

Effect of four inclusion levels of *Morus alba* L. cv. cubana on microbial populations and fermentative products in river buffalo (*Bubalus bubalis*) rumen liquid

Efecto de cuatro niveles de inclusión de *Morus alba* L. vc. cubana en las poblaciones microbianas y productos fermentativos en líquido ruminal de búfalos de río (*Bubalus bubalis*)

Niurca González¹, Juana Galindo¹ and A.L. Abdalla²

¹Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

²Centro de Energía Nuclear para la Agricultura. Piracicaba. São Paulo. Brasil

Email: ngonzaalez@ica.co.cu

To know by means of *in vitro* fermentation the effect of mulberry inclusion (*M. alba* Linn. cv. cubana) on the microbial populations and fermentative products in river buffalo (*Bubalus bubalis*) rumen liquid, four inclusion levels of *M. alba* Linn. cv. cubana (0, 15, 30, and 45 %) in a star grass (*Cynodon nlemfuensis*) basic diet were evaluated. The treatments chemical composition, gas volume and accumulated methane were determined at 4, 8, 12 and 24 h of fermentation. The sowing and count of total viable bacteria, cellulolytics, proteolytics, methanogenics and cellulolytic fungi were carried out at 0, 4 and 8 h. The protozoa count, the pH and ammonia concentration (NH₃) was made at 0, 4, 8, 12 and 24 h of incubation. A completely randomized design with factorial arrangement was applied. The treatments and the fermentation hours were the factors and four repetitions were made in time. From eight and up to 24h, all the treatments with *M. alba* had gas productions higher than the control ($P < 0.0001$), although the 30 and 45 % inclusion promoted similar amounts to each other (52.92 and 54.13 mL/g DM, respectively). The ruminal methane production was higher, when including 15 and 45 % de *M. alba* L. cv. cubana ($P < 0.05$), while the incorporation of 30% originated a volume that did not differ from control treatment. The populations of bacteria, fungi and protozoa, the pH, and the ammonia concentration were not affected with the *M. alba* inclusion. The obtained results allow to conclude that 15, 30 and 45 % of *Morus alba* cv. cubana inclusion do not exerts effect on the rumen microbial populations, pH and ammonia concentration, but when this plant is included in 15 and 45 % it increase the ruminal methane production.

Key words: *fermentation, methane, microorganisms, mulberry, rumen*

In Cuba, for some years, it is researched about the control of the ruminal methanogenesis (Galindo *et al.* 2003). The same as in many countries, diet manipulation and the use of plants as part of it, is one of the used strategies for being more feasible under the current economic conditions of the country. In this sense, the mulberry (*Morus alba* Linn.) is highlight as forage source because of its capacity of biomass production, chemical composition (Duke 2001), high degradability and excellent results on ruminants nutrition (Kandyliis *et al.* 2009), so that their evaluation in the control of the ruminal methanogenesis becomes necessary.

Delgado *et al.* (2007), when evaluating the mulberry

Para conocer mediante fermentación *in vitro* el efecto de la inclusión de morera (*M. alba* Linn. cv. cubana) en las poblaciones microbianas y productos fermentativos en el líquido ruminal de búfalos de río (*Bubalus bubalis*), se evaluaron cuatro niveles de inclusión de *M. alba* Linn. cv. cubana (0, 15, 30, y 45 %) en una dieta base de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*). Se determinó la composición química de los tratamientos, el volumen de gas y metano acumulado a las 4, 8, 12 y 24 h de fermentación. La siembra y el conteo de bacterias viables totales, celulolíticas, proteolíticas, metanogénicas y hongos celulolíticos se realizó a las 0, 4 y 8 h. El conteo de protozoos, el pH y la concentración de amoníaco (NH₃) se efectuó a las 0, 4, 8, 12 y 24 h de incubación. Se aplicó diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial. Los factores fueron los tratamientos y las horas de fermentación, y se efectuaron cuatro repeticiones en tiempo. A partir de las ocho y hasta las 24 h, todos los tratamientos con *M. alba* tuvieron producciones de gas superiores al control ($P < 0.0001$), aunque la inclusión de 30 y 45 % promovió cantidades similares entre sí (52.92 y 54.13 mL/g MS, respectivamente). La producción de metano ruminal fue superior, cuando se incluyó 15 y 45 % de *M. alba* L. cv. cubana ($P < 0.05$), mientras que la incorporación de 30 % originó un volumen que no difirió del tratamiento control. Las poblaciones de bacterias, hongos y protozoos, el pH y la concentración de amoníaco no se afectaron con la inclusión de *M. alba*. Los resultados obtenidos permiten concluir que 15, 30 y 45 % de inclusión de *Morus alba* vc. cubana no ejerce efecto en las poblaciones microbianas del rumen, pH y concentración de amoníaco, pero cuando esta planta se incluye en 15 y 45 % incrementa la producción de metano ruminal.

Palabras clave: *fermentación, metano, microorganismos, morera, rumen*

En Cuba, desde hace algunos años, se investiga acerca del control de la metanogénesis ruminal (Galindo *et al.* 2003). Al igual que en muchos países, la manipulación de la dieta y la utilización de plantas como parte de ello, es una de las estrategias utilizadas por ser más factible en las condiciones económicas actuales del país. En este sentido, la morera (*Morus alba* Linn.) se destaca como fuente de forraje por su capacidad de producción de biomasa, composición química (Duke 2001), alta degradabilidad y excelentes resultados en la nutrición de rumiantes (Kandyliis *et al.* 2009), de modo que se hace necesaria su evaluación en el control de la metanogénesis ruminal.

Delgado *et al.* (2007), al evaluar el efecto de la

effect on the control of ruminal methanogenesis founded that the 25 % inclusion of this tree reduces methane production. Taking into account this result, González *et al.* (2011) decided to deepen in the mulberry study and to evaluate the effect of different varieties on microbial populations, fermentative products and methane production, in *in vitro* conditions with river buffalo (*Bubalus bubalis*) rumen liquid.

These authors selected the most promissory variety to control ruminal methanogenesis. From the evaluated varieties (cubana, acorazonada, tigreada and indonesia), the cubana variety was the most promising to control the ruminal methanogenesis, when its inclusion in a diet based on star grass (*Cynodon nlemfuensis*) was of 30%.

Given these results, it was considered to carry out studies in those that other inclusion levels of this mulberry variety were evaluated, to determine which their effects were on microbial populations, products from ruminal fermentation and among these, specifically methane production.

The objective of this research was to evaluate, *in vitro*, the effect of four inclusion levels of mulberry (*Morus alba* Linn.) cv. cubana on microbial populations and fermentative products in river buffalo (*Bubalus bubalis*) rumen liquid.

Materials and Methods

The gas *in vitro* production technique was applied, described by Theodorou *et al.* (1994) and modified by Rodríguez *et al.* (2008).

Animals and diet. Two adult river buffalo bulls crossbred of Bufalipso fitted with rumen cannula and average weight of 453 kg were used as donor of rumen liquor. They were allocated in individual pens, under shade and *ad libitum* water and feeds. Both received *ad libitum* star grass (*Cynodon nlemfuensis*) and supplementation was not applied.

Treatments. Four treatments were evaluated, which corresponded with different mulberry inclusion levels to a star grass (SG) basic diet: 1) 100 % of SG (Control), 2) SG + 15 % *M. alba* L. cv. cubana, 3) SG + 30 % *M. alba* L. cv. cubana and 4) SG + 45 % *M. alba* L. cv. cubana.

In table 1 is showed the chemical composition of the evaluated treatments.

Experimental procedure. Samples of 0.5 g from each treatment were weighed and added to the glass bottles of 100 mL. The animals under fasting were extracted the rumen liquor through the cannula, using a vacuum pump. The material was kept in a hermetically sealed thermo to guarantee the temperature (39 °C) and anaerobiosis conditions during the transfer to the laboratory.

The rumen content of both animals was mixed and filtered through muslin. The resulting solid was added a small portion of buffering solution of Menke and

morera en el control de la metanogénesis ruminal encontraron que la inclusión de 25 % de esta arborea reduce la producción de metano. Teniendo en cuenta este resultado, González *et al.* (2010) decidieron profundizar en el estudio de la morera y evaluar el efecto de diferentes variedades en las poblaciones microbianas, productos fermentativos y producción de metano, en condiciones *in vitro* con líquido ruminal de búfalos de río (*Bubalus bubalis*). Estos autores seleccionaron la variedad más promisoría para el control de la metanogénesis ruminal. De las variedades evaluadas (cubana, acorazonada, tigreada e indonesia), la cubana fue la más prometedora para controlar la metanogénesis ruminal, cuando su inclusión en una dieta basada en pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) fue de 30%.

Ante estos resultados, se consideró realizar estudios en los que se evaluaran otros niveles de inclusión de esta variedad de morera, para determinar cuáles eran sus efectos en las poblaciones microbianas, productos de la fermentación ruminal y entre estos, específicamente la producción de metano.

El objetivo de este trabajo fue evaluar, *in vitro*, el efecto de cuatro niveles de inclusión de morera (*M. alba* Linn.) cv. cubana en las poblaciones microbianas y productos fermentativos en el 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) y modificada por Rodríguez *et al.* (2008).

Animales y dieta. Se utilizaron como donantes del líquido ruminal dos búfalos de río mestizo de Bufalipso, machos adultos, con cánula simple en rumen, con peso promedio de 453 kg. Se alojaron en cubículos individuales, a la sombra y con libre acceso al agua y a los alimentos. Ambos recibieron forraje de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) a voluntad y no se aplicó suplementación.

Tratamientos. Se evaluaron cuatro tratamientos, que se correspondieron con diferentes niveles de inclusión de morera a una dieta base de pasto estrella (PE): 1) 100 % de PE (Control), 2) PE + 15 % *M. alba* L. cv. cubana, 3) PE + 30 % *M. alba* L. cv. cubana y 4) PE + 45 % *M. alba* L. cv. cubana.

La composición química de los tratamientos evaluados se muestra en la tabla 1.

Procedimiento experimental. Se pesaron 0.5 g de 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 mediante 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

Tabla 1. Chemical composition of the evaluated treatments (%)

Indicator	Star grass (SG)	SG + 15 % <i>M. alba</i> L. vc. cubana	SG + 30 % <i>M. alba</i> L. vc. cubana	SG + 45 % <i>M. alba</i> L. vc. cubana
Ashes	11.3	10.8	10.3	9.85
Ca	0.57	0.77	0.97	1.17
P	0.33	0.32	0.32	0.31
CP	9.00	11.4	13.8	16.2
NDF	68.8	62.6	56.5	50.4
ADF	39.2	35.8	32.4	28.9
Lignin	6.56	6.33	6.09	5.86
Cellulose	29.6	26.8	24.1	21.3

Steingass(1988) and was stirred for a few seconds in a domestic blender to loosen the microorganisms adhered to the fiber. Later, the filtered material from this portion was added to the liquid fraction. The rumen liquor was kept under CO₂ atmosphere.

Each bottle was added, a mixture of 50 mL of rumen liquor and buffering solution of Menke and Steingass at a ratio of 1:3 (v/v) and they were sealed with butyl and agrafe taps. Bottles without substrate were included as blanks to correct the effect of rumen liquor on the volumes of gas produced. All bottles were randomly put in a controlled bath at 39 °C.

The gas was measured by motion of the embolus of a syringe of 10 mL, after the puncture of the tap. The gas volume and accumulated methane, the pH and ammonia concentration, were determined at 4, 8, 12, and 24 h of fermentation.

The sowing and count of total viable bacteria, cellulolytics, proteolytics, methanogenics and cellulolytic fungi were made at 0, 4 and 8 h of incubation. The protozoa count was carried out at 0, 4, 8, 12 and 24 h of fermentation.

Chemical analysis: The determination of the chemical composition of the experimental diets was carried out according to AOAC (2005). The fibrous fractions were analyzed by the procedure of Goering and van Soest (1970). The ammonia concentration was determined by the Conway (1957) method and that of methane, by gas chromatography, using a Philips PU-4400 chromatographer with capillary column of 25 m, with stationary phase DB-1. The FID detector was used and H₂ (1 mL·min⁻¹) as gas carrier. The temperature of the detector and of the injector was of 200 °C, and that of the column, was of 60 °C. One milliliter of gas from the syringe was injected. The calculations of methane concentration were performed from the equation obtained in the calibration curve: $y = 0.0001x + 2.8515$ (R² = 0.99).

Microbiological analysis: The Hungate (1970) culture technique in roll tubes and under strict anaerobiosis conditions was used. The sowing of total viable bacteria, cellulolytics and proteolytics were made in Caldwell and Bryant (1966) culture medium, modified by Elías

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 CO₂.

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. El volumen de gas y metano acumulado, el pH y la concentración de amoníaco, se determinaron a las 4, 8, 12 y 24 h de fermentación.

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

Análisis químico. La determinación de la composición química de las dietas experimentales se realizó según la AOAC (2005). Las fracciones fibrosas se analizaron por el procedimiento de Goering y van Soest (1970). La concentración de amoníaco se determinó por el método de Conway (1957) y la de metano, por cromatografía gaseosa con la utilización de un cromatógrafo Philips PU-4400 con columna capilar de 25 m con fase estacionaria DB-1. Se utilizó detector FID y como gas portador H₂ (1 mL·min⁻¹). 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. Los cálculos de la concentración de metano se realizaron a partir de la ecuación obtenida en la curva de calibración: $y = 0.0001 x + 2.8515$ (R² = 0.99).

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),

(1971). In the case of proteolytic bacteria, 10% of skim milk was added, according to Galindo *et al.* (1984). To determine the fungi population, the Joblin (1981) culture mean was used. The methanogenic microorganisms were cultivated in the culture medium described by Anderson and Horn (1987), with mixture of hydrogen and carbon dioxide gases (60:40). For inoculations, three dilutions were used and each of them was replated three times. The counts of colonies of total viable bacteria, cellulolytic, proteolytic, methanogenic and fungi, were carried out by means of the roll tubes placement under a magnifying glass. The colonies that showed digestion halo were counted. The results were expressed in unit colony formers (ucf) for bacteria and in unit thallus formers (utf) for fungi.

The protozoa were preserved in formol at 10%. Then, they were directly counted to the optic microscope in a Neubauer camera, after tinted with a violet gentian solution at 0.01 % in glacial acid.

Experimental design and statistical analysis: A completely randomized design with factorial arrangement was used. The treatments and fermentation hours were the factors. Four repetitions were made in time.

For the results processing, a multivariate variance analysis was used. In case of find interaction between treatments and sampling hours, a split plot model was applied. The main plots were the treatments and the subplot, sampling hours. In case of not find interaction, a lineal model for the effects of treatments and sampling hours was used. Duncan test for $P < 0.05$ was applied when necessary (Duncan 1955). The statistical software INFOSTAT was used proposed by Di Rienzo *et al.* (2012).

Results and Discussion

The systems of *in vitro* incubation have been used during decades to evaluate foods for ruminants (Stalker *et al.* 2013 and Muetzel *et al.* 2014). The *in vitro* gas production is one of the methods used with this purpose. This method allows evaluating the digestibility of the forages organic matter and can offer information of the degradation speed of foods (Fabio *et al.* 2008).

Table 2 shows the obtained results in gas production during this study. It can verify that, as the hours passes, the gas volumes for all treatments are increased. From eight hours up to 24 h of incubation, all treatments in which *M. alba* L. cv. cubana is included showed gas productions higher than the control treatment. The 30 and 45 % of inclusion of this mulberry variety produced similar gas quantities.

The mulberry is characterized for its high contents of easy fermentation carbohydrates, so it is expected that their participation in animals ration increases the digestibility in the rumen. This results in higher gases production. If the NDF values of the treatments

modificado por Elías (1971). En el caso de 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 mezcla de los gases hidrógeno y dióxido de carbono (60:40). Para las inoculaciones, se utilizaron tres diluciones y cada una de ellas se replicó tres veces. Los conteos de colonias de bacterias viables totales, celulolíticas, proteolíticas, metanogénicas y hongos, se realizaron mediante la colocación de 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 al 10 %. Luego, se contaron directamente al microscopio óptico en cámara de Neubauer, después de teñirlos con una solución de violeta genciana al 0.01 % en ácido acético glacial.

Diseño experimental y análisis estadístico: Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial. Los factores fueron los tratamientos y las horas de fermentación. Se efectuaron cuatro repeticiones en tiempo.

Para el procesamiento de los resultados, se utilizó análisis de varianza multivariado. En caso de encontrar interacción entre los tratamientos y los horarios de muestreo, se aplicó modelo de parcelas divididas. La parcela principal fueron los tratamientos y la subparcela, los horarios de muestreo. En caso de no encontrar interacción, se utilizó un modelo lineal para los efectos de los tratamientos y las horas de muestreo. Se aplicó la dócima de Duncan para $P < 0.05$ en los casos necesarios (Duncan 1955). Se utilizó el programa estadístico INFOSTAT propuesto por Di Rienzo *et al.* (2012).

Resultados y Discusión

Los sistemas de incubación *in vitro* se han utilizado durante décadas para evaluar alimentos para rumiantes (Stalker *et al.* 2013 y Muetzel *et al.* 2014). La técnica de producción de gas *in vitro* es uno de los métodos que se utiliza con este propósito. Este método permite evaluar la digestibilidad de la materia orgánica de los forrajes y puede brindar información de la velocidad de degradación de los alimentos (Fabio *et al.* 2008). La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en la producción de gas durante este estudio. Se puede constatar que, en la medida que transcurren las horas, se incrementan los volúmenes de gas para todos los tratamientos. A partir de las ocho horas y hasta las 24 h de incubación, todos los tratamientos en los que se incluye *M. alba* L. vc. cubana mostraron producciones de gas superiores al tratamiento control. El 30 y 45 % de inclusión de esta variedad de morera produjo cantidades similares de gas.

La morera se caracteriza por sus altos contenidos de carbohidratos de fácil fermentación, por lo que es de esperar que su participación en la ración de los animales incremente la digestibilidad en el rumen. Esto

Table 2. Effect of different inclusion levels of *M. alba* L. cv. cubana on the accumulate gas production (mL of gas g of DM incubated⁻¹).

Hours	Control	15%	30%	45%
4	1.67 ^a	2.78 ^a	3.34 ^a	5.30 ^b
8	6.38 ^b	10.57 ^c	12.53 ^d	13.95 ^d
12	17.20 ^e	22.22 ^f	25.07 ^g	26.51 ^g
24	42.17 ^h	49.20 ⁱ	52.92 ^j	54.13 ^j

^{abcdeefghij}Means with different letters differ at $P < 0.05$ (Duncan 1955)

MSE = 0.93 for the hours at the same level of the treatments

MSE = 1.19 for the treatments at the same or different level of hours

$P < 0.0001$

under study (table 1) are observed, it can be noticed that, when *Morus alba* L. cv. cubana is included, this indicator decreases. So, there is a higher quantity of cellular content and therefore, higher ruminal degradation occurs.

The ruminal methane production was higher when 15 and 45% *M. alba* L. cv. cubana was included, although the different inclusion levels of this variety did not show differences between them for this indicator (figure 1). The inclusion of 30% of cubana variety produced a methane volume that did not differ from the control, results that were similar to those obtained by González *et al.* (2010).

The structural carbohydrates, as the cellulose and the hemicellulose, are fermented at a lower speed than those not structural and produce more methane per digested substrate unit (Molano *et al.* 2008). This was previously shown by Galindo *et al.* (2003), who explained that higher ruminal cellulolysis of the food can also increase the production of this gas. If it is taken into account that cubana variety inclusion increases the methane production for all levels, except for 30%, it could be thought that the inclusion of this plant in the diet favors the degradation process of the rumen cellulose.

The inclusion of 15, 30 and 45% of *M. alba* L. cv. cubana did not produce effects on populations of cellulolytic, proteolytic, methanogenesis and total viable bacteria, fungi and protozoa (table 3). These results are

translated into greater gas production. If we observe the values of FND of the treatments under study (table 1), it can be noted that, when *Morus alba* L. cv. cubana is included, this indicator decreases. In other words, there is a greater quantity of cellular content and therefore, greater ruminal degradation occurs.

Ruminal methane production was higher when 15 and 45% *M. alba* L. cv. cubana was included, although the different inclusion levels of this variety did not show differences between them for this indicator (figure 1). The inclusion of 30% of the cubana variety produced a methane volume that did not differ from the control, results that were similar to those obtained by González *et al.* (2010).

Structural carbohydrates, such as cellulose and hemicellulose, are fermented at a slower rate than non-structural carbohydrates and produce more methane per unit of digested substrate (Molano *et al.* 2008). This was previously demonstrated by Galindo *et al.* (2003), who stated that higher ruminal cellulolysis of the feed can also increase the production of this gas. If we take into account that cubana variety inclusion increases methane production for all levels, except for 30%, it could be thought that the inclusion of this plant in the diet favors the degradation process of rumen cellulose.

The inclusion of 15, 30 and 45% of *M. alba* L. cv. cubana did not produce effects on total viable bacterial populations, cellulolytic, proteolytic, methanogenic,

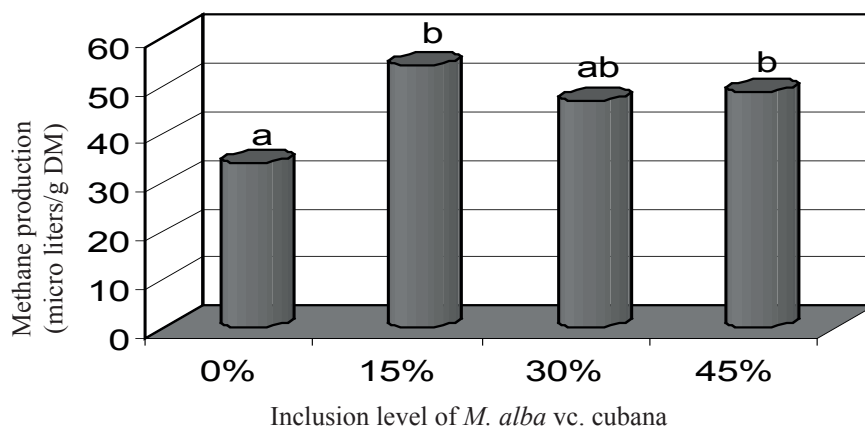


Figure 1. Effect of different inclusion levels of *M. alba* L. cv. cubana on the methane

explained, if there are kept in mind the interrelations that are stated between the microorganisms populations in the rumen. Cheng *et al.* (2009) explained that the rumen microorganisms degrade the plants fibers and produce a variety of final products, in those that are included the acetate, format, lactate, ethanol, H₂ and CO₂, some of those that are used by the methanogens to produce methane.

So it could be expected that if some of the populations is affected, it would also be reflected in the methanogens population. The protozoa counts, when not experiencing affectations with the mulberry inclusion, could explain that the methanogens numbers did not neither have variation, since the protozoa provides of a habitat for the methanogens (Hung *et al.* 2013).

The methane is produced by the methanogenics Archaea during the food use in the rumen (Chong *et al.* 2014 and Chuntrakort *et al.* 2014) but, according to Machmüller *et al.* (2003), the methanogenesis cannot always correlate with the methanogens numbers in the rumen. An experiment carried out by Kamra *et al.* (2006) show that while the methanogenesis is completely inhibited when there is presence of sulfonic bromoethane acid (SBE), methanogens number, quantified by means of PCR in real time, was not completely eliminated. If it considered the opinion that the methane production in the rumen is not necessarily correlated with the methanogens number, then it is logical that the increase in methane production, when 15 and 45 % of *M. alba* L. cv. cubana is included, was not reflected in increase in the methanogens counts for these treatments. The analysis of this result allows sharing the criteria exposed by Liu *et al.* (2013) regarding that the relation between methanogens and methane production is an aspect that needs further researches.

In table 4 is show that the inclusion of different *M. alba* L. cv. cubana levels did not produce effects on the pH and the ammonia concentration in the rumen.

hongos y protozoos (tabla 3). Estos resultados se explican, si se tienen en cuenta las interrelaciones que se establecen entre las poblaciones de microorganismos en el rumen. Cheng *et al.* (2009) plantearon que los microorganismos del rumen degradan la fibra de las plantas y producen una variedad de productos finales, entre los que se incluyen el acetato, formato, lactato, etanol, H₂ y CO₂, algunos de los que se utilizan por los metanógenos para producir metano. De modo que podría esperarse que si alguna de las poblaciones se afecta, ello se vería reflejado también en la población de metanógenos. Los conteos de protozoos, al no experimentar afectaciones con la inclusión de morera, podrían explicar que los números de metanógenos no tuvieran tampoco variación, ya que se plantea que los protozoos proveen de un habitat para los metanógenos (Hung *et al.* 2013).

El metano se produce por las Archaea metanogénicas durante la utilización de los alimentos en el rumen (Chong *et al.* 2014 y Chuntrakort *et al.* 2014) pero, según Machmüller *et al.* (2003), la metanogénesis no siempre se puede correlacionar con el número de metanógenos en el rumen. Un experimento realizado por Kamra *et al.* (2006) indicó que mientras la metanogénesis se inhibe completamente en presencia de ácido bromoetano sulfónico (BES), el número de metanógenos, cuantificados mediante PCR en tiempo real, no se eliminó completamente. Si se considera el criterio de que la producción de metano en el rumen no necesariamente se correlaciona con el número de metanógenos, entonces es lógico que el aumento en la producción de metano, cuando se incluye 15 y 45 % de la *M. alba* L. vc. cubana, no se reflejara en incremento en los conteos de metanógenos para esos tratamientos. El análisis de este resultado permite compartir el criterio expuesto por Liu *et al.* (2013) con respecto a que la relación entre los metanógenos y la producción de metano es un aspecto que necesita investigaciones futuras.

En la tabla 4 se observa que la inclusión de diferentes niveles de *M. alba* L. vc. cubana no produjo efectos en el pH y la concentración de amoníaco en rumen.

Tabla. 3. Effect of different inclusion levels of the (*M. alba* L. cv. cubana) mulberry, on the *in vitro* ruminal microbial populations

	Control	15%	30%	45%	MSE	Prob
Total viable bacteria (10 ¹¹ ufc•mL ⁻¹)	3.96	4.18	3.98	4.14	0.27	0.86
Cellulolytic bacteria (10 ⁴ ufc•mL ⁻¹)	3.32	3.29	3.57	3.59	0.18	0.52
Proteolytic bacteria (10 ⁶ ufc•mL ⁻¹)	3.11	3.22	3.34	3.48	0.10	0.47
Methanogenic bacteria (10 ⁹ ufc•mL ⁻¹)	3.47	3.34	3.52	3.86	0.42	0.81
Cellulolytic fungi (10 ³ uft•mL ⁻¹)	3.20	3.19	3.10	2.95	0.20	0.77
Protozoa (10 ⁴ cel•mL ⁻¹)	1.58	1.64	1.48	1.50	0.15	0.84

Table. 4. Effect of different inclusion levels of *M. alba* L. cv. cubana, on the pH and the ruminal ammonia concentration.

Indicator	Control	15%	30%	45%	MSE	Prob
pH	6.57	6.58	6.61	6.68	0.06	0.62
NH ₃ (mmol•L ⁻¹)	8.86	8.95	6.96	7.04	1.15	0.43

It is known that if the pH in the rumen decrease, negative effect on the fiber degradation and foods intake is produce and as consequence, an acidosis occurs (Wallace *et al.* 2006). With the *M. alba* L. cv. cubana inclusion in the ration, the pH was near to the neutrality, favoring that the fiber degradation in the ruminal liquor was not affected. This could explain the higher methane productions obtained for 15 and 45% of the cubana variety inclusion regarding the control.

The higher levels of degradable protein in the rumen caused increase in the ruminal ammonia production (Dhali *et al.* 2006 and Saro *et al.* 2014). All seems that the mulberry has high composition of non degradable protein in the rumen, and this was reflected in the ammonia concentrations obtained when including 15, 30 and 45 % of the cubana variety. Liu *et al.* (2001) and Singh and Makkar (2002) informed moderate values of non protein nitrogen and effective degradability of crude protein of the mulberry leaves of 54.9 % and 57 %, respectively. These authors explained that this plant can be a satisfactory food for the synthesis of microbial protein in the rumen and therefore, favors higher microbial protein supply to the intestine. Yao *et al.* (2000) and Liu *et al.* (2001) explained that the mulberry can be use as protein supplement for the ruminants. The use of experimental diets in ruminants showed that the mulberry nutritive value is as high as that of some high quality foods already well-known.

The 15, 30 and 45 % of *Morus alba* cv. cubana inclusion have no effect on the rumen microbial populations, the pH and the ammonia concentration, but increase the ruminal methane production, when including the 15 and 45 % in the diet.

Acknowledgements

The authors appreciate the CAPES, Brazil financing, for the research development.

Se conoce que si el pH en el rumen descende se produce efecto negativo en la degradación de la fibra y en el consumo de alimentos y como consecuencia, ocurre una acidosis (Wallace *et al.* 2006). Con la inclusión de *M. alba* L. vc. cubana en la ración, el pH se mantuvo cerca de la neutralidad, lo que propició que no se afectara la degradación de la fibra en el líquido ruminal. Esto podría explicar las mayores producciones de metano obtenidas para 15 y 45 % de inclusión de la variedad cubana con respecto al control.

Los altos niveles de proteína degradable en el rumen causan incremento en la producción de amoníaco ruminal (Dhali *et al.* 2006 y Saro *et al.* 2014). Todo parece indicar que la morera tiene alta composición de proteína no degradable en el rumen, y esto se reflejó en las concentraciones de amoníaco obtenidas cuando se incluyó 15, 30 y 45 % de la variedad cubana. Liu *et al.* (2001) y Singh y Makkar (2002) informaron valores moderados de nitrógeno no proteico y degradabilidad efectiva de la proteína bruta de las hojas de morera de 54.9 % y 57 %, respectivamente. Estos autores plantearon que esta planta puede ser un alimento satisfactorio para la síntesis de proteína microbiana en el rumen y por tanto, propicia mayor suministro de proteína microbiana al intestino. Yao *et al.* (2000) y Liu *et al.* (2001) plantearon que la morera se puede utilizar como suplemento proteico para los rumiantes. La utilización de dietas experimentales en rumiantes demostró que el valor nutritivo de la morera es tan alto como el de algunos alimentos de alta calidad ya conocidos.

El 15, 30 y 45 % de inclusión de *Morus alba* vc. cubana no tiene efecto en las poblaciones microbianas del rumen, el pH y la concentración de amoníaco, pero incrementa la producción de metano ruminal, cuando se incluye en la dieta el 15 y 45 %.

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento de CAPES, Brasil, para el desarrollo de la investigación.

References

- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis (18th Ed). Gaithersburg, M.D. USA
- 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
- Caldwell, D.R. & Bryant, M.P. 1966. Medium without fluid for non selective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Appl. Microbiolgy* 14:794
- Cheng, Y. F., Edwards, J.E., Allison, G.G., Zhu W-Y & Theodorou, M.K. 2009. Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch culture. *Bioresource Technol.* 100: 4821
- Chong, L., Zhuping, Z., Tongjun, G., Yongming, L. & Hongmin, D. 2014. Changes in methane emission, rumen fermentation, and methanogenic community in response to silage and dry cornstalk diets. *J. Basic Microbiol.* 54: 521
- Chuntrakort, P., Otsuka, M., Hayashi, K., Takenaka, A., Udchachon, S. & Sommart, K. 2014. The effect of dietary coconut

- kernels whole cotton seeds and sunflower seeds on the intake digestibility and enteric methane emission of Zebu beef cattle fed rice straw based diets. *Livestock Sci.* 161:80
- Conway, E.C. 1957. *Microdiffusion analysis and volumetric error*. 4th Edition, Crosby Lackwood, Sons, Ltd, London
- Delgado, D.C., Gonzalez, R., Galindo, J., Cairo, J. & Almeida, M. 2007. Potential of *Trichantera gigantea* and *Morus alba* to reduce *in vitro* rumen methane production. *Cuban J. Agric. Sci.* 41:319
- Dhali, A., Mishra, D.P., Mehla, R.K. & Sirohi, S.K. 2006. Usefulness of milk urea concentration to monitor the herd reproductive performance in crossbred Karan- fries cows. *Asian-Australasian J. Animal Sci.* 19: 26
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. Infostat versión 2012. Grupo Infostat. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available: <http://www.infostat.com.ar>. [Consulted: October 9, 2013]
- Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11:1
- Duke, J.A. 2001. *Morus alba* (L.). Available: <http://newcrop.hort.purdue.edu/newcrop/dukeenergy> [Consulted: December, 2001]
- Eliás, A. 1971. The rumen bacteria of animals fed on a high molasses-urea diet. PhD. Thesis. Aberdeen
- Fabio, Z., Calabró, S., Piccolo, V., Durso, S., Tudisco, R., Bovera, F., Cutrignelli, M.I. & Infascelli, F. 2008. Diets with different forage/concentrate ratios for the Mediterranean Italia Buffalo: *In vivo* Digestibility. *Asian- Australasian J. Animal Sci.* 21: 75
- Galindo, J., Eliás, A. & Cordero, J. 1984 The addition of zeolite to silages diets. II. The effect of zeolite on rumen microbial population of cows consuming silage. *Cuban J. Agric. Sci.* 18: 51.
- Galindo, J., Eliás, A., Pérez, M.C., Palenzuela, T. & Aldana, A.I. 2003. Effect of monensin on the *in vitro* methane production in three ruminal ecological systems. *Cuban J. Agric. Sci.* 37: 181
- 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., Aldana, A.I., Moreira, O., Sarduy, L. R., Abdalla, L.A. & Santos, M.R. 2010. Evaluation of different varieties of mulberry (*Morus alba*) in the control of the methanogenesis in buffalo rumen liquid. *Cuban J. Agric. Sci.* 44: 37
- Hung, L.V., Wanapat, M. & Cherdthong, A. 2013. Effects of Leucaena leaf pellet on bacterial diversity and microbial protein synthesis in swamp buffalo fed on rice straw. *Livestock Sci.* 151:188
- Hungate, P.E. 1970. A roll tube method for cultivation in microbiology. J. B. Morris, D. B. Ribbons. Eds. New York. Academic Press, Inc. p. 117
- Joblin, K.N. 1981. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Applied and Environment Microbiology.* 42:1119
- Kamra, D.N., Agarwal, N. & Chaudhary L C 2006 Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series* 1293. 156–163
- Kandyliis, 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
- Liu, C., Zhu, Z. P., Shang, B., Chen, Y.X., Guo, T.J. & Luo, Y.M. 2013. Long-term effects of ensiled cornstalk diet on methane emission, rumen fermentation, methanogenesis and weight gain in sheep. *Small Ruminant Res.* 115: 15
- Liu, J.X., Yao, J., Yan, B., Yu, J.Q. & Shi, Z.Q. 2001. Effects of mulberry leaves to replace rapeseed meal on performance of sheep feeding on ammoniated rice straw diet. *Small Ruminant Res.* 39: 131
- Machmüller, A., Soliva, C.R. & Kreuzer, M. 2003. Methane-suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage proportion. *The British J. Nutrition* 90: 529
- Menke, K.H. & Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Res. Devel.* 28:1
- Molano, G., Knight, T.W. & Clark, H. 2008 Fumaric acid supplements have no effect on methane emissions per unit of feedintake in wether lambs. *Australian J. Experimental Agric.* 48:165
- Muetzel, S., Hunt, Ch. & Tavendale, M.H. 2014. A fully automated incubation system for the measurement of gas production and gas composition. *Animal Feed Sci. Technol.* 196: 1
- Rodríguez, R., García, C.C., Oramas, A., Hernández, Y. & Domínguez, M. 2008. Use of polyethylene glycol and zeolita to improve the nutritive value of *Albizia lebbekoides* in *in vitro* conditions. *Cuban J. Agric. Sci.* 42: 263
- Saro, C., Ranilla, M.J., Tejido, M.L. & Carro, M.D. 2014. Influence of forage type in the diet of sheep on rumen microbiota and fermentation characteristics. *Livestock Sci.* 160:52
- Singh, B. & Makkar, H.P.S. 2002. The potential of mulberry foliage as a feed supplement in India. In: Sanchez Ed. *Mulberry for animal production*. FAO Animal Production and Health paper 147
- Stalker, L.A., Lorenz, B.G., Ahern, N.A. & Klopfensteir, T.J. 2013. Inclusion of forage standards with known *in vivo* digestibility in *in vitro* procedures. *Livestock Sci.* 151:198
- 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. *Animal Feed Sci. Technol.* 48:185
- Wallace, R.J., Wood, T.A., Rowe, A., Price, J., Yanez, D.R., Williams, S.P. & Newbold, C.J. 2006. Encapsulated fumaric acid as a means of decreasing ruminal methane emissions. *International Congress Series.* 1293, 148-151
- Yao, J., Yan, B., Wang, X.Q. & Liu, J.X. 2000. Nutritional evaluation of mulberry leaves as feeds for ruminants. *Livestock Res. Rural Devel.* 12:9 Available: <http://www.cipav.org.co/lrrd12/2/yao122.htm>.