

## Evaluación de diferentes variedades de morera (*Morus alba*) en el control de la metanogénesis en líquido ruminal de búfalos

Niurca González<sup>1</sup>, Juana Galindo<sup>1</sup>, Ana I. Aldana<sup>1</sup>, Onidia Moreira<sup>1</sup>, Lucía R. Sarduy, L. A. Abdalla<sup>2</sup> y M. Regina Santos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencia Animal. Apartado Postal 24, San José de las Lajas, La Habana.

Correo electrónico: ngonzalez@ica.co.cu

<sup>2</sup>Centro de Energía Nuclear para la Agricultura. Laboratorio de Nutrición Animal. Universidad de Sao Paulo. Brasil

La producción de metano en el rumen causa daños atmosféricos y reduce la productividad del animal. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de cuatro variedades de morera (*Morus alba*) en la producción de gas total y metano en condiciones *in vitro* y seleccionar la variedad más promisoría en el control de la metanogénesis ruminal en búfalos de río. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial (5 x 5) para evaluar cinco tratamientos: 1) 100 % de pasto estrella (PE) (*Cynodon nlemfuensis*) (control), 2) PE + 30 % variedad Cubana, 3) PE + 30 % variedad Acorazonada, 4) PE + 30 % variedad Tigreada, 5) PE + 30 % variedad Indonesia. Se usó la técnica de producción de gas *in vitro* y se midió el volumen de gas y de metano producido, a las 4, 8, 12 y 24 h de incubación. Para el análisis de los resultados se realizó un análisis de varianza multivariada. Se observó que la producción de gas se incrementó en el tiempo para todos los tratamientos. A las 24 h de incubación, las cuatro variedades de morera (*Morus alba*) produjeron más gas que el tratamiento control y la variedad Indonesia fue la que más gas produjo (102.36 mL gas/g de MS). La producción de metano fue similar entre el tratamiento control y el tratamiento que contenía 30 % de la variedad Cubana (99.74 y 89.13  $\mu$ L/g de MS, respectivamente). Con respecto al control, las variedades Acorazonada, Tigreada e Indonesia produjeron más metano. De ellas, la Indonesia fue la que más produjo. Se concluye que el 30 % de inclusión de las variedades evaluadas no logró disminuir la producción de metano en el rumen. Se recomienda evaluar otros niveles de inclusión de la variedad Cubana para lograr mayor reducción de la producción de metano.

Palabras clave: metano, producción de gas, rumen.

La mayoría del metano que proviene de los sistemas de producción de rumiantes se origina a partir de la fermentación de los carbohidratos de la dieta en el rumen (Mc Ginn *et al.* 2008) y se considera un producto de la fermentación ruminal. Su producción representa una pérdida significativa de la energía del alimento, que usualmente varía entre 5 y 15 % del consumo de energía bruta de la dieta, y sus emisiones a la atmósfera provocan efectos dañinos. Por estas razones, mitigar sus emisiones se ha convertido en un tema de investigación importante.

Numerosas son las numerosas estrategias que se han propuesto para reducir la metanogénesis ruminal, entre las que se incluye la disminución del número de rumiantes, la manipulación genética de las bacterias metanogénicas del rumen, la inhibición de metanógenos, la provisión de aceptores alternativos de electrones, el desarrollo de razas de animales que produzcan menos metano y las manipulaciones de la dieta (McAllister y Newbold 2008). Esta última es la que parece tener mayor potencial de desarrollo en el futuro, debido a su simplicidad y aplicación práctica (Sharma 2005).

Las manipulaciones nutricionales para suprimir la metanogénesis ruminal involucran las modificaciones en las prácticas alimenticias, la suplementación, el suministro de aditivos alimenticios (compuestos químicos, ácidos orgánicos), y dietas que contienen metabolitos secundarios (saponinas, taninos) y ácidos grasos insaturados (Sharma 2005).

El aprovechamiento de especies de árboles y arbustos para el control de la metanogénesis ruminal constituye una alternativa que se debe considerar. En este sentido, la morera (*Morus alba*) podría desempeñar una función importante, debido a que contiene ácidos grasos insaturados de cadena larga (Jaramillo 2005), que podrían actuar favorablemente en la disminución de la producción de metano en el rumen.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes variedades de morera (*Morus alba*) en la producción de gas y metano en condiciones *in vitro* y seleccionar la variedad más promisoría en el control de la metanogénesis ruminal en búfalos de río.

### Materiales y Métodos

Se empleó la técnica de producción de gas *in vitro* descrita por Theodorou *et al.* (1994), para evaluar el efecto de cuatro variedades de morera (*Morus alba*) en el control de la metanogénesis ruminal en búfalos de río.

*Animales y dieta.* Se utilizaron como donantes del líquido ruminal dos búfalos de río (Murrah), machos adultos, con cánula simple en rumen, con peso promedio de 453 kg. Estos se alojaron en cubículos individuales, a la sombra y con libre acceso al agua y a los alimentos. Todos recibieron forraje de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*).

*Tratamientos.* Se evaluaron cinco tratamientos: 1) 100 % de pasto estrella (PE) (*Cynodon nlemfuensis*)

(control), 2) PE + 30 % variedad Cubana, 3) PE + 30 % variedad Acorazonada, 4) PE + 30 % variedad Tigreada, 5) PE + 30 % variedad Indonesia.

Las plantas de morera procedieron de una plantación de tres años de establecida en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes «Indio Hatuey». Se encontraban en suelos ferralíticos rojos y se fertilizaron con gallinaza. Se cortaron hojas con los peciolos y tallos jóvenes, de forma manual, simulando la selección del animal. El PE se cortó a mano, en áreas de pastoreo del Instituto de Ciencia Animal.

Todo el material vegetal se secó en estufa a 60° C y se molió hasta alcanzar tamaño de partícula de 1 mm. La tabla 1 muestra la composición bromatológica de los tratamientos evaluados.

morera evaluadas se les determinó la concentración de compuestos fenólicos y la composición de ácidos grasos insaturados de cadena larga

*Análisis químico.* El análisis de la composición bromatológica de los tratamientos evaluados se realizó según las técnicas de la AOAC (1995) y las fracciones fibrosas se analizaron por el procedimiento de Goering y van Soest (1970).

La concentración de compuestos fenólicos se determinó por la metodología descrita por Makkar *et al.* (1988 y 1993) y la composición de ácidos grasos insaturados de cadena larga por cromatografía gaseosa, según la técnica descrita por Rodríguez *et al.* (1998).

El metano se determinó por cromatografía gaseosa, utilizando un cromatógrafo Philips PU-4400, con colum-

Tabla 1. Composición bromatológica de los tratamientos evaluados (%)

Tratamiento	MS	Cenizas	Ca	P	PB	FDN	FDA	Lig	Cel
Pasto estrella (control)	90.12	11.33	0.57	0.33	9.00	68.78	39.22	6.56	29.58
Pasto estrella + 30 % de variedad Cubana	89.76	10.34	0.97	0.32	18.04	56.52	32.36	6.09	24.06
Pasto estrella + 30 % de variedad Acorazonada	89.52	11.24	0.97	0.30	17.86	57.45	33.13	6.31	24.58
Pasto estrella + 30 % de variedad Tigreada	89.28	11.68	1.01	0.32	21.06	56.27	32.85	7.10	24.11
Pasto estrella + 30 % de variedad Indonesia	89.50	11.85	1.22	0.31	15.10	57.03	32.75	6.79	24.09

*Procedimiento experimental.* Se pesaron 0.5 g de cada uno de los tratamientos y se adicionaron a las correspondientes botellas de vidrio de 100 mL.

A los animales en ayuno se les extrajo líquido ruminal a través de la cánula, con la ayuda de una bomba de vacío. Este se guardó en un termo con cierre hermético para garantizar las condiciones de temperatura (39° C) y anaerobiosis durante el traslado al laboratorio.

El contenido ruminal de ambos animales se mezcló y se filtró por muselina. Al sólido resultante se le añadió una pequeña porción de solución amortiguadora de Menke y Steingass (1988). Se agitó por unos segundos en una batidora doméstica para desprender los microorganismos adheridos a la fibra. Posteriormente, el filtrado de esta porción se incorporó a la fracción líquida. El fluido ruminal se mantuvo en atmósfera de CO<sub>2</sub>.

Se añadieron a cada botella 50 mL de una mezcla de líquido de rumen y solución amortiguadora de Menke y Steingass (1988) en proporción 1:3 (v/v) y se sellaron con tapón de butilo y agrafe. Se incluyeron botellas sin sustrato como blancos para corregir el efecto del líquido ruminal en los volúmenes de gas producido. Todas las botellas se colocaron aleatoriamente en un baño de temperatura controlada a 39° C.

El gas se midió por desplazamiento del émbolo de una jeringuilla de 10 mL, después de puncionar el tapón.

Se determinó el volumen de gas y metano a las 4, 8, 12 y 24 h de incubación. A las cuatro variedades de

na capilar de 25 m, con fase estacionaria DB-1. Se utilizó detector FID y H<sub>2</sub> (1 mL·min<sup>-1</sup>) como gas portador. La temperatura del detector y del inyector fue de 200° C, y la de la columna de 60° C. Se inyectó 1 mL de gas contenido en la jeringuilla y los cálculos de la concentración de metano se realizaron a partir de la ecuación obtenida en la curva de calibración:  $y = 0.0001x + 2.8515$  ( $R^2 = 0.99$ ).

*Diseño experimental y análisis matemático.* Se empleó un diseño completamente aleatorizado, con arreglo factorial (5x5), donde los factores fueron los tratamientos y las horas de fermentación. Para el análisis de los resultados se realizó un análisis de varianza multivariada, para encontrar la interacción entre los tratamientos y las horas de muestreo. En los casos en que la interacción fue significativa se realizó un análisis de varianza de parcelas divididas. Se aplicó la dócima de comparación múltiple de Duncan (1955) en los casos necesarios. Se empleó el programa estadístico INFOSTAT, propuesto por Balzarini *et al.* (2001).

## Resultados y Discusión

Hubo interacción significativa entre los tratamientos y los tiempos de muestreo para los indicadores evaluados (producción de gas y metano).

La fermentación de los nutrientes (fundamentalmente los carbohidratos) en el rumen produjo una mezcla de gases, entre los que se encuentra el metano (González

et al. 2007). La técnica de producción de gas *in vitro* permite predecir la digestibilidad de los alimentos (Theodorou et al. 1994 y Mota et al. 2005). Posibilita además, cuantificar el volumen de metano producido en la fermentación ruminal. Los efectos de la inclusión de las cuatro variedades de *Morus alba* que se evaluaron en la producción de gas y metano ruminal, respectivamente, se muestran en la figura 1 y en la tabla 2.

cualitativo que realizaron García et al. (2002) a las variedades Cubana, Tigreada y Acorazonada reflejó que estas presentaron altas concentraciones de azúcares de fácil fermentación. Es posible que este indicador haya sido uno de los factores que influyó en las mayores producciones de gas, cuando se incluyeron estas variedades de morera en la dieta.

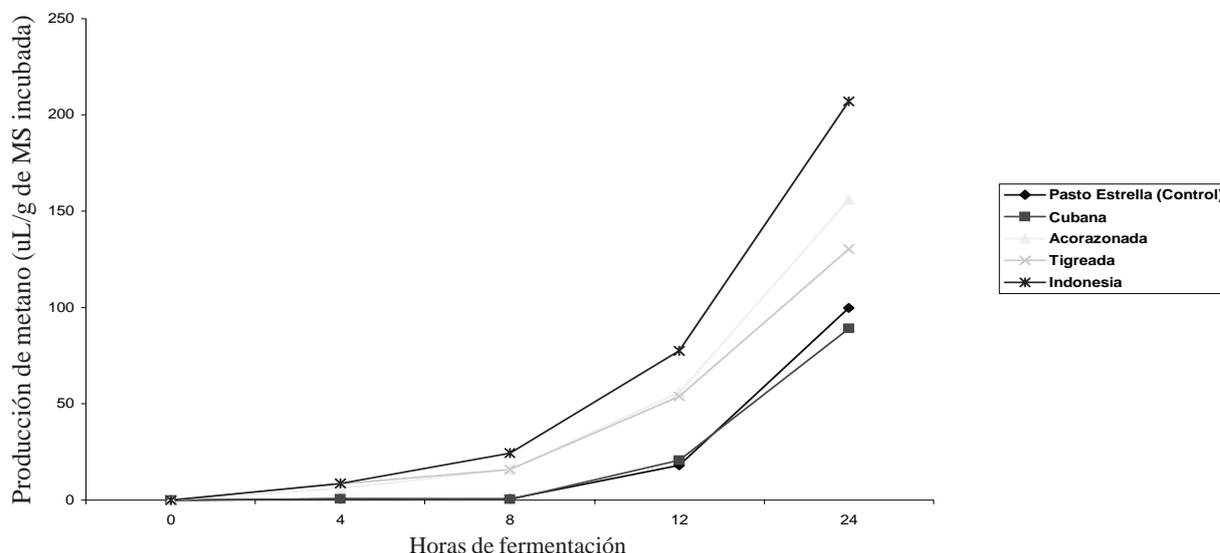


Figura 1. Efecto de la inclusión de cuatro variedades de Morera (*Morus alba*) en la producción de metano en el rumen

Tabla 2. Efecto de la inclusión de cuatro variedades de morera (*Morus alba*) en la producción de gas acumulada (mL de gas/g de MS incubada)

Horas	Tratamientos					Sig.
	Control	30 % Cubana	30 % Acorazonada	30 % Tigreada	30 % Indonesia	
4	6.38 <sup>a</sup>	13.39 <sup>ab</sup>	12.33 <sup>ab</sup>	9.0 <sup>a</sup>	12.54 <sup>ab</sup>	P < 0.01
8	12.48 <sup>ab</sup>	23.44 <sup>bc</sup>	27.45 <sup>c</sup>	24.19 <sup>c</sup>	29.44 <sup>c</sup>	
12	24.69 <sup>c</sup>	40.46 <sup>d</sup>	47.63 <sup>de</sup>	43.03 <sup>d</sup>	51.39 <sup>de</sup>	
24	56.59 <sup>e</sup>	74.22 <sup>f</sup>	82.37 <sup>f</sup>	76.22 <sup>f</sup>	102.36 <sup>g</sup>	

<sup>abcdefg</sup> Medias con letras distintas difieren significativamente a P < 0.05 (Duncan 1955)  
 EE de la diferencia entre horas para la misma variedad de morera = ± 5.014  
 EE de la diferencia entre variedades de morera para el mismo o diferente horario = ± 10.753.

Como era de esperar, como consecuencia de la fermentación microbiana ruminal de los alimentos, la producción de gas se incrementó en el tiempo para todos los tratamientos evaluados (tabla 2). A las 24 h de fermentación, los tratamientos que incluían las diferentes variedades de morera produjeron más gas que el control. Los tratamientos que correspondían a las variedades Cubana, Acorazonada y Tigreada produjeron igual volumen de gas, mientras que Indonesia fue la que más gas produjo en este tiempo.

En este trabajo no se realizó la determinación de carbohidratos reductores solubles de estas cuatro variedades de *Morus alba*. Sin embargo, el análisis fitoquímico

Los resultados para la producción de gas coinciden con lo informado por Delgado et al. (2007, datos no publicados), quienes evaluaron 25 % de inclusión de *Morus alba* a una dieta de *Pennisetum purpureum*. Estos autores atribuyeron las mayores producciones de gas del tratamiento con *Morus alba* a la alta disponibilidad de materia seca (entre 70-80 %) que caracteriza a esta planta (Benavides et al. 1994) y a su alto valor nutritivo, con niveles de proteína de aproximadamente 20 %.

Cuando se analizó el efecto de los tratamientos evaluados en la producción de metano en el rumen (figura 1), tanto para el tratamiento control como

para 30 % de inclusión de la variedad Cubana, se obtuvo igual cantidad de metano hasta las 24 h de fermentación. Además, se observó que en estos dos tratamientos el metano se comenzó a producir a partir de las 8 h de iniciada la fermentación en el rumen. Este último aspecto es similar a lo informado por González *et al.* (2006), cuando evaluaron la adición del ácido bromoetano sulfónico (BES) a una dieta de alfalfa para reducir la producción de metano en el rumen. En cambio, las variedades Acorazonada, Tigreada e Indonesia, comenzaron a producir metano a partir de las 4 h de fermentación. Hasta las 24 h de incubación, las variedades Acorazonada y Tigreada produjeron, aproximadamente, igual cantidad de metano. La variedad Indonesia tuvo la mayor producción significativa de este gas.

Hess *et al.* (2003) adicionaron la leguminosa tropical *Arachis pintoi* a una dieta de gramíneas y las emisiones de metano se incrementaron desde un rumen artificial, como consecuencia de la mejora en la degradabilidad de nutrientes de la dieta, con respecto a la dieta control, compuesta por una gramínea tropical limitada en nitrógeno. Lo mismo pudo suceder en esta investigación, con la inclusión de 30 % de las variedades Acorazonada, Tigreada e Indonesia a la dieta basal de pasto estrella, ya que la morera, a pesar de no ser una leguminosa, es una planta que aporta gran cantidad de nitrógeno a la ración.

El potencial de los compuestos secundarios de las plantas para reducir la producción de metano ha sido reconocido recientemente. Entre dichos compuestos, los taninos condensados desempeñan una función fundamental (Beauchemin *et al.* 2008). Las cuatro variedades de morera estudiadas tuvieron una concentración muy pequeña, casi cero,

de taninos condensados (tabla 3). Por tanto, en este caso, los compuestos secundarios no parecen estar involucrados en el control de la metanogénesis ruminal. Es lógico entonces que no disminuyera la producción de metano, cuando se incluyó 30 % de estas variedades de *Morus alba*.

La suplementación de la dieta con lípidos ricos en ácidos grasos insaturados también reduce las emisiones de metano a través de la hidrogenación de los mismos (Beauchemin *et al.* 2008). En la tabla 4 se muestran las cantidades de ácidos grasos insaturados de las variedades de morera. Los ácidos oleico, linoleico y linolénico estuvieron presentes mayormente en la variedad Cubana. La suma de estos ácidos equivalió a 24 %, a diferencia de 3, 12 y 17 % para Acorazonada, Tigreada e Indonesia, respectivamente. Esto podría explicar que la inclusión de 30 % de la variedad Cubana produjera menos metano que el resto de las variedades y tuviera un comportamiento muy similar al tratamiento control.

Ninguna de las cuatro variedades de *Morus alba* logró disminuir la producción de metano ruminal con 30 % de inclusión en la ración. Sin embargo, teniendo en cuenta que la variedad Cubana produjo la misma cantidad de metano que el tratamiento control, se recomienda evaluar otros niveles de inclusión de esta variedad para lograr mayor reducción de la producción de metano en el rumen.

### Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento aportado por Joint FAO/IAEA, Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, para la ejecución de los trabajos incluidos en el proyecto de investigación coordinado CUBA 12667

Tabla 3. Concentración de compuestos fenólicos en cuatro variedades de morera (*Morus alba*)

Compuesto fenólico	Variedad de morera ( <i>Morus alba</i> )			
	Cubana	Acorazonada	Tigreada	Indonesia
Fenoles totales <sup>1</sup>	32.03	3.97	5.04	39.75
Taninos totales <sup>1</sup>	24.50	2.04	2.75	30.90
Taninos Condensados <sup>2</sup>	0.30	0.20	0.10	0.40

<sup>1</sup>Valores expresados en equivalente a gramo de ácido tánico/kg de MS

<sup>2</sup>Valores expresados en equivalente a gramo de leucocianidina/kg de MS

Tabla 4. Composición de ácidos grasos insaturados de cadena larga en cuatro variedades de morera (*Morus alba*) (% del total de ácidos grasos)

Ácidos grasos insaturados	Variedad de morera ( <i>Morus alba</i> )			
	Cubana	Acorazonada	Tigreada	Indonesia
Oleico C <sub>18:1</sub> C <sub>9</sub>	3.906	0.478	0.987	2.255
Linoleico C <sub>18:2</sub> C <sub>9</sub> C <sub>12</sub>	12.79	1.958	5.821	7.948
Linolénico C <sub>18:3</sub> n-3	9.385	2.211	7.004	8.510

### Referencias

- AOAC 1995. Official methods of analysis (15<sup>th</sup> Ed). Ass. Off. Anal. Chem. Arlington.
- Balzarini, M. G., Casanoves, F., Di Rienzo, J. A., González, L. A. & Robledo, C. W. 2001. Software estadístico. Versión I. Córdoba. Argentina.
- Beauchemin, K. A., Kreuzer, M., Mara, F. D. & McAllister, T. A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian J. Exp. Agric.* 48:21
- Benavides, J. E., Lachaux, M. & Fuentes, M. 1994. Efecto de la aplicación de estiércol de cabra en el suelo sobre la calidad y producción de biomasa de morera (*Morus sp.*). En: Benavides, J. E (ed). Árboles y arbustos forrajeros en América Central. Informe técnico. CATIE. Vol. II. p. 495
- Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11:1
- García, D., Ojeda, F. & Pérez, G. 2002. Comportamiento fitoquímico preliminar de cuatro variedades de *Morus alba* en suelo ferralítico rojo con fertilización. V Taller Internacional Silvopastoril. I Reunión Regional de Morera.
- Goering, H. K. & van Soest, P. J. 1970. Forage Fiber Analysis. *Agricultural Handbook*, US. Department of Agricultura. No. 379. Washington, USA
- González, N., Galindo, J., González, R., Sosa, A., Moreira, O., Delgado, D., Martín, E. & Sanabria, C. 2006. Utilización de la técnica de PCR en tiempo real y de la producción de gas *in vitro* para determinar el efecto del ácido bromoetano sulfónico en la metanogénesis y la población microbiana ruminal. *Rev. Cubana Cienc. Agríc.* 40:183
- González, R., Delgado, D. & Cairo, J. 2007. Efecto de la inclusión de *Sapindus saponaria* en la producción de gas y metano en la fermentación *in vitro* de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115. *Rev. Cubana Cienc. Agríc.* 41:39
- Hess, H.D., Monsalve, L.M., Lascano, C.E., Carulla, J.E. & Díaz, T.E. 2003. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Australian J. Agric. Res.* 54:703
- Jaramillo, C. S. 2005. La Morera y el Sauco: arbustivas forrajeras para el trópico alto. II Curso Intensivo de Silvopastoreo Colombia-Cuba
- Makkar, H.P.S., Blummel, M., Borowy, N.K. & Becker, K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlation with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.* 61:161
- Makkar, H.P.S., Dawra, R.K. & Singh, B. 1988. Determination of both tannin and protein in a tannin-protein complex. *J. Agric. Food Chem.* 36:523
- McAllister, T.A. & Newbold, C. J. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian J. Exp. Agric.* 48:7
- McGinn, S. M., Chen, D., Loh, Z., Hill, J., Beauchemin, K. A. & Denmead, O. T. 2008. Methane emissions from feedlot cattle in Australia and Canada. *Australian Journal of Exp. Agric.* 48:183
- Menke, K.H. & Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28:1
- Mota, M., Rodríguez, R., Solanas, E. & Fondevila, M. 2005. Evaluation of four tropical browse legumes as nitrogen sources: Comparison of *in vitro* gas production with other methods to determine N degradability. *Anim. Feed Sci. Tech.* 123:341
- Rodríguez, J. R., Belarbi, E.L, García, J.L. S. & López, D. A. 1998. Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. *Biotech. Tech.* 12:689
- Sharma, R.K. 2005. Nutritional strategies for reducing methane production by ruminants – a review. *J. Res. Skuast-J* 4:1.
- 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 ruminants feed. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 48:185

**Recibido: 18 de abril de 2008**