

Effect of three collections of *Tithonia diversifolia* on the ruminal microbial population of cattle

Efecto de tres colectas de *Tithonia diversifolia* en la población microbiana ruminal de vacunos

Juana Galindo, Niurca González, Tomás Ruiz, Magaly Herrera, Onidia Moreira, Aned Capó and Humberto Díaz

Instituto de Ciencia Animal, CC. km 47½, San José de las Lajas,
Apartado Postal 24, Mayabeque.
Email: jgalindo@ica.co.cu

Juana Galindo: <http://orcid.org/0000-0001-8639-4693>

Tomás Ruiz: <http://orcid.org/0000-0002-1690-1140>

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

Niurca González Ibarra: <http://orcid.org/0000-0003-3415-6241>

In order to determine the effect of three collections of *Tithonia diversifolia* (mv-12, mv-14 and mv-17), collected in the eastern region of Cuba, on the ruminal microbial population of cattle, an experiment under *in vitro* conditions was developed. The control treatments with *Cynodon nlemfuensis* (star grass) were compared: star grass + mv-12; star grass + mv-14 and star grass + mv-17. The three collections were included at a rate of 20 % of the dry matter. The crude protein content was 19-23 % of the dry matter. With the materials mv-14 and mv-17 higher populations of cellulolytic bacteria were obtained, at three and six hours after starting fermentation with respect to that obtained with star grass. The three collections doubled the population of proteolytic bacteria three hours after starting fermentation, while at six hours only mv-12 produced effects in this bacterial group. The methane values were 37.4, 32.6, 33.2 and 32.33 g/kg of digested organic matter for the control, and the treatments mv-12, mv-14 and mv-17, respectively. Although they did not differ between plant materials, mv-12, mv-14 and mv-17 produced less methane than the star grass treatment only ($P = 0.0477$). It is concluded that the treatments mv-12, mv-14 and mv-17 caused modifications in the ruminal ecosystem, by increasing the population of total cellulolytic organisms and proteolytic bacteria; in addition to reducing the protozoan population. The methane estimated from crude protein concentration also decreased.

Key words: *cellulolytic bacteria*, *proteolytic*, *methane*, *SCFAs*, *protozoa*

Ruminants have a consortium of microorganisms in their rumen-reticulum able to fermenting feed, mainly fibrous ones. Currently, efforts are made to diversify the forage supply and silvopastoral systems are promoted with *T. diversifolia* (Gallego *et al.* 2017, Galindo *et al.* 2018 and Rivera *et al.* 2021). The latter constitutes an alternative for feeding dairy cattle.

T. diversifolia (Hemsl.) Gray is commonly called sunflower, tree marigold, tithonia, among others. It is an herbaceous plant, from the Compositae (Asteraceae) family, native to Central America and naturalized in Cuba. It has characteristics that give it a high potential for animal production, among which is its tolerance to poor soils, resistance to water stress and cut, with an

Para determinar el efecto de tres colectas de *Tithonia diversifolia* (mv-12, mv-14 y mv-17), recogidas en la región oriental de Cuba, en la población microbiana ruminal de vacunos, se desarrolló un experimento en condiciones *in vitro*. Se compararon los tratamientos control con *Cynodon nlemfuensis* (pasto estrella): pasto estrella + mv-12; pasto estrella + mv-14 y pasto estrella + mv-17. Las tres colectas se incluyeron a razón del 20 % de la materia seca. El contenido en proteína bruta fue de 19-23 % de la materia seca. Con los materiales mv-14 y mv-17 se obtuvieron mayores poblaciones de bacterias celulolíticas, a las tres y seis horas después de iniciada la fermentación con respecto a lo obtenido con pasto estrella. Las tres colectas duplicaron la población de bacterias proteolíticas a las tres horas de comenzar la fermentación, mientras que a las seis horas solamente el mv-12 produjo efectos en este grupo bacteriano. Los valores de metano fueron 37.4, 32.6, 33.2 y 32.33 g/kg de materia orgánica digerida para el control, y los tratamientos mv-12, mv-14 y mv-17, respectivamente. Aunque no difirieron entre materiales vegetales, mv-12, mv-14 y mv-17 produjeron menos metano que el tratamiento con pasto estrella solamente ($P = 0.0477$). Se concluye que los tratamientos mv-12, mv-14 y mv-17 propiciaron modificaciones en el ecosistema ruminal, al incrementar la población de organismos celulolíticos totales y bacterias proteolíticas; además de reducir la población de protozoos. El metano estimado a partir de la concentración en proteína bruta también disminuyó.

Palabras clave: *bacterias celulolíticas*, *proteolíticas*, *metano*, *AGCC*, *protozoos*

Los rumiantes presentan un consorcio de microorganismos en su rumen-retículo capaz de fermentar los alimentos, principalmente los fibrosos. En la actualidad, se realizan esfuerzos encaminados a diversificar la oferta forrajera y se promueven sistemas silvopastoriles con *T. diversifolia* (Gallego *et al.* 2017, Galindo *et al.* 2018 y Rivera *et al.* 2021). Esta última constituye una alternativa para la alimentación de ganado en producción lechera.

T. diversifolia (Hemsl.) Gray es comúnmente denominada girasolillo, botón de oro, tithonia, entre otros. Se trata de una planta herbácea, de la familia Compositae (Asteraceae), originaria de Centro América y naturalizada en Cuba. Tiene características que le otorgan alto potencial para la producción animal, entre

approximate production of 55 t DM/ha/year (Gallego *et al.* 2014). It improves the environment and adapts to various climatic conditions (González-Castillo *et al.* 2014).

Among its nutritional characteristics, the protein content, soluble carbohydrates and the level of tannins highlighted, which help to improve the nutritional balance, in terms of the energy and protein contribution in the diet of dairy cattle (Gallego-Castro *et al.* 2017, Mahecha *et al.* 2017 and Arguello *et al.* 2020).

The protein content of the plant varies from 14.0 to 36.6 %. Animals intake the whole plant, preferably leaves and flowers (Maina *et al.* 2012), which contributes to the ruminal balance and increases the efficiency for the transformation of ammonia into microbial protein, which would imply lower energy costs due to losses of ammonia, methane and ruminal CO₂, an aspect that reduces possible environmental contamination.

Mahecha *et al.* (2007) evaluated the effect of the inclusion of tithonia forage as a partial replacement of the concentrated feed in Holstein crossed cows by Cebu, without finding differences in the production and quality of milk, for which they recommend its use as a strategic option for cattle production. Gallego (2016) showed that a silvopastoral system of tithonia, associated with Pennisetum clandestinum (kikuyo), increased milk production and, importantly, its quality, by improving the passage of long-chain fatty acids, which serve as precursors for some of the fatty acids and reduce cell counts in milk, which improves udder health. García-López (2016) obtained increases in production, when used a silvopastoral system with tithonia for milk production.

González *et al.* (2014) defined tithonia as a plant with high protein value, which have a level of soluble carbohydrates higher than other forages. Its tannin content is not high, and it does not significantly affect ruminal activity. This can have an important effect on the productive performance of the animals, it is to be expected that ruminal health will improve and a great economic and environmental effect will be achieved.

Studies related to the action of tithonia in the ruminal ecology of cattle in Cuba were conducted with ecotypes collected in the western region of the country. However, the effect of the materials collected at different sites in the eastern zone, with regard to the ecology of the rumen, is not known.

The objective of this study was to determine the effect of three tithonia materials (mv-12, mv-14 and mv-17), collected in the eastern region of Cuba, on the ruminal microbial population, under *in vitro* conditions.

Materials and Methods

Research location. The study was performed at the Instituto de Ciencia Animal, located in San José

las que se encuentra su tolerancia a suelos pobres, resistencia al estrés hídrico y al corte, con producción aproximada de 55 t de MS/ha/año (Gallego *et al.* 2014). Es mejoradora del ambiente y se adapta a diversas condiciones climáticas (González-Castillo *et al.* 2014).

Entre sus características nutricionales se destaca el contenido de proteína, carbohidratos solubles y el nivel de taninos, que permiten ayudar a mejorar el balance alimentario, en cuanto al aporte de energía y proteína en la dieta del ganado lechero (Gallego-Castro *et al.* 2017, Mahecha *et al.* 2017 y Arguello *et al.* 2020).

El tenor de proteína de la planta varía de 14.0 a 36.6 %. Los animales consumen la planta completa, preferentemente hojas y flores (Maina *et al.* 2012), lo que contribuye al balance ruminal e incrementa la eficiencia para la transformación del amoníaco en proteína microbiana, lo que implicaría menores costos energéticos por pérdidas de amoníaco, metano y CO₂ ruminales, aspecto que disminuye la posible contaminación ambiental.

Mahecha *et al.* (2007) evaluaron el efecto de la inclusión del forraje de tithonia como reemplazo parcial del alimento concentrado en vacas cruzadas Holstein por Cebú, sin encontrar diferencias en la producción y la calidad de la leche, por lo que recomiendan su uso como opción estratégica para la producción bovina. Gallego (2016) demostró que un sistema silvopastoral de tithonia, asociado con Pennisetum clandestinum (kikuyo), incrementó la producción de leche y, de manera importante, su calidad, al mejorar el paso de ácidos grasos de cadena larga, que sirven de precursores para algunos de los ácidos grasos y reducen los recuentos celulares en la leche, lo que mejora la salud de la ubre. García-López (2016) obtuvo incrementos en la producción, cuando utilizó un sistema silvopastoral con tithonia para la producción de leche.

González *et al.* (2014) definieron a tithonia como una planta de alto valor proteico, que presenta un nivel de carbohidratos solubles superior al de otras forrajeras. Su contenido de taninos no resulta elevado, y no afecta de forma notoria la actividad ruminal. Esto puede tener un efecto importante en el rendimiento productivo de los animales, pues es de esperar que mejore la salud ruminal y se logre un gran efecto económico y también ambiental.

Los estudios relacionados con la acción de tithonia en la ecología ruminal de vacunos en Cuba se condujeron con ecotipos colectados en la región occidental del país. Sin embargo, no se conoce el efecto de los materiales recogidos en diferentes sitios de la zona oriental, en lo que respecta a la ecología del rumen.

Por lo antes expuesto, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de tres materiales de tithonia (mv-12, mv-14 y mv-17), colectados en la región oriental de Cuba, en la población microbiana ruminal, en condiciones *in vitro*.

Materiales y Métodos

Localización de la investigación. El estudio se realizó en el Instituto de Ciencia Animal, ubicado en el municipio

de las Lajas municipality, Mayabeque province, at 92 m a.s.l. and 22 °53' North latitude and 82 °02' West longitude. The soil of this region is fersialitic, undulated, with 4.84 % organic matter, 0.26 total nitrogen, 40.59 p.p.m. of phosphorus, 4.60 of calcium, 0.46 of magnesium and pH of 6.34. It has desiccation and is clayey and deep on limestone (Hernández *et al.* 2015).

The tithonia plant materials were collected in the eastern part of Cuba (Camagüey, Las Tunas and Granma) and were planted at Miguel Sistach Naya Pastures and Forages Experimental Station, which belongs to the Institute itself.

Preparation of tithonia samples for in vitro studies. The star grass was used as base substrate of fermentation. For the preparation of these substrates, leaves with their petioles were collected. The material was dried in an oven at 60 °C for 48 h. The fraction that was sampled was 1 kg. Subsequently, it was milled in a mill until reaching a 1 mm particle size. The dried milled samples were stored in amber glass flasks, at room temperature, until their later use in the experiments. A total of 100 g were quickly transferred to Unidad Central de Laboratorios (UCELAB) to determine its bromatological composition, according to AOAC (2016).

Procedure for the experiment preparation. The microbiological studies were conducted in the rumen microbiology laboratory, for which the Theodorou *et al.* (1994) technique was used.

Treatments. Each treatment consisted of a mixture of 80 % star grass and 20 % tithonia. The inclusion percentage of tithonia was selected from previous studies by Galindo *et al.* (2012).

The treatments consisted of star grass (control treatment, without tithonia); star grass + tithonia mv-12; star grass + tithonia mv-14 and star grass + tithonia mv-17.

Ruminal fluid donor animals. For the development of the experiments, a battery made up of four Holstein-Cebu crossbred cows was used, which for microbiological purposes were considered donor animals. These animals were kept in stabling conditions and intake low quality fibrous diets and 2 kg of commercial concentrate. They were fistulated in the dorsal sac of rumen, where a simple cannula was inserted. Ruminal fluid was extracted in fasting animals through the cannula, with the help of a vacuum pump. This was kept in thermos with hermetic closure to guarantee the temperature conditions (39 °C) and anaerobiosis during the transfer to the laboratory. The samples were taken to the rumen microbiology laboratory.

The ruminal content of all sampled donor animals was mixed and integrated into a single sample that was filtered through muslin. A small portion of Menke and Steingass (1988) buffer solution was added to the resulting solid and stirred for a few seconds in a domestic blender to loosen the microorganisms adhering to the

San José de las Lajas, provincia Mayabeque, a 92 m s.n.m. y a 22 °53' de latitud Norte y 82 °02' de longitud Oeste. El suelo de esta región es fersialítico, ondulado, con 4.84 % de materia orgánica, 0.26 de nitrógeno total, 40.59 p.p.m. de fósforo, 4.60 de calcio, 0.46 de magnesio y pH de 6.34. Presenta desecación y es arcilloso y profundo sobre calizas (Hernández *et al.* 2015).

Los materiales vegetales de tithonia se colectaron en la zona oriental de Cuba (Camagüey, Las Tunas y Granma) y se plantaron en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Miguel Sistach Naya, que pertenece al propio Instituto.

Preparación de las muestras de tithonia para los estudios in vitro. Se utilizó el pasto estrella como sustrato base de la fermentación. Para la preparación de estos sustratos se recolectaron hojas con sus pecíolos. El material se secó en estufa, a 60 °C, durante 48 h. La fracción que se muestreó fue de 1 kg. Posteriormente, se molió en molino hasta alcanzar un tamaño de partícula de 1 mm. Las muestras secas y molinadas se conservaron en frascos de cristal de color ámbar, a temperatura ambiente, hasta su posterior utilización en los experimentos. Rápidamente 100 g se trasladaron a la Unidad Central de Laboratorios (UCELAB) para determinar su composición bromatológica, según AOAC (2016).

Procedimiento para la preparación del experimento. Los estudios microbiológicos se condujeron en el laboratorio de microbiología del rumen, para lo que se empleó la técnica de Theodorou *et al.* (1994).

Tratamientos. Cada tratamiento consistió en una mezcla de 80 % de pasto estrella y 20 % de tithonia. El porcentaje de inclusión de tithonia se seleccionó a partir de estudios previos de Galindo *et al.* (2012).

Los tratamientos consistieron en pasto estrella (tratamiento control, sin tithonia); pasto estrella + tithonia mv-12; pasto estrella + tithonia mv-14 y pasto estrella + tithonia mv-17

Animales donantes de líquido ruminal. Para el desarrollo de los experimentos se utilizó una batería integrada por cuatro vacas mestizas Holstein-Cebú, que a los efectos microbiológicos, se consideraron animales donantes. Estos animales se mantuvieron en condiciones de estabulación y consumieron dietas fibrosas de baja calidad y 2 kg de concentrado comercial. Se encontraban fistuladas en el saco dorsal del rumen, donde se insertó una cánula simple. Se les extrajo líquido ruminal en ayunas a través de la cánula, con la ayuda de una bomba de vacío. Este se guardó en termos con cierre hermético para garantizar las condiciones de temperatura (39 °C) y anaerobiosis durante el traslado al laboratorio. Las muestras se condujeron al laboratorio de microbiología del rumen.

El contenido ruminal de todos los animales donantes muestreados se mezcló y se integró en una sola muestra que 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

fiber. The filtrate from this portion was incorporated into the liquid fraction. During all the time, the ruminal fluid was kept under a CO₂ atmosphere.

The experimental units consisted of 100 mL glass bottles, which contained 0.5 g of the feed to be evaluated. A total of 50 mL of a mixture of rumen fluid and buffer solution from Menke and Steingass (1988) was added to each bottle, in a 1:3 (v/v) ratio. Subsequently, each one was sealed with a butyl and graphed stopper. Bottles without substrate were included as control to correct the effect of the ruminal liquid on the volumes of produced gas. All bottles were randomly placed in a 39 °C temperature controlled bath.

The composition of the buffer solution was as follows. 5.7 g of Na₂HPO₄; 6.2 g of KH₂PO₄; 0.6 g of MgSO₄. 7 H₂O; 13.2 g CaCl₂. 2 H₂O; 10 g of MnCl₂. 4 H₂O; 1 g of CaCl₂.6H₂O; 0.8 g FeCl₂. 2 H₂O, 35 g of NaHCO₃ and 4 g of NH₄HCO₃. The procedure was carried out in a CO₂ atmosphere, in order to guarantee strict anaerobic conditions.

Culture of microorganisms from the rumen. The Hungate (1950) culture technique was used in rolled tubes and under strict anaerobic conditions.

The culture of total viable, cellulolytic and proteolytic bacteria was carried out in the culture media of Caldwell and Bryant (1966). In the case of proteolytic bacteria, 10 % skim milk was added, according to Galindo *et al.* (1988). For the determination of the fungal population, the culture medium of Joblin (1981) was used.

For the inoculations (10 %) three dilutions were used, and each one of them was replicated three times. The results were expressed in colony-forming units (CFU) for bacteria and in thallus-forming units (TFU) for fungi per milliliter of rumen fluid (mL) at the determined dilution.

Rumen protozoa count. To perform the protozoa counts, the ruminal fluid samples were preserved in a 10 % formaldehyde solution. The protozoa were counted directly under the light microscope in a Neubauer chamber, after staining them with a gentian violet solution at 0.01 % in glacial acetic acid. For its reading under the light microscope, a 1:1 (v/v) dilution was used. Similarly, the counts were expressed as cells per milliliter of rumen fluid (mL) at the determined dilution.

Determination of the chemical composition of plant materials. The analysis of the chemical composition of tithonia plant materials, evaluated in each of the treatments, was carried out according to the techniques described by the AOAC (2016) and they are showed in each case. The fibrous fractions were determined by the method of Goering and van Soest (1970). The chemical composition of the evaluated tithonia collections is shown in table 1.

microorganismos adheridos a la fibra. El filtrado de esta porción se incorporó a la fracción líquida. Durante todo el tiempo, el fluido ruminal se mantuvo bajo atmósfera de CO₂.

Las unidades experimentales consistieron en botellas de vidrio de 100 mL, que contenían 0.5 g del alimento a evaluar. Se añadieron a cada botella 50 mL de una mezcla de líquido de rumen y solución amortiguadora de Menke y Steingass (1988), en una proporción 1:3 (v/v). Posteriormente, cada una se selló 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.

La composición de la solución buffer fue la siguiente: 5.7 g de Na₂HPO₄; 6.2 g de KH₂PO₄; 0.6 g de MgSO₄. 7 H₂O; 13.2 g CaCl₂. 2 H₂O; 10 g de MnCl₂. 4 H₂O; 1 g de CaCl₂. 6H₂O; 0.8 g FeCl₂. 2 H₂O, 35 g de NaHCO₃ y 4 g de NH₄HCO₃. El procedimiento se realizó en atmósfera de CO₂, con el propósito de garantizar las condiciones de anaerobiosis estricta.

Cultivo de microorganismos del rumen. Se utilizó la técnica de cultivo de Hungate (1950) 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). En el caso de las bacterias proteolíticas, se adicionó 10 % de leche descremada, según Galindo *et al.* (1988). Para la determinación de la población de hongos se empleó el medio de cultivo de Joblin (1981).

Para las inoculaciones (10 %) se utilizaron tres diluciones, y cada una de ellas se replicó tres veces. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonia (UFC) para las bacterias y en unidades formadoras de talo (UFT) para los hongos por mililitro de líquido del rumen (mL) en la dilución determinada.

Conteo de protozoos del rumen. Para realizar los conteos de protozoos, las muestras de líquido ruminal se preservaron en una solución de formol al 10 %. Los protozoos se contaron directamente al microscopio óptico en cámara de Neubauer, luego de teñirlos con una solución de violeta genciana al 0.01 % en ácido acético glacial. Para su lectura al microscopio óptico, se utilizó una dilución 1:1 (v/v). De igual manera, los conteos se expresaron como células por mililitro de líquido del rumen (mL) en la dilución determinada.

Determinación de la composición química de los materiales vegetales. El análisis de la composición química de los materiales vegetales de tithonia, evaluados en cada uno de los tratamientos, se realizó según las técnicas descritas por la AOAC (2016) y se indican en cada caso. Las fracciones fibrosas se determinaron por el procedimiento de Goering y van Soest (1970). La composición química de las colectas de tithonia evaluadas se muestra en la tabla 1.

Table 1. Chemical composition of some studied tithonia plant materials, % DM

Collections	CP	NDF	ADF	Cellulose	Lignin	Ash
mv-12	23.39	50.1	44.93	28.23	11.87	16.88
mv-14	21.71	48.89	42.89	26.64	10.97	14.36
mv-17	21.01	48.23	44.27	30.63	10.95	17.83

Determination of final fermentation products.

The NH₃ concentration was determined according to the technique described by Conway (1957). The concentration of total and individual short-chain fatty acids (SCFAs) was recorded by gas chromatography.

pH measurement. It was determined by reading in a digital pH meter, Sartorius brand.

Calculation of the stoichiometric balance of ruminal fermentation. The BALANCE - RUMETANO program was used to estimate the stoichiometric balance of ruminal fermentation and the contribution to animal metabolism (Stuart 2015).

Experimental design and statistical processing. A completely random design with factorial arrangement was applied. The factors were the treatments and fermentation hours (four treatments and three fermentation hours). For the processing of the results, the multivariate analysis of variance was used. In case of finding interaction between the treatments and the sampling times, a split plot model was applied, where the treatments were the main plot, and the sampling times the subplot. If there were not interaction, a linear model was used for the effects of the treatments and the sampling hours. Duncan (1955) test was applied for $P < 0.05$, when necessary. The INFOSTAT statistical program, proposed by Balzarini *et al.* (2001) was used.

Statistical treatment of microorganism counts. The normality and homogeneity of the information obtained from the experimental results was determined. The counts of viable microorganisms were transformed according to Log N, to guarantee normal conditions in the growth curve. For the analysis, the formula $(K+N).10^x$ was applied, where:

K – is the constant that represents the logarithm of the dilution to which the microorganism was inoculated.

N – is the logarithm of the colony count, determined as CFU.mL⁻¹, TFU.mL⁻¹, or cells.mL⁻¹.

10 – is the base of logarithms.

X – is the dilution at which the inoculation was performed.

Results and Discussion

There was no significant interaction between the treatments and the hours after the fermentation start for the microbial populations of total viable bacteria and ruminal cellulolytic fungi (0, 3 and 6 h after fermentation). Table 2 shows the results.

The mv-12 and mv-17 propitiated fewer populations

Determinación de productos finales de la fermentación. La concentración de NH₃ se determinó según la técnica descrita por Conway (1957). La concentración de ácidos grasos de cadena corta totales e individuales (AGCC) se registró mediante cromatografía gaseosa.

Medición de pH. Se determinó mediante lectura en pH metro digital, marca Sartorius

Cálculo del balance estequiométrico de la fermentación ruminal. Se utilizó el programa BALANCE - RUMETANO para estimar el balance estequiométrico de la fermentación ruminal y la contribución al metabolismo animal (Stuart 2015).

Diseño experimental y procesamiento estadístico. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado, con arreglo factorial. Los factores fueron los tratamientos y las horas de fermentación (cuatro tratamientos y tres horas de fermentación). Para el procesamiento de los resultados se empleó el análisis de varianza multivariada. En caso de encontrar interacción entre los tratamientos y los horarios de muestreo, se aplicó un modelo de parcelas divididas, donde los tratamientos fueron la parcela principal, y los horarios de muestreo la subparcela. 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 (1955) para $P < 0.05$, cuando fue necesario. Se usó el programa estadístico INFOSTAT, propuesto por Balzarini *et al.* (2001).

Tratamiento estadístico a los conteos de microorganismos. Se determinó la normalidad y la homogeneidad a la información obtenida a partir de los resultados experimentales. Los conteos de microorganismos viables se transformaron según Log N, para garantizar las condiciones de normalidad en la curva de crecimiento. Para el análisis se aplicó la fórmula $(K+N).10^x$, donde:

K - es la constante que representa el logaritmo de la dilución a la que se inoculó el microorganismo.

N - es el logaritmo del conteo de colonias, determinado como UFC.mL⁻¹, UFT.mL⁻¹, o células.mL⁻¹.

10 - es la base de los logaritmos.

X - es la dilución a la que se efectuó la inoculación.

Resultados y Discusión

No hubo interacción significativa entre los tratamientos y las horas después de iniciada la fermentación para las poblaciones microbianas de bacterias viables totales y hongos celulolíticos ruminales (0, 3 y 6 h después de la fermentación). La tabla 2 muestra los resultados.

Los mv-12 y mv-17 propiciaron poblaciones de

Table 2. Effect of tithonia plant material on the population of total viable bacteria and cellulolytic fungi

Indicators	Plant material				SE(±) Signif.
	Star grass	mv-12	mv-14	mv-17	
Total bacteria, 10 ¹¹ CFU/mL	10.00 ^a	6.11 ^b	11.59 ^a	6.78 ^b	1.09 P=0.0012
Cellulolytic fungi, 10 ⁵ TFU/mL	6.98 ^b	12.00 ^a	10.41 ^a	9.07 ^{ab}	0.99 P=0.0049

CFU= colony forming units

TFU= thallus forming units

A b Different means in the same row differ to P < 0.05 (Duncan1955)

of total viable bacteria (P = 0.0012), while the mv-14 keep the same populations as the star grass control. The effect of tithonia on the total population of rumen bacteria was highly variable in the different experiments and plant materials evaluated. Galindo *et al.* (2018) attributed it to the defaunating effect produced by this plant, because of ecological relations of predation exerted by protozoa on total bacteria.

The mv-12 and mv-14 were able to increase the populations of cellulolytic fungi in the rumen (P = 0.0049) with respect to the control, while the mv-17 showed intermediate fungal populations between the star grass control and the other two plant materials of tithonia evaluated.

The increase in the populations of cellulolytic fungi in the rumen recorded in this experiment is of great importance, since although these microbial groups are numerically smaller than cellulolytic bacteria, their extracellular enzymes are able to degrading, largely, the cellulosic materials contained in vegetables. It is estimated that approximately 58 % of ruminal cellulolysis is due to the presence of the mentioned microorganisms, which are capable of adhering, colonizing and degrading cellulosic materials and even modifying the structure of lignin.

In this research, the effect of the fermentation time in the presence of cellulolytic fungi of the rumen was showed (table 3). At 3 and 6 h after the start of fermentation, the fungal populations were highly significant (P < 0.001) with respect to those registered at zero hour (before the start of fermentation). The populations of total viable bacteria did not show differences between the sampling hours that were evaluated.

bacterias viables totales menos numerosas (P = 0.0012), mientras que el mv-14 mantuvo iguales poblaciones que el control de pasto estrella. El efecto de tithonia en la población total de bacterias del rumen fue muy variable en los diferentes experimentos y materiales vegetales evaluados. Galindo *et al.* (2018) lo atribuyeron al efecto defaunante que produce este vegetal, como consecuencia de relaciones ecológicas de predación que ejercen los protozoarios en las bacterias totales.

Los mv-12 y mv-14 fueron capaces de incrementar las poblaciones de hongos celulolíticos del rumen (P=0.0049) respecto al control, mientras que el mv-17 presentó poblaciones fúngicas intermedias entre el control de pasto estrella y los otros dos materiales vegetales de tithonia evaluados.

De gran importancia es el incremento de las poblaciones de hongos celulolíticos del rumen registradas en este experimento, ya que aunque estos grupos microbianos numéricamente son menores que las bacterias celulolíticas, sus enzimas extracelulares son capaces de degradar, en mayor magnitud, los materiales celulósicos que contienen los vegetales. Se estima que aproximadamente 58 % de la celulolisis ruminal se debe a la presencia de los referidos microorganismos, que son capaces de adherir, colonizar y degradar los materiales celulósicos e incluso, modificar la estructura de la lignina.

En la presente investigación se demostró el efecto del tiempo de fermentación en la presencia de hongos celulolíticos del rumen (tabla 3). A las 3 y 6 h posteriores al inicio de la fermentación, las poblaciones de hongos fueron altamente significativas (P < 0.001) con respecto a las registradas a la hora cero (antes de iniciada la fermentación). Las poblaciones de bacterias viables totales no mostraron diferencias entre las horas de

Table 3. Effect of fermentation time on the population of total viable bacteria and fungi

Indicators	Time, h			SE (±) Signif.
	0	3	6	
Fungi, 10 ⁵ TFU/mL	5.92 ^b	10.70 ^a	12.23 ^a	0.86 P < 0.0001
Total viable bacteria, 10 ¹¹ CFU/mL	7.83	10.14	7.89	0.94 P = 0.1495

CFU= colony forming units, TFU= thallus forming units

^a^b Different means in the same row differ to P < 0.05 (Duncan 1955)

The evaluation of the population dynamics of the cellulolytic bacteria of the rumen with the inclusion of tithonia plant materials is shown in figure 1. With the inclusion of mv-12, mv-14 and mv-17 in the diet, higher populations of cellulolytic bacteria were achieved at 3 and 6 h after the fermentation start with respect to that obtained with star grass.

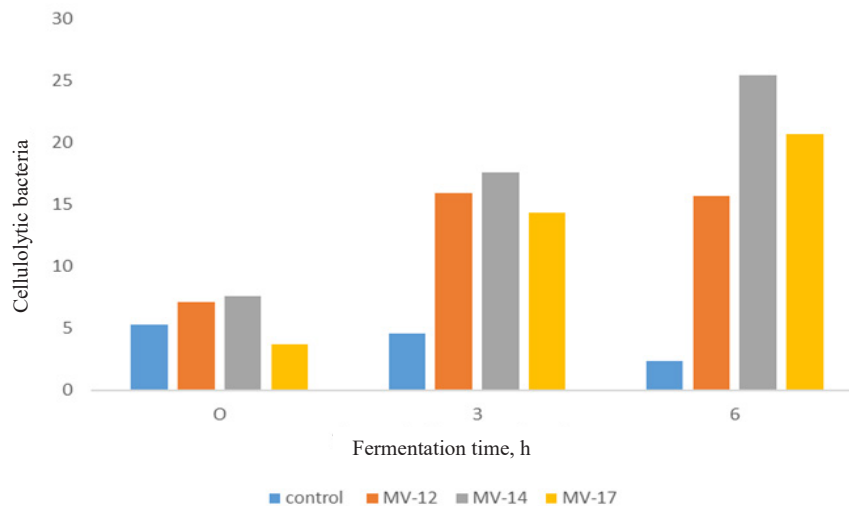


Figure 1. Effect of tithonia plant material and fermentation time on the ruminal cellulolytic bacteria population, 10^6 CFU/mL, SE \pm 3.11, P = 0.0267

The treatment that included mv-12 showed similar cellulolytic bacteria populations at 3 and 6 h. While, the inclusion of plant materials 14 and 17 highlighted for its variability. The mv-17 stood out for producing high populations of cellulolytic bacteria, at 3 and 6 h after the start of fermentation. These results are similar to those obtained by Ruiz *et al.* (2017) with materials of *T. diversifolia*, collected in the western region of Cuba.

The results related to the presence of cellulolytic bacteria and fungi, when mv-12, mv-14 and mv-17 were used coincide with those obtained by López *et al.* (2019), who found higher ruminal degradability values of NDF and ADF with the referred tithonia plant materials.

The different plant materials of tithonia showed their effect on the ruminal protozoa population. There was interaction (P < 0.0001) between the treatments and the fermentation times in this indicator (figure 2). As can be seen, 3 and 6 h after the beginning of the fermentation, all the plant materials showed superior protozoa population than the control (star grass) and the higher were at 6 h in mv-14 and mv-17.

The effect of different tithonia collections on the protozoa population has been studied in previous experiments by Galindo *et al.* (2012) and Galindo *et al.* (2018), in which decreases in its population were showed. Among the advantages of protozoa reduction or defaunation are: increase in the population of cellulolytic microorganisms, stabilization of rumen pH, decrease in free ammonia, reduction of

muestreo que se evaluaron.

La evaluación de la dinámica poblacional de las bacterias celulolíticas del rumen con la inclusión de los materiales vegetales de tithonia se muestra en la figura 1. Con la inclusión de los mv-12, mv-14 y mv-17 en la dieta se lograron mayores poblaciones de bacterias celulolíticas a las 3 y 6 h después de iniciada la fermentación con

respecto a lo obtenido con pasto estrella.

El tratamiento que incluyó el mv-12 presentó poblaciones de bacterias celulolíticas similares a las 3 y 6 h. Mientras, la inclusión de los materiales vegetales 14 y 17 se destacó por su variabilidad. El mv-17 se destacó por producir altas poblaciones de bacterias celulolíticas, a las 3 como a las 6 h posteriores al inicio de la fermentación. Estos resultados son similares a los que obtuvieron Ruiz *et al.* (2017) con materiales de *T. diversifolia*, colectados en la región occidental de Cuba.

Los resultados relacionados con la presencia de bacterias y hongos celulolíticos, cuando se utilizaron los mv-12, mv-14 y mv-17 coinciden con los que lograron López *et al.* (2019), quienes encontraron mayores valores de degradabilidad ruminal de la FDN y FDA con los referidos materiales vegetales de tithonia.

Los diferentes materiales vegetales de tithonia mostraron su efecto en la población de protozoos ruminales. Hubo interacción (P < 0.0001) entre los tratamientos y los tiempos de fermentación en este indicador (figura 2). Como se puede observar, a las 3 y 6 horas posteriores al inicio de la fermentación, todos los materiales vegetales presentaron poblaciones de protozoos superiores al control de pasto estrella y las mayores fueron a las 6 horas los materiales vegetales mv-14 y mv-17.

El efecto de diferentes colectas de tithonia en la población de protozoos se ha estudiado en experimentos precedentes de Galindo *et al.* (2012) y Galindo *et al.* (2018), en los que se demostraron disminuciones en su población. Entre las ventajas de la reducción protozoaria o la defaunación se encuentran: incremento

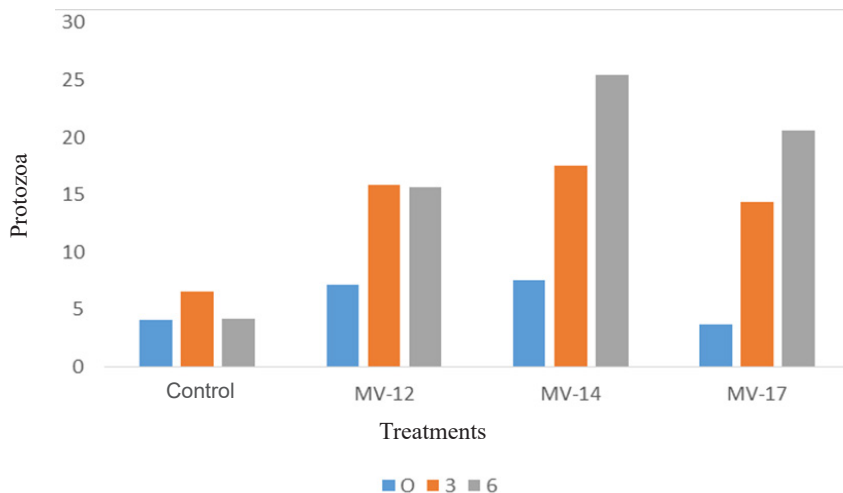


Figure 2. Effect of tithonia plant material and fermentation time on ruminal protozoa population, 10^5 cells/mL, SE \pm 0.55 P < 0.0001

methanogenesis, and increase in the efficiency of digestive use of different diets, mainly fibrous ones.

The obtained results coincide with compilation reports by Hristov (2013), in which it is asserted that the most outstanding contribution of the reduction of protozoa in rumen is that it improves energy metabolism and reduces losses due to methane production, which is an environmental pollutant. This effect was showed in this research. In this regard, Leng (2014) reported that defaunation reduces the enteric emission of CH₄, due to the flow of microbial cells from the rumen and the reduction in the acetate/propionate ratio, events that are considered electron sinks.

Table 4 shows the population of proteolytic bacteria and the pH of the rumen. In both indicators of ruminal fermentation, there were interaction between treatments and fermentation times. Regarding the population of proteolytic bacteria, the high values of these groups highlighted at 6 h, when mv-12, mv-14 and mv-17 are used, which does not differ from that obtained with mv-12 and mv-14, at 3 h of fermentation.

It is important to highlight that mv-17 showed 2.47

de la población de microorganismos celulolíticos, estabilización del pH del rumen, decrecimiento del amoníaco libre, reducción de la metanogénesis, e incremento en la eficiencia de utilización digestiva de diferentes dietas, fundamentalmente las fibrosas.

Los resultados que se obtuvieron coinciden con informes de compilación de Hristov (2013), en los cuales se asevera que el aporte más sobresaliente de la reducción de protozoos en el rumen es que mejora el metabolismo energético y reduce las pérdidas por concepto de producción de metano, que es un contaminante ambiental. Este efecto quedó demostrado en esta investigación. Al respecto, Leng (2014) informó que la defaunación reduce la emisión entérica de CH₄, debido al flujo de células microbianas desde el rumen y a la reducción en la relación acetato/propionato, eventos que se consideran sumideros de electrones.

En la tabla 4 se presenta la población de bacterias proteolíticas y el pH del rumen. En ambos indicadores de la fermentación ruminal, se encontró interacción entre los tratamientos y los tiempos de fermentación. Con respecto a la población de bacterias proteolíticas, se destacan los altos valores de estos grupos a las 6 h, cuando se utiliza mv-12, mv-14 y mv-17, lo que no difiere de lo obtenido con mv-12 y mv-14, a las 3 h de fermentación.

Table 4. Effect of tithonia plant material and fermentation time on the population of proteolytic bacteria and rumen pH

Indicators	mv	Time, h			SE(±) Signif.
		0	3	6	
Proteolytic bacteria, 10 ⁶ CFU/mL	Star grass	6.94 ^d	5.08 ^d	3.39 ^d	6.51 P = 0.0006
	mv-12	16.78 ^{bcd}	36.78 ^{ab}	34.11 ^{abc}	
	mv-14	15.33 ^{cd}	36.22 ^{ab}	37.11 ^{ab}	
	mv-17	6.33 ^d	15.67 ^{cd}	42.67 ^a	
pH	Star grass	6.39 ^c	6.44 ^c	6.14 ^d	0.07 P < 0.0390
	mv-12	6.73 ^{ab}	6.68 ^{ab}	6.66 ^b	
	mv-14	6.84 ^{ab}	6.79 ^{ab}	6.88 ^a	
	mv-17	6.69 ^{ab}	6.78 ^{ab}	6.81 ^{ab}	

^{abcd}Different means in the same row differ to P < 0.05 (Duncan 1955)

and 2.72 times more proteolytic bacteria at 3 and 6 h after the start of fermentation, respectively. In the mv-12 and mv-14 they were 2.19 and 2.36 times, respectively, more numerous at 3 h with respect to the population found before starting the fermentation. At 6 h there was no increase.

The results found in the populations of proteolytic bacteria are related to the high CP content of these materials and, specifically, to the protein solubility. The largest populations of bacteria that degrade proteins in rumen are conditioned by factors such as their high protein content and their solubility. This produces the elimination of the terminal amino group of them, higher release of ammonia and, consequently, pH increase.

In this research, with all the tithonia plant materials and times evaluated, the rumen pH was higher with respect to the star grass, which confirms the hypothesis previously exposed (table 4).

Due to the presence of the different plant materials of tithonia, there was no effect on the molar percent of ruminal acetic acid and propionic acid, determined as percent of the total concentration of SCFAs in the rumen (table 5). In all cases, the fermentation pattern was acetic. Ramírez *et al.* (2014) reported that ruminal microbial activity produces varied concentrations of SCFAs, which are absorbed through the ruminal epithelium and are used as an energy source. Other products of the fermentation process, such as carbon dioxide (CO₂) and hydrogen (H₂), are not used by the ruminant, but serve as a substrate for a particular community of microorganisms belonging to Archaea domain, the methanogens. These microorganisms produce methane (CH₄) as a metabolic strategy to obtain the energy necessary for their growth.

Resulta importante destacar que el mv-17 presentó 2.47 y 2.72 veces más bacterias proteolíticas a las 3 y 6 h después de iniciada la fermentación, respectivamente. En los mv-12 y mv-14 fueron 2.19 y 2.36 veces, respectivamente, más numerosas a las 3 h con respecto a la población encontrada antes de iniciar la fermentación. A las 6 h no hubo incremento.

Los resultados que se encontraron en las poblaciones de bacterias proteolíticas se relacionan con el alto contenido en PB de estos materiales y, de manera específica, con la solubilidad de la proteína. Las mayores poblaciones de bacterias que degradan las proteínas en el rumen están condicionadas por factores como su alto contenido en proteínas y su solubilidad. Esto produce la eliminación del grupo amino terminal de las mismas, mayor liberación de amoníaco y, consecuentemente, incremento del pH.

En esta investigación, con todos los materiales vegetales de tithonia y tiempos evaluados, el pH del rumen fue superior con respecto al pasto estrella, lo que confirma la hipótesis antes expuesta (tabla 4).

Debido a la presencia de los diferentes materiales vegetales de tithonia, no se encontró efecto en el porcentaje molar de ácido acético y ácido propiónico ruminal, determinado como por ciento de la concentración total de los AGCC en el rumen (tabla 5). En todos los casos, el patrón de fermentación fue acético. Ramírez *et al.* (2014) informaron que la actividad microbiana ruminal produce variadas concentraciones de AGCC, los que se absorben a través del epitelio ruminal y se utilizan como fuente energética. Otros productos del proceso fermentativo, como dióxido de carbono (CO₂) e hidrógeno (H₂), no se utilizan por el rumiante, pero sirven como sustrato para una comunidad particular de microorganismos pertenecientes al dominio Archaea, los metanógenos. Estos microorganismos

Table 5. Effect of tithonia plant materials on SCFAs concentration in rumen and some elements of the stoichiometric balance of fermentation

Indicator	Treatment				SE(±) Signif.
	Control	mv-12	mv-14	mv-17	
Acetic acid, %	69.03	62.32	67.08	67.49	1.65 P = 0.0581
Propionic acid, %	16.41	17.41	16.30	14.72	0.62 P = 0.0503
CH ₄ , g/kg digested OM	37.4 ^b	32.6 ^a	33.2 ^a	32.33 ^a	2.53 P = 0.0477
Acetic/propionic	4.22 ^{ab}	3.58 ^b	4.13 ^{ab}	4.77 ^a	0.23 P = 0.0200

In this experiment it was not possible to determine the methane concentration, reasons that led to its estimation from the equation of Sauvart *et al.* (2011), who considered that the methane production that takes place in the rumen is related to the crude protein content of the intake feed. In this regard, it is reported that the CH₄ content, determined in grams/kg of digested OM = 40.1 - (0.32 × CP), % DM.

producen metano (CH₄) como estrategia metabólica para obtener la energía necesaria para su crecimiento.

En este experimento no fue posible determinar la concentración de metano, razones que condujeron a su estimación a partir de la ecuación de Sauvart *et al.* (2011), quienes consideraron que la producción de metano que tiene lugar en el rumen se relaciona con el contenido en proteína cruda de los alimentos consumidos. Al respecto,

The methane values were 37.4, 32.6, 33.2 and 32.33 g/kg of digested OM for star grass and *T. diversifolia* plant materials mv-12, mv-14 and mv-17, respectively. The different plant materials did not differ from each other for this indicator, but produced less methane than the star grass ($P = 0.0477$).

Results similar to those of this research were reported by Delgado *et al.* (2011) and Pérez-Can *et al.* (2020), when foliages from different tropical plants were evaluated. The authors found that leucaena and tithonia were the plants that produced the least methane (mL/gDM) compared to ten others, and showed that the response is associated with the higher content of condensed tannins and saponins that act on methanogens and protozoa, in addition to they have the ability to increase the molar ratio of propionic acid.

The acetic/propionic ratio (table 5) varied erratically between the treatments, without differences between the plant materials and the star grass control. However, it is clear that mv-12 and mv-17 differed from each other ($P = 0.0200$).

From these results, it is concluded that the mv-12, mv-14 and mv-17, obtained in the eastern region of Cuba, led to modifications in the ruminal ecosystem, by increasing the population of total cellulolytic organisms and proteolytic bacteria, in addition to reducing the population of protozoa and the methane estimated from the concentration in CP.

Conflict of interest

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

Author's contribution

Juana Galindo: Conceptualization, Investigation, Writing – original draft

Niurca González: Conceptualization, Investigation

Tomás Ruiz: Conceptualization, Investigation

Magaly Herrera: Metodology, Formal analysis

Onidia Moreira: Investigation

Aned Capó: Investigation

Humberto Díaz: Investigation

se informa que el contenido en CH₄, determinado en gramo /kg de MO digerida = $40.1 - (0.32 \times PC)$, % de MS.

Los valores de metano fueron 37.4, 32.6, 33.2 y 32.33 g/kg de MO digerida para pasto estrella y los materiales vegetales de *T. diversifolia* mv-12, mv-14 y mv-17, respectivamente. Los diferentes materiales vegetales no difirieron entre sí para este indicador, pero produjeron menos metano que el pasto estrella ($P=0.0477$).

Resultados similares a los de esta investigación informaron Delgado *et al.* (2011) y Pérez-Can *et al.* (2020), cuando se evaluaron follajes de diferentes plantas tropicales. Los autores encontraron que leucaena y tithonia fueron las plantas que menos metano produjeron (mL/gMS) con respecto a otras diez, y señalaron que la respuesta se asocia al mayor contenido en taninos condensados y saponinas que actúan sobre los metanógenos y protozoarios, además de que tienen la capacidad de incrementar la proporción molar de ácido propiónico.

La relación acético/propiónico (tabla 5) varió de forma errática entre los tratamientos, sin diferencias entre los materiales vegetales y el control de pasto estrella. Sin embargo, es evidente que el mv-12 y el mv-17 difirieron entre sí ($P = 0.0200$).

A partir de estos resultados, se concluye que los mv-12, mv-14 y mv-17, obtenidos en la región oriental de Cuba, propiciaron modificaciones en el ecosistema ruminal, al incrementar la población de organismos celulolíticos totales y las bacterias proteolíticas, además de reducir la población de protozoos y el metano estimado a partir de la concentración en PB.

Conflicto de intereses

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

Contribución de los autores:

Juana Galindo: Conceptualización, Investigación, Redacción- borrador original

Niurca González: Conceptualización, Investigación

Tomás Ruiz: Conceptualización, Investigación

Magaly Herrera: Metodología, Análisis formal

Onidia Moreira: Investigación

Aned Capó: Investigación

Humberto Díaz: Investigación

References

- Argüello, R., Mahecha-Ledesma, L., Angulo-Arizala, J. 2020. "Perfil nutricional y productivo de especies arbustivas en trópico bajo, Antioquia (Colombia)". *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 21(3): e1700, ISSN: 2500-5308. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1700.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2016. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 20th Ed. Latimer Jr, G.W. (ed). Ed. AOAC International, Rockville M.D, USA, ISBN: 9780935584875.
- Balzarini, M., Di Rienzo, J.A, González, L.A. & Robledo, C.W. 2001. *Paquete estadístico INFOSTAT versión 2001*, Córdoba, Argentina.
- Caldwell, D.R. & Bryant, M.P. 1966. "Medium without fluid for non-selective enumeration and isolation of rumen bacteria". *Applied and Environmental Microbiology*, 14(5): 794-801, ISSN: 1098-5336. <https://doi.org/10.1128/am.14.5.794-801.1966>.
- Conway, E.J. 1957. *Micro diffusion analysis and volumetric error*. 4th Rev. Ed. Ed. Crosby Lockwood and Son Ltd, London, U.K., pp. XVIII.
- Delgado, D., Galindo, J., González, R. Savón, D., Scull, I., González, N. & Marrero, Y. 2011. "Feeding of tropical trees and shrub foliage as a strategy to reduce ruminal methanogenesis: studies conducted in Cuba". *Tropical Animal Health Prod.*,

- 44: 1097-1104, ISSN: 1573-7438. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-0045-5>.
- Duncan, D.B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". *Biometrics*, 11(1): 1-42, ISSN: 0006-341X. <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- Galindo, J. 1988. Efecto de la zeolita en la población de bacterias celulolíticas y su actividad en vacas que consumen ensilaje. PhD Thesis. Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.
- Galindo, J., González, N., Scull, I., Marrero, Y., Sosa, A., Aldana, A.I. Onidia Moreira, O., Delgado, D., Ruiz, T., Febles, G., Torres, V., La O, O., Sarduy, L., Noda, A. & Achang, O. 2012. "Effect of *Samanea saman* (Jacq.) Merr., *Albizia lebeck* Benth and *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray (plant material 23) on the methanogen population and on the ruminal microbial ecology". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 46(3): 273-278, ISSN: 2079-3480.
- Galindo-Blanco, J.L., Rodríguez-García, I., González-Ibarra, N., García-López, R. & Herrera-Villafranca, M. 2018. "Sistema silvopastoril con *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray: efecto en la población microbiana ruminal de vacas". *Pastos y Forrajes*, 41(4): 273-280, ISSN: 2078-8452.
- Gallego-Castro, L.A. 2016. Evaluación agronómica y análisis productivo del botón de oro (*Tithonia diversifolia* Hemsl. A Gray) como suplemento alimenticio de vacas lecheras en trópico alto. MSc. Thesis. Universidad de Antioquia, Antioquia, Colombia.
- Gallego-Castro, L.A., Mahecha-Ledesma, L. & Angulo-Arizala, J. 2017a "Calidad nutricional de *Tithonia diversifolia* Hemsl. A Gray bajo tres sistemas de siembra en el trópico alto". *Agronomía Mesoamericana*, 28(1): 213-222, ISSN: 2215-3608. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v28i1.21671>.
- Gallego-Castro, L.A., Mahecha-Ledesma, L. & Angulo-Arizala, J. 2017b. "Producción, calidad de leche y beneficio: costo de suplementar vacas Holstein con *Tithonia diversifolia*". *Agronomía Mesoamericana*, 28(2): 357-370, ISSN: 2215-3608. <https://doi.org/10.15517/ma.v28i2.25945>.
- García-López, R., Rodríguez, I. & González, M. 2016. Opción de pastoreo con *Tithonia diversifolia* en vacas lecheras. In: *Memorias IV Convención Internacional AGRODESARROLLO 2016*, Varadero, Matanzas, Cuba.
- Goering, H.K. & Van Soest, P.J. 1970 Forage fiber analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications). *Agriculture Handbook No. 379*. Ed. U.S.D.A. Agricultural Research Service. Washington, U.S.A., p. 20.
- González-Castillo, J.C., Hahn von-Hessberg, C.M. & Narváez-Solarte, W., 2014. "Características botánicas de *Tithonia diversifolia* (Asterales: *Asteraceae*) y su uso en la alimentación animal". *Boletín Científico Museo de Historia Natural*, 18(2): 45-58, ISSN: 0123-3068.
- Hernández, A, Pérez, J.M., Bosh, D. & Castro, N. 2015. Clasificación de los suelos de Cuba. 1st Ed. González, O. (ed.). Ed. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, p. 93, ISBN: 978-959-7023-77-7.
- Hristov, A.N., Oh, J., Lee, C., Meinen, R., Montes, F., Ott, T., Firkins, J., Rotz, A., Dell, C., Adesogan, A., Yang, W., Tricarico, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Dijkstra, J. & Oosting, S. 2013. Mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero en la producción ganadera: Una revisión de las opciones técnicas para la reducción de las emisiones de gases diferentes al CO₂. Gerber, P.J., Henderson, B. & Makkar, H.P.S. (eds). Ed. Producción y Sanidad Animal FAO Documento No. 177. Rome, Italy, E-ISBN: 978-92-5-307659-8.
- Hungate, R.G. 1950. "The anaerobic, mesophilic cellulolytic bacteria". *Bacteriological Reviews*, 14(1): 1-49, ISSN: 2691-9443.
- Joblin, K.N. 1981. "Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes". *Applied and Environmental Microbiology*, 42(6): 1119-1122, ISSN: 1098-5336. [https://doi.org/0099-2240/81/121119-04\\$02.00/0](https://doi.org/0099-2240/81/121119-04$02.00/0).
- Leng, R.A. 2014. "Interactions between microbial consortia in biofilms: a paradigm shifts in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation". *Animal Production Science*, 54(5): 519-543, ISSN: 1836-5787. <https://doi.org/10.1071/AN1338>.
- Mahecha, L., Escobar, J.P., Suárez, J.F. & Restrepo, L.F. 2007. "*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray (botón de oro) como suplemento forrajero de vacas F1 (Holstein por Cebú)". *Livestock Research for Rural Development*, Volume 19, Article #16, Available: <http://www.lrrd.org/lrrd19/2/mahe19016.htm>.
- Mahecha-Ledesma, L. & Angulo-Arizala, J. 2017. Experiencia investigativa sobre *Tithonia diversifolia* en la Universidad de Antioquia. In: *Memorias IX Congreso Internacional de Sistemas Silvopastoriles: Aportes de la ganadería a los objetivos de desarrollo sostenible*. Red Global Silvopastoril. Manizales, Colombia, pp. 1 446-447.
- Maina, I., Abdulrazak, S., Mueke, C. & Fujihara, T. 2012. "Potential nutritive value of various parts of wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) as source of feed for ruminants in Kenya". *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10(2): 632-635, ISSN: 14590263.
- 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: 7-55, ISSN: 0340-3165.
- Pérez-Can, G.E., Tzecz-Gamboa, M., Albores-Moreno, S., Sanginés-García, J., Aguilar-Urquiza, E., Chay-Canul, A., Canul-Solis, J., Muñoz-Gonzalez, J., Diaz-Echeverria, V., Piñero-Vázquez, A.T. 2021. "Degradabilidad y producción de metano *in vitro* del follaje de árboles y arbustos con potencial en la nutrición de rumiantes". *Acta Universitaria*, 30, ISSN: 2007-9621. DOI: <https://doi.org/10.15174/au.2020.2840>.
- Ramírez, J.F., Posada-Ochoa, S. & Noguera, R. 2014. "Metanogénesis ruminal y estrategias para su mitigación". *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 9(2): 307-323, ISSN: 1900-9607.
- Rivera, J.E., Ruiz, T.E., Chará, J., Florencio, J., Gómez-Leyva, J.F. & Barahona, R. 2021. "Biomass production and nutritional properties of promising genotypes of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray under different environments". *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, 9(3): 280-291, ISSN: 2346-3775. [https://doi.org/10.17138/TGFT\(9\)280-291](https://doi.org/10.17138/TGFT(9)280-291).
- Ruiz, T.E., Alonso, J., Febles, G.J., Galindo, J.L., Savon, L.L., Chongo, B.B., Martínez, Y., La O, O., Cino, D.M., Crespo, G.J., Mora, L., Valenciaga, N., Padilla, C., Rodríguez, B., Muir, L., Rivero A. & Hernández, N. 2017. Evaluación de materiales recolectados de *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray en Cuba. In: *Memorias IX Congreso Sistemas Silvopastoriles. Aporte a*

- los objetivos de desarrollo sostenible, CIPAV. Chará, J., Peri, P. & Rivera, J. (eds). Ed. Fundación CIPAV. Cali, Colombia, p. 486.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Serment, A. & Broudiscou, I. 2011. "Influences des régimes et de leur fermentation dans le rumen sur la production de méthane par les ruminants". INRAE Productions Animales, 5(24): 433-446, ISSN: 2273-7766. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2011.24.5.3276>.
- Stuart, R. 2015. BALANCE-RUMETANO: programa estadístico para el cálculo del balance estequiométrico de la fermentación ruminal. Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.
- 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): 185-197, ISSN: 0377-8401. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6).

Received: October 19, 2021

Accepted: December 6, 2021