



EFFECTO DE UN SISTEMA SILVOPASTORIL CON *TITHONIA DIVERSIFOLIA* (HEMSL.) A. GRAY EN LA COMUNIDAD MICROBIANA RUMINAL DE MACHOS VACUNOS SIBONEY DE CUBA

EFFECT OF A SILVOPASTORAL SYSTEM WITH *TITHONIA DIVERSIFOLIA* (HEMSL.) A. GRAY ON THE RUMINAL MICROBIAL COMMUNITY OF SIBONEY DE CUBA MALE CATTLE

✉ JUANA L. GALINDO BLANCO*, ✉ J. IRAOLA JEREZ, ✉ MAGALY HERRERA VILAFRANCA

Instituto de Ciencia Animal, Carretera Central, km 47½, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

*Email: juanaluzgblanco@gmail.com

Para evaluar el efecto del silvopastoreo con *Tithonia diversifolia* en la comunidad microbiana ruminal de vacunos del genotipo Siboney de Cuba en crecimiento-ceba, se utilizaron 24 animales machos enteros. Se establecieron dos tratamientos: 1) pastoreo en gramíneas mejoradas y naturales y 2) pastoreo en sistema silvopastoril de gramíneas *T. diversifolia*, asociada en 100 % del área. Los animales pastaron 24 horas en 10 hectáreas (ha) de gramíneas mejoradas, divididas en dos sistemas de 5 ha cada uno. La proteína cruda en el tratamiento control fue 9.54 %, mientras que en el SSP fue 10.5 % en la gramínea y 22.7 % en *Tithonia*. En el rumen de los animales que pastaron en el SSP con *Tithonia*, el número de bacterias viables totales fue más numeroso ($p < 0.0001$), mientras que las proteolíticas fueron 47.17×10^5 UFC/mL y las del tratamiento control, 19.42×10^5 UFC/mL, que representa 2.43 veces menos bacterias. No se encontró efectos en el número de hongos celulolíticos. El sistema silvopastoril incrementó el número de bacterias celulolíticas y los protozoos se redujeron 3.5 veces. La producción de metano fue 37.0472 g/kg de MO digerida con las gramíneas y en el SSP con *Tithonia* de 34.788 g/kg de MO digerida. Se concluye que la comunidad microbiana del rumen de vacunos enteros Holstein x Cebú que pastan en SSP con *Tithonia* presentó mayor número de bacterias viables totales, proteolíticas, celulolíticas, menor número de protozoos y menos CH₄ con respecto al control que pastó en áreas de gramíneas.

Palabras clave: bacterias celulolíticas, bacterias proteolíticas, bacterias totales, metano, protozoos

To evaluate the effect of silvopastoral system with *Tithonia diversifolia* on the ruminal microbial community of Siboney de Cuba genotype cattle in growth-fattening, a total of 24 non-castrated animals were used. Two treatments were established: 1) grazing on improved and natural grasses and 2) grazing in a silvopastoral system of *T. diversifolia* grasses, associated in 100 % of the area. The animals grazed for 24 hours on 10 hectares (ha) of improved grasses, divided into two systems of 5 ha each. The crude protein in the control treatment was 9.54 %, while in the SPS it was 10.5 % in the grass and 22.7 % in *Tithonia*. In the rumen of animals that grazed in the SPS with *Tithonia*, the total number of viable bacteria was higher ($p < 0.0001$), while the proteolytic bacteria were 47.17×10^5 CFU/mL and those of the control treatment, 19.42×10^5 CFU/mL, which represents 2.43 times fewer bacteria. There were no effects on the number of cellulolytic fungi. The silvopastoral system increased the number of cellulolytic bacteria and the protozoa were reduced 3.5 times. Methane production was 37.0472 g/kg of digested OM with grasses and in the SPS with *Tithonia* 34.788 g/kg of digested OM. It is concluded that the rumen microbial community of Holstein x Zebu non-castrated cattle that grazed in SPS with *Tithonia* showed a higher number of total viable bacteria, proteolytic bacteria, cellulolytic bacteria, a lower number of protozoa and less CH₄ compared to the control that grazed in grass areas.

Key words: cellulolytic bacteria, proteolytic bacteria, total bacteria, methane, protozoa

Recibido: 05 de mayo de 2025

Aceptado: 03 de septiembre de 2025

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Declaración de contribución de autoría CRediT: Conceptualización, Investigación, Curación de datos, Redacción - documento original: Juana L. Galindo Blanco. Conceptualización, Investigación, Curación de datos: J. Iraola Jerez. Conceptualización, Análisis formal: Magaly Herrera Villafranca.



Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



Introducción

Los rumiantes presentan un consorcio de microorganismos en su rumen-retículo capaz de fermentar los alimentos, principalmente los fibrosos (da Silva-Macedo et al. 2022 y Pazla et al. 2024). En la actualidad, se realizan esfuerzos encaminados a diversificar la oferta forrajera y se promueven los sistemas silvopastoriles con este propósito. *T. diversifolia* (Hemsl.). Gray, es una planta herbácea de la familia Compositae (Asteracea), originaria de Centro América y naturalizada en Cuba. Esta especie tiene características promisorias para la producción animal, mejora el ambiente y se adapta a diversas condiciones climáticas (Rai et al. 2023 y Hernández-Arboleda et al. 2024).

Tithonia diversifolia es una especie multifuncional, con tolerancia a diversas afectaciones del suelo, entre las que se relacionan la baja fertilidad, la acidez y los bajos niveles de fósforo (dos Santos Silva et al. 2021). Sus propiedades la identifican con principios farmacológicos, que le otorgan potencialidades como antiinflamatorio, antibacteriano, antitumoral y antipalúdica (Zhao et al. 2020), debido a una variada composición de metabolitos secundarios. La referida planta ofrece abundante biomasa, con valores desde 14.4 hasta 30.6 t MS/ha, definidos por la variedad (Guatusmal-Gelpud et al. 2020), condiciones de crecimiento y atenciones culturales (dos Santos Silva et al. 2021).

Entre sus características nutricionales se destaca el contenido de proteína, carbohidratos solubles y el nivel de taninos, condiciones de gran importancia, debido a que estos componentes pueden ayudar a mejorar el balance alimentario en cuanto al aporte de energía y proteína en la dieta del ganado lechero (Argüello et al. 2020 y Rivera et al. 2021). Además de contribuir a mejorar el balance ruminal e incrementar la eficiencia para la transformación del amoníaco en proteína microbiana. Esto implicaría menores costos energéticos por pérdidas de amoníaco, CH₄ y CO₂ ruminales, aspecto que disminuye la posible contaminación ambiental.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de un silvopastoreo con *T. diversifolia* en la comunidad microbiana del rumen de machos enteros Siboney de Cuba, destinados a la producción de carne de res.

Materiales y Métodos

Localización: El experimento se desarrolló en el Cebadero Ayala del Instituto de Ciencia Animal (ICA). Esta finca se encuentra ubicada en los 22° 53' de latitud norte, a los 82° 02' de longitud oeste y 92 m s.n.m., pertenece al municipio San José de las Lajas, provincia Mayabeque, República de Cuba. El estudio respondió a las normas de ética de la comisión de la granja experimental del ICA para el trabajo con animales. Se aprobó con el código del proyecto PN131LH001 49. Los animales no tuvieron intervención sanitaria durante el experimento.

Características edafoclimáticas: Las condiciones climáticas de la región se caracterizaron por temperatura media anual de 24.86 °C, con los valores más altos en junio (27.17 °C) y agosto (27.48 °C), con máximas entre 32.65 °C y 33.48 °C. Diciembre, enero y febrero presentaron los menores valores de temperatura media (22.18, 21.47 y 22.50 °C, respectivamente), con mínimas por debajo de los 17 °C y, en algunos días, con registros de 5 a 10 °C.

La precipitación anual fue de 1361 mm y de mayo a octubre se registró 77.13 % de las precipitaciones anuales, con promedio mensual de 174.95 mm, mientras que de noviembre a abril ocurrió 22.92 % con promedio por meses de 51.99 mm. La humedad relativa promedio anual fue del 80.88 % y sus valores extremos se presentaron en marzo (77.15 %) y junio (82.86 %) (datos tomados de la Estación Meteorológica del Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque).

Animales: Se utilizaron 24 machos enteros de un grupo genético Siboney de Cuba (5/8Holstein x 3/8Cebú) en la etapa de crecimiento-ceba, añojos de 12 meses de edad. Iniciaron el experimento con 198 kg de PV y finalizaron con 414 kg. Pastaron durante 24 h en 10 ha de gramíneas mejoradas (*Cynodon nlemfuensis*) y gramíneas naturales (*Paspalum notatum*, *Sporobolus indicus* y *Dichanthium sp*), divididas en dos sistemas de 5 ha, uno con gramíneas y el otro conformado por un sistema silvopastoril (SSP) de gramíneas - *T. diversifolia* asociada en 100 % del área.

Cada sistema se dividió a su vez en ocho potreros de 0.63 ha, con libre acceso a los abrevaderos y saleros. El pastoreo se estableció con 42 d de reposo, seis días de ocupación en cada potrero y carga de 2.40 animal/ha. Los tratamientos fueron: control 1) pastoreo a voluntad de gramíneas + sales minerales y un grupo experimental 2) pastoreo a voluntad del SSP *T. diversifolia* + sales minerales.

Tratamientos: Se compararon los tratamientos 1) pastoreo en gramíneas mejoradas (*C. nlemfuensis*) y gramíneas naturales (*P. notatum*, *S. indicus* y *Dichanthium sp*) y 2) pastoreo en un SSP de gramíneas - *T. diversifolia* asociada en 100 % del área.

En el SSP se utilizó el material vegetativo (MV) No. 10 de *T. diversifolia*, propuesto por Ruiz et al. (2010) para su utilización en pastoreo. Galindo et al. (2018) informaron que el MV 10, junto al MV 23 de *T. diversifolia*, fueron entre doce materiales los que produjeron menos metanógenos y protozoos en el rumen. El peso inicial de los animales fue homogéneo en la categoría de añojos (animales de un año).

Muestras: Se realizaron muestreos de líquido ruminal a cada animal vía sonda esofágica. Todos los muestreos coincidieron con los días de pesaje de los animales, una vez al mes. Para ello se seleccionaron, cada vez, dos animales de cada tratamiento. Las muestras de líquido ruminal se trasladaron al laboratorio de bioquímica y microbiología del rumen, ubicado en la Unidad Central de Laboratorios del

ICA, con el auxilio de termos herméticamente cerrados para mantener la temperatura y las condiciones de anaerobiosis del líquido ruminal. El contenido de los termos se filtró a través de muselina- Se efectuaron preservaciones para las determinaciones seleccionadas y se tomaron muestras para la siembra de microorganismos del rumen.

Mediciones: Se determinaron los siguientes indicadores microbiológicos: número de bacterias viables totales, celulolíticas, proteolíticas, hongos celulolíticos y protozoos. Para el cultivo de microorganismos del rumen, se utilizó la técnica de cultivo de [Hungate \(1950\)](#) en tubos rodados y bajo condiciones de anaerobiosis estricta. La siembra de bacterias viables totales, celulolíticas y proteolíticas se efectuó en los medios de cultivo de [Caldwell y Bryant \(1966\)](#), modificado por [Eliás \(1971\)](#). En el caso de las bacterias proteolíticas, se adicionó 10 % de leche descremada estéril, según [Galindo \(1988\)](#). En la determinación del número de hongos se empleó el medio de cultivo de [Joblin \(1981\)](#). Para las inoculaciones de los microorganismos se utilizaron tres diluciones, y cada una de ellas se replicó tres veces. Los conteos de colonias de bacterias viables totales, celulolíticas, proteolíticas y hongos se realizaron mediante la colocación de los tubos rodados bajo una lupa y se contaron las colonias que presentaron halo de digestión ([Galindo 1988](#)). Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonia (UFC) para las bacterias y en unidades formadoras de talo (UFT) para los hongos.

Conteo de protozoos del rumen: 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 realizar los conteos de protozoos, las muestras de líquido ruminal se preservaron en una solución de formol al 10 % en una dilución 1:1 (v/v).

Determinación de la composición química de los alimentos: El análisis de la composición química de los alimentos que consumieron los animales se realizó según las técnicas descritas por la [AOAC \(2016\)](#). Las fracciones fibrosas se analizaron por el procedimiento de [Goering y van Soest \(1970\)](#). La [tabla 1](#) muestra la composición química de cada una de las dietas.

En este experimento no fue posible determinar la concentración de metano, razones que condujeron a su estimación a partir de la ecuación de [Sauvant et al. \(2011\)](#), al considerar que la producción de metano que se produce en el

rumen se encuentra en relación con el contenido en PC de los alimentos que consumen los animales. Esto es: $CH_4, \text{ g/kg de MO digerida} = 40.1 - (0.32 \times PC) \% \text{ de MS}$.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado.

Tratamiento estadístico a los conteos de microorganismos: Los conteos de microorganismos viables se transformaron según Log N para garantizar las condiciones de normalidad en la curva de crecimiento microbiano.

Para el análisis se aplicó la fórmula $(K+N).10X$ donde:

K: constante que representa el logaritmo de la dilución donde se inoculó el microorganismo

N: logaritmo del conteo de colonias, determinado como UFC/mL, UFT/mL, o células/mL

10 es la base de los logaritmos

X: dilución a la cual se efectuó la inoculación ([Galindo 1988](#))

Análisis estadístico: Se verificaron los supuestos teóricos del análisis de varianza para las variables originales bacterias totales, celulolíticas, hongos, bacterias proteolíticas y protozoos. Para la homogeneidad de varianza de los tratamientos, se aplicó la dócima de [Levene \(1960\)](#). La normalidad de los errores se analizó mediante la dócima de [Shapiro-Wilk \(1965\)](#), ambos supuestos fueron incumplidos, por lo que se empleó el modelo lineal generalizado mixto con ayuda del procedimiento GLIMMIX del [SAS \(2007\)](#).

En el modelo se consideró como efectos fijos los tratamientos, como efecto aleatorio las repeticiones de líquido ruminal y el sujeto fue el animal. Para conocer el comportamiento de los datos se probaron las distribuciones Normal, Poisson, log normal, Igauss y Gamma. En el caso de las bacterias totales, celulolíticas, hongos y protozoos, la de mejor ajuste fue Igauss y para las bacterias proteolíticas Gamma, ambas distribuciones con función de enlace log.

Se probaron las estructuras de varianza-covarianza Toeplitz (Toep), componente de varianza (VC), simetría compuesta (CS), auto regresiva de orden 1 (AR [1]) y no estructurada (UN), con mejor comportamiento la Toep. Para la selección de la estructura de mejor ajuste a los datos, se utilizaron los criterios de información [Akaike (AIC), Akaike corregido (AICC) y Bayesiano (BIC)], para lo que se consideró el valor más pequeño. Para la comparación de medias, se aplicó la dócima de rango fijo ([Kramer 1956](#)). Los datos se analizaron con el paquete estadístico [SAS \(2013\)](#), versión 9.3.

Tabla 1. Composición química de las dietas experimentales

Indicadores, %	Tratamiento 1 (control)	Tratamiento 2 (SSP con <i>T. diversifolia</i>)	
	pasturas	pasturas	<i>T. diversifolia</i>
Materia seca, MS	35.2	33.1	19.6
Cenizas	13.4	11.5	16.8
Proteína cruda, PC	9.54	10.5	22.7
Fibra detergente neutro, FDN	71.8	70.3	56.9
Fibra detergente ácido, FDA	38.3	39.6	33.7

Resultados y Discusión

En la **tabla 2** se presentan los resultados de las bacterias viables totales, proteolíticas y hongos celulolíticos del rumen. Se observó en el rumen de los animales que estuvieron en el SSP con *T. diversifolia*, que el número de bacterias viables totales fue más numeroso ($p < 0.0001$) que en el rumen de aquellos que se mantuvieron pastando en la mezcla gramíneas mejoradas. Los valores de las poblaciones fueron 17.20 y 27.98×10^{11} UFC/mL para el sistema de gramíneas y SSP, respectivamente.

Galindo-Blanco et al. (2018) encontraron incrementos en el número total de bacterias viables, que se atribuyeron al efecto defaunante que produce este vegetal, como consecuencia de relaciones ecológicas de predación que ejercen los protozoarios sobre las bacterias viables totales. Sin embargo, al evaluar diferentes materiales vegetales o ecotipos, se encontraron diferencias entre los mismos (Galindo et al. 2022). Al reducir la población protozoaria, el número total de bacterias se ven favorecidas. En otros experimentos se ha observado reducción, lo cual se puede atribuir a los metabolitos secundarios de *T. diversifolia* y a otras relaciones ecológicas más complejas que existen en el órgano.

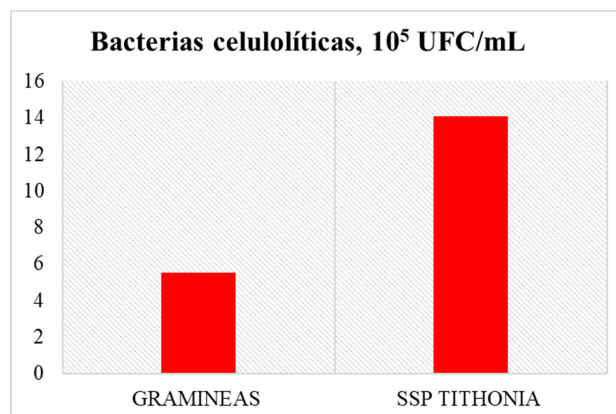
En el rumen de los animales que estuvieron en el SSP, el número de bacterias proteolíticas fue 47.17×10^5 UFC/mL, mientras que aquellos que pastaron en el tratamiento control, la población fue de 19.42×10^5 UFC/mL, lo que representa 2.43 veces menos bacterias que degradan las proteínas.

En el presente experimento no se encontró efectos debido al sistema de alimentación en el número de hongos celulolíticos ruminales (**tabla 2**). Al respecto se debe informar 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 estudios anteriormente realizados por Galindo-Blanco et al. (2018) y Galindo et al. (2022) se ha encontrado que el

efecto de Tithonia en la población de hongos celulolíticos del rumen varía en dependencia con la variedad cultivable y otros factores, como la edad del vegetal, aspectos que se encuentran en fase de estudios.

El número de bacterias celulolíticas se modificó como consecuencia del efecto del SSP con Tithonia. En la **figura 1** se muestra que las poblaciones de estos organismos celulolíticos fueron 5.55 y 14.10×10^5 UFC/mL, para el control y el SSP, respectivamente ($p < 0.0001$).



Datos transformados: Gramíneas 1.71 y SSP con Tithonia 2.55 UFC/mL; Medias originales 5.55 UFC/mL y 14.10 UFC/mL para gramíneas y Tithonia, respectivamente; EE (\pm) 0.16, $p < 0.0001$ **Figura 1.** Efecto del pastoreo en SSP con *T. diversifolia* en el número de bacterias celulolíticas del rumen (10^5 UFC/mL)

La evaluación de la dinámica poblacional de las bacterias celulolíticas del rumen ha sido objeto de estudio desde el 2012, cuando se iniciaron los primeros estudios con esta planta. Se ha encontrado incrementos, los que varían con el material vegetal y el tiempo de corte. Es de importancia destacar que el mayor valor nutritivo de este vegetal contribuye de manera destacada a la obtención de estos resultados. En estudios mostrados por Ruiz et al. (2017) con materiales de *T. diversifolia* colectados en la región occidental de Cuba en el año 2006 y posteriormente en el 2015 en la región oriental se obtuvieron resultados similares.

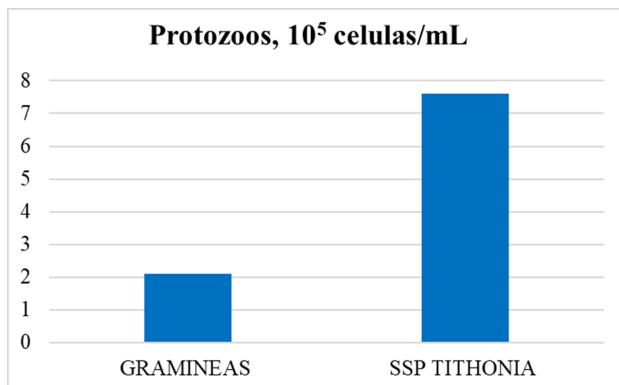
Tabla 2. Efecto del SSP con *T. diversifolia* en el número de bacterias viables totales, proteolíticas y hongos celulolíticos del rumen.

Tratamientos	Gramíneas mejoradas +naturales	Gramíneas mejoradas +Tithonia	EE (\pm), Signif.
Grupos microbianos			
Número de bacterias viables totales, 10^{11} UFC/mL	2.84 (17.20)	3.33 (27.98)	0.12 $p = 0.0001$
Número de hongos, 10^2 UFT/mL	2.21 (9.12)	2.20 (9.03)	0.14 $p = 0.9442$
Número de bacterias proteolíticas, 10^2 UFC/mL	2.97 (19.42)	3.85 (47.17)	0.11 $p < 0.0001$

UFC/mL: unidades formadoras de colonias por mililitro de líquido ruminal, UFT/mL: unidades formadoras de talo por mililitro de líquido ruminal. Valores entre paréntesis son las medias originales del número de poblaciones microbianas.

Al realizar un análisis integral acerca del efecto del SSP en el número bacterias celulolíticas, se puede informar que estos materiales vegetales propician mayor degradabilidad de la fibra, aspecto de vital importancia en la evaluación de fuentes fibrosas, pues aunque *T. diversifolia* presenta alto contenido en PC, la presencia en fibra la ubica como fuente fibrosa, razones que requiere que sea degradada a nivel ruminal por los microorganismos que tienen esa capacidad.

En la figura 2 se muestra que el número de protozoos del rumen se redujo 3.5 veces cuando los animales pastaron en el SSP. Este efecto no es un hecho aislado, ya que se ha demostrado que en los materiales vegetales de *T. diversifolia* colectados en la región occidental y oriental de Cuba, así como en más de 20 arbustos y árboles leguminosos o no, existen menores poblaciones protozoarias. Entre las ventajas de la reducción protozoaria o defaunación se encuentran el incremento de la población de microorganismos celulolíticos, la estabilización del pH del rumen, el decrecimiento del amoníaco libre, la reducción de la metanogénesis y el incremento en la eficiencia de utilización digestiva de diferentes dietas, fundamentalmente las fibrosas (Dai y Faciola 2019). Estos resultados coinciden con los expuestos por Króliczewska et al. (2023), en los que 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. Palangi y Lackner (2022) informaron 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.



Datos transformados: Gramíneas 2.03 y SSP con Tithonia 0.76, Medias originales 7.58 gramíneas y 2.16 SSP con Tithonia, EE (±) 0.10, p<0.0001

Figura 2. Efecto del pastoreo en SSP con Tithonia en el número de protozoos del rumen

Al considerar los resultados del contenido en PC que se muestran en la tabla 1, la producción de metano (CH₄) para el tratamiento de gramíneas fue 37.0472 g/kg

de MO digerida y para el SSP con *T. diversifolia*, de 34.788 g/kg de MO digerida. Resultados similares informaron Delgado et al. (2011), Galindo et al. (2018) y Pérez-Can et al. (2021) cuando se evaluaron follajes de diferentes plantas tropicales. Estos autores encontraron que *Leucaena leucocephala* y *T. diversifolia* 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. Sin embargo, al parecer, el mecanismo de acción es diferente en cada ocasión.

Conclusiones

Se concluye que la comunidad microbiana del rumen de vacunos enteros Holstein x Cebú, que pastan en un sistema silvopastoril con *T. diversifolia*, presentó mayor población de bacterias viables totales, proteolíticas, celulolíticas, menor población de protozoos y menos CH₄ con respecto al control que pastó en áreas de gramíneas.

Agradecimientos

Se agradece la valiosa colaboración de los técnicos Onidia Moreira, Aned Capó, Ybeth Orta, Jorge Luis Hernández y Lucía Sarduy en la ejecución de la investigación.

Referencias

- AOAC. 2016. Official methods of analysis of AOAC International. 20 ed., Rockville MD: AOAC International., Latimer, George W. Jr., ISBN: 9780935584875. <http://www.worldcat.org/title/official-methods-of-analysis-of-aoac-international/oclc/981578728?referer=null&ht=edition>.
- Argüello, R., Mahecha- Ledesma, L. & Angulo- Arizala, J. 2020. Perl 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.
- Caldwell, D.R. & Bryant, M.P. 1966. Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Applied Microbiology*, 14(5): 794-801, ISSN: 2717-5936. <https://doi.org/10.1128/am.14.5.794-801>.
- Dai, X. & Faciola, A.P. 2019. Evaluating strategies to reduce ruminal protozoa and their impacts on nutrient utilization and animal performance in ruminants - A meta analysis. *Frontiers in Microbiology*, 10: 2648, ISSN: 1664-302X. <https://doi.org/10.1007/sl.1250-011-0045-5>.
- 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 and Production*, 44(5): 1097-1104, ISSN: 1573-7438. <https://doi.org/10.1007/sl.1250-011-0045-5>.
- dos Santos Silva, A.M., Santos, M.V., da Silva, L.D., dos Santos, J.B., Ferreira, E.A. & Santos, L.D.T. 2021. Effects of irrigation and nitrogen fertilization rates on yield, agronomic efficiency and morphophysiology in *Tithonia diversifolia*. *Agricultural Water Management*, 248: 106782, ISSN: 1873-2283. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.106782>.
- Elías, A. 1971. The rumen bacteria of animals fed on a high-molasses urea diet. Thesis PhD. Aberdeen.
- Galindo, J. 1988. Efecto de la Zeolita en la población microbiana ruminal de vacas que consumen ensilaje. Tesis DrC. Instituto de Ciencia Animal. La Habana.
- Galindo, J., González, N., Ruiz, T., Herrera, M., Moreira, O., Capó, A. & Díaz, H. 2022. Effect of three collections of *Tithonia diversifolia* on the ruminal microbial population of cattle. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 56(1): 1-12, ISSN: 2079-3480. <https://cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/1039>.
- Galindo, J.L., La O, O., Ruiz, T., González, A. & Narváez, W. 2018. Efecto de diferentes materiales vegetales de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray en la población de metanógenos y protozoos del rumen. *Revista UNESUM-Ciencias. Revista Científica Multidisciplinaria*, 2(3): 98, ISSN: 2602-8166. <https://doi.org/10.47230/unesum-ciencias.v2.n3.2018.98>.
- 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. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942018000400006&Ing=es&tIng=es.
- Goering, H.K. & Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). US. Agricultural Research Service. 20p.
- Guatusmal-Gelpud, C., Escobar-Pachajoa, L.D., Meneses-Buitrago, D.H., Cardona-Iglesias, J.L. & Castro-Rincón, E. 2020. Production and quality of *Tithonia diversifolia* and *Sambucus nigra* high andean colombian tropic. *Agronomía Mesoamericana*, 31(1): 193-208, ISSN: 2215-3608. <https://doi.org/10.15517/ma.v31i1.36677>.
- Hernández-Arboleda, X., Ortiz-Grisales, S., Vivas-Arturo, W.F., Fernández-Romay, Y., La O-León, O., Luiz-Abdalla, A., Pérez-Márquez, S. & Ledea Rodríguez, J.L. 2024. Nutritional value and invitro dry matter degradability in Mexican sunflower: *Tithonia diversifolia* Hemsl (Gray). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 27(3): 094, ISSN: 1870-0462. <https://doi.org/10.56369/tsaes.5211>.
- Hungate, R.G. 1950. The anaerobic, mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 14(1): 1-49, ISSN: 2691-9443. <https://doi.org/10.1128/br.14.1.1-49.1950>.
- 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/10.1128/aem.42.6.1119-1122.1981>.
- Kramer, C.Y. 1956. Extension of multiple range tests to group means with unequal numbers of replications. *Biometrics*, 12(3): 307-310, ISSN: 0006-341X. <https://doi.org/10.2307/3001469>.
- Króliczewska, B., Pecka-Kielb, E. & Bujok, J. 2023. Strategies used to reduce methane emissions from ruminants: Controversies and issues. Review. *Agriculture*, 13(3): 602, ISSN: 2077-0472. <https://doi.org/10.3390/agriculture13030602>.
- Levene, H. 1960. Robust tests for the equality of variance. Contributions to Probability and Statistics. Stanford University Press.
- da Silva-Macedo, A.J., Costa-Campos, A., Nascimento-Coutinho, D., Soares-Freitas, C.A., dos Anjos, A.J. & Rocha-Bezerra, L. 2022. Efecto de la dieta sobre los parámetros ruminales y la microbiota ruminal: revisión. *Revista Colombiana de Ciencia Animal (Recia)*, 14(1): e886, ISSN: 2027-4297. <http://doi.org/10.24188/recia.v14.n1.2022.886>.
- Palangi, V. & Lackner, M. 2022. Management of enteric methane emissions in ruminants using feed additives: A Review. *Animals*, 12(24): 3452, ISSN: 2076-2615. <https://doi.org/10.3390/ani12243452>.
- Pazla, R., Jamarum, N., Agustín, F., Arief, A., Elihasridas, E., Ramaiyulis, R., Yanti, G., Ardani, L.R., Sucitra, L.S. & Ikhlas, Z. 2024. Nutrition profile and rumen fermentation of *Tithonia diversifolia* fermented with *Lactobacillus bulgaricus* at different dosis. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 11(1): 146-152, ISSN: 2311-7710. <https://doi.org/10.5455/javar.2024.k759>.
- Pérez-Can, G.E., Tzec-Gamboa, M., Albores-Moreno, S., Sanginés-García, J., Aguilar-Urquizo, 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: e2480, ISSN: 2007-9621. http://scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-62662020000100129&Ing=es&tIng=es.
- Rai, P.K., Soo Lee, S., Bhardwaj, N. & Kim, K-H. 2023. The environmental, socio-economic, and health effects of invasive alien plants: Review on *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray in Asteraceae. *South African Journal of Botany*, 62: 461-480, ISSN: 1727-9321. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.09.038>.
- Rivera, J.E., Ruiz, T.E., Chara, J., Gómez-Leiva, 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. [http://doi.org/10.17138/tgft\(9\)280-291](http://doi.org/10.17138/tgft(9)280-291).
- Ruiz, T.E., Alonso, J., Febles, G.J., Galindo, J.L., Savón, 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. Editores: Chará J, Peri P y Rivera J. IX Congreso Sistemas Silvopastoriles. Aporte a los objetivos de desarrollo sostenible, CIPAV. Cali, Colombia. Fundación CIPAV, pág. 486.
- Ruiz, T.E., Febles, G., Torres, V., González, J., Achang, G., Sarduy, L. & Díaz, H. 2010. Assessment of collected materials of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray in the center-western región of Cuba. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 44(3): 291-296, ISSN: 2079-3480. <https://cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/223>.
- SAS. 2007. SAS/STAT Software. Version 9 Edition, SAS Institute Inc., Cary, NC. Available at: <http://www.sas.com/>.
- SAS 2013. SAS/IML 9.3 User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC. Available at: <http://www.sas.com/>.
- 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. *Productions animales*, 24(5): 433-446, ISSN: 2824-3633. <http://doi.org/10.20870/productions-animales.2011.24.5.3276>.
- Shapiro, S. & Wilk, B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete simples). *Biometrika*, 52(3-4): 591-611, ISSN: 1464-3510. <https://doi.org/10.2307/2333709>.
- Zhao, L., Hu, Z., Li, S., Zhang, L., Yu, P., Zhang, J., Zheng, X., Rahman, S. & Zhang, Z. 2020. Tagitinin A from *Tithonia diversifolia* provides resistance to tomato spotted wilt orthospovirus by inducing systemic resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 169: 104654, ISSN: 1095-9939. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104654>.