Efecto de cuatro variedades de morera (*Morus alba* Linn.) en la población microbiana y productos fermentativos con líquido ruminal de búfalos de río (*Bubalus bubalis*) en condiciones *in vitro*

Niurca González, Juana Galindo, Ana I. Aldana, Onidia Moreira y Lucía Sarduy
Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba
Correo electrónico: ngonzalez@ica.co.cu

Se determinó el efecto de cuatro variedades de morera (*Morus alba* inn) en la población microbiana y productos fermentativos en condiciones *in vitro*, con líquido ruminal de búfalos de río (*Bubalus bubalis*). Se desarrolló una fermentación *in vitro* 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 y 5) PE + 30 % variedad indonesia. Se realizó la siembra y conteo de bacterias viables totales, celulolíticas, proteolíticas, amilolíticas, metanogénicas y hongos. También se efectuó el conteo de protozoos, medición de pH y determinación de la concentración de amoníaco. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado, con arreglo factorial 5 x 3 para los conteos de bacterias y hongos, y de 5 x 5 para los indicadores pH, concentración de amoníaco y conteo de protozoos. La inclusión de las diferentes variedades de morera no afectó las poblaciones de bacterias viables totales, proteolíticas, celulolíticas y hongos. A las ocho horas de fermentación, el tratamiento con la variedad acorazonada mostró los menores conteos de metanógenos (1.96 x 10^9 ufc.mL^{-1}) con respecto a los que incluyeron las variedades cubana, tigreada e indonesia (3.75, 3.99 y 3.70 x 10^9 ufc•mL^{-1}, respectivamente). Los conteos de protozoos fueron superiores para la variedad cubana (1.04 x 10^4 cel•mL^{-1}). El pH disminuyó, independientemente del tratamiento, a medida que transcurrió el tiempo de fermentación, aunque siempre se mantuvo cercano a la neutralidad. La concentración de amoníaco fue similar para todos los tratamientos. Se concluye que la inclusión de 30 % de las variedades de morera: acorazonada, cubana, tigreada e indonesia no afectó las poblaciones que degradan la fibra, y tampoco los productos finales de la fermentación ruminal.

Palabras clave: *microorganismos del rumen, metanógenos, búfalos de río, morera*

El aprovechamiento de especies de árboles y arbustos es una de las estrategias que más se utilizan en la nutrición de rumiantes para controlar la producción de metano en el rumen por considerarse una aplicación práctica y simple (Sharma 2005). Trabajos de Delgado *et al*. (2007) y González *et al*. (2010) demuestran su eficiencia en evaluaciones realizadas en morera (*Morus alba* Linn).

La reducción de la formación de metano en el rumen se puede lograr por varios mecanismos de acción. La inhibición directa de los metanógenos es uno de ellos (McAllister y Newbold 2008). Las estrategias para el control de la metanogénesis ruminal son efectivas cuando logran reducir la formación de metano en el rumen, sin afectar las poblaciones de microorganismos que degradan la fibra (Soliva *et al*. 2003).

En estudios de González *et al*. (2010) se evaluó el efecto de cuatro variedades de morera (acorazonada, cubana, tigreada e indonesia) en la formación de metano en el rumen, pero no se determinó su acción en los microorganismos ruminales ni en los productos formados como resultado de su actividad, aspectos necesarios para explicar cuáles podrían ser las vías que intervienen en la disminución del metano. Por ser la morera una planta que se utiliza en la alimentación de rumiantes con excelentes resultados productivos, es importante controlar su acción en las poblaciones ruminales. Sin embargo, no se dispone de estudios fisiológicos que expliquen este efecto.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar la acción de cuatro variedades de morera (*M. alba* Linn) en las poblaciones microbianas y productos fermentativos en condiciones *in vitro* con líquido ruminal de búfalos de río (*Bubalus bubalis*).

Materiales y Métodos

Se aplicó la técnica de producción de gas *in vitro*, descrita por Theodorou *et al*. (1994).

Animales y dieta. Se utilizaron como donantes del líquido ruminal dos búfalos de río (Mestizo de Bufalipso), machos adultos, con cánula simple en rumen y peso promedio de 453 kg. 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*) sin suplementar.

Tratamientos. Se evaluaron cinco tratamientos, donde se incluyeron diferentes variedades de morera: 1) 100 % de pasto estrella (PE) (*Cynodon nlemfuensis*) (control), 2) PE + cubana, 3) PE + acorazonada, 4) PE + tigreada y 5) PE + indonesia.

El nivel de inclusión para todas las variedades de morera fue 30 %. Este fue el que se aplicó en las investigaciones desarrolladas en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”, en Matanzas, Cuba, para la producción de leche de vaca (Ojeda 2006, comunicación personal).

Las variedades de morera (*Morus alba* Linn.) procedieron de una plantación de tres años de establecimiento, perteneciente a la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”, en Matanzas, Cuba. Se sembraron en suelo ferralítico rojo lixiviado y se fertilizaron con gallinaza. A los 60 d de rebrote y en época de lluvia, se cortaron manualmente las hojas con

los pecíolos y tallos jóvenes, para simular la selección del animal. El pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) se recolectó en áreas de pastoreo del Instituto de Ciencia Animal, ubicado en la provincia Mayabeque. El corte se realizó a mano, a una altura de 10 cm del suelo.

El material vegetal se secó en estufa a 60 ºC durante 48 h. Después se molió hasta alcanzar tamaño de partícula de 1mm. La composición química de los tratamientos se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Composición química de los tratamientos, %

Tratamiento	Cen	Ca	P	PB	FDN	FDA	Lig	Cel
Pasto estrella	11.33	0.57	0.33	9.00	68.78	39.22	6.56	29.58
PE + *M. alba* L. vc. cubana	10.34	0.97	0.32	13.76	56.52	32.36	6.09	24.06
PE + *M. alba* L. vc acorazonada	11.24	0.97	0.30	13.58	57.45	33.13	6.31	24.58
PE + *M. alba* L. vc. tigreada	11.68	1.01	0.32	16.79	56.27	32.85	7.10	24.11
PE + *M. alba* L. vc. indonesia	11.85	1.22	0.31	10.82	57.03	32.75	6.79	24.09

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

A los animales en ayuno se les extrajo líquido ruminal a través de la cánula con una bomba de vacío. 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) y 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_2.

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). Las botellas se sellaron con tapón de butilo y agrafe. Luego se colocaron aleatoriamente en un baño a 39 °C de temperatura.

Se efectuó la siembra y el conteo de bacterias viables totales, celulolíticas, proteolíticas, metanogénicas y hongos celulolíticos a las 0, 4 y 8 h de fermentación. El conteo de protozoos, medición de pH y determinación de la concentración de amoníaco se realizó a las 0, 4, 8, 12 y 24 h de incubación.

Análisis químico. Se realizó según las técnicas descritas por la AOAC (1995). Las fracciones fibrosas se analizaron por el procedimiento de Goering y van Soest (1970). Las concentración de NH_3 se determinó según la técnica descrita por Conway (1957) y el pH se midió mediante lectura en un pH metro digital marca Sartorius.

Análisis microbiológico. Se utilizó la técnica de cultivo de Hungate (1970) en tubos rodados y en condiciones de anaerobiosis estricta.

La siembra de bacterias viables totales, celulolíticas y proteolíticas se efectuó en los medios de cultivo de Caldwell y Bryant (1966), modificado por Elías (1971). Para las bacterias proteolíticas, se adicionó 10 % de leche descremada, según Galindo *et al*. (1984). Para la determinación de la población de hongos se utilizó el medio de cultivo de Joblin (1981). Los microorganismos metanogénicos se cultivaron en el medio de cultivo descrito por Anderson y Horn (1987), con la influencia de una mezcla de los gases hidrógeno y dióxido de carbono (60:40).

Para las inoculaciones se utilizaron tres diluciones. Cada una de ellas se replicó tres veces.

Para el conteo de colonias de bacterias viables totales, celulolíticas, proteolíticas, metanogénicas y hongos se colocaron los tubos rodados bajo una lupa. Se contaron las colonias que presentaron halo de digestión. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonia (ufc) para las bacterias, y en unidades formadoras de talo (uft) para los hongos.

Los protozoos se preservaron en formol a 10 %. Posteriormente se contaron directamente al microscopio óptico en cámara de Neubauer, luego de teñirlos con solución de violeta genciana al 0.01 % en ácido acético glacial.

Diseño experimental y análisis matemático. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con arreglo factorial 5 x 3 (cinco tratamientos y tres horas de muestreo) para las medidas de poblaciones microbianas (bacterias y hongos) y 5 x 5 (cinco tratamientos, cinco horas de muestreo) para los indicadores pH, concentración de amoníaco y conteos de protozoos. Se efectuaron cuatro repeticiones en tiempo. Para examinar los resultados, se aplicó análisis de varianza multivariado. Cuando hubo interacción entre los tratamientos y los horarios de muestreo, se aplicó un modelo de parcelas divididas, donde la principal correspondió a los tratamientos, y la subparcela a los horarios de muestreo. Cuando no existió interacción, se utilizó modelo lineal para los efectos de tratamiento y horas de muestreo. Se aplicó la dócima de comparación múltiple de Duncan (1955) para $P < 0.05$ en los casos necesarios. Se usó el programa estadístico INFOSTAT propuesto por Balzarini *et al*. (2001).

Resultados y Discusión

Hubo interacción entre los tratamientos y tiempos de muestreo, solamente para el conteo de bacterias metanogénicas y pH.

En la tabla 2 se muestran los conteos de bacterias metanogénicas ruminales para los cinco tratamientos en estudio. A medida que transcurrió el tiempo, el número de metanógenos no varió para los diferentes tratamientos, excepto cuando se incluyó 30 % de morera vc. acorazonada, donde hubo disminución de esta población de microorganismos a las ocho horas de iniciada la fermentación. En este momento se comparó el comportamiento de los tratamientos donde se incluyeron las diferentes variedades de morera, y ninguno difirió del control. Sin embargo, la variedad acorazonada mostró los menores conteos de bacterias metanogénicas.

existen en el rumen. En este experimento se realizaron los conteos de microorganismos metanógenicos mediante la utilización de los métodos tradicionales de cultivo, por lo que también es posible que muchos de los metanógenos no crecieran en este medio. Esta consideración también podría explicar la disminución de estos microorganismos, observada en la variedad acorazonada.

En algunas plantas como las leguminosas, los taninos condensados demostraron su toxicidad para los metanógenos (Hess *et al*. 2003). Sin embargo, se dispone de pocos informes de los efectos inhibitorios de los taninos en cultivos puros de metanógenos (Tavendale *et al*.2005). González *et al*. (2010) realizaron la determinación de taninos condensados en variedades de morera, y encontraron que ninguna contenía cantidades estimables de taninos condensados. Por tanto, este tipo

Tabla 2. Efecto de cuatro variedades de morera (*Morus alba* L.) en la población de metanógenos del rumen de búfalos (x 10^9 ufc mL^{-1})

Tratamiento	Tiempo de fermentación, horas		
	0	4	8
Pasto estrella	3.28^{bc} (33.18)	3.15^{abc} (26.44)	3.19^{abc} (36.04)
M. alba L.vc. cubana	2.82^{abc} (19.38)	3.31^{bc} (29.58)	3.75^{bc} (47.64)
M. alba L. vc. acorazonada	3.41^{bc} (35.06)	3.87^{c} (54.10)	1.96^{a} (13.46)
M. alba L. vc. tigreada	3.15^{abc} (26.58)	2.84^{abc} (19.13)	3.99^{c} (84.72)
M. alba L. vc. indonesia	2.52^{ab} (17.38)	3.45^{bc} (35.20)	3.70^{bc} (60.20)

Datos transformados según ln. Medias originales entre paréntesis.
EE ±=0.56 las horas nivel de los tratamientos.
EE ±=0.46 los tratamientos al mismo nivel de las horas o diferentes.
Medias con letras distintas difieren a $P < 0.05$ (Duncan 1955)
** $P < 0.01$

Los metanógenos son los microorganismos que se encargan de la formación del metano en el rumen (Attwood *et al*. 2008). Si se consideran los volúmenes de metano que obtuvieron González *et al*. (2010), cuando evaluaron los mismos tratamientos para el control de la metanogénesis ruminal, y encontraron que la variedad cubana fue la que menos metano produjo, entonces se espera que fuera esta, y no la acorazonada, la que disminuyera el número de metanógenos. En este caso, la disminución en la producción de metano no parece ser por efecto directo en los metanógenos.

Según Cook *et al*. (2008), los metanógenos son anaerobios obligados, difíciles de cultivar en el laboratorio. En la actualidad se reconoce que las especies cultivables no representan la diversidad de la población metanógena ruminal nativa, lo que podría llevar a una subestimación de las cantidades reales que

de metabolito secundario no parece tener acción en la población de metanógenos, lo que ayuda a explicar las pocas variaciones encontradas entre los tratamientos en la población ruminal.

El conteo del resto de las poblaciones ruminales se muestra en la tabla 3. La inclusión de 30 % en la ración de *M. alba* L. vc. cubana, y en la de acorazonada, tigreada e indonesia, no produjo variaciones en las poblaciones de bacterias viables totales, celulolíticas, proteolíticas y hongos celulolíticos, cuando se comparó con el control de pasto estrella. Sin embargo, los conteos de protozoos fueron mayores para la cubana.

Desde el punto de vista de la degradación de la fracción fibrosa en el rumen, es favorable que no se produjeran efectos negativos en las poblaciones de bacterias y hongos celulolíticos, cuando se incluyó 30 % de cualquiera de las cuatro variedades de morera. De este modo, si una de estas variedades de *M. alba*

Tabla 3. Efecto de la inclusión de cuatro variedades de morera (*M. alba* L.) en algunas poblaciones de microorganismos del rumen de búfalos

Población microbiana	Tratamientos					EE ±
	Pasto estrella	*M. alba* L.vc. cubana	*M. alba* L. vc. acorazonada	*M. alba* L.vc. tigreada	*M. alba* L.vc. indonesia	
Bacterias viables totales (10^{11}ufc•mL^{-1})	3.02 (32.27)	3.54 (41.95)	3.61 (52.62)	3.46 (40.48)	3.69 (48.09)	0.21
Bacterias celulolíticas (10^{4}ufc•mL^{-1})	2.85 (19.80)	2.86 (20.64)	2.91 (22.81)	3.12 (25.59)	3.07 (21.70)	0.16
Bacterias proteolíticas (10^{6}ufc•mL^{-1})	3.04 (31.10)	3.46 (47.98)	3.55 (41.37)	3.33 (33.34)	2.93 (26.40)	0.24
Hongos celulolíticos (10^{3}uft•mL^{-1})	2.28 (14.54)	2.47 (18.75)	2.72 (27.63)	2.53 (17.48)	2.75 (21.82)	0.26
Protozoos (10^{4}cel•mL^{-1})	0.05^{a} (1.06)	1.04^{b} (4.29)	0.30^{a} (1.75)	0.16^{a} (1.34)	0.14^{a} (1.63)	0.19**

Ufc, unidades formadoras de colônias. uft unidades formadoras de talo. cel.mL céulas/mL
Datos transformados según ln. Medias originales entre paréntesis
Medias con letras distintas difieren a $P < 0.05$ (Duncan 1955)
** $P < 0.01$

L. logra disminuir la producción de metano ruminal, puede seleccionarse como alternativa para controlar la metanogénesis ruminal porque cumpliría con el postulado de Soliva *et al*. (2003). Este refiere que las estrategias utilizadas para disminuir la producción de metano ruminal se deben ejecutar de modo que no afecten los microorganismos involucrados en los procesos de degradación de la fibra.

Los protozoos establecen relaciones ectosimbióticas y endosimbióticas con los metanógenos ruminales (Finlay *et al*. 1994 y Ohene-Adjei *et al*. 2007), lo que favorece la formación de metano en el rumen. Cuando se relacionan los conteos de protozoos que se obtuvieron en este trabajo con los volúmenes de metano informados por González *et al*. (2010), quienes evaluaron 30 % de inclusión de estas mismas variedades de morera, se debió esperar que la cubana, que produjo los menores volúmenes de metano, presentara también los menores conteos de protozoos. Sin embargo, ocurrió lo contrario. Esto reafirma el criterio de que la menor formación de metano, obtenida con la inclusión de 30 % de esta variedad, no parece ser resultado de una inhibición directa de los metanógenos o de los protozoos del rumen, sino de otros factores que deben estudiarse en investigaciones futuras.

La defaunación o reducción de los protozoos es una de las vías para disminuir los metanógenos y para la producción de metano en el rumen.

En diversos laboratorios se han desarrollado estudios con gran cantidad de plantas y sus compuestos secundarios, como las saponinas y los taninos (Galindo *et al*. 2001 y Patra *et al*. 2006). El efecto supresor en la producción de metano que ejercen las saponinas parece relacionarse con la acción directa contra los microorganismos del rumen involucrados en la formación de metano, entre los que se incluyen los metanógenos y protozoos (Hu *et al*. 2005). En este trabajo no se determinó la presencia de saponinas, pero no encontrar disminuciones en los conteos de protozoos con la inclusión en la ración de las diferentes variedades de morera sugiere que estas plantas no contenían este tipo de metabolito secundario. Esta valoración estaría en correspondencia con resultados de estudios previos, realizados por Maldonado *et al*. (2000) y García (2003), donde no se constató presencia de saponinas en *M. alba* L.

Los valores de pH (tabla 4) disminuyeron en el tiempo para todos los tratamientos, pero siempre se mantuvieron cercanos a la neutralidad. Esta disminución es lógica, puesto que el experimento se efectuó en condiciones *in vitro*, donde hay acumulación de productos finales de la fermentación. Según Valdez-Vázquez y Poggi-Varaldo (2009), en sistemas *in vitro*, la caída del pH se debe, entre otros factores, a la acumulación de ácidos orgánicos.

La mayoría de los metanógenos crecen bajo valores estrechos de pH (6-8) (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo 2009). En este experimento, los valores de pH no fueron inferiores a seis, por lo que se considera que este indicador tampoco ejerció efecto supresor en la población de metanógenos. Aún cuando no se determinó la actividad celulolítica, tampoco se considera que el pH tuvo efecto negativo en la degradación de la fibra porque se hubiese reflejado en las poblaciones celulolíticas, las que tampoco mostraron variación para ninguno de los tratamientos.

Las concentraciones de amoníaco ruminal no presentaron diferencias para los tratamientos en estudio (tabla 5). Se reconoce que el nitrógeno no proteico y las fracciones solubles de las proteínas se degradan usualmente en el rumen (Kandilys *et al*. 2009), y uno de los productos finales de la fermentación de estos compuestos es el amoníaco. Wohlt *et al*. (1973) y Kretovich (1986) plantearon que los alimentos compuestos principalmente de albúminas y globulinas presentan mayor solubilidad

Tabla. 4. Efecto de la inclusión de cuatro variedades de *M. alba* L. en el pH ruminal *in vitro*

Tratamiento	Horas de fermentación				
	0	4	8	12	24
Pasto estrella	7.07^{h}	7.09^{h}	7.06^{h}	6.68^{cdefg}	6.38^{abc}
M. alba L. vc. cubana	7.00^{gh}	6.97^{fgh}	6.74^{defgh}	6.53^{abcd}	6.35^{abc}
M. alba L. vc acorazonada	7.05^{h}	6.88^{defgh}	6.88^{defgh}	6.60^{cde}	6.30^{ab}
M. alba L. vc. tigreada	6.98^{gh}	6.93^{efgh}	6.83^{defgh}	6.62^{bcdef}	6.27^{ab}
M. alba L. vc. indonesia	6.99^{gh}	6.83^{defgh}	6.82^{defgh}	6.58^{bcde}	6.19^{a}

EE ± =0.14 las horas nivel de los tratamientos.
EE ± =0.14 los tratamientos al mismo nivel de las horas o diferentes.
Medias con letras distintas difieren a $P < 0.05$ (Duncan 1955)
** $P < 0.01$

Tabla 5. Efecto de la inclusión de cuatro variedades de *M. alba* L. en la concentración de amoníaco ruminal de búfalos (mmol.L^{-1})

Indicador	Tratamientos					EE ±
	Pasto estrella	*M. alba* L.vc. cubana	*M. alba* L.vc. acorazonada	*M. alba* L.vc. tigreada	*M. alba* L.vc. indonesia	
NH_3	10.35	12.39	13.07	12.92	10.81	0.83

en agua y soluciones salinas con respecto a las proteínas formadas primariamente por prolaminas y glutelinas. Si se considera el fraccionamiento proteico realizado a morera por Kandylis *et al*. (2009), donde encontraron que la mayor fracción proteica fue de prolaminas y albúminas (44.1 y 11.1 % de la proteína verdadera total, respectivamente), y los valores de NNP fueron moderados, se podría explicar por qué la inclusión de morera no provocó variaciones en la concentración de amoníaco.

La mayor proporción de proteínas insolubles que podrían estar presentes en la morera sugiere que la mayor degradación de la proteína en esta planta ocurre en las partes bajas del tracto gastrointestinal. Esto explicaría los excelentes resultados productivos que encontraron Benavides (2000), González y Milera (2000) y Ba *et al*. (2005), cuando le suministraron *M. alba* L. a corderos y cabras en crecimiento. La concentración similar de amoníaco ruminal obtenida para todos los tratamientos evaluados se corresponde con los conteos de bacterias proteolíticas que, como se conoce, son las responsables de degradar las proteínas a productos finales en el rumen, como el NH3.

Se concluye que las variedades de morera: acorazonada, cubana, tigreada e indonesia, cuando se incluyeron en 30 % no tuvieron efectos negativos en las poblaciones de microorganismos que degradan la fibra, y tampoco afectaron el pH ni la concentración de amoníaco ruminal.

Agradecimientos

Se agradece a Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture por el financiamiento para la ejecución de los trabajos comprendidos en el proyecto de investigación coordinado CUBA 12667.

Referencias

Anderson, M.A. & Horn, G.M. 1987. Effect of Lasalocic in wheight gain, ruminal fermentation and forage intake of stocker cattle grasing wintwer pasture. J. Animal Sci. 65:865

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. Ass. Off. Anal. Chem. 15 th. Arlington, V.A.

Attwood, G. T., Kelly, W. J., Altermann, E. H. & Leahy, S. C. 2008. Analysis of the *Methanobrevibacter ruminantium* draft genome: understanding methanogen biology to inhibit their action in the rumen. Australian J. Experimental Agric. 48:83

Ba, N.X., Giang V.D. & Ngoan L.D. 2005. Ensiling of mulberry foliage (*Morus alba*) and the nutritive value of mulberry foliage silage for goats in central Vietnam. Disponible: http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/2/ba17015.htm. Consultado: 12/07/06

Balzarini, M.G., Casanoves, F., Di Rienzo, J. A., González, L.A. & Robledo, C. W. 2001. Software estadístico. Versión 1. Córdoba, Argentina

Benavides, J. 2000. Utilization of Mulberry in Animal Production Systems. Disponible: "Mulberry for Animal Production". Ed. Sánchez. S.A. Disponible: http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/Mulberry/Papers/PDF/Benavid.pdf. Consultado: 24/05/02

Caldwell, D.R. & Bryant, M.P. 1966. Medium without fluid for non selective enumeration and isolation of rumen bacteria. Appl. Microb. 14:794

Conway, E.C. 1957. Microdiffusion analysis and volumetric error. 4th Ed. Crosby Lackwood, Sons, Ltd, London

Cook, S.R., Maiti, P.K., Chaves, A.V., Benchaar, C., Beauchemin, K. A. & McAllister, T.A. 2008. Avian (IgY) anti-methanogen antibodies for reducing ruminal methane production : *in vitro* assessment of their effects. Australian J. Exp. Agric. 48:260

Delgado, D.C., González, R., Galindo, J., Cairo, J. & Almeida, M. 2007. Potencialidad de *Trichantera gigantea* y *Morus alba* para reducir la producción animal de metano *in vitro*. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 41: 339

Duncan, D. B. 1955. Multiple ranges and multiple F test. Biometrics 11:1

Elías, A. 1971. The rumen bacteria of animals fed on a high molasses-urea diet. Ph.D Thesis. Aberdeen

Finlay, B. J., Esteban, G., Clarke, K. J., Williams, A. G., Embley, T. M. & Hirt, R. R. 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. FEMS Microbiol. Letters. 117:157

Galindo, J., Elías, A. & Cordero, J. 1984. La adición de zeolita a la dieta de ensilaje. II. Efecto de la zeolita en la población microbiana ruminal de vacas que consumen ensilaje. Rev. Cubana. Cienc. Agríc. 18:55

Galindo, J., González, N., Aldama, A. I. & Marrero, Y. 2001. Efecto de *Enterolobium cyclocarpum* en la población microbiana ruminal y su actividad en condiciones *in vitro*. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 35: 241

García, D. 2003. Efecto de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba* (Linn.). Tesis de Maestría en Pastos y Forrajes. Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba

Goering, H. K. & van Soest, P.J. 1970. Forage Fiber Analysis. Agric. Hardbook, US. Departament of Agric. No. 379. Washington, USA

González, N., Galindo, J., Aldana, A. I., Moreira, O., Sarduy, L. R., Abdalla, L. A . & Santos, M. R. 2010. Evaluación de diferentes variedades de morera (*Morus alba*) en el control de la metanogénesis en líquido ruminal de búfalos. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 44:37

González, E. & Milera, M. 2000. Mulberry in livestock feeding systems in Cuba: forage quality and goat growth. Disponible: http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGAP/FRG/MULBERRY/Paper/papers.htm. Consultado: 28/09/02

Hess, H. D., Kreuzer, M., Díaz, T. E., Lascano, C. E. & Carulla, J. E. 2003. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. Animal Feed Sci. Tech. 109:79

Hu, W.L. Liu, J. X, Ye, J. A., Wu, Y. M. & Guo, Y.Q. 2005. Effect of tea saponin onrumen fermentation *in vitro*. Animal Feed Sci. Tech. 120:333

Hungate, P. E. 1970. A roll tube method for cultivation in microbiology. Eds. J. B. Morris, D. B. Ribbons. New York. Academic Press, Inc. 117 pp.

Joblin, K. N. 1981. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. Appl. Environ. Microb. 1119 pp.

Kandylis, K., Hadjigeorgiou & Harizanis, P. 2009. The nutritive value of mulberry leaves (*Morus alba*) as a feed supplemented for sheep. Trop Anim Health Prod. 41:17

Kretovich, V.L. 1986. Plant Biochemistry. University Press. Moscow, Russia. Pp. 54- 56

Maldonado, M., Grande, D., Aranda, E. & Perez-Gil, F. 2000. Evaluación de árboles forrajeros tropicales para la alimentación de rumiantes en Tabasco, México. IV Taller Internacional Silvopastoril "Los árboles y arbustos en la ganadería tropical". Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p. 135-142

McAllister, T. A. & Newbold, C. J. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. Australian J. Experimental Agric. 48:13

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

Ohene-Adjei, S., Teather, R. M., Ivan, M. & Forster, R. J. 2007. Post-inoculation protozoan establishment and association patterns of methanogenic archaea in the ovine rumen. Appl. Env. Microbiol. 73:4609

Patra, A. K., Kamra, D. N. & Agarwal, N. 2006. Effects of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. Animal Feed Sci. Tech. 128:276

Sharma, R.K. 2005. Nutritional strategies for reducing methane production by ruminants. J. Res. Skuast. 4:12

Soliva, C.R., Hess, H.D., Meile, L., Kreuzer, M. & Machmüller, M. 2003. Suppression of ruminal methanogenesis by dietary means: apparent inconsistency between methane release and counts of microbes involved in methanogenesis. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 3:209

Tavendale, M.H., Meagher, L.P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G. T. & Sivakumaran, S. 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubation with *Lotus fedunculatun* and *Medicago sativa* effects of extractable condensed tannins fractions on methanogenesis. Animal Feed Sci. Tech. 123:403

Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., Mc Allan, 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

Valdez-Vázquez, I. & Poggi-Varaldo, H. M. 2009. Hydrogen production by fermentative consortia. Renewable and Sustainable Energy Rev. 13:1000

Wohlt, J.F., Sniffen, C.J. & Hoover, W.H. 1973. Measurements of protein solubility in common feedstuffs. J. Dairy Sci. 56:1052

Recibido: 4 de abril de 2011