

Effect of five inclusion levels of mulberry (*Morus alba* cv. cubana) on methanogens and some main cellulolytic populations within rumen liquor of water buffalos (*Bubalus bubalis*)

Efecto de cinco niveles de inclusión de morera (*Morus alba* vc cubana) en los metanógenos y algunas de las poblaciones celulolíticas principales presentes en el líquido ruminal de búfalos de río (*Bubalus bubalis*)

Niurca González¹, Adibe L. Abdalla², Juana Galindo¹, María Regina Santos²,
Patricia Louvandini² and Helder Louvandini²

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

²Centro de Energía Nuclear para la Agricultura. Laboratorio de Nutrición Animal. Universidad de São Paulo. Brasil
Email: ngonzalez@ica.co.cu

In order to study the effect of five inclusion levels of mulberry (*Morus alba* cv. cubana) on methanogens and some main cellulolytic populations within rumen liquor of water buffalos (*Bubalus bubalis*), and contribute to the knowledge of the action mechanism by which the Cuban variety of mulberry reduces ruminal methanogenesis, an *in vitro* fermentation was carried out and five inclusion levels (0, 15, 20, 25 and 30%) of *M. alba* cv. cubana to a diet based on star grass (*Cynodon nlemfuensis*) were evaluated. Total, methanogenic and cellulolytic (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*) bacteria, and fungi were identified and quantified by polymerase chain reaction in real time. The percentage of cellulolytic and methanogenic bacteria, regarding total bacteria population was evaluated, as well as the delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) and the expression of different ruminal microbial populations, in relation to control treatment. The inclusion of *M. alba* cv. cubana did not affect the studied ruminal microbial populations. The percentage of representation of *F. succinogenes*, *R. albus* and methanogens, regarding total bacteria was not affected with the inclusion of this variety of mulberry on the diet. Values of $\Delta\Delta Ct$ and expression relative to control treatment of microbial populations evidenced that diets containing mulberry tree had the same difference and the same expression relative to the control treatment. It can be concluded that inclusion of *M. alba* cv. cubana on diet not affect the main microbial populations that degrade the fiber in the rumen, which could be used as a strategy for reducing methane production in the rumen. The mechanism by which this plant is able to reduce ruminal methanogenesis is not through direct effect on methanogens.

Key words: mulberry, cellulolytic microorganisms, real time polymerase chain reaction, methane, rumen

In most of tropical countries, ruminant production is limited due to the low quality of feed provided to them, which are nitrogen deficient and low digestibility. There are different researches that search for alternatives to improve feed quality. Mulberry is used for ruminant nutrition and its leaves are provided as a main source of feed for sheep and goats (Bakshi and Wadhwa 2007). This plant has also been used for substituting concentrates in diets cows, sheep, goats and buffalos (Anbarasu *et al.* 2004, Kandyliis *et al.* 2009, Foiklang

Para estudiar el efecto de la inclusión de diferentes niveles de morera (*Morus alba* vc cubana) en los metanógenos y algunas de las principales poblaciones de microorganismos celulolíticos del rumen de búfalos de río (*Bubalus bubalis*), y contribuir al conocimiento del mecanismo de acción mediante el cual la variedad cubana de morera reduce la metanogénesis ruminal, se realizó una fermentación *in vitro* y se evaluaron cinco niveles de inclusión (0, 15, 20, 25 y 30 %) de *M. alba* vc cubana a una dieta base de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*). Se identificaron y cuantificaron bacterias totales, metanogénicas, celulolíticas (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*) y hongos mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Se determinó el porcentaje de bacterias celulolíticas y metanogénicas relativo a la población de bacterias totales, el delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) y la expresión de las diferentes poblaciones microbianas ruminales relativo al tratamiento control. La inclusión de *M. alba* vc cubana no afectó las poblaciones microbianas ruminales estudiadas. El porcentaje de representación de *F. succinogenes*, *R. albus* y metanógenos con respecto a las bacterias totales tampoco se afectó con la inclusión de esta variedad de morera en la dieta. Los valores de $\Delta\Delta Ct$ y la expresión relativa al tratamiento control de las poblaciones microbianas evidencian que las dietas que contenían morera tuvieron la misma diferencia y la misma expresión relativa al tratamiento control. Se concluye que la inclusión de *M. alba* vc cubana en la dieta no afecta las principales poblaciones microbianas que degradan la fibra en el rumen, lo que podría utilizarse como estrategia para reducir la producción de metano en el rumen. El mecanismo por el que esta planta logra reducir la metanogénesis ruminal no es por efecto directo sobre los metanógenos.

Palabras clave: Morera, microorganismos celulolíticos, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, metano, rumen

En la mayoría de los países tropicales, la producción de rumiantes está limitada por la baja calidad de los alimentos que se le suministran a los animales, que son deficientes en nitrógeno y tienen baja digestibilidad. Diversas son las investigaciones que se realizan para buscar alternativas que mejoren la calidad de los alimentos. La morera se utiliza en la nutrición de rumiantes y sus hojas se suministran como fuente principal de alimento para carneros y cabras (Bakshi y Wadhwa 2007). Esta planta también se ha usado para

et al. 2011).

Mulberry grows under various climatic conditions (Foiklang *et al.* 2011) and have a great capacity of biomass production. Its leaves have a great content of protein (from 15.0 % to 27.6 % of DM) and high *in vivo* digestibility of DM (from 75 % to 85 %) (Ba *et al.* 2005). Therefore, it has a high potential as protein-rich forage for animal production (Tan *et al.* 2012). This plant has also been evaluated as part of nutritional strategies, based on use of tree and shrub species to reduce methane production by ruminants.

Delgado *et al.* (2007) and González *et al.* (2010) studied the effect of inclusion of different levels of mulberry on control of ruminal methanogenesis. These authors found that 25 and 30 % of inclusion reduced the formation of this *in vitro* gas, which is very beneficial. It is also known the negative impact of methane emission to the environment, and losses from 2 to 12 % of energy from feed consumed by the animal, as a consequence of the formation of this gas within the rumen. In addition to this potential to reduce methane formation in the rumen, there are properties and potentialities of this plant for its use in ruminant feed.

Decrease of methane formation in the rumen can be obtained by many action mechanisms. Direct inhibition of methanogens is one of them (McAllister and Newbold 2008). However, it is not known the mechanism by which mulberry decreased ruminal methanogenesis, in studies conducted by Delgado *et al.* (2007) and González *et al.* (2010). In addition, it is also necessary to know the effect of this plant on some of the main ruminal populations that are involved in fibrous material degradation, because strategies for controlling ruminal methanogenesis are effective, only if they are able to reduce the formation of this gas without affecting microbial populations that degrade fiber (Soliva *et al.* 2003).

The objective of this study was to analyze the effect of different inclusion levels of mulberry (*M. alba* cv cubana) on methanogenic microorganisms and some of the main cellulolytic populations (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* and fungi) from the rumen of water buffalos (*Bubalus bubalis*), and contribute to the knowledge of the action mechanism by which mulberry tree reduces ruminal methanogenesis.

Materials and Methods

The research was conducted in cooperation between the Institute of Animal Science (ICA, initials in Spanish), from Cuba, and the University of São Paulo (CENA/USP) from Brazil. *In vitro* fermentation took place at ICA, according to the technique described by Theodorou *et al.* (1994). Molecular techniques were implemented at CENA / USP.

sustituir concentrados en dietas para ganado lechero, cabras, carneros y búfalos (Anbarasu *et al.* 2004, Kandyliis *et al.* 2009, Foiklang *et al.* 2011).

La morera crece en condiciones climáticas variadas (Foiklang *et al.* 2011) y posee gran capacidad de producción de biomasa. Sus hojas tienen gran contenido de proteína (15.0 % a 27.6 % de la MS) y alta digestibilidad *in vivo* de MS (75 % a 85 %) (Ba *et al.* 2005), por lo que posee alto potencial como forraje rico en proteínas para la producción animal (Tan *et al.* 2012). Esta planta también se ha evaluado como parte de las estrategias nutricionales basadas en el aprovechamiento de especies de árboles y arbustos para reducir la producción de metano por los rumiantes.

Delgado *et al.* (2007) y González *et al.* (2010) estudiaron el efecto de la inclusión de diferentes niveles de morera en el control de la metanogénesis ruminal. Estos autores encontraron que 25 y 30 % de inclusión redujeron la formación de este gas *in vitro*, lo que resulta muy beneficioso. No es desconocido el impacto perjudicial de la emisión de metano al ambiente, y las pérdidas de 2-12 % de la energía del alimento consumido por el animal, como consecuencia de la formación de este gas en el rumen. Además, a esta potencialidad de disminuir la formación de metano en el rumen se suman las propiedades y potencialidades de esta planta para su uso en la alimentación de rumiantes.

La disminución en la formación de metano en el rumen se puede obtener mediante numerosos mecanismos de acción. La inhibición directa de los metanógenos es uno de ellos (McAllister y Newbold 2008). Sin embargo, no se conoce cuál podría ser el mecanismo por el cual la morera disminuyó la metanogénesis ruminal en los trabajos conducidos por Delgado *et al.* (2007) y González *et al.* (2010). Además, también es necesario conocer el efecto de esta planta en algunas de las principales poblaciones del rumen que participan en la degradación de materiales fibrosos, ya que las estrategias para el control de la metanogénesis ruminal son efectivas, siempre y cuando logren reducir la formación de este gas sin afectar las poblaciones microbianas que degradan la fibra (Soliva *et al.* 2003).

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto de diferentes niveles de inclusión de morera (*M. alba* cv cubana) en los microorganismos metanogénicos y algunas de las principales poblaciones celulolíticas (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y hongos) del rumen de búfalos de río (*Bubalus bubalis*), y contribuir así al conocimiento del mecanismo de acción por el que la morera reduce la metanogénesis ruminal.

Materiales y Métodos

La investigación se realizó en cooperación entre el Instituto de Ciencia Animal (ICA) de Cuba y la Universidad de São Paulo (CENA/USP) de Brasil. La fermentación *in vitro* se desarrolló en el ICA, según la técnica descrita por Theodorou *et al.* (1994). Las técnicas moleculares se ejecutaron en el CENA/USP.

Animals and diet. Two adult male water buffalos (Murrah breed), with a single cannula in rumen and average weight of 453 kg were used as donors of ruminal liquor. Animals were housed in individual cubicles, with shade and free access to water and feed. All received star grass (*Cynodon nlemfuensis*) forage.

Experimental diets. Five diets were evaluated: 1) 100% star grass (SG) (control), 2) SG + 15% *M. alba* cv. cubana, 3) SG + 20% *M. alba* cv. cubana, 4) SG + 25% *M. alba* cv. cubana and 5) SG + 30% *M. alba* cv. cubana.

Mulberry plants came from the Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Matanzas province, Cuba. These plants grew in a red ferrallitic soil and were fertilized with chicken manure. Their leaves with petioles and young stems were manually cut, simulating animal selection. The SG was cut by hand in grazing areas from the Institute of Animal Science, Cuba. The plant material was dried in an oven at 60 °C and ground in hammer mill up to reach a particle size of 1mm.

The experimental diets underwent the analysis of chemical composition according to AOAC (2016) and fibrous fractions were analyzed according to Goering and van Soest (1970). Table 1 shows the chemical composition of the experimental diets.

Animales y dieta. Se utilizaron como donantes del líquido ruminal dos búfalos de río (raza Murrah), machos adultos, con cánula simple en rumen, con peso promedio de 453 kg. Los animales 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*).

Diets experimentales. Se evaluaron cinco dietas: 1) 100% de pasto estrella (PE) (control), 2) PE + 15% *M. alba* cv cubana, 3) PE + 20% *M. alba* cv cubana, 4) PE + 25% *M. alba* cv cubana y 5) PE + 30% *M. alba* cv cubana.

Las plantas de morera procedieron de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", provincia de Matanzas, Cuba. Se encontraban en suelos ferralíticos rojos y se fertilizaron con gallinaza. Se cortaron manualmente hojas con los peciolos y tallos jóvenes, simulando la selección del animal. El PE se cortó a mano en áreas de pastoreo del Instituto de Ciencia Animal, Cuba. El material vegetal se secó en estufa a 60 °C y se molió en molino de martillo hasta alcanzar tamaño de partícula de 1mm.

A las dietas experimentales se les realizó el análisis de la composición química, según AOAC (2016) y las fracciones fibrosas se analizaron de acuerdo con Goering y van Soest (1970). La tabla 1 muestra la composición química de las dietas experimentales.

Procedimiento experimental. Se pesaron 0.5 g de

Table 1. Chemical composition of experimental diets (%)

Experimental diets	OM	CP	MM	NDF	ADF
SG (Control)	88.7	9.00	11.33	68.78	39.22
SG + 15% <i>M. alba</i> cv cubana	89.2	11.38	10.84	62.64	35.79
SG + 20% <i>M. alba</i> cv cubana	89.3	12.18	10.67	60.60	34.65
SG + 25% <i>M. alba</i> cv cubana	89.5	12.97	10.51	58.56	33.50
SG + 30% <i>M. alba</i> cv cubana	89.7	13.76	10.34	56.52	32.36

OM: organic matter; CP: crude protein; MM: mineral matter; NDF: neutral detergent fiber; ADF: acid detergent fiber

Experimental Procedure. An amount of 0.5 g from each of the treatments were weighed and added to the corresponding glass bottles of 100 ml.

Ruminal liquor of fastening animals was extracted through the cannula, with the help of a vacuum pump. The liquor was stored in a thermos to ensure adequate temperature conditions (39 °C) and anaerobiosis during transport to the laboratory.

Ruminal content of both animals was mixed and filtered through muslin. The resulting solid was added a small portion of buffer solution of Menke and Steingass (1988). This solution was agitated for a few seconds in a domestic blender to release microorganisms adhered to fiber. Later, filtrate of this portion was added to liquid fraction. Ruminal liquor was maintained in a CO₂ atmosphere.

Each bottle was added 50 mL of a mixture of rumen liquor and buffer solution of Menke and Steingass

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. El líquido 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 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

(1988), in a 1:3 (v/v) proportion, and they were sealed with a butyl and agrafe stopper. Bottles without substrate were included as targets for correcting the effect of ruminal liquor in volumes of produced gas. All bottles were placed in a temperature controlled bath of 39 °C.

At 0 and 12 h of incubation, samples of each treatment were taken for identification and quantification by RT-PCR of populations of *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* and total methanogens. Subsequently, they were placed in a freezer at -20 °C for further determination.

Values of Ct (threshold cycle), which is the cycle at which fluorescence is considered detectable in the exponential phase of PCR reaction, were obtained to determine the Δ Ct, $\Delta\Delta$ Ct, expression of these microbial populations related to control treatment and the percentage of cellulolytic and methanogenic bacteria in relation to total bacteria population.

Counting of protozoa, preserved in 10% of formaldehyde, was performed. They were counted with Neubauer chamber using an optical microscopy, after dyeing with a solution of gentian violet at 0.01% in glacial acetic acid.

DNA extraction. Cell disruption was achieved by freezing-thawing with liquid nitrogen. DNA was obtained using a matrix (glassmilk), joined to it and later released from it, when dissolved in double-distilled water (Makkar and McSweeney 2005). DNA concentration and sample purity (OD 260 nm/280 nm OD) were determined by absorbance at 260 nm and 280 nm in a Nanodrop 1000 spectrophotometer.

RT-PCR. Extracted DNA was amplified with pairs of primers for bacteria, fungi, *R. flavefaciens*, *F. succinogenes* and ruminal methanogens, according to the description of Denman and McSweeney (2006) and Denman *et al.* (2007).

DNA samples were taken to a final concentration of 10ng• μ L⁻¹ and amplification reaction was carried out with each of the specific primers (total bacteria, fungi, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and methanogens) was performed. Primers were used at a concentration of 10mM and the SYBR Green 490 was also used. Final reaction volume was 25 μ L.

DNA amplification was performed in an Applied Biosystem thermocycler, according to the following program: 1 cycle of 50 °C 2 min. and 95 °C 2 min., 40 cycles of 95 °C 15 sec. and 60 °C 1 min; 1 cycle of 95 °C 2 min., 60 °C 15 sec and 95 °C 15 sec.

The amounts of studied microbial populations were expressed as proportion of total bacteria (Δ Ct). These Δ Ct values were calculated by the difference between the Ct value of target gene and the reference gene (16S rRNA of bacteria). The $\Delta\Delta$ Ct was determined by the difference between the Δ Ct of target groups from experimental diets and Δ Ct of target groups from control diet. Percentage of *F. succinogenes* and *R. flavefaciens*,

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 en un baño a temperatura controlada de 39 °C.

A las 0 y 12 h de incubación, se tomaron muestras de cada tratamiento para la identificación y cuantificación por RT-PCR de las poblaciones de hongos *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y metanógenos totales. Posteriormente, se colocaron en freezer a -20 °C para su determinación posterior.

Se obtuvieron los valores de Ct (cycle threshold) (ciclo en el cual la fluorescencia se considera detectable en la fase exponencial de la reacción de PCR) para determinar el Δ Ct, $\Delta\Delta$ Ct, la expresión de estas poblaciones microbianas relativo al tratamiento control y el porcentaje de bacterias celulolíticas y metanogénicas relativo a la población de bacterias totales.

Se realizó el conteo de protozoos preservados en formol a 10 %. Se contaron al microscopio óptico en cámara de Neubauer, luego de teñirlos con solución de violeta genciana al 0.01% en ácido acético glacial.

Extracción de ADN. La ruptura de células se logró con la congelación-descongelación con nitrógeno líquido. El ADN se obtuvo mediante la utilización de una matriz (glassmilk), a la que se unió y de la que se liberó posteriormente, cuando se disolvió en agua bidestilada (Makkar y McSweeney 2005). La concentración de ADN y la pureza de la muestra (D.O 260 nm/D.O 280 nm) se determinaron por absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 1000.

RT-PCR. El ADN extraído se amplificó con pares de primers para bacterias, hongos, *R. flavefaciens*, *F. succinogenes* y metanógenos del rumen, según lo descrito por Denman y McSweeney (2006) y Denman *et al.* (2007).

Las muestras de ADN se llevaron a una concentración final de 10ng• μ L⁻¹ y se efectuó la reacción de amplificación con cada uno de los primers específicos (bacterias totales, hongos, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* y metanogénicas). Los iniciadores se utilizaron a una concentración de 10mM y se utilizó el Sybr Green 490. El volumen final de la reacción fue de 25 μ L.

La amplificación del ADN se efectuó en un termociclador Applied Biosystem según el siguiente programa: 1 ciclo de 50 °C 2 min. y 95 °C 2min., 40 ciclos de 95 °C 15 seg. y 60 °C 1 min; 1 ciclo de 95 °C 2 min., 60 °C 15 seg y 95 °C 15 seg.

Las cantidades de las poblaciones microbianas estudiadas se expresaron como proporción de bacteria total (Δ Ct). Estos valores de Δ Ct se calcularon mediante la diferencia entre el valor del Ct del gen diana y el gen de referencia (16S rRNA de bacteria). El $\Delta\Delta$ Ct se determinó mediante la diferencia entre el Δ Ct de los grupos diana de las dietas experimentales y Δ Ct de los grupos diana de la dieta control. El porcentaje de *F. succinogenes* y *R. flavefaciens*, relativo a la población de

in relation to total bacterial population, was calculated from ΔCt values as $100 \times (2\Delta Ct)^{-1}$ and the expression of target groups related to control treatment as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Denman and McSweeney 2006).

Experimental design and statistical analysis. A completely randomized design with 5x2 factorial arrangement (5 experimental diets and 2 h of sampling) was used. Four replications were carried out.

INFOSTAT statistical program was used for processing results, which was proposed by Di Rienzo *et al.* (2012). Multiple comparisons test of Duncan (1955) was applied on necessary cases.

Results and Discussion

There were no significant interactions among experimental diets and hours of sampling for the studied variables, nor differences among individual factors (experimental diet and hours) for any of the selected indicators. Therefore, only the results of the effect of treatments on each variable are presented.

Currently, the characterization of complex microbial communities by molecular techniques is widely used and counting of microorganisms have been replaced by traditional culture methods (Saro *et al.* 2014). The study of ruminal microorganisms under the effect of different feeding strategies does not escape from this tendency. In this sense, real-time PCR has become a powerful tool that allows a fast quantification of these microorganisms. The design of specific primers has allowed their identification and quantification by this technique. In this experiment, identification and quantification of populations of microorganisms involved in fiber degradation in the rumen (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and fungi) and total methanogens by RT-PCR (Table 2) indicated that the inclusion of *M. alba* cv cubana did not affect any of these ruminal populations. These results allowed to complement and corroborate those obtained by González *et al.* (2011), after evaluating the effect of four varieties of mulberry on the population of methanogens and cellulolytic microorganisms, quantified by culture techniques.

Secondary plant metabolites (saponins, flavonoids and tannins) have demonstrated the ability to manipulate ruminal fermentation in a favorable manner, which reduces the formation of methane in the rumen (Hu *et al.* 2005, Patra *et al.* 2006). Saponins reduce protozoa counts

bacterias totales, se calculó a partir de los valores de ΔCt como $100 \times (2\Delta Ct)^{-1}$ y la expresión de los grupos diana relativo al tratamiento control como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Denman y McSweeney 2006).

Diseño experimental y análisis estadístico. Se empleó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 5 x 2 (5 dietas experimentales y 2 h de muestreo). Se efectuaron cuatro repeticiones.

Para el procesamiento de los resultados se empleó el programa estadístico INFOSTAT, propuesto por Di Rienzo *et al.* (2012). Se aplicó la dícima de comparación múltiple de Duncan (1955) en los casos necesarios.

Resultados y Discusión

No hubo interacciones significativas entre las dietas experimentales y las horas de muestreo para las variables estudiadas. Tampoco se encontraron diferencias en los factores independientes (dieta experimental y horas) para ninguno de los indicadores determinados. Por ello, solo se presentan los resultados del efecto de los tratamientos en cada una de las variables.

En la actualidad, la caracterización de comunidades microbianas complejas por técnicas moleculares es muy utilizada y se han reemplazado los conteos de microorganismos por los métodos tradicionales de cultivo (Saro *et al.* 2014). El estudio de los microorganismos del rumen bajo el efecto de diferentes estrategias de alimentación no escapa de esta tendencia. En este sentido, la PCR en tiempo real se ha convertido en una poderosa herramienta que permite la rápida cuantificación de estos microorganismos. El diseño de primers específicos ha permitido realizar la identificación y cuantificación de los mismos por esta técnica. En este experimento, la identificación y cuantificación de poblaciones de microorganismos que intervienen en la degradación de la fibra en el rumen (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* y hongos) y de metanógenos totales por RT-PCR (tabla2) indicó que la inclusión de *M. alba* cv cubana no afectó ninguna de estas poblaciones ruminales. Estos resultados permitieron complementar y corroborar lo obtenido por González *et al.* (2011), al evaluar el efecto de cuatro variedades de morera en la población de metanógenos y microorganismos celulolíticos cuantificados por técnicas de cultivo.

Los metabolitos secundarios de las plantas (saponinas, flavonoides y taninos) han demostrado habilidad para manipular la fermentación ruminal de un modo

Table 2. Effect of inclusion levels of *M. alba* cv. cubana on microbial populations of rumen

	Control	15%	20%	25%	30%	SE	P
<i>R. flavefaciens</i> ¹	11.87	11.88	11.53	12.15	11.57	0.02	0.69
Fungi ¹	13.66	13.94	13.73	14.26	13.63	0.30	0.55
Methanogens ¹	13.80	13.11	13.53	14.30	14.11	0.48	0.37
<i>F. succinogenes</i> ¹	6.40	6.29	6.46	6.21	6.48	0.40	0.96
Protozoa, 104 cel/mL	3.98	4.3	3.48	4.05	3.13	0.10	0.21

¹Values calculated as ΔCt

because the latter are more sensitive to changes caused by these compounds in their cell membranes (Moss *et al.* 2000). According to Goel *et al.* (2008), these compounds increase the proliferation of fiber-degrading bacteria and inhibit fungal population. Maldonado *et al.* (2000) and García (2003) determined saponin concentration in *M. alba* and found no presence of this compound in the plant. The absence of saponins in mulberry could then explain that no variations were found in populations of cellulolytic microorganisms (*R. flavefaciens*, *F. succinogenes* and fungi) and protozoa with the inclusion of this plant on the diet.

Condensed tannins present in some plants have demonstrated to be toxic to methanogens (Hess *et al.* 2003, Tavendale *et al.* 2005). In previous studies, González *et al.* (2010) determined the composition of condensed tannins of this mulberry variety and found no appreciable amounts of this compound. The fact that mulberry shows no saponins and tannins in its composition could explain that their inclusion on the diet had no negative effect on the population of methanogens.

Defaunation or reduction of protozoa is one of the methods used for reducing methanogens. It is stated that methanogens establish an ecto- and endosymbiotic relationship with rumen protozoa (Finlay *et al.* 1994, Ohene-Adjei *et al.* 2007). Many of methanogens are observed on the outer surface of ciliated protozoa from rumen. Therefore, when the number of protozoa decreases, generally methanogens are also reduced and, consequently, ruminal methane production diminishes (Kobayashi 2010). In this study, the inclusion of mulberry cv. cubana on the diet did not affect protozoa counts, so the amounts of methanogens were not affected either.

Table 3 shows that representation percentage of *F. succinogenes* and *R. flavefaciens* regarding total bacteria population was not affected by the inclusion of *M. alba* cv. cubana on diet. It is important to point out that in all treatments, *F. succinogenes* had a higher percentage of representation than *R. flavefaciens*. This result coincides with that obtained by McSweeney *et al.* (2007) and Hung *et al.* (2013), who listed some bacterial populations in the rumen of animals fed different diets and found that *F. succinogenes* was the predominant cellulolytic bacteria. The highest representation of *F. succinogenes*, found in this study, was favorable, taking into account that it is one of the cellulolytic bacteria with higher potentialities for fiber degradation (Kobayashi 2010). Therefore, animals could make better use of the fiber component of feeds.

Values of $\Delta\Delta Ct$ (figure 1) and the expression related to control treatment of ruminal microbial populations, identified and quantified (Table 4), demonstrated that all treatments including *M. alba* cv. cubana showed similar differences and expression related to control treatment

favorable, que disminuye la formación de metano en el rumen (Hu *et al.* 2005, Patra *et al.* 2006). En el caso de las saponinas, reducen los conteos de protozoos al ser estos últimos más sensibles a los cambios que provocan estos compuestos en sus membranas celulares (Moss *et al.* 2000). De acuerdo a Goel *et al.* (2008), estos compuestos incrementan la proliferación de bacterias que degradan la fibra e inhiben la población de hongos. Maldonado *et al.* (2000) y García (2003) determinaron la concentración de saponinas en *M. alba* y no encontraron presencia de este compuesto en la planta. La ausencia de saponinas en morera podría explicar entonces que no se encontraran variaciones en las poblaciones de microorganismos celulolíticos (*R. flavefaciens*, *F. succinogenes* y hongos) y protozoos con la inclusión de esta planta en la dieta.

Los taninos condensados presentes en algunas plantas han demostrado ser tóxicos a los metanógenos (Hess *et al.* 2003, Tavendale *et al.* 2005). En estudios previos, González *et al.* (2010) determinaron la composición de taninos condensados de esta variedad de morera y no encontraron cantidades apreciables de este compuesto. El hecho de que la morera no presente saponinas y taninos en su composición podría explicar que su inclusión en la dieta no afectara la población de metanógenos.

La defaunación o reducción de los protozoos es una de las vías que se utilizan para disminuir los metanógenos. Se plantea que los metanógenos establecen una relación ecto y endo simbiótica con los protozoos del rumen (Finlay *et al.* 1994, Ohene-Adjei *et al.* 2007). Muchos de los metanógenos se observan en la superficie exterior de los protozoos ciliados del rumen. Por ello, cuando el número de protozoos disminuye se reducen generalmente los metanógenos y, consecuentemente, se reduce la producción de metano ruminal (Kobayashi 2010). En este trabajo, la inclusión en la dieta de la variedad cubana de morera no afectó los conteos de protozoos, por lo que tampoco se afectaron las cantidades de metanógenos.

En la tabla 3 se muestra que el porcentaje de representación de *F. succinogenes* y *R. flavefaciens* respecto a la población de bacterias totales no se afectó con la inclusión de *M. alba* cv cubana en la dieta. Es importante señalar que para todos los tratamientos, *F. succinogenes* tuvo un porcentaje de representación mayor que *R. flavefaciens*. Este resultado coincide con lo obtenido por McSweeney *et al.* (2007) y Hung *et al.* (2013), quienes enumeraron algunas poblaciones bacterianas del rumen de animales alimentados con diferentes dietas y encontraron que *F. succinogenes* fue la bacteria celulolítica predominante. La mayor representación de *F. succinogenes* que se encontró en este trabajo es favorable, si se tiene en cuenta que es una de las bacterias celulolíticas con mayores potencialidades en la degradación de la fibra (Kobayashi 2010). Por tanto, el animal podría hacer mejor aprovechamiento del componente fibroso de los alimentos.

Los valores de $\Delta\Delta Ct$ (figura 1) y la expresión relativa al tratamiento control de las poblaciones microbianas del

Table 3. Representation percentage of two populations of cellulolytic bacteria, in relation to total bacteria in the rumen

	Control	15%	20%	25%	30%	SE	P
<i>R. flavefaciens</i>	4.23	4.24	4.36	4.13	4.37	0.13	0.64
<i>F. succinogenes</i>	7.85	7.99	7.88	8.17	7.83	0.34	0.95

for all microbial populations. These variables showed that inclusion levels of 15, 20, 25 and 30% of this Cuban variety in the ration did not affect populations of *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* fungi and methanogens rumen.

Ruminal methanogens are a specialized group of microorganisms having the function of producing methane during the use of energy from food into the organ (Attwood *et al.* 2008, Liu *et al.* 2013, Chuntrakort *et al.* 2014, Khiaosa-ard & Zebeli 2014). In this study, the inclusion of this Cuban variety of mulberry did not reduce this microbial population numbers, so reductions of ruminal methane production should not be expected either. However, Gonzalez *et al.* (2012), when evaluating the same inclusion levels of this variety on the control of ruminal methanogenesis, found that all levels reduced methane production. Gonzalez *et al.* (2014), when evaluated the effect of these levels of mulberry on methanogen population by the molecular technique of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), found no negative effects on these microorganisms. Therefore, it can be stated that reduction of methane production with the inclusion of 15, 20, 25 and 30% of *M. alba* cv. cubana is no because of direct effect of this plant on methanogens.

It is a favorable factor that studied cellulolytic populations within the rumen have not been affected by the inclusion of *M. alba* cv. cubana in the diet. Therefore, assuming the use of this variety as a strategy for controlling rumen methanogenesis, it would be carried out with the guarantee that it will not affect the

rumen, identificadas y cuantificadas (tabla 4), reflejaron que todos los tratamientos que incluyeron *M. alba* cv cubana mostraron similar diferencia y expresión relativa al tratamiento control para todas las poblaciones microbianas. Estas variables demostraron que los niveles de inclusión en la ración del 15, 20, 25 y 30 % de la variedad cubana no afectó las poblaciones de hongos *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* y metanogénicos del rumen.

Los metanógenos del rumen son un grupo especializado de microorganismos que tienen la función de formar el metano durante la utilización de la energía de los alimentos en este órgano (Attwood *et al.* 2008, Liu *et al.* 2013, Chuntrakort *et al.* 2014, Khiaosa-ard & Zebeli 2014). En este estudio, se pudo observar que la inclusión de la variedad cubana de morera no redujo los números de esta población microbiana, por lo que se debe esperar que tampoco se obtengan reducciones en la producción de metano ruminal. Sin embargo, González *et al.* (2012) al evaluar los mismos niveles de inclusión de esta variedad en el control de la metanogénesis ruminal, encontraron que todos los niveles redujeron la producción de metano. González *et al.* (2014), cuando evaluaron el efecto de estos niveles de morera en la población de metanógenos por la técnica molecular de electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) tampoco hallaron afectación en estos microorganismos. Por ello, se puede plantear que la reducción en la producción de metano con la inclusión de 15, 20, 25 y 30 % de *M. alba* cv cubana no es por efecto directo de esta planta sobre los metanógenos.

Es favorable que las poblaciones celulolíticas del rumen estudiadas no hayan sido afectadas con la inclusión de la *M. alba* cv cubana en la dieta. Por tanto,

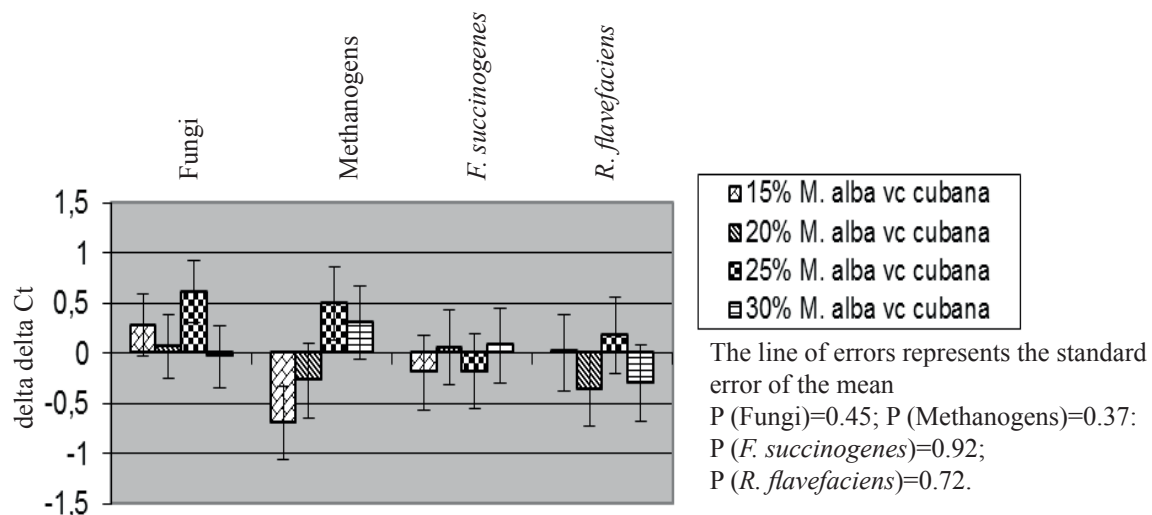


Figure. 1. Difference between control treatment and treatments that include *M. alba* cv. cubana, for studied ruminal microbial populations ($\Delta\Delta C_t$).

Table 4. Relative expression of studied ruminal microbial populations regarding control treatment

	Control	15%	20%	25%	30%	SE	P
Fungi	1.00	0.82	0.95	0.66	1.02	0.31	0.45
Methanogens	1.00	1.61	1.21	0.71	0.81	0.52	0.37
<i>F. succinogenes</i>	1.00	1.14	0.96	1.13	0.95	0.37	0.92
<i>R. flavefaciens</i>	1.00	0.99	1.27	1.13	0.88	0.38	0.72

main microbial populations degrading fiber nor their degradation process in the rumen.

Inclusion of *M. alba* cv. cubana on the diet does not affect methanogens or the main microbial populations that degrade the fiber in the rumen, which could be used as a strategy for reducing methane production in the rumen. The mechanism by which this plant reduces ruminal methanogenesis is not the direct effect on methanogens.

Acknowledgements

Thanks to FAO/OIEA (Food and Agriculture Organization/International Atomic Energy Agency) program and to the Coordination and Improvement of Staff at Superior Level (CAPES, Brazil) for the financial support.

de asumir la utilización de esta variedad como estrategia para el control de la metanogénesis ruminal, se haría con la seguridad de que no afectarían las principales poblaciones microbianas que degradan la fibra ni su proceso de degradación en el rumen.

La inclusión de *M. alba* cv cubana en la dieta no afecta los metanógenos ni las principales poblaciones microbianas que degradan la fibra en el rumen, lo que podría emplearse como estrategia para reducir la producción de metano en el rumen. El mecanismo por el que esta planta logra reducir la metanogénesis ruminal no es por efecto directo sobre los metanógenos.

Agradecimientos

Se agradece al programa FAO/OIEA (Food and Agriculture Organization/International Atomic Energy Agency) y a la Coordinación y Perfeccionamiento de personal de nivel superior (CAPES, Brasil) por el apoyo financiero.

References

- Anbarasu, C., Dutta, N., Sharma, K. & Rawat, M. 2004. "Response of goats to partial replacement of dietary protein by a leaf meal mixture containing *Leucaena leucocephala*, *Morus alba* and *Tectona grandis*". Small Ruminant Research, 51(1): 47–56, ISSN: 0921-4488, DOI: 10.1016/S0921-4488(03)00203-7.
- AOAC. 2016. Official methods of analysis of AOAC International. 20th ed., Rockville, MD: AOAC International, ISBN: 978-0-935584-87-5, OCLC: 950056914, Available: <<http://www.directtextbook.com/isbn/9780935584875>>, [Consulted: September 22, 2016].
- 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 Journal of Experimental Agriculture, 48(2): 83–88, ISSN: 0816-1089, DOI: 10.1071/EA07269.
- Ba, N. X., Giang, V. D. & Ngoan, L. D. 2005. "Ensilage of mulberry foliage (*Morus alba*) and the nutritive value of mulberry foliage silage for goats in central Vietnam". Livestock Research for Rural Development, 17(2), ISSN: 0121-3784.
- Bakshi, M. P. S. & Wadhwa, M. 2007. "Tree leaves as complete feed for goat bucks". Small Ruminant Research, 69(1–3): 74–78, ISSN: 0921-4488, DOI: 10.1016/j.smallrumres.2005.12.009.
- Chuntrakort, P., Otsuka, M., Hayashi, K., Takenaka, A., Udchachon, S. & Sommart, K. 2014. "The effect of dietary coconut kernels, whole cottonseeds and sunflower seeds on the intake, digestibility and enteric methane emissions of Zebu beef cattle fed rice straw based diets". Livestock Science, 161: 80–89, ISSN: 1871-1413, DOI: 10.1016/j.livsci.2014.01.003.
- Delgado, D. C., González, R., Galindo, J., Cairo, J. & Almeida, M. 2007. "Potencialidad de *Trichantera gigantea* y *Morus alba* para reducir la producción ruminal de metano *in vitro*". Cuban Journal of Agricultural Science, 41(4): 339–342, ISSN: 2079-3480.
- Denman, S. E. & McSweeney, C. S. 2006. "Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen: Real-time PCR assay of the rumen anaerobic fungal population". FEMS Microbiology Ecology, 58(3): 572–582, ISSN: 0168-6496, 1574-6941, DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00190.x.
- Denman, S. E., Tomkins, N. W. & McSweeney, C. S. 2007. "Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane: Monitoring of rumen methanogenic Archaea". FEMS Microbiology Ecology, 62(3): 313–322, ISSN: 0168-6496, 1574-6941, DOI: 10.1111/j.1574-6941.2007.00394.x.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2012. InfoStat. version 2012, [Windows], Universidad Nacional de Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, Available: <<http://www.infostat.com.ar/>>.
- Duncan, D. B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". Biometrics, 11(1): 1–42, ISSN: 0006-341X, DOI: 10.2307/3001478.

- Finlay, B. J., Esteban, G., Clarke, K. J., Williams, A. G., Embley, T. M. & Hirt, R. P. 1994. "Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens". *FEMS Microbiology Letters*, 117(2): 157–161, ISSN: 0378-1097, 1574-6968, DOI: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb06758.x.
- Foiklang, S., Wanapat, M. & Toburan, W. 2011. "Effects of various plant protein sources in high-quality feed block on feed intake, rumen fermentation, and microbial population in swamp buffalo". *Tropical Animal Health and Production*, 43(8): 1517–1524, ISSN: 0049-4747, 1573-7438, DOI: 10.1007/s11250-011-9836-y.
- García, D. 2003. Efecto de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba* (Linn.). Master Thesis, Universidad de Matanzas 'Camilo Cienfuegos' - EEPF 'Indio Hatuey', Matanzas, Cuba.
- Goel, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. 2008. "Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials". *Journal of Applied Microbiology*, 105(3): 770–777, ISSN: 1364-5072, 1365-2672, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.03818.x.
- Goering, H. K. & Van Soest, P. J. 1970. Forage fiber analysis: apparatus, reagents, procedures, and some applications. (ser. Agriculture Handbook, no. ser. 379), Washington, D.C.: Agricultural Research Service, U.S. Dept. of Agriculture, 20 p., OCLC: 13295375.
- González, N., Galindo, J., Aldana, A. I., Moreira, O. & Sarduy, L. R. 2011. "Effect of four mulberry (*Morus alba* Linn.) varieties on microbial population and fermentative products with rumen liquid from river buffaloes (*Bubalus bubalis*) under *in vitro* conditions". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 45(4): 399–404, ISSN: 2079-3480.
- González, N., Galindo, J., Aldana, A. I., Moreira, O. & Sarduy, L. R. 2012. "Effect of different inclusion levels of *Morus alba* Linn cv. cubana on the methane fermentation and production under *in vitro* conditions with rumen liquor from river buffaloes (*Bubalus bubalis*)". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 46(2): 151–157, ISSN: 2079-3480.
- 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 Journal of Agricultural Science*, 44(1): 37–41, ISSN: 2079-3480.
- González, N., Galindo, J., Navarrete, A. A., Abdalla, A. L. & Tsai, S. M. 2014. "Determination of the effect of *Morus alba* cv. cubana on the population of methanogens within the rumen liquor of water buffaloes, using the Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 48(3): 253–257, ISSN: 2079-3480.
- Hess, H. D., Kreuzer, M., Díaz, T. E., Lascano, C. E., Carulla, J. E., Soliva, C. R. & Machmüller, A. 2003. "Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid". *Animal Feed Science and Technology*, 109(1–4): 79–94, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/S0377-8401(03)00212-8.
- Hu, W. L., Liu, J. X., Ye, J. A., Wu, Y. M. & Guo, Y. Q. 2005. "Effect of tea saponin on rumen fermentation *in vitro*". *Animal Feed Science and Technology*, 120(3–4): 333–339, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2005.02.029.
- 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 Science*, 151(2–3): 188–197, ISSN: 1871-1413, DOI: 10.1016/j.livsci.2012.11.011.
- Kandyli, K., Hadjigeorgiou, I. & Harizanis, P. 2009. "The nutritive value of mulberry leaves (*Morus alba*) as a feed supplement for sheep". *Tropical Animal Health and Production*, 41(1): 17–24, ISSN: 0049-4747, 1573-7438, DOI: 10.1007/s11250-008-9149-y.
- Khiaosa-ard, R. & Zebeli, Q. 2014. "Cattle's variation in rumen ecology and metabolism and its contributions to feed efficiency". *Livestock Science*, 162: 66–75, ISSN: 1871-1413, DOI: 10.1016/j.livsci.2014.01.005.
- Kobayashi, Y. 2010. "Abatement of Methane Production from Ruminants: Trends in the Manipulation of Rumen Fermentation". *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(3): 410–416, ISSN: 1011-2367, 1976-5517, DOI: 10.5713/ajas.2010.r.01.
- 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 Research*, 115(1–3): 15–20, ISSN: 0921-4488, DOI: 10.1016/j.smallrumres.2013.07.011.
- Makkar, H. P. S. & McSweeney, C. S. (eds.). 2005. *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, ISBN: 978-1-4020-3790-0, Available: <<http://link.springer.com/10.1007/1-4020-3791-0>>, [Consulted: September 22, 2016].
- Maldonado, M., Grande, D., Aranda, E. & Pérez-Gil, F. 2000. "Evaluación de árboles forrajeros tropicales para la alimentación de rumiantes en Tabasco, México". In: IV Taller Internacional Silvopastoril 'Los árboles y arbustos en la ganadería tropical', Matanzas, Cuba: EEPF 'Indio Hatuey', pp. 135–142, ISBN: 978-959-16-0285-5.
- McAllister, T. A. & Newbold, C. J. 2008. "Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis". *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(2): 7, ISSN: 0816-1089, DOI: 10.1071/EA07218.
- McSweeney, C. S., Denman, S. E., Wright, A. D. G. & Yu, Z. 2007. "Application of Recent DNA/RNA-based Techniques in Rumen Ecology". *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 20(2): 283–294, ISSN: 1011-2367, 1976-5517, DOI: 10.5713/ajas.2007.283.
- Menke, K. H. & Steingass, H. 1988. "Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid". *Animal Research and Development*, 28(1): 7–55, ISSN: 0340-3165.
- Moss, A. R., Jouany, J. P. & Newbold, J. 2000. "Methane production by ruminants: its contribution to global warming". *Annales de Zootechnie*, 49(3): 231–253, ISSN: 0003-424X, 1297-9651, DOI: 10.1051/animres:2000119.
- Ohene-Adjei, S., Teather, R. M., Ivan, M. & Forster, R. J. 2007. "Postinoculation Protozoan Establishment and Association Patterns of Methanogenic Archaea in the Ovine Rumen". *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14): 4609–4618, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.02687-06.
- Patra, A. K., Kamra, D. N. & Agarwal, N. 2006. "Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and

- fermentation of feed in rumen liquor of buffalo”. *Animal Feed Science and Technology*, 128(3–4): 276–291, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2005.11.001.
- 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 Science*, 160: 52–59, ISSN: 1871-1413, DOI: 10.1016/j.livsci.2013.12.005.
- Soliva, C. R., Hess, H. D., Meile, L., Kreuzer, M. & Machmüller, A. 2003. “Suppression of ruminal methanogenesis by dietary means: apparent inconsistency between methane formation and counts of microbes involved in methanogenesis”. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 3: 209–213, ISSN: 1870-0462.
- Tan, N. D., Wanapat, M., Uriyapongson, S., Cherdthong, A. & Pilajun, R. 2012. “Enhancing Mulberry Leaf Meal with Urea by Pelleting to Improve Rumen Fermentation in Cattle”. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(4): 452–461, ISSN: 1011-2367, 1976-5517, DOI: 10.5713/ajas.2011.11270.
- Tavendale, M. H., Meagher, L. P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G. T. & Sivakumaran, S. 2005. “Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis”. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124: 403–419, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2005.04.037.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B. & France, J. 1994. “A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds”. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3–4): 185–197, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/0377-8401(94)90171-6.

Received: March 29, 2016