la fermentación de carbohidratos por los microorganismos del rumen.

Respecto al efecto de la inclusión del aditivo microbiano LB-25 en el contenido de FDN, resultados similares encontraron Junges *et al.* (2013) al evaluar como aditivo microbiano una mezcla de *L. plantarum*, *L. brevis* y *E. faecium*. Estos autores relacionaron este incremento del contenido de FDN al incluir aditivos microbianos, con la fermentación de parte de los componentes solubles del forraje a conservar por las bacterias inoculadas, lo que conlleva al aumento proporcional de los componentes insolubles. Sin embargo, Ozduven *et al.* (2017) al inocular con *L. buchneri* y *P. acidilactici* observaron que estos microorganismos mejoraban las características de la fermentación y disminuían el contenido de FDN y FDA de ensilajes de plantas de girasol.

Fermentación *in vitro* de los ensilados. En la tabla 2 se muestran los parámetros de las ecuaciones de mejor ajuste a los datos experimentales obtenidos según el modelo de exponencial de Krishnamoorthy *et al.* (1991), que fue capaz de explicar alto por ciento de la variabilidad de los datos de producción acumulada de gas *in vitro* de todos los tratamientos ( $R^2 > 0.9783$ ).

Se pudo apreciar que el potencial de producción de gas (parámetro D) tendió a incrementarse con el nivel de inclusión de boniato. Igual tendencia se apreció para el aditivo microbiano cuando se empleó con los forrajes solo y 50% de boniato. Respecto a la tasa fraccional o parámetro c, también se apreció una tendencia a incrementarse al incluir boniato, pero a igual nivel de inclusión del tubérculo no se



Table 2. Kinetic parameters of the curve of accumulated production of *in vitro* gas when fermenting evaluated silages, according to the exponential model of Krishnamoorthy *et al.* (1991)

Treatments	Parameter D* (mL g <sup>-1</sup> MOinc)	SE±	Parameter c (h <sup>-1</sup> )	SE±	Parameter L (h)	SE±	SE of the curve ±	R <sup>2</sup>
F	433.97	8.590	0.04	0.003	7.25	0.397	20.109	0.9835
F + 25% B	543.10	10.177	0.05	0.003	6.88	0.381	26.528	0.9815
F + 50% B	619.63	11.919	0.05	0.003	6.87	0.384	32.264	0.9790
F+ LB-25	468.57	10.682	0.04	0.003	7.34	0.459	23.265	0.9810
F + 25% B+ LB-25	538.24	11.189	0.05	0.003	6.83	0.430	28.362	0.9783
F + 50% B+ LB-25	662.69	11.502	0.05	0.003	6.82	0.351	30.795	0.9831

\*Parameters were significant in all cases (P< 0.0001)

microbial additive or not. On the other hand, the Lag phase (parameter L) showed an inverse trend because with the inclusion of sweet potato, the time required to start fermentation tended to decrease, but, like for fractional rate, this indicator was not affected by the inclusion of *Pediococcus* strain.

The increase of potential and fractional rate of gas production when sweet potato was included could be due to the greater amount of soluble carbohydrates available for fermentation, which corroborates the increase of nutritional value of silages by including this energy additive. Similar responses were observed when replacing *Cenchrus* forage with better quality *T. diversifolia* forage (Morales *et al.* 2016) or including up to 15 % of sweet potato in mixed silages of *Cenchrus* and *M. oleifera* (Rodríguez *et al.* 2019).

For the variable accumulative production of *in vitro* gas, there was no interaction between sweet potato level, the inclusion or not of LB-25 and sampling times, in the two phases of fermentation in which the sampling times were distributed a priori (P> 0.05).

Table 3 shows the individual effects of factors analyzed in the accumulated production of *in vitro* gas. It was appreciated that the effect of energy additive on accumulated gas production had the following performance in both fermentation phases: level 50 %> level 25 %> level 0 % (P<0.0001). Similarly, it was observed that the microbial additive improved gas production in the second phase of fermentation (P=0.0470). Regarding the factor sampling time, in both phases, gas production increased over time (P<0.0001).

Indicators of *in vitro* fermentation of silages. At 24 hours, there was no interaction between tuber level and microbial additive inclusion, nor the effect of LB-25 inclusion in DAIVMS (P>0.05). However, sweet potato level influenced on this gravimetric indicator (figure 3). DAIVMS increased with 50 % of tuber inclusion, but no differences were observed between the other two inclusion levels (P=0.0207).

The observed DAIVMS was higher than that reported by Rodríguez *et al.* (2019) for silages of *C. purpureus* (cv. Cuba CT-169) and *M. oleifera*, with the same cutting age and lower sweet potato inclusion levels (5, 10 and

observó diferencias en las magnitudes de este parámetro al incluir o no el aditivo microbiano. Por su parte, la fase Lag (parámetro L) mostró una tendencia inversa pues al incluir boniato el tiempo requerido para comenzar la fermentación tendió a disminuir, pero al igual que para la tasa fraccional este indicador no se afectó con la inclusión de la cepa de *Pediococcus*.

El incremento del potencial y la tasa fraccional de producción de gas cuando se incluyó boniato pudo estar dado por la mayor cantidad de carbohidratos solubles disponibles para la fermentación, lo que corrobora el incremento del valor nutritivo de los ensilados al incluir este aditivo energético. Respuestas similares se observaron al sustituir forraje de *Cenchrus* por forraje de *T. diversifolia* de mejor calidad (Morales *et al.* 2016) o incluir hasta 15 % de boniato en ensilajes mixtos de *Cenchrus* y *M. oleifera* (Rodríguez *et al.* 2019).

Para la variable producción acumulada de gas *in vitro*, no hubo interacción entre el nivel de boniato, la inclusión o no de LB-25 y los horarios de muestreo, en las dos fases de la fermentación en que a priori se distribuyeron los horarios de muestreo (P> 0.05).

En la tabla 3 se muestran los efectos individuales de los factores analizados en la producción acumulada de gas *in vitro*. Se apreció que el efecto del aditivo energético en la producción acumulada de gas tuvo en ambas fases de la fermentación el siguiente comportamiento: nivel 50 %> nivel 25 %> nivel 0 % (P<0,0001). De igual forma, se observó que el aditivo microbiano mejoró la producción de gas en la segunda fase de la fermentación (P=0.0470). Respecto al factor horario de muestreo, en ambas fases la producción de gas se incrementó en el transcurso del tiempo (P<0.0001).

Indicadores de la fermentación *in vitro* de los ensilados. A las 24 horas no hubo interacción entre el nivel de tubérculo y la inclusión del aditivo microbiano, ni efecto de la inclusión del LB-25 en la DAIVMS (P>0.05). Sin embargo, el nivel de boniato sí influyó en este indicador gravimétrico (figura 3). La DAIVMS se incrementó con el 50 % de inclusión del tubérculo, pero no se apreció diferencias entre los otros dos niveles de inclusión (P=0.0207).

La DAIVMS observada fue superior a la reportada por Rodríguez *et al.* (2019) para ensilados de *C. purpureus* (cv. Cuba CT-169) y *M. oleifera*, con la misma edad de corte

Table 3. Effect of sweet potato level, LB-25 inclusion and sampling time on accumulated production of *in vitro* gas (mL g<sup>-1</sup> incOM) during the two phases of fermentation

Sweet potato level (%)			
Tuber (%)	Gas production 1st phase	Gas production 2nd phase	
0	32.1 <sup>a</sup>	137.2 <sup>a</sup>	
25	55.3 <sup>b</sup>	187.3 <sup>b</sup>	
50	60.7 <sup>b</sup>	225.7 <sup>c</sup>	
SE	2.12	3.78	
P	<0.0001	<0.0001	
Inclusion of LB-25			
LB-25	Gas production 1st phase	Gas production 2nd phase	
Without LB-25	48.2	179.0	
With LB-25	50.5	187.8	
SE	1.73	3.09	
P	0.3340	0.0470	
Sampling times within the same phase (h)			
Time (h)	Gas production 1st phase	Time (h)	Gas production 2nd phase
3	13.3 <sup>a</sup>	12	128.4 <sup>a</sup>
6	47.0 <sup>b</sup>	18	186.9 <sup>b</sup>
9	87.8 <sup>c</sup>	24	234.9 <sup>c</sup>
SE	2.12	EE	3.78
P	<0.0001	P	<0.0001

<sup>abc</sup>Values with different letters per row differ at P<0.05 (Duncan 1955)

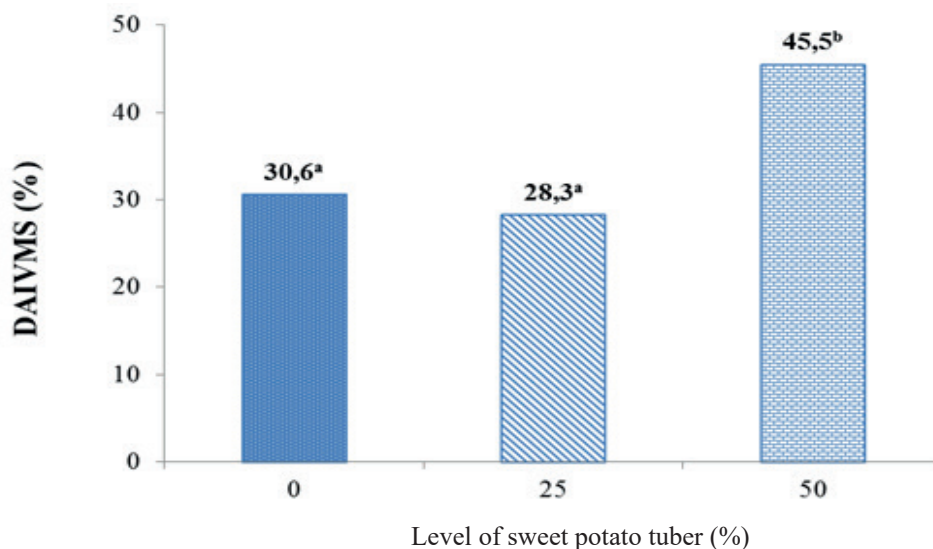


Figure 3. Effect of sweet potato tuber inclusion level on DAIVMS (%) after 24 h of fermentation of the evaluated silages (SE = ±4.42)

15 %). This confirms the importance of increasing inclusion levels of energy additives in mixed silages of tropical forages, to improve fermentation conditions for their conservation and their nutritional quality as feed for ruminants (Mühlbach 2001).

For N-NH<sub>3</sub>, there was also no interaction between sweet potato level and LB-25 inclusion, nor microbial additive effect (P> 0.05). However, sweet potato level influenced on this indicator (P<0.05), when an increase was observed after including 25 and 50 % of tuber regarding silage with only forage (figure 4).

y la inclusión de niveles inferiores de boniato (5, 10 y 15 %). Esto reafirma la importancia de incrementar los niveles de inclusión de aditivos energéticos en ensilajes mixtos de forrajes tropicales, para mejorar tanto las condiciones de fermentación para su conservación como su calidad nutritiva como alimento para rumiantes (Mühlbach 2001).

Para el N-NH<sub>3</sub> tampoco hubo interacción entre el nivel de boniato y la inclusión de LB-25, ni efecto del aditivo microbiano (P>0.05). Sin embargo, el nivel de boniato influyó en este indicador (P<0.05), al observarse un incremento al incluir 25 y 50% del tubérculo en

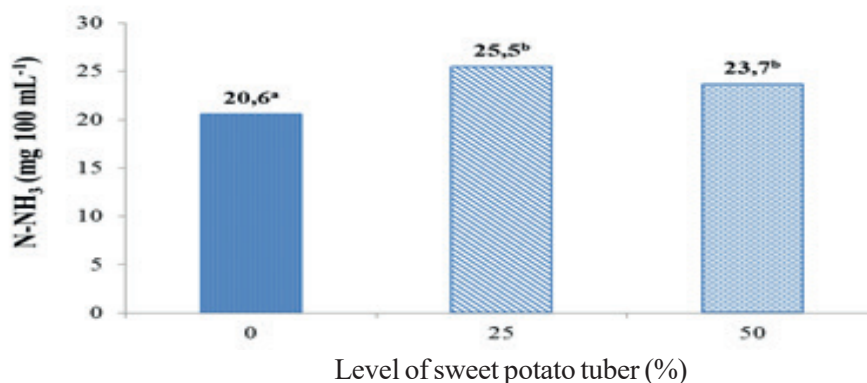


Figure 4. Effect of inclusion level of the energy additive on N-NH<sub>3</sub> (mg 100 mL<sup>-1</sup>) after 24 hours of *in vitro* fermentation of the evaluated silages (SE = ± 3.94)

Results demonstrated higher ruminal concentrations of N-NH<sub>3</sub> than those reported by Rodríguez *et al.* (2019). These differences could be caused by the higher levels of moringa used and urea inclusion in the mixtures to be ensiled. In addition, ammonia N concentrations above 20 mg 100 mL were observed in all treatments, superior to ruminal values considered optimal to maximize microbial protein synthesis (2-13 mg 100 mL<sup>-1</sup>) and ruminal fermentation rate of food (3-25 mg 100 mL<sup>-1</sup>) (Boucher *et al.* 2007).

The lack of effects of microbial additive, except in the NDF content of silage and in the accumulated production of *in vitro* gas from 12 to 24 h, could be related to the preserved forage species. A meta-analysis of 130 articles showed that the effect of microbial additives varies according to the forage species (Oliveira *et al.* 2017). That study showed that the use of microbial additives, regardless of the conserved forage species, improved the production of lactic acid and reduced the concentrations of butyric acid and ammoniacal nitrogen in silage. However, inocula reduced pH in many temperate and tropical forages, including legumes, but it did not influence on this indicator when corn, sorghum and sugar cane were preserved. Similarly, they observed that it did not influence on yield of corn and sorghum silos, and this indicator worsened in sugar cane silages.

### Conclusions

The inclusion of sweet potato tubers in mixed silages of *C. purpureus* x *C. glaucum* (OM-22 hybrid) and *M. oleifera* improved the nutritional value of conserved materials, with the best results with the inclusion of 50%. On the other hand, the use of *P. pentosaceus* LB-25 strain, at 5% (v/w), did not influence on nutritional quality of the evaluated silages, except NDF increased its content.

relación con el ensilaje con solo forrajes (figura 4).

Los resultados obtenidos mostraron mayores concentraciones ruminales de N-NH<sub>3</sub> que los informados por Rodríguez *et al.* (2019). Estas diferencias pudieron estar dadas por los mayores niveles de moringa utilizados y por la inclusión de urea en las mezclas a ensilar. Además, en todos los tratamientos se observaron concentraciones de N amoniacal por encima de los 20 mg 100 mL, superiores a los valores ruminales considerados óptimos para maximizar la síntesis de proteína microbiana (2 - 13 mg 100 mL<sup>-1</sup>) y la tasa de fermentación ruminal de los alimentos (3 - 25 mg 100 mL<sup>-1</sup>) (Boucher *et al.* 2007).

La falta de efectos del aditivo microbiano, excepto en el contenido de FDN del ensilaje y en la producción acumulada de gas *in vitro* desde las 12 a las 24 h, pudo estar relacionado con las especies forrajeras conservadas. Un meta-análisis de 130 artículos mostró que el efecto de los aditivos microbianos varía según la especie de forraje (Oliveira *et al.* 2017). Ese estudio demostró que el uso de aditivos microbianos, independientemente de la especie forrajera conservada, mejoraba la producción de ácido láctico y reducía las concentraciones de ácido butírico y nitrógeno amoniacal en el ensilaje. Sin embargo, los inóculos reducían el pH en muchos forrajes templados y tropicales, incluso leguminosas, pero no influía en este indicador cuando se conservaba maíz, sorgo y caña de azúcar. De igual manera, observaron que no influía en el rendimiento de silos de maíz y sorgo, y este indicador empeoraba en ensilajes de caña de azúcar.

### Conclusiones

La inclusión de tubérculos de boniato en ensilajes mixtos de *C. purpureus* x *C. glaucum* (híbrido OM-22) y *M. oleifera* mejoró el valor nutritivo de los materiales conservados, con los mejores resultados cuando se incluyó al 50%. Por su parte, el empleo de la cepa *P. pentosaceus* LB-25, al 5% (v/p), no influyó en la calidad nutritiva de los ensilajes evaluados, excepto que aumentó el contenido de FDN.

### References

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th Ed. George W. Latimer Jr (ed). Ed. AOAC International, Rockville MD, USA, ISBN: 978-0935-584-875.

- Boucher, S.E., Ordway, R.S., Whitehouse, N.L., Lundy, F.P., Kononoff, P.J. & Schwab, C.G. 2007. "Effect of Incremental Urea Supplementation of a Conventional Corn Silage-Based Diet on Ruminal Ammonia Concentration and Synthesis of Microbial Protein". *Journal of Dairy Science*, 90: 5619–5633, ISSN: 0022-0302, DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0012>.
- Castle, M.E. & Watson, J.N. 1984. "Silage and milk production: A comparison between unwilted and wilted grass silages". *Grass and Forage Science*, 39(2): 187-193, ISSN: 1365-2494, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1984.tb01680.x>.
- Chaney, A.L. & Marbach, E.P. 1962. "Modified reagents for determination of urea and ammonia". *Clinical Chemistry*, 8(2): 130-132, ISSN: 0009-9147, DOI: <https://doi.org/10.1093/clinchem/8.2.130>.
- 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: <http://www.infostat.com.ar>
- Domínguez, G.H., Hardy, C. & Ayala, J.R. 1982. "Effect of cutting age and final molasses levels on the quality of King grass silage (*P. purpureum* x *P. typhoides*)". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 16(1): 89-94, ISSN: 2079-3480.
- Dos Santos, R.J.C., Andrade, M., Guim, A., dos Santos, M.V.F., Batista, J.C. & de Leão de Mello, A.C. 2013. "Elephant grass clones for silage production". *Scientia Agricola*, 70(1): 6-11, ISSN: 1678-992X, DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162013000100002>.
- Dumont, J.C. 1994. Análisis y composición química de ensilajes. In: II Seminario "Producción y utilización de ensilajes de pradera para agricultores de la zona sur". González, M. & Bortolameolli, G. (eds.). Ed. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Remehue, Serie Remehue, nº 52, p: 27-37.
- Duncan, D.B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". *Biometrics*, 11(1): 1-42, ISSN: 0006-341X, DOI: <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- García, L.M., Mesa, A.R. & Hernández, N. 2014. "Forage potential of four cultivars of *Pennisetum purpureum* on a Grayish Brown soil of Las Tunas". *Pastos y Forrajes*, 37(4): 413-419, ISSN: 0864-0394.
- Gómez, S., Torres, V., García, Y., Herrera, M., Medina, Y. & Rodríguez, R. 2019. "Statistical procedure for the analysis of experiments with repeated measures over time in the agricultural and livestock field". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 53(4): 353-360, ISSN: 2079-3480.
- Gutiérrez, D., Morales, A., Elías, A. García, R. & Sarduy, L. 2014. "Chemical composition and in situ ruminal degradability of dry matter in mixed silages of *Tithonia diversifolia*: *Pennisetum purpureum* cv. Cuba CT-169, inoculated with VITAFERT". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 48(4): 379-385, ISSN: 2079-3480.
- Hernández A, Pérez J.M., Bosch, D. & Castro, N. 2015. Clasificación de los suelos de Cuba. Ed. INCA. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, p. 93, ISBN: 978-959-7023-77-7.
- Junges, D., Schmidt, P., Ortiz, C. & Pratti, J.L. 2013. "Additive containing homo and heterolactic bacteria on the fermentation quality of maize silage". *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 35(4): 371-377, ISSN: 1806-2636, DOI: <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v35i4.18833>.
- Krishnamoorthy, U., Soller, H., Steingass, H. & Menke, K.H. 1991. "A comparative study on rumen fermentation of energy supplements *in vitro*". *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 65(1-5): 28-35, ISSN: 1439-0396, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.1991.tb00237.x>.
- Liu, Q.H., Shao, T. & Bai, Y.F. 2016. "The effect of fibrolytic enzyme, *Lactobacillus plantarum* and two food antioxidants on the fermentation quality, alpha-tocopherol and beta-carotene of high moisture napiergrass silage ensiled at different temperatures". *Animal Feed Science and Technology*, 221 (Part A): 1–11, ISSN: 0377-8401, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.08.020>.
- McDonald, P., Henderson, A.R. & Heron, S.J.E. 1991. Principle of Ensilage. In: The Biochemistry of Silage. 2nd Ed. McDonald, P., Henderson, A. R. & Heron, S.J.E. (eds). Ed. Chalcombe, Marlow, England, p. 9-40, ISBN: 978-0948617225.
- 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.
- Mertens, D.R. 1994. Regulation of forage intake. In: Forage quality, evaluation and utilization. Fahey Jr., G.C. (Ed.). American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, p.450-493, ISBN: 9780891185796, DOI: <https://doi.org/10.2134/1994.foragequality.c11>
- Michelena, J.B. & Molina, A. 1990. "The effect of time of sun exposure of King grass (hybrid *Pennisetum*) on silage quality". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 24(2): 219-224, ISSN: 2079-3480.
- Morales, A., Rodríguez, R., Gutiérrez, D., Elías, A., Gómez, S. & Sarduy, L. 2016. "Evaluación de la inclusión de VITAFERT en el valor nutritivo de ensilajes de *Tithonia diversifolia* y *Pennisetum purpureum*". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 50(4): 619-630, ISSN: 2079-3480.
- Muck, R.E., Nadeau, E.M.G., McAllister, T.A., Contreras-Govea, F.E., Santos, M.C. & Kung Jr., L. 2018. "Silage review: Recent advances and future uses of silage additives". *Journal of Dairy Science*, 101(5): 3980-4000, ISSN: 0022-0302, DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>.
- Mühlbach, P.R.F. 2001. Uso de aditivos para mejorar el ensilaje de los forrajes tropicales. Estudio FAO: Producción y Protección Vegetal. Available: <http://www.fao.org/3/X8486S/x8486s0b.htm>, [Consulted: April 22th, 2020]
- Neiva, J.N.M., Ferreira, A.C.H. & Teixeira, M. 2001. Uso de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) deshidratada como aditivo en el ensilaje de pasto elefante (*Pennisetum purpureum*). Cartel Técnico 9.2. In: Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. Memorias de la Conferencia Electrónica de la FAO sobre los Ensilajes Tropicales. tMannetje, L. (ed.). Ed. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Rome, Italy, p. 175-176, ISBN: 92-5-304500-0
- Oliveira, A.S., Weinberg, Z.G., Ogunade, I.M., Cervantes, A.A.P., Arriola, K.G., Kim, Y.D., Li, X., Gonçalves, M.C.M., Vyas, D. & Adesogan, A.T. 2017. "Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative

- lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows". *Journal of Dairy Science*, 100(6): 4587-4603, ISSN: 0022-0302, DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11815>.
- Ozduven, M.L., Okuyucu, B., Büyükkiliç Beyzi, S. & Konca, Y. 2017. "The effects of lactic acid bacterial inoculants on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of sunflower silages". *International Journal of Current Research*, 9(7): 54289-54295, ISSN: 0975-833X.
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H. & Spoelstra, S.F. 2003. Microbiology of ensiling. In: *Silage Science and Technology*. Volume 42. Buxton, D.R., Muck, R.E. & Harrison, J.H (eds). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA, p. 31-93, ISBN: 9780891182344, DOI: <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c2>.
- Porto, M.C., Kuniyoshi, T.M., Azevedo, P.O.S., Vitolo, M. & Oliveira, R.P.S. 2017. "*Pediococcus spp.*: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers". *Biotechnology Advances*, 35(3): 361-374, ISSN: 0734-9750, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.004>.
- Rodríguez, R., Elías, A., Herrera, F., González, N., Moreira, O., Gutiérrez, D., Gómez, S., Sarduy, L. & Medina, Y. 2016. "Valor nutritivo de ensilajes mixtos *Pennisetum purpureum* (vc. CUBA CT-169): *Moringa oleifera*: *Ipomoea batatas*, inoculados con el producto biológico VITAFERT". Available: <<http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/nutricion/articulos/cuba2015-valor-nutritivo-ensilajes-t39536/141-p0.htm>>, [Consulted: April 25th, 2020].
- Rodríguez, R., Herrera, F., Gómez, S., González, N., Alonso, J., Elías, A., Moreira, O., Sarduy, L. & Medina, Y. 2019. "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". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 53(2): 119-133, 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.
- Rodríguez, R., Ontivero, Y., García, Y., Sosa, D. & Gómez, S. 2020. "Empleo del tubérculo de boniato (*Ipomoea batatas* L.) y la cepa *Lactobacillus pentosus* LB-31 como aditivos a ensilajes mixtos para rumiantes". *Livestock Research for Rural Development*, 32, ISSN: 0121-3784, Available: <<http://www.lrrd.org/lrrd32/7/rodri32117.html>>.
- Statistical Analysis Systems (SAS). 2013 *The SAS System for Windows*, Release 9.3. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, North Carolina, USA.
- Theodorou, M.K., Williams, B., Dhanoa, M., 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(3-4): 185-197, ISSN: 0377-8401, DOI: [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/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: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).

**Received: April 29, 2020**

**Accepted: June 2, 2020**