

# IN VITRO EVALUATION OF THE ANTIMETHANOGENIC POTENTIAL OF TROPICAL FOLIAGE AS A FEED STRATEGY FOR RUMINANTS

## EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL POTENCIAL ANTIMETANOGÉNICO DE FOLLAJES TROPICALES COMO ESTRATEGIA DE ALIMENTACIÓN PARA RUMIANTES

Ángeles-Mayorga, Y.<sup>1</sup>; Ramírez-Mella, M.<sup>1,2\*</sup>; Mayo-Hernández, R.<sup>3</sup>; Crosby-Galván, M. M.<sup>1</sup>; Ramírez-Briebesca J. E.<sup>1</sup>; Sánchez-Villarreal A.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados Campus Montecillo Programa de Ganadería, Texcoco, Estado de México, México; <sup>2</sup>CONACYT-Colegio de Postgraduados Campus Campeche, Champotón, Campeche, México; <sup>3</sup>Escuela Superior de Ciencias Agropecuarias-Universidad Autónoma de Campeche, Escárcega, Campeche, México; <sup>4</sup>BioSAT-Colegio de Postgraduados Campus Campeche, Champotón, Campeche, México.

\*Autor para correspondencia: monicara@colpos.mx

### ABSTRACT

**Objective:** The objective of this study was to evaluate the effect of the foliage of *Leucaena leucocephala*, *Albizia lebeck*, *Piscidia piscipula* (Fabaceae) and *Guazuma ulmifolia* (Malvaceae) at 30% inclusion on gas production, methane production and dry matter digestibility *in vitro*.

**Design/methodology/approach:** The foliage of *Leucaena leucocephala*, *Albizia lebeck*, *Piscidia piscipula* and *Guazuma ulmifolia*, as well as *Cynodon plectostachyus* (Poaceae) in a foliage/grass ratio of 30:70 was evaluated. The chemical composition of the mixtures and the grass was determined. Dry matter digestibility and gas production were determined *in vitro* at 1, 2, 3, 6, 9, 12, 16, 20 and 24 h of incubation. Methane concentration was determined with NaOH.

**Results:** The mixture with 30% of *Leucaena leucocephala* has the highest crude protein content (14%), while that of *Piscidia piscipula* has the lowest (11%). There were no differences in gas production at different times, nor in the production of methane; however, the incorporation of *Guazuma ulmifolia* and *Piscidia piscipula* did negatively affect the dry matter digestibility, decreasing it by around 9% ( $P < 0.05$ ).

**Limitations on study/implications:** The 30% combination of *Leucaena leucocephala*, *Albizia lebeck*, *Piscidia piscipula* and *Guazuma ulmifolia*, with *Cynodon plectostachyus* did not decrease methane production *in vitro*.

**Findings/conclusions:** The dry matter digestibility was negatively affected when foliage of *Piscidia piscipula* and *Guazuma ulmifolia* was included; nevertheless, it is necessary to confirm the results obtained by conducting *in vivo* studies and evaluating the changes in the ruminal microbiota.

**Key words:** ruminant, greenhouse gases, fodder trees and shrubs.



## RESUMEN

**Objetivo:** El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del follaje de *Leucaena leucocephala*, *Albizia lebbek*, *Piscidia piscipula* (Fabaceae) y *Guazuma ulmifolia* (Malvaceae) al 30% de inclusión sobre la producción de gas, producción de metano y digestibilidad de la materia seca *in vitro*.

**Diseño/metodología/aproximación:** Se determinó la composición química de las mezclas y del pasto *Cynodon plectostachyus* (Poaceae). La digestibilidad de la materia seca y producción de gas se determinaron *in vitro* a las 1, 2, 3, 6, 9, 12, 16, 20 y 24 h de incubación. La concentración de metano se determinó con NaOH.

**Resultados:** La mezcla con 30% de *Leucaena leucocephala* posee el contenido de PC más elevado, mientras que la de *Piscidia piscipula* el más bajo. No hubo diferencias en la producción de gas a los diferentes tiempos, ni tampoco en la producción de metano; sin embargo, la incorporación de *Guazuma ulmifolia* y *Piscidia piscipula* sí afectó negativamente la digestibilidad de la materia seca, disminuyéndola en alrededor de 9% ( $P < 0.05$ ).

**Limitaciones del estudio/implicaciones:** La combinación al 30% de *Leucaena leucocephala*, *Albizia lebbek*, *Piscidia piscipula* y *Guazuma ulmifolia*, con *Cynodon plectostachyus* no disminuyó la producción de metano *in vitro*.

**Hallazgos/conclusiones:** Se afectó negativamente la digestibilidad de la materia seca cuando se incluyó follaje de *Piscidia piscipula* y *Guazuma ulmifolia*; no obstante, se requieren confirmar los resultados obtenidos realizando estudios *in vivo* y evaluando los cambios en la microbiota ruminal.

**Palabras clave:** rumiante; gases de efecto invernadero, árboles y arbustos forrajeros.

metabolitos secundarios presentes en diversas plantas (por ejemplo taninos condensados, saponinas y alcaloides los cuales tienen actividad antimicrobiana y reducen la disponibilidad de hidrógeno) (Hook *et al.*, 2010). Además, se ha comprobado que el follaje de diversos árboles y arbustos forrajeros del trópico, tales como la *Leucaena leucocephala* y *Albizia lebbek* disminuye las emisiones de CH<sub>4</sub> en rumiantes (Delgado *et al.*, 2012). Se ha reportado, además, que el follaje de *Leucaena leucocephala* o *Albizia lebbek*, mezclado al 30% con un pasto tropical produce menos CH<sub>4</sub> que el pasto solo (Delgado *et al.*, 2012); sin embargo, otros estudios indican que la producción de CH<sub>4</sub> aumenta en borregos alimentados hasta con 40% de *Leucaena leucocephala* (Barros-Rodríguez *et al.*, 2015). Bajo este contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del follaje de *Leucaena leucocephala*, *Albizia lebbek*, *Piscidia piscipula* y *Guazuma ulmifolia* al 30% de inclusión sobre la producción de gas, producción de CH<sub>4</sub> y digestibilidad de la materia seca (MS) *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó el follaje de *Leucaena leucocephala*, *Albizia lebbek*, *Piscidia piscipula* y *Guazuma ulmifolia*, así como de *Cynodon plectostachyus*. Las muestras se obtuvieron del Colegio de Postgraduados Campus Campeche, las cuales se secaron a 55 °C entre 48 y 72 h. Posteriormente, se molieron en malla de 1 mm y mezclaron en una proporción follaje/pasto de 30:70. Las mezclas follaje/pasto y el pasto sólo se analizaron para determinar MS, proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE), cenizas (C), fibra detergente ácido (FDA) y fibra detergente neutro (FDN) con técnicas

## INTRODUCCIÓN

La producción de gases de efecto invernadero en la agricultura, principalmente las emisiones de metano (CH<sub>4</sub>) originadas por los rumiantes, contribuyen negativamente al Cambio Climático. De acuerdo con Gerber *et al.* (2013), se prevé un crecimiento demográfico para el año 2050 que alcanzará los 9600 millones de habitantes y, por consiguiente, un incremento del 73% y 58% en el consumo de leche y carne, respectivamente, provocando aumento en la cantidad de gases de efecto invernadero emitidos al ambiente proveniente de actividades ganaderas. Si se reducen las emisiones de CH<sub>4</sub> en los rumiantes, se contribuiría en la disminución de la tasa de calentamiento global. Al respecto, se han usado varias estrategias para reducir estas emisiones, algunas de éstas son el uso de grasas (al inhibir metanógenos y protozoos, hay mayor proporción de propionato frente al acetato); la defaunación de microorganismos del rumen con aditivos químicos (que elimina los metanógenos asociados disminuyendo la producción de hidrógeno para la metalogénesis); cambio en la composición de las dietas (aumento de la tasa de pasaje, mayor cantidad de propionato frente al acetato); uso de monensina (inhibe a los protozoos y las bacterias Gram positivas); así como el uso de diferentes

convencionales. Los tratamientos y su composición química se muestran en el Cuadro 1.

La digestibilidad de la MS y la producción de gas se determinaron *in vitro* a las 1, 2, 3, 6, 9, 12, 16, 20 y 24 h de incubación. Se pesó 0.5 g de cada uno de los tratamientos y se colocaron en viales de 120 mL. Para preparar el inóculo, se recolectó líquido ruminal de tres bovinos y mezcló con las soluciones buffer (Menke y Steingass, 1988). En total se realizaron tres incubaciones en diferentes tiempos, con tres repeticiones en cada una. Se usó el modelo propuesto por Kholif et al. (2017) para calcular volumen máximo ( $V_{max}$ , mL g<sup>-1</sup> MS) y fase lag (h).

La concentración de CH<sub>4</sub> (%) se determinó de manera indirecta (Kholif et al., 2017), tal como sigue: los viales se incubaron como se mencionó anteriormente a los cuales se les midió y recolectó el gas con una jeringa de vidrio de 50 mL. El gas recolectado se depositó en un segundo vial con 80 mL de NaOH (1 N), se agitó y se recolectó nuevamente el gas residual. El NaOH capturó el bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) contenido en el gas de la primera jeringa; así, el gas de la segunda se consideró como CH<sub>4</sub>. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Los resultados se analizaron con el procedimiento GLM de programa estadístico SAS 9.0 (2002) y se realizó la comparación de medias por la prueba de Tukey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición de las diferentes dietas se muestra en el Cuadro 1. Se observan algunas variaciones, principalmente en el contenido de PC, FDN y FDA, lo cual se atribuye a las diferencias en la composición de los diferentes follajes. Por ejemplo, la dieta con 30% de *L. leucocephala* registró el contenido de PC más elevado, debido a que el follaje de ésta contiene hasta 30% de

PC (en base seca) (Sosa-Rubio et al., 2004). De manera contraria, *P. piscipula* contiene alrededor de 13% de PC (López-Herrera et al., 2008), por lo que la combinación con el pasto registró 11% de PC.

El Cuadro 2 muestra los resultados de la cinética de producción de gas, producción y concentración de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> y digestibilidad *in vitro* de la MS. La incorporación al 30% de *L. leucocephala*, *A. lebbeck*, *P. piscipula* y *G. ulmifolia*, con *C. plectostachyus* no afectó la producción de gas. Tampoco afectó la concentración o producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> (g MS<sup>-1</sup> incubada). Sin embargo, la incorporación de *G. ulmifolia* y *P. piscipula* sí afectó negativamente la digestibilidad de la MS, disminuyéndola en alrededor de 9% (P<0.05). Tampoco hubo cambios en la producción de gas en los diferentes tiempos por efecto de alguno de los follajes evaluados (Figura 1).

Estos resultados difieren con los reportados por Delgado et al. (2012), quienes indican que el follaje de *A. lebbeck* y *L. leucocephala*, como suplemento en dietas de baja calidad para rumiantes, disminuye la producción de metano y no se afecta la digestibilidad de la MS cuando se incluyen al 30%. Sin embargo, aunque la incorporación al 30% de *G. ulmifolia* o *P. piscipula* disminuyó la digestibilidad de la MS, ésta se mantuvo dentro del porcentaje normal para dietas a base de forraje (45-50%). En referencia a Barros-Rodríguez et al. (2015) en un estudio con borregos, quienes indican que incluir *L. leucocephala* hasta 40% en la dieta no reduce la producción de metano por unidad de consumo de MS, pero sí fue menor por unidad de ganancia de peso vivo.

Es importante señalar que la mayor parte de los follajes de árboles y arbustos tropicales contienen diversos compuestos bioactivos, que son moléculas activas biológicamente pero no están involucrados en los procesos

**Cuadro 1.** Composición química de las dietas experimentales a base de pasto y de follaje/pasto.

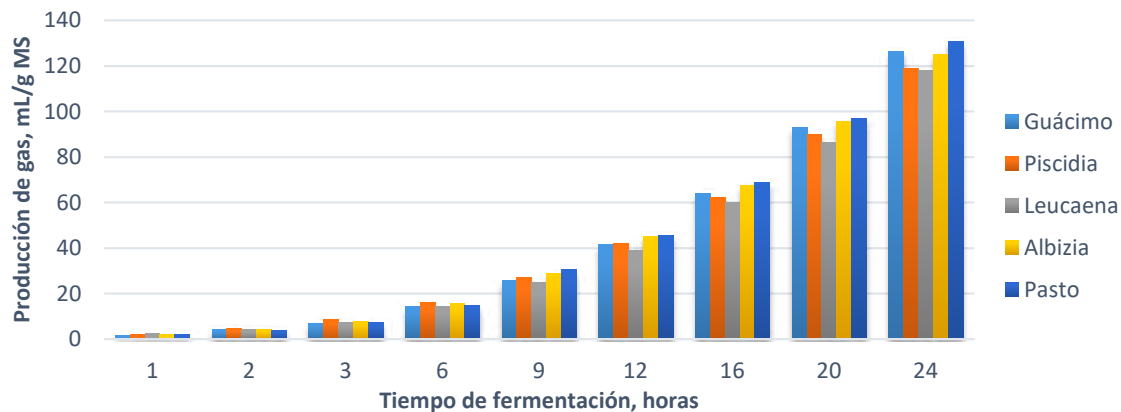
Variable (%)	Tratamiento				
	<i>Cynodon plectostachyus</i> (Pasto)*	<i>Guazuma ulmifolia</i> Pasto**	<i>Piscidia piscipula</i> Pasto**	<i>Leucaena leucocephala</i> Pasto**	<i>Albizia lebbeck</i> Pasto**
PC	10.26	12.09	11.46	14.04	12.24
FDN	78.31	71.43	72.49	71.08	67.92
FDA	39.43	38.99	40.59	37.23	35.98
EE	2.11	3.04	2.54	2.29	2.98
C	7.28	8.19	7.97	6.37	7.53

\* 100% de pasto; \*\* proporción follaje/pasto de 30%:70%. PC: Proteína cruda; FDN: Fibra detergente neutro; FDA: Fibra detergente ácido; EE: Extracto etéreo; C: Cenizas.

**Cuadro 2.** Cinética de gas, concentración y producción de metano y digestibilidad de la materia seca *in vitro* de las dietas experimentales a base de pasto y mezcla follaje/pasto.

Variable	Tratamiento					EE
	<i>Cynodon plectostachyus</i> Pasto*	<i>Guazuma ulmifolia</i> / Pasto**	<i>Piscidia piscipula</i> / Pasto**	<i>Leucaena leucocephala</i> / Pasto**	<i>Albizia lebbbeck</i> / Pasto**	
Vmax, mL/g MS	168.19	159.82	151.71	154.80	153.63	1.56
Tasa, h	0.050	0.051	0.049	0.049	0.050	0.006
Lag, h	7.33	8.00	7.22	7.89	7.08	0.32
DIVMS, %	48.16 <sup>ab</sup>	44.27 <sup>b</sup>	43.64 <sup>b</sup>	45.10 <sup>ab</sup>	49.3 <sup>a</sup>	0.60
CH <sub>4</sub> , %	27.18	30.15	26.13	30.90	26.07	1.56
CO <sub>2</sub> , %	72.82	69.85	73.87	69.10	73.93	1.56
CH <sub>4</sub> , mL/g MS	39.69	47.87	38.85	45.93	37.90	2.03
CO <sub>2</sub> , mL/g MS	128.50	111.96	112.86	108.88	115.73	4.51

<sup>a, b</sup> Superíndices diferentes en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05). \* 100% de pasto; \*\* proporción follaje/pasto de 30%:70%. Vmax: Volumen máximo de producción de gas, 24 h; DIVMS: Digestibilidad *in vitro* de la materia seca a las 24 h; EE: Error estándar.



**Figura 1.** Producción de gas *in vitro* a las 1, 2, 3, 6, 9, 12, 16, 20 y 24 h de fermentación de mezclas (30:70) de *Leucaena leucocephala*, *Albizia lebbbeck*, *Piscidia piscipula* y *Guazuma ulmifolia*, con *Cynodon plectostachyus*.

de crecimiento, desarrollo o reproducción; no obstante, pueden tener alguna actividad en otros organismos, ya sea animales o microorganismos (Bodas *et al.*, 2012). De acuerdo con Delgado *et al.* (2012), el follaje de *A. lebbbeck*, *L. leucocephala* y *G. ulmifolia* posee cantidades moderadas o altas de saponinas, alcaloides, taninos, triterpenos, esteroides y alcaloides. En esta investigación, la disminución en la digestibilidad de la MS pudo deberse al contenido de algún o algunos compuestos bioactivos.

Hay un aspecto muy importante que debe tenerse en cuenta, ya sea en estudios *in vitro* o *in vivo* y consiste en estudiar el ecosistema ruminal, tanto en la identificación de sus poblaciones como su actividad, dado que los microorganismos ruminales son los responsables de la producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>.

Históricamente, la microbiología del rumen se ha estudiado con técnicas de cultivo las cuales han permitido identificar a varias especies de microorganismo ruminales; sin embargo, muchas no son cultivables por lo que aún existen incógnitas respecto a su participación en diversos procesos metabólicos del rumen, incluyendo la producción de CH<sub>4</sub>. Actualmente, las herramientas moleculares incluyendo la genómica, permiten la identificación de los microorganismos del rumen sin la necesidad de cultivarlos, permitiendo tener un panorama del ambiente ruminal bajo diversas condiciones (Espinoza-Velasco *et al.*, 2018). Como ejemplo, Guo *et al.* (2008) evaluaron *in vitro* saponinas de té para disminuir metano y aunque reportaron una reducción del 76% en la expresión del gen *mcrA*, sólo se redujo 8% la producción de metano, a las 24 h de incubación (Figura 2).



## CONCLUSIONES

La combinación al 30% de *L. leucocephala*, *A. lebbek*, *P. piscipula* y *G. ulmifolia*, con *C. plectostachyus* no disminuyó la producción de metano *in vitro*. Además, se afectó negativamente la digestibilidad de la MS cuando se incluyó follaje de *P. piscipula* y *G. ulmifolia*. Es indispensable que se realicen estudios *in vivo* antes de hacer conclusiones con base en resultados obtenidos *in vitro* y, de este modo, comprobar que los follajes de árboles tropicales tienen el potencial de disminuir las emisiones de metano en rumiantes. Además, realizar estudios moleculares de las poblaciones microbianas y de la expresión de genes involucrados en la producción de metano en el rumen permitirá tener un mejor entendimiento de la microbiota ruminal, con lo cual se puedan establecer estrategias efectivas en la disminución de gases de efecto invernadero en rumiantes.

## AGRADECIMIENTOS

Los resultados mostrados forman parte del proyecto 417 "Análisis transcriptómico de la microbiota ruminal de bovinos alimentados con forrajes tropicales y su correlación con la producción de gases de efecto invernadero", de la Convocatoria para atender Problemas Nacionales 2015 de CONACYT, del cual la autora de correspondencia es Responsable Técnico.

## LITERATURA CITADA

- Barros-Rodríguez, M.A., Solorio-Sánchez, F.J., Sandoval-Castro, C.A., Klieve, A., Rojas-Herrera, R.A., Briceño-Poot, E.G., & Ku-Vera, J.C. (2015). Rumen function *in vivo* and *in vitro* in sheep fed *Leucaena leucocephala*. *Tropical Animal Health and Production*, 47, 757-764. doi: 10.1007/s11250-015-0790-y
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., & López, S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176, 78-93. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010
- Delgado, D.C., Galindo, J., González, R., González, N., Scull, I., Dihigo, L., Cairo, J., Aldama A., Moreira, O. (2014). Feeding of tropical trees and shrubs foliages as a strategy to reduce ruminal methanogenesis: studies conducted in Cuba. *Tropical Animal Health and Production*, 44, 1097-1104. doi: 10.1007/s11250-011-0045-5
- Espinoza-Velasco, B., Ramírez-Mella, M., & Sánchez-Villarreal, A. (2018). Elucidando la relación entre la microbiota ruminal y la emisión de gases de efecto invernadero mediante la aplicación de la genómica. *Agroproductividad*, 11, 3-8.
- Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., & Tempio G. (2013). Tackling climate change



Figura 2. Becerras alimentados con follaje de árboles de especies tropicales.

through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.

- Guo, Y.Q., Liu, J.X., Lu, Y., Zhu, W.Y., Denman, S.E., & McSweeney, C.S. (2008). Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 421-426. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02459.x
- Hook, S.E., Wright, A.G., & McBride, B.W. (2010). Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. *Archaea*. doi:10.1155/2010/945785.
- Kholif, A.E., Elghandour, M.M.Y., Rodríguez, G.B., Olafadehan, O.A., & Salem, A.Z.M. (2017). Anaerobic ensiling of raw agricultural waste with a fibrolytic enzyme cocktail as a cleaner and sustainable biological product. *Journal of Cleaner Production*, 142, 2649-2655. doi:10.1016/j.jclepro.2016.11.012
- López-Herrera, M.A., Rivera-Lorca, J.A., Ortega-Reyes, L., Escobedo-Mex, J.G., Magaña-Magaña, M.A., Sanginés-García, J.R., & Sierra-Vazquez, A.C. (2008). Contenido nutritivo y factores antinutricionales de plantas nativas forrajeras del norte de Quintana Roo. *Técnica Pecuaria México*, 46, 205-215.
- Menke, K., & 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.
- Sosa-Rubio, E.E., Pérez-Rodríguez, D., Ortega-Reyes, L., Zapata-Buenfil, G. (2004). Evaluación del potencial forrajero de árboles y arbustos tropicales para la alimentación de ovinos. *Técnica Pecuaria México*, 42, 129-144.