

## Evaluation of non-linear and mixed non-linear models to describe *in vitro* gas production kinetics of ruminant feeds

### Evaluación de modelos no lineales y no lineales mixtos para describir la cinética de producción de gas *in vitro* de alimentos para rumiantes

Yaneilys García Avila<sup>1</sup>, Magaly Herrera Villafranca<sup>1</sup>, R. Rodríguez Hernández<sup>1</sup>  
and Yadiana Ontivero Vasallo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas. Mayabeque, Cuba. CP. 32700

<sup>2</sup>Instituto de Pastos y Forrajes. La Habana, Cuba

Email: feygarciaa@ica.co.cu

Yaneilys García Avila: <https://orcid.org/0000-0003-0126-6233>

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

Rafael Rodríguez Hernández: <https://orcid.org/0000-0003-1894-4328>

The performance of non-linear and mixed non-linear models was evaluated in the description of *in vitro* gas production kinetics of ruminant feeds. For this, the logistic, Gompertz and Groot models were used. The analyzes included the addition of random effects to the asymptotic parameter of each model, since this parameter was the one that varied the most among the incubation bottles. Each random effect was associated with a probable source of variability in the experiment. The parameters were estimated with the NLMIXED proc of SAS program. For the selection of the best fit model, the  $R^2_{aj}$ ,  $\sigma^2$ , AIC and BIC were considered. In addition, compliance with the basic assumptions for the residuals and the relationship among mathematical fit, simplicity and biological interpretation of the parameters were assessed. It is concluded that the non-linear mixed models allowed to obtain better  $R^2_{aj}$ , BIC and  $\sigma^2$ . The random effects had no significant effect on the fulfillment of the assumptions of autocorrelation and randomness of residuals. The random effect bottle over time allowed to determine the times in which there was a lack of fit. Despite the limitations of the analyzed models, the logistic, without the inclusion of the random effect, was the most appropriate according to the parsimony criterion.

Keywords: *mathematical modeling, random effect, goodness of fit, parsimony, fermentation*

*In vivo* studies of the nutritional value of foods are time consuming. They require a sufficient number of animals and large amounts of plant material, and are, therefore, economically expensive (Posada and Noguera 2005). However, *in vitro* techniques are less expensive, performed in less time, require only small amounts of plant material as substrate, and allow greater control of experimental conditions (Makkar 2005). In this regard, Theodorou *et al.* (1994) proposed a method to study the fermentation kinetics of substrates from the gas production generated by their *in vitro* fermentation, which is estimated at different times from the gas pressure measured inside glass bottles. The volume is assumed constant for all bottles and over time.

In general, the models to describe *in vitro* gas production kinetics are non-linear models (NLM).

Se evaluó el comportamiento de modelos no lineales y no lineales mixtos en la descripción de la cinética de producción de gas *in vitro* de alimentos para rumiantes. Para ello se utilizaron los modelos logístico, Gompertz y Groot. Los análisis incluyeron la adición de efectos aleatorios al parámetro asintótico de cada modelo, pues dicho parámetro fue el que más varió entre las botellas de incubación. Cada efecto aleatorio se asoció con una fuente probable de variabilidad del experimento. Los parámetros se estimaron con el proc NLMIXED del programa SAS. Para la selección del modelo de mejor ajuste, se tuvo en cuenta el  $R^2_{aj}$ ,  $\sigma^2$ , AIC y BIC. Además, se valoró el cumplimiento de los supuestos básicos para los residuos y la relación entre ajuste matemático, simplicidad e interpretación biológica de los parámetros. Se concluye que los modelos no lineales mixtos permitieron obtener mejores  $R^2_{aj}$ , BIC y  $\sigma^2$ . Los efectos aleatorios no tuvieron efecto considerable en el cumplimiento de los supuestos de autocorrelación y aleatoriedad de los residuos. El efecto aleatorio botella en el tiempo permitió determinar los horarios en los que hubo falta de ajuste. A pesar de las limitaciones de los modelos analizados, el logístico, sin la incorporación del efecto aleatorio, fue el más adecuado según criterio de parsimonia.

Palabras clave: *modelación matemática, efecto aleatorio, bondad de ajuste, parsimonia, fermentación.*

Los estudios *In vivo* del valor nutritivo de los alimentos consumen mucho tiempo, requieren un número suficiente de animales y grandes cantidades de material vegetal, y son por tanto económicamente costosos (Posada y Noguera 2005). Sin embargo, las técnicas *in vitro* son menos costosas, se ejecutan en menor tiempo, requieren solo pequeñas cantidades de material vegetal como sustrato y permiten mayor control de las condiciones experimentales (Makkar 2005). Al respecto, Theodorou *et al.* (1994) propusieron un método para estudiar la cinética de fermentación de los sustratos a partir de la producción de gas que genera su fermentación *in vitro*, la que se estima en diferentes horarios a partir de la presión del gas que se mide dentro de botellas de vidrio. El volumen se asume constante para todas las botellas y en el tiempo.

De manera general, los modelos para describir la cinética de producción de gas *in vitro* son modelos

They can be classified according to their structure in exponential, sigmoidal and multicompartimental or multiphase models (Muro *et al.* 2017). However, a frequent problem when modeling *in vitro* gas production data is that residues are correlated with each other. One of the possible causes is that, in order to obtain *in vitro* gas production, repeated measurements are carried out over time on the same experimental unit and a specific structure of variances is generated. For this reason, mixed NLMs constitute an alternative for analysis. With them, the correlation structure can be modeled, directly or through random variables. Other benefits of the mixed approach are that it does not require data distribution to be normal, help to control heterogeneity, improve the statistical adjustment criteria and have positive effects in the analysis of NLM, fitted to longitudinal data (Gómez and Agüero 2020).

Mixed models gain value in the agricultural and livestock field because they are applied to the analysis of longitudinal data, multi-environment trials and growth curves (Bandera and Pérez 2018). The use of linear models with a mixed approach is common in the analysis of variance of *in vitro* gas production experiments with repeated measures (Gómez *et al.* 2019). However, little is known about the use of mixed NLMs to describe *in vitro* gas production performance.

The main objective of this study was to evaluate the performance of mixed NLMs and NLMs in the description of *in vitro* gas production kinetics of ruminant feeds.

## Materials and Methods

**Experimental procedure.** Data was selected from an experiment that was carried out at the Institute of Animal Science in 2019. In this study, the effect of including sweet potato tuber and *Lactobacillus pentosus* LB-31 on the nutritional value of the mixed silage of *Cenchrus purpureus* x *Cenchrus glaucum* (hybrid OM-22) + *Moringa oleifera* was evaluated (Rodríguez *et al.* 2019). The experiment used *in vitro* gas production (GP) technique, described by Theodorou *et al.* (1994). A completely randomized experimental design was applied, with factorial arrangement (3 x 2). The factors were three levels of inclusion of the tuber (0, 25 and 50 %) and the use or not of the bacterial strain. GP was measured at 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 29, 48, 72, 77 and 144 h and three repetitions were performed per treatment. Although the experiment analyzed six silage variants, for the present study, GP data from the fermentation of mixed silage + 25 % of sweet potato tuber + the microbial additive (*L. pentosus* LB-31) were used.

**Statistical analysis.** The sigmoidal equations shown in table 1 were modeled. Three analyzes were performed for the evaluation. In the first, only the random effect of residuals was considered. In the second, a random effect was added to parameter b, as it was the one that showed the greatest variability among the incubation

no lineales (MNL). Se pueden clasificar según su estructura en modelos exponenciales, sigmoidales y multicompartimentales o multifásicos (Muro *et al.* 2017). Sin embargo, un problema frecuente al modelar los datos de producción de gas *in vitro* es que los residuos se correlacionan entre sí. Una de las posibles causas es que para obtener la producción de gas *in vitro* se realizan medidas repetidas en el tiempo sobre la misma unidad experimental y se genera una estructura de varianzas específica. Ante esta situación, los MNL mixtos constituyen una alternativa de análisis. Con ellos se puede modelar la estructura de correlación, de forma directa o mediante variables aleatorias. Otras de las bondades del enfoque mixto es que no requiere que la distribución de los datos sea normal, ayudan a controlar la heterogeneidad, mejoran los criterios de ajuste estadístico y tienen efectos positivos en el análisis de MNL, ajustados a datos longitudinales (Gómez y Agüero 2020).

Los modelos mixtos cobran valor en el ámbito agropecuario porque se aplican en el análisis de datos longitudinales, ensayos multiambientes y curvas de crecimiento (Bandera y Pérez 2018). Es común el uso de los modelos lineales con enfoque mixto en el análisis de varianza de los experimentos de producción de gas *in vitro* con medidas repetidas (Gómez *et al.* 2019). No obstante, poco se conoce acerca del uso de los MNL mixtos para describir el comportamiento de la producción de gas *in vitro*.

Este estudio tiene como objetivo principal evaluar el comportamiento de MNL y MNL mixtos en la descripción de la cinética de producción de gas *in vitro* de alimentos para rumiantes.

## Materiales y Métodos

**Procedimiento experimental.** Se seleccionaron datos de un experimento que se realizó en el Instituto de Ciencia Animal en el 2019. En dicho estudio se evaluó el efecto de incluir tubérculo de boniato y *Lactobacillus pentosus* LB-31 en el valor nutritivo del ensilado mixto de *Cenchrus purpureus* x *Cenchrus glaucum* (híbrido OM-22) + *Moringa oleifera* (Rodríguez *et al.* 2019). El experimento utilizó la técnica de producción de gas (PG) *in vitro*, descrita por Theodorou *et al.* (1994). Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado, con arreglo factorial (3 x 2). Los factores fueron tres niveles de inclusión del tubérculo (0, 25 y 50 %) y la utilización o no de la cepa bacteriana. La PG se midió a las 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 29, 48, 72, 77 y 144 h y se realizaron tres repeticiones por tratamiento. A pesar que el experimento analizó seis variantes de ensilaje, para el presente estudio se utilizaron los datos de PG de la fermentación del ensilado mixto + 25 % de tubérculo de boniato + el aditivo microbiano (*L. pentosus* LB-31).

**Análisis estadístico.** Se modelaron las ecuaciones sigmoidales que se muestran en la tabla 1. Para la evaluación se realizaron tres análisis. En el primero solo se consideró el efecto aleatorio de los residuales. En el segundo se añadió un efecto aleatorio al parámetro

bottles. This random effect is related to the individuality of each incubation bottle. With its inclusion in the model, an attempt was made to control the source of variability that each individual subject might have.

b, pues fue el que mostró mayor variabilidad entre las botellas de incubación. Este efecto aleatorio se relaciona con la individualidad de cada botella de incubación. Con su inclusión en el modelo, se trató de controlar la fuente

Table 1. Mathematical models used to describe the *in vitro* GP kinetics

Analysis	Logistic model Schofield <i>et al.</i> (1994)	Gompertz model Lavrencic <i>et al.</i> (1997)	Groot model Groot <i>et al.</i> (1996)
1: GP (t) =	$(b)/(1+\exp(2-4*c*(t-L)))+e$	$(b)*\exp(-k*\exp(-r*t))+e$	$(b)/(1+(T/t)^F)+e$
2: GP <sub>i</sub> (t) =	$(b+b_i)/(1+\exp(2-4*c*(t-L)))+e$	$(b+b_i)*\exp(-k*\exp(-r*t))+e$	$(b+b_i)/(1+(T/t)^F)+e$
3: GP <sub>ij</sub> (t) =	$(b+b_{ij})/(1+\exp(2-4*c*(t-L)))+e$	$(b+b_{ij})*\exp(-k*\exp(-r*t))+e$	$(b+b_{ij})/(1+(T/t)^F)+e$

GP: gas production at time t (mL g<sup>-1</sup> incubated OM), c: GP rate (h<sup>-1</sup>), t: fermentation time (h), L: Lag phase (h), b: asymptote when t = ∞ (mL g<sup>-1</sup> incubated OM), k: relative GP rate (h<sup>-1</sup>), r: constant factor of microbial efficiency (h<sup>-1</sup>), T: time in which half of the GP (h) is reached, F: constant that determines shape and characteristics of curve profile, i: incubation bottle, j: incubation time, e: error term, bi: asymptotic random effect associated with bottle "i", bij: asymptotic random effect associated with bottle "i" at time "j".

In the previous analyzes, the fact that GP data are not taken with total randomness was neglected, but that measurements are made repeatedly on the same experimental unit or incubation bottle, violating the assumption of independence of observations. Therefore, in the third analysis, it was considered that there is a random effect associated with asymptotic GP, and that it varies according to the bottle and the bottle-time incubation time.

The estimation of parameters was carried out with the NLMIXED procedure of SAS 9.3 (2013). To apply this procedure, it was assumed that observations were independent, and that there was a joint probability density function, which links observations and vectors of random effects. Random effects were assumed to be normal, with zero mean and constant variance. They were estimated by the empirical Bayes method (Gaver and O'Muircheartaigh 1987).

The parameters obtained with the NLMIXED proc were substituted in the MODEL proc. In this way, White test (Pérez *et al.* 2020) was executed to assess the homogeneity of variances of residuals, and Durbin-Watson (DW) test was used for determining the presence of autocorrelation (Hurtado *et al.* 2021). With the help of the CAPABILITY proc, the Kolmogorov-Smirnov (De Roa 2020) normality test was applied. In addition, the SPSS 22 (2013) program applied the non-parametric run test for randomness to residual. This test allowed to contrast the hypothesis of a random order versus a trend alternative.

The selection of the model with the best fit was made based on the variance of the error ( $\sigma^2$ ), the coefficient of determination adjusted to the degrees of freedom ( $R^2_{aj}$ ), the significance of the parameters, Akaike Information Criterion (AIC) and the Bayesian Information Criterion (BIC) (Tiago *et al.* 2017). Models with lower  $\sigma^2$ , AIC and BIC values were considered to have a better fit, unlike  $R^2_{aj}$ , in which higher values are preferred. The fulfillment of hypotheses on the residual component

de variabilidad que pudo tener cada sujeto en particular.

En los análisis anteriores se despreció el hecho de que los datos de PG no se toman con total aleatoriedad, sino que sobre la misma unidad experimental o botella de incubación se realizan mediciones repetidas veces, violándose el supuesto de independencia de las observaciones. Por ello, en el tercer análisis se consideró que existe un efecto aleatorio asociado a la PG asintótica, y que varía según la botella y el tiempo de incubación botella-tiempo.

La estimación de los parámetros se realizó con el procedimiento NLMIXED del SAS 9.3 (2013). Para aplicar este procedimiento se supuso que las observaciones eran independientes, y que existía una función de densidad de probabilidad conjunta, que vincula las observaciones y los vectores de efectos aleatorios. Se asumió que los efectos aleatorios fueron normales, con media cero y varianza constante. Se estimaron por el método empírico de Bayes (Gaver y O'Muircheartaigh 1987).

Los parámetros obtenidos con el proc NLMIXED se sustituyeron en el proc MODEL. De esta forma se ejecutó el test de White (Pérez *et al.* 2020) para valorar homogeneidad de varianzas de los residuos, y el contraste de Durbin-Watson (DW) para determinar la presencia de autocorrelación (Hurtado *et al.* 2021). Con la ayuda del proc CAPABILITY, se aplicó el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov (De Roa 2020). Además, se utilizó el programa SPSS 22 (2013) para ejecutar la prueba no paramétrica de rachas a los residuos. Esta prueba permitió contrastar la hipótesis de un ordenamiento aleatorio versus una alternativa de tendencia.

La selección del modelo con mejor ajuste se realizó en función de la varianza del error ( $\sigma^2$ ), el coeficiente de determinación ajustado a los grados de libertad ( $R^2_{aj}$ ), la significación de los parámetros, el criterio de información de Akaike (AIC) y el criterio de información bayesiano (BIC) (Tiago *et al.* 2017). Modelos con menores valores  $\sigma^2$ , AIC y BIC se consideraron de mejor ajuste, a diferencia del  $R^2_{aj}$ , en los que se prefieren los valores más altos. Se valoró el cumplimiento de

was assessed, as well as the relationship between mathematical adjustment, simplicity and biological interpretation of parameters, according to the parsimony criterion (Santoyo *et al.* 2017).

### Results and Discussion

Tables 2, 3 and 4 show the regression coefficients, as well as the components of variance of the error ( $\sigma^2$ ) and of the random effects ( $\sigma^2a$ ). The goodness of fit criteria of models in the three mentioned approaches are exposed (without random effect, with random effect associated with the incubation bottle and with random effect linked to the bottle over time). The estimates obtained with the NLMIXED proc were those that maximized the integrated verisimilitude function on the random effects.

las hipótesis sobre la componente residual, y también la relación entre ajuste matemático, simplicidad e interpretación biológica de los parámetros, según criterio de parsimonia (Santoyo *et al.* 2017).

### Resultados y Discusión

En las tablas 2, 3 y 4 se muestran los coeficientes de regresión, así como las componentes de varianza del error ( $\sigma^2$ ) y de los efectos aleatorios ( $\sigma^2a$ ). Se exponen los criterios de bondad de ajuste de los modelos en los tres enfoques mencionados (sin efecto aleatorio, con efecto aleatorio asociado a la botella de incubación y con efecto aleatorio vinculado a la botella en el tiempo). Las estimaciones obtenidas con el proc NLMIXED fueron las que maximizaron la función de verosimilitud integrada sobre los efectos aleatorios.

Table 2. Statistical criteria for models without random effects

Logistic model Schofield <i>et al.</i> (1994)			Gompertz model Lavrencic <i>et al.</i> (1997)			Groot model.Groot <i>et al.</i> (1996)		
Fix parameter	± SE	P Value	Fix parameter	± SE	P Value	Fix parameter	± SE	P Value
b = 151.4	2.35	< 0.0001	b = 154.2	2.00	< 0.0001	b = 160.00	2.19	< 0.0001
c = 0.04	0.003	< 0.0001	k = 5.27	0.49	< 0.0001	T = 20.4	0.4	< 0.0001
L = 7.94	0.71	< 0.0001	r = 0.1	0.006	< 0.0001	F = 2.55	0.13	< 0.0001
$\sigma^2$		61.98			39.60			26.10
R <sup>2</sup> aj		97.82 %			98.61 %			99.08 %
AIC		285.6			268.2			249.90
BIC		297.3			279.8			259.90
Residuals								
DW		1.0104			1.0161			0.8491
K-S		p = 0.1378			p = 0.0391			p = 0.1500
White		p = 0.6451			p = 0.3457			p = 0.0344
Randomness		p = 0.009			p = 0.023			p = 0.023

The fermentation of the selected treatment (mixed silage + 25 % of sweet potato + *L. pentosus* LB-31) showed an asymptotic value of GP, which ranged between 138.9 and 160 mL g<sup>-1</sup> incOM. GP rate was lower than 0.052 h<sup>-1</sup>. The constant factor of microbial efficiency was close to 0.1 (h<sup>-1</sup>). Lag phase was significant, indicating that GP did not start instantaneously. Half of GP was reached around 21 h. Similar results were obtained by Rodríguez *et al.* (2020) in a study of the same silage, but with the difference that the asymptotic GP values, estimated in this research, were close to 460 mL g<sup>-1</sup> incOM.

The addition of random effects to the parameters favored the improvement of fit criteria, such as  $\sigma^2$ , BIC and R<sup>2</sup>aj. Similar deductions were obtained by Gómez and Agüero (2020), when studying bovine lactation curves. Also, Corral *et al.* (2019) reached similar conclusions, when evaluating height/diameter relationship of seven Pinus species.

The R<sup>2</sup>aj were superior to 97 %, which indicates

La fermentación del tratamiento seleccionado (ensilado mixto + 25 % boniato + *L. pentosus* LB-31) dejó ver un valor asintótico de PG, que osciló entre 138.9 y 160 mL g<sup>-1</sup> MOinc. La tasa de PG fue menor que 0.052 h<sup>-1</sup>. El factor constante de eficiencia microbiana estuvo próximo a 0.1 (h<sup>-1</sup>). La fase Lag fue significativa, lo que indica que la PG no comenzó de forma instantánea. La mitad de la PG se alcanzó cerca de las 21 h. Resultados similares obtuvieron Rodríguez *et al.* (2020) en un estudio del mismo ensilado, pero con la diferencia de que los valores de PG asintótica estimados en este trabajo se aproximaron a los 460 mL g<sup>-1</sup> MOInc.

La adición de efectos aleatorios a los parámetros favoreció la mejora de criterios de ajuste, como la  $\sigma^2$ , el BIC y R<sup>2</sup>aj. Deducciones semejantes obtuvieron Gómez y Agüero (2020), al estudiar curvas de lactación bovina. También Corral *et al.* 2019 llegaron a conclusiones similares, al evaluar la relación altura/diámetro de siete especies de Pinus.

Los R<sup>2</sup>aj fueron superiores al 97 %, lo que indica que los

that models explained a large part of the observed variability. According to Rodríguez *et al.* (2019), sigmoid curves fit favorably to GP performance, since they allow describing the three phases of GP (rapid GP, deceleration, and linear or asymptotic phase). Out of the analyzed models, that of Groot *et al.* (1996) reached the most suitable values of  $R^2_{aj}$ , AIC and BIC. These results agree with those obtained by Chaves *et al.* (2021). These authors recommended the model of Groot *et al.* (1996) to estimate mean *in vitro* GP curves of silages. However, this model has been little known because it has a complex biological interpretation of the F parameter.

Regarding the basic assumptions for residuals, it was found that the residual mean was approximately zero in all cases. Normality and homogeneity of variances did not have a uniform performance in the evaluated models. Residual independence was not fulfilled. DW statistic was lower than 1.7, out of the required interval for the number of observations and parameters of the used models (Guerra *et al.* 2018). Autocorrelation, especially in the case of longitudinal data, could be due to the fact that variables that really affect the model have not been included or that the appropriate model has not been chosen (Gómez and Agüero 2020). Failure to comply with the assumption of independence of errors is a limitation that can lead to biased estimates (Pérez 2018).

The run test for randomness found that residuals were not random. The same was evident when studying residual graphs, in which a characteristic pattern was observed near 48 h. Once this happens, authors like Oddi *et al.* (2020) propose the inclusion of a variance function that allows modeling heteroscedasticity. However, no published information was found about specific functions of variance for *in vitro* GP curves.

In the second analysis, the incubation bottle effect was considered as a source of error that was not controlled in simple NLM. Table 3 presents the results. It was observed that the individual effects of bottles on the asymptotic GP were not statistically significant. Therefore, it was deduced that it was not necessary to add this effect in the regression analysis, and that, during the experiment, the incubation conditions of bottles were adequately controlled.

Table 4 shows the results obtained, when the bottle-time random effect was added to explain the correlation between the repeated measures over time on the same experimental unit. It was observed that the growth of  $\sigma^2_a$  caused a decrease in  $\sigma^2$ . The induced correlation structure, when the bottle-time random effect was added, explained part of the variability of the GP data. With these results, it was evidenced that there was heterogeneity within bottles, and that it is important to consider this source of variation in the model. The bottle-time mixed NLMs reached the best fit, but did not solve the breach of the

modelos explicaron gran parte de la variabilidad observada. Según Rodríguez *et al.* (2019), las curvas sigmoideas se ajustan de forma favorable al comportamiento de la PG, ya que permiten describir las tres fases de la PG (rápida PG, desaceleración y fase lineal o asintótica). De los modelos analizados, el de Groot *et al.* (1996) alcanzó los valores más adecuados de  $R^2_{aj}$ , AIC y BIC. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chaves *et al.* (2021). Estos autores recomendaron el modelo de Groot *et al.* (1996) para estimar las curvas promedios de PG *in vitro* de ensilajes. No obstante, este modelo se ha divulgado poco porque tiene una compleja interpretación biológica del parámetro F.

En relación con los supuestos básicos para los residuos, se comprobó que la media residual fue aproximadamente cero en todos los casos. La normalidad y la homogeneidad de varianzas no tuvieron un comportamiento uniforme en los modelos evaluados. No se cumplió la independencia residual. El estadístico DW fue menor que 1.7, fuera del intervalo requerido para el número de observaciones y parámetros de los modelos utilizados (Guerra *et al.* 2018). La autocorrelación, sobre todo si se trata de datos longitudinales, se podría deber a que en el modelo no se han incluido variables que realmente afectan o que no se ha escogido el modelo adecuado (Gómez y Agüero 2020). El incumplimiento del supuesto de independencia de los errores es una limitación que puede conducir a estimaciones sesgadas (Pérez 2018).

La prueba de rachas para la aleatoriedad arrojó que los residuos no fueron aleatorios. Lo mismo se evidenció al estudiar los gráficos residuales, en los que se observó un patrón característico cerca de las 48 h. Cuando esto sucede, autores como Oddi *et al.* (2020) proponen la inclusión de una función de varianza que permita modelar la heterocedasticidad. Sin embargo, no se encontró información publicada acerca de funciones específicas de varianza para curvas de PG *in vitro*.

En el segundo análisis, se consideró el efecto botella de incubación como una fuente de error que no se controló en los MNL simples. La tabla 3 presenta los resultados. Se observó que los efectos individuales de las botellas en la PG asintótica no fueron estadísticamente significativos. Por ello, se dedujo que no fue necesario añadir dicho efecto en el análisis de regresión, y que durante el experimento se controlaron de forma adecuada las condiciones de incubación de las botellas.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos, cuando se añadió el efecto aleatorio botella-tiempo para explicar la correlación entre las medidas repetidas en el tiempo en la misma unidad experimental. Se observó que el crecimiento de la  $\sigma^2_a$  provocó disminución de la  $\sigma^2$ . La estructura de correlación inducida, cuando se añadió el efecto aleatorio botella-tiempo explicó parte de la variabilidad de los datos de PG. Con estos resultados se evidenció que hubo heterogeneidad dentro de las botellas, y que es importante considerar esta fuente de variación en el modelo. Los MNL mixtos botella-tiempo alcanzaron los

Table 3. Statistical criteria for models, when the random effect related to the incubation bottle is added to the parameter b

Logistic model Schofield <i>et al.</i> (1994)			Gompertz model Lavrencic <i>et al.</i> (1997)			Groot model Groot <i>et al.</i> (1996)		
Fix parameter	± SE	P Value	Fix parameter	± SE	P Value	Fix parameter	± SE	P Value
b = 151.5	2.84	0.0004	b = 154.2	2.8	0.0003	b = 160.0	3.00	0.0004
c = 0.04	0.003	0.004	k = 5.27	0.454	0.0074	ta = 20.4	0.35	0.0003
L = 7.94	0.694	0.008	r = 0.1	0.005	0.0027	F = 2.54	0.11	0.0019
Random parameter	± SE	P Value	Random parameter	± SE	P Value	Random parameter	± SE	P Value
b1 = -2.31	3.46	0.5741	b1 = -3.48	3.01	0.37	b1 = -4.3	2.88	0.27
b2 = 2.39	3.53	0.5676	b2 = 3.65	3.05	0.35	b2 = 4.59	2.89	0.25
b3 = -0.09	2.43	0.9728	b3 = -0.17	2.64	0.95	b3 = -0.25	2.75	0.93
$\sigma^2$		58.87			34.24			19.60
$\sigma_a^2$		8.43			12.60			16.50
R <sup>2</sup> aj		98.02 %			98.82 %			99.33 %
AIC		285.10			265.80			243.70
BIC		278.80			259.50			238.30
Residuals								
DW		1.0897			1.1916			1.1143
K-S		p = 0.15			p = 0.0190			p = 0.1500
White		p = 0.5785			p = 0.2533			p = 0.0083
Randomness		p = 0.009			p = 0.105			p = 0.023

residual independence and randomness assumption. Although authors such as Corral *et al.* (2019) state that it is possible to minimize autocorrelation by adding random effects, the expected results were not obtained. The persistence of residual autocorrelation was attributed to the fact that the logistic, Gompertz and Groot *et al.* (1996) models have limitations in the description of *in vitro* GP.

The estimates of the random effects of each model can be observed in tables 5, 6 and 7. It is important to note that each set of bij behaved in a normal way, with

mejores ajustes, pero no solucionaron el incumplimiento del supuesto de independencia residual y aleatoriedad. A pesar de que autores como Corral *et al.* (2019) plantean que es posible minimizar la autocorrelación mediante la adición de efectos aleatorios, no se obtuvieron los resultados esperados. La persistencia de la autocorrelación residual se atribuyó a que los modelos logísticos Gompertz y Groot *et al.* (1996) tienen limitaciones en la descripción de la PG *in vitro*.

Las estimaciones de los efectos aleatorios de cada modelo se pueden observar en las tablas 5, 6 y 7. Es

Table 4. Statistical criteria for the models, when the random effect related to the incubation bottle over time is added to parameter b

Logistic model Schofield <i>et al.</i> (1994)			Gompertz model Lavrencic <i>et al.</i> (1997)			Groot model Groot <i>et al.</i> (1996)		
Fix parameter	± SE	P Value	Fix parameter	± SE	P Value	Fix parameter	± SE	P Value
b = 138.9	4.91	< 0.0001	b = 154.1	2.49	0.0001	b = 158.9	2.49	0.0001
c = 0.052	0.002	< 0.0001	k = 5.713	0.242	0.0001	Ta = 20.2	0.37	0.0001
L = 9.33	0.231	< 0.0001	r = 0.106	0.003	0.0001	F = 2.68	0.09	0.0001
$\sigma^2$		1E-12			2.85			5.68
$\sigma_a^2$		282.50			68.57			45.50
R <sup>2</sup> aj		99.99 %			99.96 %			99.91 %
AIC		259.70			237.20			234.10
BIC		271.30			248.80			244.00
Residuals								
DW		0.3183			1.2272			0.8468
K-S		p = 0.01			p = 0.0100			p = 0.0159
White		p = 0.0003			p = 0.1424			p = 0.1109
Randomness		p = 0.001			p = 0.004			p = 0.023

zero mean and constant variance. The addition of the  $b_{ij}$  effect to the models produced a characteristic GP for each bottle, according to the time. In addition, differences between the asymptotic GP  $b + b_{ij}$  and the general mean  $b$  were reflected (Bandera and Pérez 2018). Through this analysis, it was observed that the 48 h of incubation was decisive in the estimation of the *in vitro* GP asymptote. At approximately this time, the NLM partially characterized the GP. This could be due to limitations of the models used to adequately describe *in vitro* GP in all its stages or because the readings after the first 24 h were not equally spaced. By not measuring GP frequently and systematically, fluctuations typical to the *in vitro* GP process may no longer be recorded (Muro *et al.* 2017).

It is concluded that the non-linear mixed models

importante señalar que cada conjunto de  $b_{ij}$  se comportó de forma normal, con media cero y varianza constante. La adición del efecto  $b_{ij}$  a los modelos produjo una PG característica para cada botella, según el horario. Además, se reflejaron las diferencias entre las PG asintóticas  $b + b_{ij}$  y la media general  $b$  (Bandera y Pérez 2018). Por medio de este análisis se pudo observar que la hora 48 de incubación fue determinante en la estimación de la asíntota de PG *in vitro*. Aproximadamente en este horario, los MNL caracterizaron de forma parcial la PG. Lo anterior pudo estar dado por limitaciones de los modelos utilizados para describir adecuadamente la PG *in vitro* en todas sus etapas o porque las lecturas después de las primeras 24 h no estuvieron igualmente espaciadas. Al no medir la PG de forma frecuente y sistemática, se pueden dejar de registrar fluctuaciones propias del proceso de PG *in vitro* (Muro *et al.* 2017).

Table 5. Random effects associated with the asymptotic GP of bottle  $i$  in the time  $j$  ( $b_{ij}$ : mL g<sup>-1</sup> incOM) for the logistic model

Time	$i = 1$	$\pm$ SE	P Value	$i = 2$	$\pm$ SE	P Value	$i = 3$	$\pm$ SE	P Value
$j = 3$ h	-14.72	6.46	0.028	3.90	7.34	0.598	15.94	7.94	0.052
$j = 6$ h	-14.78	4.86	0.004	1.01	5.36	0.851	-23.28	4.63	0.000
$j = 9$ h	-8.10	4.38	0.072	6.04	4.72	0.209	-7.41	4.39	0.100
$j = 12$ h	14.59	5.39	0.010	28.43	5.81	0.000	16.22	5.44	0.005
$j = 15$ h	15.16	6.26	0.020	26.25	6.62	0.000	21.79	6.48	0.002
$j = 18$ h	5.73	6.38	0.375	12.47	6.59	0.066	14.03	6.64	0.041
$j = 21$ h	-0.99	6.03	0.871	7.84	6.25	0.218	8.99	6.28	0.160
$j = 24$ h	-7.43	5.48	0.183	-0.44	5.59	0.938	2.40	5.63	0.673
$j = 29$ h	-16.73	4.93	0.002	-7.53	4.97	0.138	-6.78	4.97	0.180
$j = 48$ h	-10.49	4.90	0.039	-0.02	4.90	0.997	-3.04	4.90	0.538
$j = 72$ h	7.68	4.91	0.126	18.62	4.91	0.001	10.69	4.91	0.036
$j = 77$ h	14.13	4.91	0.007	25.19	4.91	0.000	15.10	4.91	0.004
$j = 144$ h	22.14	4.91	0.000	33.35	4.91	0.000	21.48	4.91	0.000

Table 6. Random effects associated with the asymptotic GP of bottle  $i$  in the time  $j$  ( $b_{ij}$ : mL g<sup>-1</sup> incOM) for Gompertz model

Time	$i = 1$	$\pm$ SE	P Value	$i = 2$	$\pm$ SE	P Value	$i = 3$	$\pm$ SE	P Value
$j = 3$ h	0.74	8.27	0.929	0.99	8.27	0.906	1.15	8.28	0.891
$j = 6$ h	0.48	8.08	0.953	1.59	8.11	0.846	-0.12	8.08	0.988
$j = 9$ h	-4.86	7.76	0.535	-1.6	7.47	0.832	-4.7	7.74	0.548
$j = 12$ h	-4.54	6.27	0.473	1.91	6.18	0.759	-3.78	6.23	0.548
$j = 15$ h	-2.76	4.89	0.576	4.8	5.04	0.346	1.76	4.94	0.723
$j = 18$ h	-2.32	4.09	0.573	3.42	4.2	0.421	4.75	4.24	0.270
$j = 21$ h	-0.36	3.64	0.921	8.23	3.83	0.038	9.36	3.87	0.020
$j = 24$ h	-2.05	3.26	0.534	5.27	3.38	0.127	8.24	3.44	0.022
$j = 29$ h	-11.97	2.81	0.000	-2.04	2.85	0.478	-1.24	2.85	0.667
$j = 48$ h	-20.39	2.77	0.000	-10.03	2.7	0.001	-13.03	2.72	0.000
$j = 72$ h	-6.74	2.89	0.025	3.79	2.86	0.193	-3.84	2.88	0.191
$j = 77$ h	-0.69	2.89	0.812	9.94	2.86	0.001	0.24	2.88	0.935
$j = 144$ h	6.75	2.89	0.025	17.52	2.89	0.000	6.12	2.9	0.041

Table 7. Random effects associated with the asymptotic GP of bottle *i* in the time *j* ( $b_{ij}$ : mL g<sup>-1</sup> incOM) for Groot model

Time	<i>i</i> =1	± SE	P Value	<i>i</i> =2	± SE	P Value	<i>i</i> = 3	± SE	P Value
<i>j</i> = 3 h	0.16	6.74	0.981	0.2	6.74	0.977	0.22	6.74	0.975
<i>j</i> = 6 h	0.59	6.71	0.930	0.89	6.72	0.896	0.43	6.71	0.949
<i>j</i> = 9 h	-1.24	6.54	0.851	-0.04	6.51	0.995	-1.18	6.54	0.858
<i>j</i> = 12 h	-2.82	6.1	0.647	0.36	5.99	0.953	-2.44	6.07	0.690
<i>j</i> = 15 h	-3.55	5.31	0.508	1.17	5.25	0.825	-0.73	5.23	0.889
<i>j</i> = 18 h	-3.5	4.58	0.449	0.7	4.56	0.879	1.67	4.58	0.718
<i>j</i> = 21 h	-0.91	4.08	0.826	6.03	4.28	0.167	6.94	4.33	0.117
<i>j</i> = 24 h	-0.73	3.78	0.848	5.57	3.91	0.163	8.12	4.02	0.050
<i>j</i> = 29h	-7.52	3.45	0.036	1.57	3.44	0.650	2.31	3.45	0.508
<i>j</i> = 48h	-15.72	3.13	0.000	-5.76	2.93	0.057	-8.64	2.97	0.006
<i>j</i> = 72h	-6.48	3	0.037	3.5	2.93	0.241	-3.73	2.97	0.216
<i>j</i> = 77h	-1.33	2.97	0.656	8.71	2.97	0.006	-0.46	2.96	0.879
<i>j</i> = 144h	2.74	3.09	0.380	12.75	3.14	0.000	2.16	3.09	0.489

allowed to obtain better R<sup>2</sup><sub>aj</sub>, BIC and σ<sup>2</sup>. Random effects did not have a significant effect on the fulfillment of the assumptions of autocorrelation and randomness of residuals. The random effect bottle over time allowed to determine the times in which there was a lack of fit. Despite limitations of the analyzed models, the logistic, without the inclusion of the random effect, was the most appropriate according to the parsimony criterion.

#### Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interests among them

#### Author's contribution

Yaneilys García Avila: Conceptualization, Investigation, Data curation, Formal analysis,

Writing – original draft

Magaly Herrera Villafranca: Formal analysis, Writing – original draft

Rafael Rodríguez Hernández: Data curation, Writing – original draft

Yadiana Ontivero Vasallo: Data curation

Se concluye que los modelos no lineales mixtos permitieron obtener mejores R<sup>2</sup><sub>aj</sub>, BIC y σ<sup>2</sup>. Los efectos aleatorios no tuvieron un efecto considerable en el cumplimiento de los supuestos de autocorrelación y aleatoriedad de los residuos. El efecto aleatorio botella en el tiempo permitió determinar los horarios en los que hubo falta de ajuste. A pesar de las limitaciones de los modelos analizados, el logístico, sin la incorporación del efecto aleatorio, fue el más adecuado según el criterio de parsimonia.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses en la presente publicación.

#### Contribución de los autores:

Yaneilys García Avila: Conceptualización, Investigación, Curación de datos, Análisis formal,

Redacción- borrador original

Magaly Herrera Villafranca: Análisis formal, Redacción- borrador original

Rafael Rodríguez Hernández: Curación de datos, Redacción- borrador original

Yadiana Ontivero Vasallo: Curación de datos

#### References

- Bandera, E., & Pérez, L. 2018. "Los modelos lineales generalizados mixtos. Su aplicación en el mejoramiento de plantas". *Cultivos tropicales*, 39(1): 127-133, ISSN: 1819-4087.
- Chaves, A.L., Morais, J.A.S., Santana, J.C.S, Difante, G.S, Emerenciano. J.V., Ítavo, L.C., Ítavo, C.C., Oliveira, V.S & Rodríguez, M.J. 2021. "Mathematical models to adjust the parameters of *in vitro* cumulative gas production of diets containing preserved *Gliricidia*". *Ciencia Rural*, 51(11):1-9, ISSN: 1678-4596.
- Corral, S., Silva, A. M., & Quiñonez, G. 2019. "Modelo generalizado no-lineal altura-diámetro con efectos mixtos para siete especies de *Pinus* en Durango, México". *Rev. Mexicana de Ciencias Forestales*, 10(53): 86-117, ISSN: 2448-6671.
- De Roa, E.M.G. 2020. "Potencia y Robustez en pruebas de Normalidad con Simulación Montecarlo". *Revista Científica*, 5(18): 108119, ISSN: 2542-2987.
- Gaver, D. P. & O'Muircheartaigh, I. G. 1987. "Robust Empirical Bayes Analysis of Event Rates," *Technometrics*, 29 (1): 1-15, ISSN: 0040-1706, DOI: <http://doi.org/10.2307/1269878>.
- Gómez, M.A. & Agüero, Y. 2020. "Ajuste de modelos mixtos no lineales para la descripción de curvas de lactación bovina bajo pastoreo en El Mantaro, Junín, Perú". *Rev. Investig. Vet. Perú*, 31(4): 19027, ISSN: 1609-9117, DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i4.19027>.



- Gómez, S., Torres, V., García, Y., Herrera, M., Medina, Y. & Rodríguez, R. 2019. "Procedimiento estadístico para el análisis de experimentos con medidas repetidas en el tiempo en la esfera agropecuaria". Cuba. J. Agric. Sci. 53(4): 353-360, ISSN: 2079-3480.
- Groot, J.C.J., Cone, J.W., Williams, B.A., Debersaques, F.M.A. & Latinga, E.A. 1996. "Multiphasic analysis of gas production kinetic for *in vitro* fermentation of ruminant feeds". Anim. Feed Sci. Tech., 64 (1): 77-89, ISSN: 0377-8401.
- Guerra, R., Hernández, A. & Menéndez, A. 2018. "Análisis de curvas de lactancia en vacas Holstein de la cuenca lechera de Chiriquí, Panamá". Livestock Research for Rural Development, 30 (65), ISSN: 0121-3784, DOI: <http://www.lrrd.org/lrrd30/4/rgue30065.html>.
- Hurtado, E.A., Cueva, T. & Barba, C.2021. "La modelización del crecimiento de los cerdos bajo un sistema de cama profunda". Ciencia UNEMI, 14 (36): 1-11, ISSN:2528-7737.
- IBM SPSS. 2013. Sistema de análisis estadístico. Universidad de Chicago. Versión 22.
- Lavrencic, A., Stefanon, B. & Susmel, P. 1997. "An evaluation of the Gompertz model in degradability studies of forage chemical components". J. Animal Sci., 64 (3): 423-431, ISSN: 1525-3163.
- Makkar, H.P.S. 2005. "*In vitro* gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals". Anim. Feed Sci. Tech., 123: 291-302, ISSN: 0377-8401.
- Muro, A., Arzola, C., Rodríguez, C., Corral, A., Gutiérrez, H., Herrera, E., Gutiérrez, F. J., & Espinoza, A. 2017. "Cinética de degradación ruminal *in vitro* de dietas con Manzarina y rastrojo de maíz en ovinos". Acta Universitaria, 27(2):17-23, ISSN: 2007-9621, DOI: 10.15174/au.2017.1200.
- Oddi, F. J., Míguez, F., Benedetti, G., & Garibaldi, L. A. 2020. "Cuando la variabilidad varía: Heterocedasticidad y funciones de varianza". Ecología Austral, 30: 438-453, ISSN: 1667-7838.
- Pérez, L. 2018. "¿Cómo proceder ante el incumplimiento de las premisas de los métodos paramétricos? o ¿cómo trabajar con variables biológicas no normales?". Revista del Jardín Botánico Nacional, 39: 1-12, ISSN: 2410-5546.
- Pérez, J. J., Antonio, R. T., Rodríguez, E. A., Yamallel, J. I. Y., García, D. A. G., & Cárdenas, M. G. 2020. "Estimación del carbono almacenado en una plantación de *Tectona grandis* L. f. mediante ecuaciones alométricas". Rev. Mexicana de Ciencias Forestales, 11(57), ISSN: 2448-6671.
- Posada, S.L. & Noguera, R.R. 2005. "Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes". Livestock Research for Rural Development, 17(36), ISSN: 0121-3784, DOI: <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posal7036.htm>.
- Rodríguez, R., Galindo, J., Ruiz, T. E., Solis, C., Scull, I. & Gómez, S. 2019. "Valor nutritivo de siete ecotipos de *Tithonia diversifolia* colectados en la zona oriental de Cuba". Livestock Research for Rural Development, 31(119), ISSN: 0121-3784, DOI: <http://www.lrrd.org/lrrd31/8/ruiz31119.html>.
- 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(117), ISSN: 0121-3784, DOI: <http://www.lrrd.org/lrrd32/7/rodri32117.html>.
- Santoyo, F., Rangel, A., Santoyo, E. & Santoyo, V. 2017. "Uso de ecuaciones estructurales en la confirmación de modelos causales haciendo uso del software AMOS versión 19". Revista electrónica AMIUTEM, 5(1):146-153, ISSN: 2395-955X.
- SAS. 2013. Sistema de análisis estadístico. Universidad de Nebraska. Versión 9.3.
- Schofield, P., Pitt, R.E. & Pell, A.N. 1994. "Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production". J. Animal Sci., 72 (11): 2980-2991, ISSN: 1525-3163.
- Tiago, J., Cazonatto, A. & Silva, W. 2017. "Comparing non-linear mathematical models to describe growth of different animals". Animal Sci. Maringá., 39 (1): 73-81, ISSN printed: 1806-2636, ISSN on-line: 1807-8672, DOI: 10.4025/actascianimsci.v39i1.31366.
- 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". Anim. Feed Sci. Tech., 48, 185-197, ISSN: 0377-8401.

**Receiver: June 2, 2021**

**Accepted: December 6, 2021**