

Evaluation of the VITAFERT inclusion in the nutritive value of *Tithonia diversifolia* and *Pennisetum purpureum* silages

Evaluación de la inclusión de VITAFERT en el valor nutritivo de ensilajes de *Tithonia diversifolia* y *Pennisetum purpureum*

A. Morales¹, R. Rodríguez², D. Gutiérrez², A. Elías², S. Gómez² and L. Sarduy²

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Holguín, Avenida XX Aniversario, Vía Guardalavaca, Piedra Blanca, Holguín

²Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque
Email: rrodriguez@ica.co.cu

The effect of the inclusion of four levels of VITAFERT (0; 4.5, 6.0, 8.0 %) on the nutritive value of *T. diversifolia* and *P. purpureum* (cv. Cuba CT-169) mixed silages mixed in two proportions (40:60 and 60:40 wet basis). The chemical composition of silages improved, in terms of higher crude protein and lower neutral detergent fiber, when including VITAFERT at 4.5 and 6.0 %. The analysis of *in vitro* gas production showed that there was interaction between the three factors in the initial and intermediate phases of the fermentation ($P < 0.05$). In the intermediate phase, the highest gas production at all times corresponded to 60 % *T. diversifolia* and 8.0 % of VITAFERT ($P < 0.05$). In the final phase, there was no interaction between the three factors and the individual interactions indicated that the highest gas production was obtained by ensiling 60% *T. diversifolia* with 8.0% VITAFERT ($P < 0.001$). Regarding the kinetic parameters, the treatment with 60 % of *T. diversifolia* and 8.0 % of VITAFERT had the highest gas production potential (94.69 ml.g⁻¹ OMinc) and Vmax (2.58 ml.g⁻¹ OMinch⁻¹), although it reached Vmax later (7.46 h). It is concluded that the use of 4.5 and 6.0% of VITAFERT as a mixed silages additive of *T. diversifolia* and *P. purpureum* (v. CUBA CT-169) improved the chemical composition of silage. Likewise, the best indicators of the *in vitro* fermentation of mixed silages were obtained with 60 % of *T. diversifolia* and 8.0 % of VITAFERT.

Key words: mixed silage, *in vitro* gas production, fermentation

In the tropics, the grasses and forages production varies depending on the season of the year. In the rainy season there is an excess, while during the drought they are scarce. Silage is one of the most used methods to conserve and to use the forage during the period of lower growth of grasses. The ensiling process inhibits the growth of undesirable microorganisms that corrupt the dry matter (DM) and, in turn, guarantees the forages conservation with an adequate nutritional value.

The most commonly used forage species used in Cuba after sugarcane is *Pennisetum purpureum*, due to its high biomass production, good leaves ratio, rusticity and adaptation to a great diversity of soils and adverse climatic conditions (García *et al.* 2015). Among the *P. purpureum* clones, obtained and used in Cuba as forages, the cultivar variety CT-169 is one of the highest, of fast growing and DM yield (Martínez *et al.* 2010, Caballero 2013)

Se evaluó el efecto de la inclusión de cuatro niveles del producto VITAFERT (0; 4.5; 6.0; 8.0 %) en el valor nutritivo de ensilajes mixtos de *T. diversifolia* y *P. purpureum* (vc. Cuba CT-169), mezclados en dos proporciones (40:60 y 60:40 base húmeda). La composición química de los ensilados mejoró, en términos de mayor proteína bruta y menor fibra neutro detergente, al incluir VITAFERT al 4.5 y 6.0 %. El análisis de la producción de gas *in vitro* mostró que hubo interacción entre los tres factores en las fases inicial e intermedia de la fermentación ($P < 0.05$). En la fase intermedia, la mayor producción de gas en todos los horarios correspondió a 60 % *T. diversifolia* y 8.0 % de VITAFERT ($P < 0.05$). En la fase final, no hubo interacción entre los tres factores y las interacciones individuales indicaron que la mayor producción de gas se obtuvo al ensilar 60 % *T. diversifolia* con 8.0 % de VITAFERT ($P < 0.001$). En cuanto a los parámetros cinéticos, el tratamiento con 60 % de *T. diversifolia* y 8.0 % de VITAFERT tuvo el mayor potencial de producción de gas (94.69 ml.g⁻¹ MOinc) y Vmáx (2.58 ml.g⁻¹ MOinc h⁻¹), aunque alcanzó Vmáx más tardíamente (7.46 h). Se concluye que la utilización del 4.5 y 6.0 % de VITAFERT como aditivo de ensilajes mixtos de *T. diversifolia* y *P. purpureum* (vc. CUBA CT-169) mejoró la composición química de los ensilados. De igual forma, los mejores indicadores de la fermentación *in vitro* de los ensilajes mixtos se obtuvieron con 60 % de *T. diversifolia* y 8.0 % de VITAFERT.

Palabras clave: ensilaje mixto, producción de gas *in vitro*, fermentación

En el trópico, la producción de pastos y forrajes varía en dependencia de la estación del año. En el período lluvioso hay un exceso, mientras que durante la seca escasean. El ensilaje es uno de los métodos más utilizados para conservar y utilizar el forraje durante el período de menor crecimiento de los pastos. El proceso de ensilado inhibe el crecimiento de microorganismos indeseables que corrompen la materia seca (MS) y, a su vez, garantiza la conservación de los forrajes con un valor nutricional adecuado.

La especie forrajera más utilizada en Cuba, después de la caña de azúcar, es *Pennisetum purpureum*, debido a su alta producción de biomasa, buena proporción de hojas, rusticidad y adaptación a una gran diversidad de suelos y condiciones climáticas adversas (García *et al.* 2015). Entre los clones de *P. purpureum*, obtenidos y utilizados en Cuba como forrajes, la variedad cultivar CT-169 es una de las más altas, de rápido crecimiento y rendimiento de MS (Martínez *et al.* 2010, Caballero 2013).

Tithonia diversifolia is a forage shrub with high potential for animal production, due to its easy establishment, frequent cutting resistance, tolerance to poor soils and production of approximately 55 tons of DM per hectare per year (Nieves *et al.* 2011). In addition, this species accumulates as much nitrogen in its leaves as legumes, which can be used to improve the nitrogen balance in silages that are produced with the forage biomass surpluses obtained during the rainy season (Roa and Galeano 2015).

However, the low value of DM and soluble carbohydrates of tropical grasses does not favor the proper fermentation of freshly cut green material. Therefore, the use of natural additives as inoculants to improve fermentation and increase the nutritive value of conventional silage is recommended (Bates *et al.* 1989, Staples 1995).

VITAFERT is a biological product, developed at the Instituto de Ciencia Animal, which is considered a fermentation activator because it stimulates the production of organic acids and decrease pH (Elías and Herrera 2011). This product contains bacteria and yeasts, capable of producing appreciable amounts of short chain organic acids (lactic, acetic, propionic, succinic and pyruvic), as well as vitamins and enzymes.

The objective of this study was to evaluate the effect of the inclusion of the biological product VITAFERT on the nutritive value of *T. diversifolia* and *P. purpureum* (cv. Cuba CT-169) mixed silages by analyzing their chemical composition and the gas *in vitro* production.

Materials and Methods

Obtaining the evaluated silages. Eight mixed silages of *T. diversifolia* and *P. purpureum* (v. Cuba CT-169), selected from the silage formulations obtained and characterized previously by Gutiérrez *et al.* (2014) were evaluated. The eight silages evaluated were obtained by mixing two proportions of *T. diversifolia* and *P. purpureum* (40:60 and 60:40 weight on wet basis), preserved without inoculating or inoculated with four increasing levels of VITAFERT (0; 4.5, 6.0, 8.0% weight on wet basis).

Forage of *T. diversifolia* and *P. purpureum* (cv. Cuba CT-169) of 40 and 80 d of age were used, respectively. The plant material was collected in forage areas of

Tithonia diversifolia es una arbustiva forrajera con alto potencial para la producción animal, por su fácil establecimiento, resistencia al corte frecuente, tolerancia a suelos pobres y producción aproximada de 55 toneladas de MS por hectárea por año (Nieves *et al.* 2011). Además, esta especie acumula tanto nitrógeno en sus hojas como las leguminosas, lo que se puede aprovechar para mejorar el balance de nitrógeno en ensilajes que se elaboran con los excedentes de biomasa forrajera que se obtienen durante la época lluviosa (Roa y Galeano 2015).

Sin embargo, el bajo valor de MS y de carbohidratos solubles de los pastos tropicales no favorece la fermentación adecuada del material verde recién cortado. Por ello, se recomienda el uso de aditivos naturales como inoculantes para mejorar la fermentación y aumentar el valor nutritivo del ensilaje convencional (Bates *et al.* 1989, Staples 1995). El VITAFERT es un producto biológico, desarrollado en el Instituto de Ciencia Animal, que se considera un activador de la fermentación porque estimula la producción de ácidos orgánicos y disminuye el pH (Elías y Herrera 2011). Este producto contiene bacterias y levaduras, capaces de producir cantidades apreciables de ácidos orgánicos de cadena corta (láctico, acético, propiónico, succínico y pirúvico), así como vitaminas y enzimas.

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inclusión del producto biológico VITAFERT en el valor nutritivo de ensilajes mixtos de *T. diversifolia* y *P. purpureum* (vc. Cuba CT-169), mediante el análisis de su composición química y la producción de gas *in vitro*.

Materiales y Métodos

Obtención de los ensilajes evaluados. Se evaluaron ocho ensilajes mixtos de *T. diversifolia* y *P. purpureum* (vc. Cuba CT-169), seleccionados entre las formulaciones de ensilajes obtenidas y caracterizadas previamente por Gutiérrez *et al.* (2014). Los ocho ensilajes evaluados se obtuvieron por la mezcla de dos proporciones de *T. diversifolia* y *P. purpureum* (40:60 y 60:40 de peso en base húmeda), conservadas sin inocular o inoculadas con cuatro niveles crecientes del producto VITAFERT (0; 4.5; 6.0; 8.0 % peso en base húmeda).

Se empleó forraje de *T. diversifolia* y *P. purpureum* (vc. Cuba CT-169) de 40 y 80 d de edad, respectivamente. El material vegetal se recolectó en las áreas forrajeras de cultivos establecidos pertenecientes al Instituto de

Table 1. Proportions of *T. diversifolia* and *P. purpureum*

Proportion of silage forages	VITAFERT levels (%)
40 % <i>T. diversifolia</i> :	0.0
60 % <i>P. purpureum</i>	4.5
	6.0
	8.0
60 % <i>T. diversifolia</i> :	0.0
40 % <i>P. purpureum</i>	4.5
	6.0
	8.0

established crops from the Instituto de Ciencia Animal. The soil of these areas is Typical red ferrallitic, without fertilization and no irrigation (Hernández *et al.* 1999). Both forages, once harvested and fresh, were milled and dried in the sun to increase their DM up to approximately 30% (Reyes *et al.* 2008). The chemical composition of forages used for ensiling was previously reported (Gutiérrez *et al.* 2014).

The biological product VITAFERT was obtained from the fermentation of a mixture with final molasses of sugarcane, soybean, maize, urea, ammonium sulfate and mineral formulas and yogurt as a microbial inoculum (Elías and Herrera 2011). A fermenter with a capacity of 250 L of stainless steel was used for its elaboration, with a central blade to homogenize the mixture and an automatic regulator to control the agitation and rest time (120 and 20 minutes respectively).

The different forage proportions and inclusion levels of VITAFERT were mixed and flattened in microsilos, produced in PVC tubes (24 cm x 10 cm), with capacity for 450 g of fresh forage. Finally, the microsilos were hermetically sealed and placed for 62 days in a protected and dry place. Five microsilos were prepared per treatment.

At the end of the silage process, the microsilos were opened and a sample of about 100 g of each microsilo of the same treatment was taken and mixed homogeneously. The pool of fresh ensiled material per treatment was stored in hermetically sealed bags and in refrigeration (-4 °C) until its evaluation.

In vitro experimental procedure. The *in vitro* technique of gas production in glass bottles described by Theodorou *et al.* (1994) was used. 1.5 g of fresh matter of 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 the total incubation volume (80 mL). Four bottles per treatment were incubated and four bottles without substrate, as control bottle.

The ruminal content of three stabulated adult goats (*Capra hircus*), Nubia breed was used as inoculum, and they were fed ad libitum with grass forage and free access to water and mineral salts. The ruminal content of each animal was collected orally, before offering the food in the morning and was kept independent in closed vacuum flask until arriving at the laboratory, where they were filtered through several gauze layers. Subsequently, the three inocula were mixed in equal proportions. During the process, the inoculum temperature (39 ± 1 °C) and the anaerobiosis conditions were maintained by continuous CO₂ flow. The bottles were sealed and incubated in a water bath at controlled temperature (39 °C). That moment was taken as the zero hour of incubation.

The gas production was measured at 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 72 and 96 h by a HD8804 pressure gauge, coupled to a TP804 (DELTA OHM, Italy)

Ciencia Animal. El suelo de estas áreas es ferralítico rojo típico, sin fertilización ni riego (Hernández *et al.* 1999). Ambos forrajes, una vez cosechados y frescos, se molieron y secaron al sol para incrementar su MS hasta aproximadamente 30 % (Reyes *et al.* 2008). La composición química de los forrajes utilizados para ensilar se informó previamente (Gutiérrez *et al.* 2014).

El producto biológico VITAFERT 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 paleta central para homogenizar la mezcla, y un regulador automático para controlar el tiempo de agitación y reposo (120 y 20 min. respectivamente).

Las diferentes proporciones de forrajes y niveles de inclusión del VITAFERT se mezclaron y compactaron en microsilos, elaborados en tubos de PVC (24 cm x 10 cm), con capacidad para 450 g de forraje fresco. Por último, los microsilos se cerraron herméticamente y se ubicaron por 62 d en un local protegido y seco. Se prepararon cinco microsilos por tratamiento.

Al finalizar el proceso de ensilaje, se abrieron los microsilos y se tomó una muestra de aproximadamente 100 g de cada microsilo de un mismo tratamiento y se mezclaron homogéneamente. El pool de material ensilado fresco por tratamiento se almacenó en bolsas herméticamente selladas y en refrigeración (-4 °C) hasta su evaluación.

Procedimiento experimental in vitro. Se utilizó la técnica *in vitro* de producción de gas en botellas de vidrio descrita por Theodorou *et al.* (1994). Se incubó 1.5 g de materia fresca 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 incubaron cuatro botellas por tratamiento y cuatro botellas sin sustrato, como blancos.

Se utilizó como inóculo el contenido ruminal de tres cabras adultas estabuladas (*Capra hircus*), de raza Nubia, alimentadas ad libitum con forraje de gramíneas y libre acceso al agua y sales minerales. El contenido ruminal de cada animal se recolectó por vía oral, antes de ofrecer el alimento en la mañana y se conservó independiente en termos cerrados hasta llegar al laboratorio, donde se filtraron mediante varias capas de gasa. Posteriormente, los tres inóculos se mezclaron en proporciones iguales. Durante el proceso, se mantuvo la temperatura de los inóculos (39 ± 1 °C) y las condiciones de anaerobiosis mediante flujo continuo de CO₂. 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.

La producción de gas se midió a las 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 72 y 96 h por medio de un manómetro HD8804, acoplado a un calibrador de presión TP804 (DELTA OHM, Italy). Después de cada medición, se

pressure calibrator. After each measurement, the gas was released until the external and internal pressures of the bottles were equal. The gas volume was estimated from the pressure data by a pre-established linear regression equation (Rodríguez *et al.* 2013):

$$\text{Gas (mL)} = (\text{pressure [103 Pa]} + 4.95) / 2.5858, n = 132; r = 0.991)$$

The gas volume was expressed per gram of incubated organic matter (OMinc). To estimate the gas production kinetics, the Gompertz single-phase model was used:

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

Where:

Y- Gas production in the time t (mL g⁻¹ OMinc)

A- Potential of gas production (asymptote when t = ∞; mL g⁻¹ OMinc).

B- Relative rate of gas production

C- Constant factor of the microbial efficiency (h⁻¹)

t- Incubation time (h)

In addition, the incubation time at which the maximum velocity (TVmax) of gas production was reached was estimated, from the second derivative of Gompertz model evaluated at zero (Inflection point of this type of sigmoidal model). The maximum velocity of gas production (Vmax; mL g⁻¹ OMinc h⁻¹) was also estimated by replacing TVmax in the first derivative from the model (Rodríguez *et al.* 2013).

Chemical analysis. The samples of the different ensiled treatments were determined DM, OM and crude protein (CP), according to Latimer (2016). The neutral detergent fiber (NDF) was obtained by the procedure described by van Soest *et al.* (1991).

Statistical analysis. The gas production results were analyzed by a Mixed Generalized Linear Model with measures repeated over time, by the Proc Mixed procedure of SAS (SAS Institute Inc 2013). The variance-covariance structures (composite symmetry, variance components, toeplitz, and order1 autoregressive and non-structured) were tested to decrease the variation sources within the error. In order to select the model with the variance-covariance matrix of the best fit to the data, the AkaiKe Information, Corrected Akaike and Bayesian information criteria were used, for which the lowest value was considered. In this case, the best fit was the Toeplitz matrix. When there were differences (P < 0.05), the means were compared by means of the mid-range Tuckey-Kramer test (Kramer 1956). In the model, the proportion of silage forage (40 % *T. diversifolia*: 60 % *P. purpureum*, 60 % *T. diversifolia*, 40 % *P. purpureum*), VITAFERT levels (0, 4.5, 6.0, 8.0 %), time (2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 72, 96 h) and all possible interactions were considered as effect. As a random effect the replication nested in different hours was taken into account.

The response of indicators of the chemical composition of silages to the inclusion level of VITAFERT was estimated by linear regressions of second order, while

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):

$$\text{Gas (mL)} = (\text{presión [103 Pa]} + 4.95) / 2.5858, n = 132; r = 0.991)$$

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 monofásico de Gompertz:

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

Donde:

Y- es la producción de gas al tiempo t (mL g⁻¹ MOinc)

A- es el potencial de producción de gas (asíntota cuando t = ∞; mL g⁻¹ MOinc).

B- es la tasa relativa de producción de gas

C- es un factor constante de la eficiencia microbiana (h⁻¹)

t- es el tiempo de incubación (h)

Además, se estimó el tiempo de incubación al que se alcanzó la velocidad máxima (TVmáx) de producción de gas, a partir de la segunda derivada del modelo de Gompertz evaluada en cero (Punto de inflexión de este tipo de modelo sigmoidal). También se estimó la velocidad máxima de producción de gas (Vmáx; mL g⁻¹ MOinc h⁻¹), al sustituir TVmáx en la primera derivada del modelo (Rodríguez *et al.* 2013).

Análisis químico. A las muestras de los diferentes tratamientos ensilados se les determinó MS, MO y proteína bruta (PB), según Latimer (2016). La fibra neutro detergente (FND) se obtuvo mediante el procedimiento descrito por van Soest *et al.* (1991).

Análisis estadístico. Los resultados de producción de gas se analizaron por un Modelo Lineal Generalizado mixto con medidas repetidas en el tiempo, por el procedimiento Proc Mixed del SAS (SAS Institute Inc 2013). Se probaron las estructuras de varianza-covarianza (simetría compuesta, componentes de la varianza, toeplitz, auto-regresiva de orden 1 y no estructurada) para disminuir las fuentes de variación dentro del error. Para seleccionar el modelo con la matriz de varianza-covarianza de mejor ajuste a los datos, se utilizaron los criterios de Información AkaiKe, Akaike Corregido e Información Bayesiano, para lo que se consideró el valor más pequeño. En este caso la de mejor ajuste fue la matriz de Toeplitz. Cuando hubo diferencias (P < 0.05), las medias se compararon por medio de la dódima de rango medios Tuckey-Kramer (Kramer 1956). En el modelo se consideraron como efectos: proporción de forrajes ensilados (40% *T. diversifolia*: 60 % *P. purpureum*, 60 % *T. diversifolia*, 40 % *P. purpureum*), niveles de VITAFERT (0; 4.5; 6.0; 8.0 %), horarios (2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 72, 96 h) y todas las posibles interacciones. Como efecto aleatorio se tuvo en cuenta la réplica anidada en horarios.

La respuesta de indicadores de la composición química de los ensilajes al nivel de inclusión del VITAFERT se estimó mediante regresiones lineales de

to estimate the kinetic parameters of the gas production the single-phase Gompertz model was used. In both cases, the statistical package InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2012) was used.

Results and Discussion

Table 2 shows the chemical composition of the silage products evaluated in this study. When increasing the inclusion level of *T. diversifolia*, there was an increase in CP content and a decrease of OM and NDF content, as expected from the chemical composition of the fresh forage used (Gutiérrez *et al.* 2014). The NDF content of the silages ranged from 30.75 to 62.79 %, and was considered lower to the maximum acceptable NDF level (65 %) (Mahanna 1994, Phiri *et al.* 2007). The OM content was between 67.04 and 87.13 %, lower than the ranges of 90.0 to 92.0, reported by Topps and Oliver (1993), and 93.8 to 94.4, according to Phiri *et al.* (2007).

The CP content of the obtained silages was higher

segundo orden, mientras que para estimar los parámetros cinéticos de la producción de gas se utilizó el modelo monofásico de Gompertz. En ambos casos, se usó el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2012).

Resultados y Discusión

En la tabla 2 se presenta la composición química de los productos ensilados evaluados en este estudio. Al incrementar el nivel de inclusión de *T. diversifolia*, se constató incremento del contenido de PB y disminución del contenido de MO y FND, como era de esperar por la composición química de los forrajes frescos utilizados (Gutiérrez *et al.* 2014). El contenido de FND de los ensilajes varió de 30.75 a 62.79 %, por lo que se consideró inferior al máximo nivel de FND aceptable (65 %) (Mahanna 1994, Phiri *et al.* 2007). El contenido de MO estuvo entre 67.04 y 87.13 %, inferior a los rangos de 90.0 a 92.0, informados por Topps y Oliver (1993), y de 93.8 a 94.4, según análisis de Phiri *et al.* (2007).

El contenido de PB de los ensilajes obtenidos fue

Table 2. Chemical composition of the evaluated mixed forages

Proportion of silage forages	VITAFERT levels, %	DM, %	OM, %	CP, %	NDF, %
40% <i>T. diversifolia</i>	0.0	31.70	87.13	10.82	62.79
60% <i>P. purpureum</i>	4.5	33.30	68.27	22.90	37.37
	6.0	34.40	68.19	24.10	36.51
	8.0	35.70	80.71	17.32	60.49
60% <i>T. diversifolia</i>	0.0	28.90	78.29	16.86	50.76
40% <i>P. purpureum</i>	4.5	29.00	67.04	23.74	30.75
	6.0	31.70	69.61	24.94	36.13
	8.0	32.00	77.34	19.88	48.06

than the range of CP values for silage (9-14 % CP) reported by McDonald *et al.* (1987) and even, was higher than the protein content obtained in mixed maize silages with four different shrub legumes (50:50 on wet basis) (Phiri *et al.* 2007). However, other authors also reported silages with high protein tenors when ensiling *T. diversifolia* (Roa and Galeano 2015).

The addition of VITAFERT to forage mixtures improved the quality of the obtained silages, in terms of CP increase and NDF decrease, with respect to its not inclusion (0 % VITAFERT). However, the best results were observed for the VITAFERT 4.5 and 6.0 % levels, although precisely these two inclusion levels had an effect on the decrease of OM content.

The increase of CP levels of silages when including VITAFERT at 4.5 and 6.0 % coincides with what was reported by other authors when including an additive in the ensiling process of sugar cane forage (Reyes-Gutiérrez *et al.* 2015). It has also been described the NDF decrease when microbial additives are used, because certain fibrolytic enzymes can influence on the reduction of NDF contents under anaerobic conditions

superior al rango de valores de PB para ensilados (9-14 % PB) informado por McDonald *et al.* (1987) e incluso, fue muy superior a los contenidos proteicos obtenidos en ensilajes mixtos de maíz con cuatro leguminosas arbustivas diferentes (50:50 en base húmeda) (Phiri *et al.* 2007). Sin embargo, otros autores también informaron ensilajes con elevados tenores de proteína al ensilar *T. diversifolia* (Roa y Galeano 2015).

La adición del VITAFERT a las mezclas forrajeras mejoró la calidad de los ensilados obtenidos, en términos de incremento de PB y disminución de FND, con respecto a su no inclusión (0 % VITAFERT). Sin embargo, los mejores resultados se observaron para los niveles de 4.5 y 6.0 % de VITAFERT, aunque precisamente estos dos niveles de inclusión incidieron en la disminución del contenido de MO.

El incremento de los niveles de PB de los ensilados al incluir VITAFERT al 4.5 y 6.0 % coincide con lo informado por otros autores al incluir un aditivo en el proceso de ensilado de forraje de caña de azúcar (Reyes-Gutiérrez *et al.* 2015). También se ha descrito la disminución de la FND cuando se utilizan aditivos microbianos, pues ciertas enzimas fibrolíticas pueden incidir en la disminución de los contenidos de FND

(Dean *et al.* 2005). These results are important because most of the evaluated additives have not improved the fermentation characteristics of silage based on thick stems forages such as *Pennisetum spp.* (Mühlbach 2001).

Table 3 shows the second-order linear regression equations, obtained by evaluating the effect of the inclusion level of VITAFERT on the chemical composition indicators. All equations showed a high determination coefficient ($R^2 > 0.7900$). It was found that the inclusion level of VITAFERT had a quadratic effect on the performance of all analyzed variables. It seems that, although when including 4.5 and 6.0 % of VITAFERT, the fermentation process is improved, when increasing the dose to 8 %, are generate negative processes that counteract the positive effect of this product observed at lower inclusion levels. This could be due to the contribution of organic acids made by the product, which can influence on the pH of the silage, and which can affect, from the beginning, the plant material fermentation.

This performance of VITAFERT, when it is used as an additive in mixed silages of tropical forages, should

en condiciones anaeróbicas (Dean *et al.* 2005). Estos resultados son importantes porque la mayoría de los aditivos evaluados no han mejorado las características de la fermentación de ensilajes basados en forrajes de tallos gruesos como *Pennisetum spp.* (Mühlbach 2001).

En la tabla 3 se muestran las ecuaciones de regresión lineal de segundo orden, obtenidas al evaluar el efecto del nivel de inclusión del VITAFERT en los indicadores de la composición química. Todas las ecuaciones mostraron un coeficiente de determinación elevado ($R^2 > 0.7900$). Se constató que el nivel de inclusión de VITAFERT tuvo un efecto cuadrático en el comportamiento de todas las variables analizadas. Todo parece indicar que, si bien al incluir 4.5 y 6.0 % de VITAFERT se mejora el proceso de fermentación, al aumentar la dosis a 8 % se generan procesos negativos que contrarrestan el efecto positivo de este producto observado a niveles de inclusión más bajos. Esto se podría deber al aporte de ácidos orgánicos que hace el producto, que puede influir en el pH del ensilaje, y que puede afectar, desde el comienzo, la fermentación del material vegetal.

Este comportamiento del VITAFERT, cuando se utiliza como aditivo en ensilados mixtos de forrajes

Table 3. Linear regression equations of the second order between the level of VITAFERT used (independent variable) and indicators of the chemical composition of the evaluated mixed silages.

Proportion of silage forages	Indicator	Equation	SE	R ²
40% <i>T. diversifolia</i>	DM, %	$y = 0.04 x^2 + 0.21 x + 31.69$	0.071	0.9974
60% <i>P. purpureum</i>	OM, %	$y = 1.03 x^2 - 9.09 x + 87.25$	0.964	0.9861
	CP, %	$y = -0.58 x^2 + 5.52 x + 10.72$	0.763	0.9789
	NDF, %	$y = 1.68 x^2 - 13.87 x + 63.09$	2.374	0.9632
60% <i>T. diversifolia</i>	DM, %	$y = 0.06 x^2 - 0.08 x + 28.82$	0.663	0.7914
40% <i>P. purpureum</i>	OM, %	$y = 0.68 x^2 - 5.52 x + 78.28$	0.071	0.9998
	CP, %	$y = -0.37 x^2 + 3.41 x + 16.77$	0.718	0.9496
	NDF, %	$y = 1.14 x^2 - 9.41 x + 50.69$	0.570	0.9952

be analyzed in other studies. In this regard, Brea (2015), when studying the effect of inclusion of VITAFERT on the solid state fermentation processes of the bread fruit tree, also observed that CP values increased when adding this product to 2.5 and 5.5 %. In the same way, this author observed a decrease in OM when adding 2.5 % of VITAFERT, but there were not effect on the NDF content of the obtained products.

The analysis of *in vitro* gas production (mL.g⁻¹ OMinc) showed that there was interaction between the three factors ($P < 0.05$) for the first two phases of the fermentation (initial and intermediate). Table 4 presents the results of gas production in these two fermentation phases.

In the initial phase of fermentation, at 2 and 4 h there were not differences between treatments at the same

tropicales, se debe analizar con profundidad en otros estudios. Al respecto, Brea (2015) al estudiar el efecto de la inclusión del VITAFERT en los procesos de fermentación en estado sólido del fruto del árbol del pan también observó que los valores de PB se incrementaron al adicionar este producto al 2.5 y 5.5 %. De igual manera, este autor observó disminución de la MO al adicionar 2.5 % de VITAFERT, pero no encontró efectos en el contenido de FND de los productos obtenidos.

El análisis de la producción de gas *in vitro* (mL.g⁻¹ MOinc) mostró que hubo interacción entre los tres factores ($P < 0.05$) para las dos primeras fases de la fermentación (inicial e intermedia). En la tabla 4 se presentan los resultados de producción de gas en estas dos fases de la fermentación.

En la fase inicial de la fermentación, a las 2 y 4 h

Table 4. Profile of *in vitro* gas production (mL g⁻¹ OMinc) of the mixed silages evaluated in the initial and intermediate phases of the fermentation.

Initial phase Proportion of silage forage	VITAFERT levels, %	2 h	4 h	8 h	12 h	SE and Signif.
40% <i>T. diversifolia</i> 60% <i>P. purpureum</i>	0.0	18.85 ⁱ	24.78 ^h	33.83 ^{fg}	39.91 ^{cde}	±0.5812 P=0.0273
	4.5	18.38 ⁱ	25.49 ^h	34.26 ^{fg}	40.40 ^{cd}	
	6.0	16.69 ⁱ	24.37 ^h	32.97 ^g	40.10 ^{cd}	
	8.0	18.13 ⁱ	25.37 ^h	34.68 ^{fg}	42.29 ^{bc}	
60% <i>T. diversifolia</i> 40% <i>P. purpureum</i>	0.0	18.37 ⁱ	24.90 ^h	33.78 ^{fg}	41.09 ^{bc}	
	4.5	19.31 ⁱ	26.86 ^h	37.07 ^{def}	43.50 ^{ab}	
	6.0	18.81 ⁱ	25.06 ^h	34.63 ^{fg}	40.78 ^{bc}	
	8.0	17.34 ⁱ	24.38 ^h	36.60 ^{ef}	46.32 ^a	
Intermediate phase Proportion of silage forages						
40% <i>T. diversifolia</i> 60% <i>P. purpureum</i>	0	47.32 ⁿ	50.57 ^{klmn}	53.58 ^{ghijkl}	58.04 ^{cdef}	±0.7787 P=0.0346
	4.5	47.80 ^{mn}	51.06 ^{klmn}	54.61 ^{fghijk}	58.01 ^{cdefg}	
	6.0	47.79 ^{mn}	51.92 ^{iklm}	56.06 ^{efghij}	60.58 ^{cd}	
	8.0	50.44 ^{klmn}	53.43 ^{hijkl}	56.49 ^{defghi}	59.53 ^{cde}	
60% <i>T. diversifolia</i> 0% <i>P. purpureum</i>	0	48.06 ^{mn}	51.35 ^{klmn}	55.88 ^{efghij}	60.03 ^{cde}	
	4.5	49.97 ^{lmn}	53.22 ^{ijkl}	56.23 ^{defghij}	60.02 ^{cde}	
	6.0	47.20 ⁿ	50.43 ^{klmn}	53.28 ^{ijkl}	57.87 ^{cdefgh}	
	8.0	61.66 ^c	66.56 ^b	69.60 ^b	74.42 ^a	

Different letters indicate significant differences to $P < 0.05$

time. At 8 h of incubation, the gas production of the treatment with 40 % *T. diversifolia*: 60 % *P. purpureum* and 6.0 % of VITAFERT was lower with respect to the treatments 60 % *T. diversifolia*: 40 % *P. purpureum* with 4.5% and 8.0% of VITAFERT. While, at 12 h the highest values were observed for 60 % *T. diversifolia*: 40 % *P. purpureum* and 4.5 and 8.0 % inclusion of this microbial additive ($P < 0.05$).

In the intermediate phase of fermentation, it was observed that the highest gas production at all times corresponded to the highest level of *T. diversifolia*, ensiled with 8.0 % of VITAFERT ($P < 0.05$).

In the case of the final phase of fermentation, it was found that for gas production the interaction of the three effects was not significant. Table 4 shows the other tested interactions, which were significant.

With respect to VITAFERT interaction and level of the protein shrub, it was observed that the lower gas production was obtained for the treatments with 40 % *T. diversifolia*: 60 % *P. purpureum*, with 0 and 4.5 % of VITAFERT. While, the highest gas production was achieved by ensiling 60 % *T. diversifolia*: 40 % *P. purpureum* with 8.0 % of the microbial additive ($P < 0.001$).

Referring to the sampling time interaction and level of the protein shrub used, it was verified that as the incubation time increased, the gas production for both levels of the shrub ($P < 0.001$) increased, as expected from the accumulated values of gas production. But it was also observed that at all times the gas production

no hubo diferencias entre tratamientos en el mismo horario. A las 8 h de incubación, la producción de gas del tratamiento con 40 % *T. diversifolia*: 60 % *P. purpureum* y 6.0 % de VITAFERT fue menor con respecto a los tratamientos 60 % *T. diversifolia*: 40 % *P. purpureum* con 4.5 y 8.0 % de VITAFERT. Mientras, a las 12 h los mayores valores se observaron para 60 % *T. diversifolia*: 40 % *P. purpureum* y 4.5 y 8.0 % de inclusión de este aditivo microbiano ($P < 0.05$).

En la fase intermedia de la fermentación se observó que la mayor producción de gas en todos los horarios correspondió al mayor nivel de *T. diversifolia*, ensilada con 8.0 % de VITAFERT ($P < 0.05$).

En el caso de la fase final de la fermentación se constató que para la producción de gas la interacción de los tres efectos no fue significativa. En la tabla 4 se informan las demás interacciones probadas, que sí resultaron significativas.

Con respecto a la interacción VITAFERT y nivel de la arbustiva proteica, se observó que la menor producción de gas se obtuvo para los tratamientos con 40 % *T. diversifolia*: 60% *P. purpureum*, con 0 y 4.5 % de VITAFERT. Mientras, la mayor producción de gas se logró al ensilar 60 % *T. diversifolia*: 40 % *P. purpureum* con 8.0 % del aditivo microbiano ($P < 0.001$).

En cuanto a la interacción horario de muestreo y nivel de la arbustiva proteica utilizado, se comprobó que a medida que aumentó el tiempo de incubación se incrementó la producción de gas para ambos niveles de la arbustiva ($P < 0.001$), como era de esperarse al

was higher for treatments with 60 % *T. diversifolia*: 40 % *P. purpureum*.

For the sampling time interaction and VITAFERT level, there was a tendency to gas production increase, when increasing the incubation time, although this increase was not always significant. At all times the 8.0 % VITAFERT level showed the highest gas productions, while after 72 h, the treatment without VITAFERT reached the lowest values ($P < 0.05$).

The lack of interaction between the factors in the final phase of fermentation was probably due to the little fermentable material available after 30 h of incubation, which is even more probably in the case of silages. It is known that during the fermentative processes that take place during the food conservation, nutritive value is lost.

The differences observed in favor of a higher gas production, when increasing the levels of *T. diversifolia* and VITAFERT may be due to the increase in the degradability of the substrates or changes in the production of short chain fatty acids in the rumen with respect to the production of microbial biomass per unit of fermented substrate (Bach *et al.* 2005).

The results of gas production, attributed to the higher levels of VITAFERT used in the silage process, are corresponded with the improvement of the quality in the chemical composition of the silage products obtained, with respect to treatments without inoculant (Gutiérrez *et al.* 2014). In addition, there is a possibility that the microorganisms contributed by the biological product VITAFERT, of being active after the preservation process, may influence on the fermentative processes with effects similar to other microorganisms used as additives in the diet to improve the degradability of the fiber, such as *Saccharomyces cerevisiae* (Rodríguez *et al.* 2007), *Lactobacillus sp.* (Galina *et al.* 2007) and *Aspergillus oryzae* (Sosa *et al.* 2010).

The higher gas productions in the treatments with higher levels of *T. diversifolia* may be due to the high starch contents of this species (Mahecha and Rosales 2005), higher than the values of other shrubs of wide use in cattle feeding, which are easily fermentable by ruminant microorganisms. Castaño (2012) observed high contents of non-structural carbohydrates in *T. diversifolia* silages. However, in this study it was not possible to quantify how many of these carbohydrates were fermented during the silage process, an element to be determined in future studies.

The kinetic parameters of the *in vitro* fermentation of the evaluated silages are in table 5. It is important to note that the applied model showed a high determination coefficient for all treatments ($R^2 > 0.9685$), which allows to affirm that the mathematical model was capable of explaining a high percentage of the variability of the experimental data obtained.

The treatment of 60 % *T. diversifolia*: 40 % *P.*

tratarse de valores acumulados de producción de gas. Pero también se observó que en todos los horarios la producción de gas fue mayor para los tratamientos con 60 % *T. diversifolia*: 40 % *P. purpureum*.

Para la interacción horario de muestreo y nivel de VITAFERT se observó tendencia al incremento en la producción de gas, al aumentar el tiempo de incubación, aunque no siempre este incremento fue significativo. En todos los horarios el nivel de 8.0 % de VITAFERT mostró las mayores producciones de gas, mientras que a partir de las 72 h, el tratamiento sin VITAFERT alcanzó los menores valores ($P < 0.05$).

La falta de interacción entre los factores en la fase final de la fermentación probablemente se debió al poco material fermentable disponible después de las 30 h de incubación, lo que es más probable aún en el caso de ensilajes. Se conoce que durante los procesos fermentativos que tienen lugar durante la conservación del alimento, se pierde valor nutritivo.

Las diferencias observadas a favor de una mayor producción de gas, al incrementarse los niveles de *T. diversifolia* y VITAFERT se pueden deber al incremento en la degradabilidad de los sustratos o a cambios en la producción de ácidos grasos de cadena corta en el rumen con respecto a la producción de biomasa microbiana por unidad de sustrato fermentado (Bach *et al.* 2005).

Los resultados de la producción de gas, atribuidos a los niveles mayores de VITAFERT utilizados en el proceso de ensilaje, se corresponden con la mejora de la calidad en la composición química de los productos ensilados obtenidos, con respecto a los tratamientos sin inoculante (Gutiérrez *et al.* 2014). Además, existe la posibilidad de que los microorganismos aportados por el producto biológico VITAFERT, de mantenerse activos después del proceso de conservación, puedan influir en los procesos fermentativos con efectos similares a otros microorganismos utilizados como aditivos en la dieta para mejorar la degradabilidad de la fibra, como *Saccharomyces cerevisiae* (Rodríguez *et al.* 2007), *Lactobacillus sp.* (Galina *et al.* 2007) y *Aspergillus oryzae* (Sosa *et al.* 2010).

Las mayores producciones de gas en los tratamientos con mayores niveles de *T. diversifolia* se pueden deber a los altos contenidos de almidones de esta especie (Mahecha y Rosales 2005), superiores a los valores de otras arbustivas de amplio uso en la alimentación bovina, los que son fácilmente fermentables por los microorganismos ruminales. Castaño (2012) observó altos contenidos de carbohidratos no estructurales en ensilajes de *T. diversifolia*. Sin embargo, en este estudio no se pudo cuantificar cuántos de esos carbohidratos se fermentaron durante el proceso de ensilado, elemento que se debe determinar en estudios futuros.

Los parámetros cinéticos de la fermentación *in vitro* de los ensilajes evaluados se presentan en la tabla 5. Es importante señalar que el modelo aplicado mostró elevado coeficiente de determinación para todos los tratamientos ($R^2 > 0.9685$), lo que permite afirmar que el modelo

Table 5. Profile of *in vitro* gas production (mL g⁻¹ OMinc) of the mixed silages evaluated in the final phase of fermentation.

(%) Silage	VITAFERT				SE and Signif.
	0	4.5	6.0	8.0	
40% <i>T. diversifolia</i> 60% <i>P. purpureum</i>	66.83 ^d	66.57 ^d	70.13 ^c	70.39 ^c	±0.5318 P<0.0001
60% <i>T. diversifolia</i> 40% <i>P. purpureum</i>	69.01 ^{cd}	74.14 ^b	70.58 ^c	90.24 ^a	
Silage	Time				
	36 h	48 h	72 h	96 h	
40% <i>T. diversifolia</i> 60% <i>P. purpureum</i>	62.22 ^f	66.33 ^e	70.70 ^d	74.67 ^c	±0.6416 P=0.0004
60% <i>T. diversifolia</i> 40% <i>P. purpureum</i>	67.20 ^e	72.64 ^{cd}	79.18 ^b	84.96 ^a	
VITAFERT (%)	Time				
	36 h	48 h	72 h	96 h	±0.8156 P=0.0435
0	62.20 ⁱ	65.88 ^{hi}	69.45 ^{gh}	74.16 ^{de}	
4.5	62.73 ⁱ	67.53 ^{gh}	73.19 ^{de}	77.97 ^c	
6.0	62.76 ⁱ	67.18 ^{gh}	73.08 ^{ef}	78.39 ^c	
8.0	71.16 ^{efg}	77.34 ^{cd}	84.04 ^b	88.73 ^a	

Different letters indicate significant differences to P<0.05

purpureum and 8.0 % VITAFERT tended to have the highest gas production potential (94.69 mL.g⁻¹ OMinc) and maximum velocity (2.58 mL.g⁻¹ OMinc h⁻¹), although it was the one that later reached the maximum velocity (7.46 h). This treatment also showed the second highest value of parameter C.

The treatment 40 % *T. diversifolia*: 60 % *P. purpureum* and 4.5 % VITAFERT tended to have the lowest gas production potential (68.75 mL.g⁻¹ OMinc), the highest value of parameter C. Although its maximum velocity value was intermediate, this was the treatment that reached this value in a shorter time (3.83 h).

As is the case with respect to the gas production levels, the increases in gas production potential and the maximum velocity with the highest level of *T. diversifolia* could be related to the higher availability of nutrients for the rumen microorganisms (La O *et al.* 2009). This availability allows these silages to promote a more efficient microbial synthesis process (Roa and Galeano 2015).

However, the lower TVmax when using 4.5 % VITAFERT could be given by a higher microbial efficiency. The fact that this treatment had the highest value of the parameter C, described in the model as a constant factor of the microbial efficiency, proves what was previously mentioned. In addition, it is known that the inclusion of additives rich in yeast, such as *S. cerevisiae*, influence positively on the fractional rate of the *in vitro* gas production when fermenting tree substrates (Rodríguez *et al.* 2007). Although there are evidences that the inocula used as additives to the silage process could have effects on the *in vitro* ruminal fermentation and in the

matemático fue capaz de explicar un alto porcentaje de la variabilidad de los datos experimentales obtenidos.

El tratamiento de proporción de 60 % *T. diversifolia*: 40 % *P. purpureum* y 8.0 % de VITAFERT tendió a tener el mayor potencial de producción de gas (94.69 mL.g⁻¹ MOinc) y velocidad máxima (2.58 mL.g⁻¹ MOinc h⁻¹), aunque fue el que más tardíamente alcanzó la velocidad máxima (7.46 h). También este tratamiento mostró el segundo mayor valor del parámetro C.

El tratamiento 40 % *T. diversifolia*: 60 % *P. purpureum* y 4.5 % de VITAFERT tendió a tener el menor potencial de producción de gas (68.75 mL.g⁻¹ MOinc), el mayor valor del parámetro C. Aunque su valor de velocidad máxima fue intermedio, este fue el tratamiento que alcanzó este valor en menor tiempo (3.83 h).

Al igual que lo considerado con respecto a los niveles de producción de gas, los incrementos en el potencial de producción de gas y la velocidad máxima con el nivel mayor de *T. diversifolia* pudieron estar relacionados con la mayor disponibilidad de nutrientes para los microorganismos del rumen (La O *et al.* 2009). Esta disponibilidad permite que estos ensilajes promuevan un proceso de síntesis microbiana más eficiente (Roa y Galeano 2015).

Sin embargo, el menor TVmax al utilizar 4.5 % de VITAFERT pudo estar dado por una mayor eficiencia microbiana. El hecho de que este tratamiento tuviera el mayor valor del parámetro C, descrito en el modelo como un factor constante de la eficiencia microbiana, corrobora lo anterior. Además, se conoce que la inclusión de aditivos ricos en levaduras, como *S. cerevisiae*, influye de manera positiva en la tasa fraccional de producción de gas *in vitro* al fermentar sustratos arbóreos (Rodríguez *et al.* 2007). Aunque existen evidencias de que inóculos utilizados

Table 6. Kinetic parameters, according to the Gompertz mathematical model, of the *in vitro* fermentation of the evaluated mixed silages

Proportion of silage forage	VITAFERT levels (%)	Parameter A (±SE) ^a	Parameter B (±SE)	Parameter C (±SE)	SE ^b	R ²	V _{max} (mL g ⁻¹ OM/inc h ⁻¹)	T _{Vmax} (h)
40% <i>T. diversifolia</i>	0	69.43 (0.675)	1.341 (0.0350)	0.072 (0.0029)	2.0627	0.9839	1.839	4.08
60% <i>P. purpureum</i>	4.5	68.75 (0.565)	1.338 (0.0312)	0.076 (0.0026)	1.7827	0.9876	1.922	3.83
	6.0	73.35 (0.793)	1.464 (0.0417)	0.072 (0.0030)	2.4066	0.9840	1.943	5.29
	8.0	73.32 (0.844)	1.369 (0.0422)	0.072 (0.0034)	2.5799	0.9782	1.942	4.36
60% <i>T. diversifolia</i>	0	71.96 (0.852)	1.380 (0.0435)	0.072 (0.0035)	2.5963	0.9772	1.906	4.47
40% <i>P. purpureum</i>	4.5	80.72 (1.208)	1.264 (0.0367)	0.053 (0.0029)	2.9973	0.9730	1.574	4.42
	6.0	76.29 (0.989)	1.294 (0.0339)	0.055 (0.0027)	2.5274	0.9791	1.544	4.69
	8.0	94.69 (1.494)	1.737 (0.0734)	0.074 (0.0043)	4.5617	0.9685	2.578	7.46

^aSE of the parameter, all parameter were significant ($p < 0.0001$). ^bSE of the model

productive performance of the animals (Muck *et al.* 2005), there are lack of evidences about the presence of active microorganisms from the VITAFERT in the evaluated mixed silages, which could be proven in further studies.

Conclusions

The use of 4.5 and 6.0 % o VITAFERT, as additive of *T. diversifolia* and *P. purpureum* (vc. CUBA CT-169) mixed silages, improve the chemical composition of the

como aditivos al proceso de ensilaje pueden tener efectos en la fermentación ruminal *in vitro* y en el comportamiento productivo de los animales (Muck *et al.* 2005), faltan evidencias de la presencia de microorganismos activos del VITAFERT en los ensilajes mixtos evaluados, lo que se deberá corroborar en estudios futuros.

Conclusiones

La utilización de 4.5 y 6.0 % de VITAFERT, como aditivo de ensilajes mixtos de *T. diversifolia* y *P.*

obtained products. In the same way, the best indicators of the *in vitro* fermentation of the obtained mixed silages were obtained with 60 % *T. diversifolia* in the mixture of silage forages and 8.0 % VITAFERT.

purpureum (vc. CUBA CT-169), mejoró la composición química de los productos obtenidos. De igual forma, los mejores indicadores de la fermentación *in vitro* de los ensilajes mixtos obtenidos se obtuvieron con 60 % de *T. diversifolia* en la mezcla de forrajes ensilados y 8.0 % de VITAFERT.

References

- Bach, A., Calsamiglia, S. & Stern, M. D. 2005. "Nitrogen Metabolism in the Rumen". Journal of Dairy Science, 88: E9–E21, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(05)73133-7.
- Bates, D. B., Kunkle, W. E., Dawson, T. E., Berthe, A., Denham, S. C., Chambliss, C. G., Cromwell, R. C., Wasdin, J. G. & Wakeman, D. L. 1989. "Beef Cattle Short Course, Gainesville, Fl.: Univ. of Florida, pp. 45–57, Round bale silage-a forage harvesting alternative". In: Proceedings XXXVIII Annual Florida Available: <https://www.researchgate.net/profile/Steve_Denham/publication/242140733_ROUND_BALE_SILAGEDIMEA_FORAGE_HARVESTING_ALTERNATIVE/links/568bd93708ae16c414a9c2e8.pdf>, [Consulted: January 31, 2017].
- Brea, O. 2015. Obtención de un alimento energético-proteico a partir de la fermentación en estado sólido de la harina de frutos del árbol del pan (*Artocarpus altilis*) y su empleo en dietas para cerdos y conejos. Ph.D. Thesis, Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba, 147 p.
- Caballero, A. 2013. Caracterización productiva de cinco accesiones de *Pennisetum purpureum* Schum. M.Sc. Thesis, Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos - EEPF Indio Hatuey, Matanzas, Cuba.
- Castaño, G. A. 2012. "Efecto del proceso del ensilaje sobre el valor nutricional de *Pennisetum purpureum*, *Tithonia diversifolia* y *Trichanthera gigantea*". Boletín de Investigaciones de Unisarc, 10(2): 22–36, ISSN: 1692-312X.
- Dean, D. B., Adesogan, A. T., Krueger, N. & Littell, R. C. 2005. "Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of bermudagrass silage". Journal of Dairy Science, 88(3): 994–1003, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72767-3.
- 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/>>.
- Elías, A. & Herrera, F. 2011. Registro de patente. no. 81/2011, La Habana, Cuba: Oficina Cubana de la Propiedad Industrial.
- Galina, M. A., Ortiz-Rubio, M. A., Delgado, M. & Pineda, L. 2007. "Effect of a lactic probiotic supplementation on goat kids growth". In: XII Seminar of the FAO-CIHEAM Sub-Network on Sheep and Goat Nutrition, Thessaloniki, Grecia: Estación Experimental del Zaidín, p. 11.
- García, L. M., Mesa, A. R. & Hernández, M. 2015. "Forage potential of four cultivars of *Pennisetum purpureum* on a Grayish Brown soil of Las Tunas". Pastos y Forrajes, 37(4), ISSN: 2078-8452, Available: <http://pastures-forages.ihatuey.cu/index.php/Pastures_Forages/article/view/270>, [Consulted: January 31, 2017].
- 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, J. A., Pérez, J. M., Bosch, D., Rivero, L., Camacho, E., Ruíz, J., Salgado, E. J., Marsán, R., Obregón, A., Torres, J. M., Gonzáles, J. E., Orellana, R., Paneque, J., Ruiz, J. M., Mesa, A., Fuentes, E., Durán, J. L., Pena, J., Cid, G., Ponce de León, D., Hernández, M., Frómata, E., Fernández, L., Garcés, N., Morales, M., Suárez, E. & Martínez, E. 1999. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. La Habana, Cuba: AGROINFOR, 64 p., ISBN: 959-246-022-1.
- Kramer, C. Y. 1956. "Extension of Multiple Range Tests to Group Means with Unequal Numbers of Replications". Biometrics, 12(3): 307–310, ISSN: 0006-341X, DOI: 10.2307/3001469.
- La O, O., Valenciaga, D., González, H., Orozco, A., Castillo, Y., Ruíz, O., Gutiérrez, E., Rodríguez, C. & Arzola, C. 2009. "Effect of the combination of *Tithonia diversifolia* with *Pennisetum purpureum* cv. Cuba CT-115 on the *in vitro* gas kinetics and production". Cuban Journal of Agricultural Science, 43(2): 143–146, ISSN: 2079-3480.
- Latimer, G. W. 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: September 22, 2016].
- Mahanna, B. 1994. "Proper management assures high-quality silage, grains". Feedstuffs, 10: 12, ISSN: 0014-9624.
- Mahecha, L. & Rosales, M. 2005. "Valor nutricional del follaje de Botón de Oro (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray), en la producción animal en el trópico". Livestock Research for Rural Development, 17(9), ISSN: 0121-3784, Available: <<http://www.lrrd.org/lrrd17/9/mahe17100.htm>>, [Consulted: February 5, 2017].
- Martínez, R. O., Tuero, R., Torres, V. & Herrera, R. S. 2010. "Models of biomass accumulation and quality in varieties of elephant grass, Cuba CT-169, OM-22, and king grass during the rainy season in the western part of Cuba". Cuban Journal of Agricultural Science, 44(2): 185–188, ISSN: 2079-3480.
- McDonald, P., Edwards, R. A. & Greenhalgh, J. F. D. 1987. Animal nutrition. Harlow, Essex: ELBS/Longman, 543 p., ISBN: 978-0-582-01875-4.
- 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(1): 7–55, ISSN: 0340-3165.
- Muck, R. E., Filya, I. & Contreras-Govea, F. E. 2005. "Inoculant effects on ensiling and *in vitro* gas production in lucerne silage". In: Park, R. S. & Stronge, M. D. (eds.), XIV International Silage Conference 'Silage production and

- utilisation', Belfast, Northern Ireland: USDA, p. 204, Available: <<https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=175144>>, [Consulted: January 31, 2017].
- Mühlbach, P. R. F. 2001. "Uso de aditivos para mejorar el ensilaje de los forrajes tropicales". In: 't Mannetje, L. (ed.), Conferencia Electrónica de la FAO sobre el Ensilaje en los Trópicos 'Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos', Roma, Italia: FAO, pp. 157–172, ISBN: 92-5-104500-3, Estudio 9.0.
- Nieves, D., Terán, O., Cruz, L., Mena, M., Gutiérrez, F. F. & Ly, J. 2011. "Digestibilidad de nutrientes en follaje de árnica (*Tithonia diversifolia*) en conejos de engorde". *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(1): 309–314, ISSN: 1870-0462.
- Phiri, M. S., Ngongoni, N. T., Maasdorp, B. V., Titterton, M., Mupangwa, J. F. & Sebata, A. 2007. "Ensilage characteristics and feeding value of silage made from browse tree legume-maize mixtures". *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 7(3): 149–156, ISSN: 1870-0462.
- Reyes, N., Mendieta, B., Fariñas, T. & Mena, M. 2008. "Elaboración de microsilos para los ejercicios de descubrimiento y experimentación en fincas". In: Guía de suplementación alimenticia estratégica para bovinos en época seca, Universidad Nacional Agraria, pp. 26–27, Available: <<http://repositorio.una.edu.ni/2417/1/RENLO2G943.pdf>>, [Consulted: January 31, 2017].
- Reyes-Gutiérrez, J. A., Montañez-Valdez, O. D., Rodríguez-Macias, R., Ruiz-López, M., Salcedo-Pérez, E. & Guerra-Medina, C. E. 2015. "Effect of a bacterial inoculum and additive on dry matter *in situ* degradability of sugarcane silage". *Journal of Integrative Agriculture*, 14(3): 497–502, ISSN: 2095-3119, DOI: 10.1016/S2095-3119(14)60826-1.
- Roa, M. L. & Galeano, J. R. 2015. "Calidad nutricional y digestibilidad *in situ* de ensilajes de cuatro leñosas forrajeras". *Pastos y Forrajes*, 38(4): 431–440, ISSN: 0864-0394.
- 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., Marrero, Y., Chongo, B., Carrasco, T. & Oramas, A. 2007. "Efecto de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en la cinética de fermentación *in vitro* y la colonización de la fibra de cuatro leguminosas arbustivas tropicales". In: VI Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias, La Habana, Cuba: Consejo Científico Veterinario de Cuba - Instituto de Medicina Veterinaria - Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, ISBN: 978-959-282-047-3.
- SAS Institute Inc 2013. Statistical Analysis Software SAS/STAT®. version 9.1.3, Cary, N.C., USA, Available: <http://www.sas.com/en_us/software/analytics/stat.html#>.
- Sosa, A., Galindo, J., Bocourt, R., Rodríguez, R., Albelo, N. & Oramas, A. 2010. "Effect of *Aspergillus oryzae* on the rumen fermentation of *Pennisetum purpureum* cv. Cuba CT-115 through the *in vitro* gas technique". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 44(2): 151–155, ISSN: 2079-3480.
- Staples, C. R. 1995. Bermuda grass: growing, storing, and feeding for dairy animals. (no. ser. CIR1140), Florida, USA: Institute of Food and Agricultural Sciences - University of Florida, 9 p., Available: <<http://ufdc.ufl.edu/IR00004759/00001>>, [Consulted: January 31, 2017].
- 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.
- Topps, J. H. & Oliver, J. 1993. Animal foods of Central Africa. (ser. Technical Handbook / Zimbabwe Agricultural Journal, no. ser. 2), Harare, Zimbabwe: Information Services, Dept. of Research and Specialist Services, Ministry of Agriculture, 154 p.
- 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.

Received: September 7, 2016