

EFFECT OF THE ADDITION OF TWO LEVELS OF (*Ruta chalepensis* L.) ON *in vitro* METHANE GAS PRODUCTION

EFFECTO DE LA ADICION DE DOS NIVELES DE RUDA (*Ruta chalepensis* L.) SOBRE LA PRODUCCION DE GAS METANO *in vitro*

Rayas-Amor, A.A.^{1*}; Méndez-Manzano, E.²; Cisneros-García, I.²; Cruz-Monterrosa, R.G.¹; Miranda de la Lama, G.C.¹;
Díaz-Ramírez, M.¹; Jiménez-Guzmán, J.¹; García-Garibay, M.¹; Núñez-López, M.³

¹Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Lerma. Departamento de Ciencias de la Alimentación. Av. de las Garzas No. 10, Col. El Panteón Lerma de Villada, Estado de México, C.P. 52005.

²Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Lerma, Licenciatura en Biología Ambiental del Departamento de Ciencias Ambientales. ³ITAM, Departamento de Matemáticas, Río Hondo 1, Ciudad de México 01080, México.

*Autor de correspondencia: a.rayas@correo.ler.uam.mx

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of two levels of rue leaves (*Ruta chalepensis* L.) with different levels of dry matter on the mitigation of methane production (CH₄) and the digestibility of dry matter *in vitro*.

Design/methodology/approach: The treatments evaluated were samples of native grass dominated by Kikuyo grass (*Penisetum clandestinum*) plus the addition of 3 and 6% of rue leaves in relation to a control. The CH₄ was quantified at 12, 24 and 48 h post-incubation.

Results: Significant differences (P<0.01) were found between treatments in all the hours of measurement, with treatments PN0.57 R0%, PN1.19 R3%, PN1.95 R3% and PN2.18 R3% being the ones with lowest production of CH₄ accumulated at 12, 24 and 48 h, respectively.

Study limitations/implications: The results of this study were obtained from an *in vitro* study; therefore, they are not directly applicable to enteric emissions *in vivo*; however, they represent an approximation to how much metabolizable energy can be lost in the form of methane.

Findings/conclusions: The rue leaves showed a mitigation effect of CH₄. In this regard, the treatments PN1.95 R3% and PN2.18 R3% reduced the production rate of CH₄ at 24 and 48 h, by 75% and 95%, in relation to the treatments without rue leaves, and an increase in *in vitro* digestibility of dry matter was observed compared to the treatments without rue leaves.

Keywords: methane, *in vitro*, dry matter level.

RESUMEN

Objetivo: evaluar el efecto de la adición de dos niveles de hojas de ruda (*Ruta chalepensis* L.) con diferentes niveles de materia seca incubada sobre la mitigación de metano (CH₄) y la digestibilidad de la materia seca *in vitro*.

Diseño/metodología/aproximación: Los tratamientos evaluados consistieron en muestras de pasto nativo dominado por pasto kikuyo (*Penisetum clandestinum*) más la adición de 3 y 6% de hoja de ruda respecto a un control. El CH₄ se cuantificó a las 12, 24 y 48 h, post-incubación.

Resultados: se registraron diferencias significativas (P<0.01) entre tratamientos en todas las horas de medición; siendo los tratamientos PN0.57 R0%, PN1.19 R3%, PN1.95 R3% y PN2.18 R3% los que presentaron menor producción acumulada de CH₄ a las 12, 24 y 48 h, respectivamente.

Limitaciones del estudio/implicaciones:

los resultados de este trabajo fueron obtenidos a partir de un estudio *in vitro*; por lo tanto, no son aplicables directamente a las emisiones entéricas *in vivo*, no obstante, se tiene una aproximación de cuanto energía metabolizable se puede perder en forma de metano.

Hallazgos/conclusiones: las hojas de ruda presentaron mayor efecto de mitigación de CH₄. En este tenor, los tratamientos PN1.95 R3% y PN2.18 R3% redujeron en 75% y 95% la tasa de producción de CH₄ a las 24 y 48 h, con respecto a los tratamientos sin hoja de ruda, y se observó un aumento en la digestibilidad *in vitro* de la materia seca cuando se compararon los tratamientos con ruda y los tratamientos sin hoja de ésta.

Palabras clave: metano, *in vitro*, nivel de materia seca

INTRODUCCIÓN

Las emisiones de metano (CH₄) significan pérdida de energía en un sistema de producción pecuario ya que parte de la energía ingerida por los rumiantes es perdida en forma de CH₄, en lugar de ser asimilada por el rumiante y utilizarla para producción de leche y carne. La implementación de dietas que contienen metabolitos secundarios que tienen la capacidad de alterar la población microbiana del rumen y los procesos de fermentación ruminal constituye una alternativa para reducir las emisiones de CH₄ entérico (Valencia *et al.*, 2018). Por lo tanto, el desperdicio de cierta porción de la energía en forma de CH₄, no solamente afecta negativamente al ambiente, sino que también afecta la viabilidad económica del sistema. La ruda se ha utilizado en la medicina tradicional ya que tiene propiedades inhibitorias *in vitro* frente a *Erwinia amylovora*, *E. carotovora*, *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas campestris*. Asimismo, reveló propiedades sobre *Culex quinquefasciatus* y repelentes frente a *Popillia japonica*; y efecto inhibitorio sobre los hongos *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* y *T. mentagrophytes*; así como bacteriostático contra *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* y *Escherichia coli*. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la adición de dos niveles de hojas de ruda (*Ruta chalepensis* L.) con diferentes niveles de materia seca incubada sobre la mitigación de metano y la digestibilidad de la materia seca *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El muestreo se desarrolló en el invernadero de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Unidad Lerma (19° 17' 31.38" N; 99° 30' 06.63" O) a una elevación de 2572 m. Las muestras se secaron en una estufa de aire forzado a 60 °C por 24 h, posteriormente las muestras se molieron con un molino a un tamaño de partícula cercano a los 2 mm (AOAC, 2012). La producción de gas se cuantificó mediante la técnica de producción de gas *in vitro* (Theodorou *et al.*, 1994). El líquido ruminal se colectó de una vaca fistulada, múltipara, raza Holstein con peso promedio de 550 kg y alimentación basada en 100% pradera nativa. La recolección de líquido ruminal se realizó a las 07:00 h, se filtró a través de cuatro capas de tela manta de cielo, y se colocó en un termo calentado previamente a 39 °C, este se transportó rápidamente al laboratorio para la incubación. Se realizaron tres incubaciones por muestra utilizando botellas ámbar de vidrio con capacidad de 120 ml, se incubó aproximadamente 1 g de muestra en cada botella; en cada corrida de incubación se incluyeron cuatro blancos. A cada botella se le adicionaron 90 ml de solución nutritiva (Kansas State) la cual consiste en una solución A (10 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0.5 g L⁻¹ de MgSO₄*7H₂O, 0.5 g L⁻¹ de NaCl, 0.1 g L⁻¹ de CaCl₂*2H₂O, 0.5 g L⁻¹ de urea) y una solución B (9g de Na₂CO₃ y 0.6 g Na₂S*9H₂O diluidos en 60 ml de agua destilada), posteriormente se inoculó con 10 ml de líquido ruminal. La producción de gas metano se cuantificó con un sensor electroquímico acoplado a un analizador portátil (Aeroqual serie 500®) las mediciones se realizaron a las 12, 24 y 48 h post-incubación. La calibración del sensor electroquímico se realizó en fábrica (Aeroqual Limited 109 Valley Road, Mt Eden, Auckland 1024, New Zealand). Se evaluó el efecto de tres especies localizadas comúnmente en el valle de Toluca sobre la mitigación de CH₄ *in vitro*; estas fueron, hoja de ruda (*Ruta chalepensis*), hoja de pino (*Picea abies*) y hoja de higo (*Ficus carica*) ya que tienen propiedades bactericidas o bacteriostáticas. Los datos de producción de metano *in vitro* a las 12, 24 y 48 h, se evaluaron mediante un diseño de bloques completos al azar; donde los tratamientos estuvieron compuestos por el pasto nativo dominado por *Penisetum clandestinum* (80%) y malezas (20%); se le adicionó 3% y 6% de hojas de ruda (Cuadro 1). Adicionalmente se incluyó la pradera nativa como control.

La producción de CH₄ *in vitro* se analizó mediante un diseño de bloques completos al azar. El modelo general lineal fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + e_{ij}$$

donde, Y_{ij} =variable respuesta (CH_4 *in vitro*), μ =media general, α_i =efecto debido al i -ésimo tratamiento, β_j =efecto debido al j -ésimo bloque, e_{ijk} =error experimental del i -ésimo tratamiento en el j -ésimo bloque.

La y la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) a las 48 horas se evaluó mediante un diseño completamente aleatorio. El modelo general lineal fue:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_i$$

donde, Y_i =variable respuesta (CH_4 *in vitro*), μ =media general, α_i =efecto debido al i -ésimo tratamiento, e_i =error experimental del i -ésimo tratamiento.

Cuando se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los tratamientos se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. El análisis estadístico se realizó con el software MINITAB v14.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Cuadro 2 muestra los promedios de la concentración acumulada de CH_4 y la DIVMS cuando el pasto nativo se

incubó con dos niveles de hoja de ruda. Se registraron diferencias significativas ($P < 0.01$) entre tratamientos en todas las horas de medición; siendo los tratamientos PN0.57 R0%, PN1.19 R3%, PN1.95 R3% y PN2.18 R3% los que presentaron menor producción acumulada de CH_4 a las 12, 24 y 48 h, respectivamente. Los tratamientos PN1.95 R3%, PN1.95 R6%, PN2.18 R3%, PN2.18 R6% no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) a las 24 y 48 h.

Cuadro 1. Tratamientos y bloques que componen el diseño estadístico de bloques completos al azar.

Tratamientos	Acrónimo	Bloque (h)
0.57 g de MS sin hoja de ruda	PN0.57 R0%	12
0.57 g de MS más 3% hoja de ruda	PN0.57 R3%	24
0.57 g de MS más 6% hoja de ruda	PN0.57 R6%	48
1.19 g de MS sin hoja de ruda	PN1.19 R0%	
1.19 g de MS más 3% hoja de ruda	PN1.19 R3%	
1.19 g de MS más 6% hoja de ruda	PN1.19 R6%	
1.95 g de MS sin hoja de ruda	PN1.95 R0%	
1.95 g de MS más 3% hoja de ruda	PN1.95 R3%	
1.95 g de MS más 6% hoja de ruda	PN1.95 R6%	
2.18 g de MS sin hoja de ruda	PN2.18 R0%	
2.18 g de MS más 3% hoja de ruda	PN2.18 R3%	
2.18 g de MS más 6% hoja de ruda	PN2.18 R6%	

Los niveles en los tratamientos se adicionaron en base seca con respecto al peso del tratamiento. PN=pastor nativo compuesto por pastor nativo y malezas

Cuadro 2. Efecto de la adición de hojas de ruda, higo y pino sobre la concentración acumulada promedio de metano (CH_4) y la digestibilidad de la materia seca *in vitro* (DIVMS)

Tratamientos	Concentración de CH_4 (g kg^{-1} MS)			DIVMS (g kg^{-1} MS)
	12 h	24 h	48 h	48 h
PN0.57 R0%	0.013 ^{abA} ±0.01	1.0 ^{bbB} ±0.7	7.5 ^{acC} ±0.6	558 ^a ±45
PN0.57 R3%	0.025 ^{abA} ±0.01	2.7 ^{abB} ±0.2	21.7 ^{bcC} ±0.2	591 ^a ±47
PN0.57 R6%	0.084 ^{abA} ±0.02	1.9 ^{abB} ±0.5	24.4 ^{bcC} ±0.6	549 ^a ±13
PN1.19 R0%	0.101 ^{abA} ±0.08	1.8 ^{abB} ±0.1	3.9 ^{acC} ±0.3	496 ^c ±40
PN1.19 R3%	0.051 ^{abA} ±0.04	1.4 ^{abB} ±0.1	2.8 ^{acC} ±0.2	541 ^a ±43
PN1.19 R6%	0.140 ^{baA} ±0.09	1.8 ^{abB} ±0.4	5.7 ^{acC} ±0.1	530 ^a ±30
PN1.95 R0%	0.174 ^{baA} ±0.14	2.4 ^{abB} ±0.2	11.2 ^{acC} ±0.9	439 ^c ±35
PN1.95 R3%	0.166 ^{baA} ±0.13	0.7 ^{bbB} ±0.5	0.9 ^{bbB} ±0.07	612 ^b ±49
PN1.95 R6%	0.184 ^{baA} ±0.02	1.3 ^{abB} ±0.3	1.4 ^{abB} ±0.03	640 ^b ±50
PN2.18 R0%	0.255 ^{baA} ±0.20	4.8 ^{cbB} ±0.4	12.6 ^{acC} ±0.1	498 ^c ±40
PN2.18 R3%	0.205 ^{baA} ±0.16	1.0 ^{bbB} ±0.7	1.4 ^{abB} ±0.1	603 ^b ±48
PN2.18 R6%	0.308 ^{caA} ±0.07	2.0 ^{abB} ±0.5	2.3 ^{abB} ±0.05	627 ^b ±52
EEM	0.2	0.3	2.5	17
Tratamientos	0.001	0.001	0.001	0.01
Bloques	0.011	0.001	0.001	

Tratamientos como se indica en el Cuadro 1. Superíndices en minúsculas refieren a diferencias entre filas y superíndices en mayúsculas refieren a diferencias entre columnas. EEM: error estándar de la media.

La DIVMS presento diferencias significativas entre tratamientos a las 48 h, post-incubación. En general los tratamientos PN0.57 R0%, PN1.19 R0%, PN1.95 R0% y PN2.18 R0% presentaron menor DIVMS que los tratamientos que se les adicionó el 3 y el 6% de hoja de ruda siendo el tratamiento PN1.95 R6% el que presento mayor DIVMS seguido de PN2.18 R6%. Los tratamientos PN0.5 R3% y PN1.19 R3% presentaron mayor digestibilidad con respecto a los tratamientos PN0.5 R0%, PN0.5 R6% y PN1.19 R0%, PN1.19 R6%, respectivamente.

La Figura 1 muestra la tasa de producción de CH₄ por hora con los diferentes niveles de MS. Los tratamientos PN1.95 R3% y PN2.18 R3% redujeron en 75% y 95% la tasa de producción de CH₄ a las 24 y 48 h, con respecto a PN1.95 R0% y PN2.18 R0%, respectivamente y PN1.19 R3% redujo la tasa de producción de CH₄ hasta 33% con respecto a PN1.19 R0% a las 24 h de postincubación. Cuando se incubó 0.57 g MS no se observó efecto de disminución de la tasa de producción de CH₄ ya que el tratamiento PN0.57 R0% mostro la menor tasa de producción de CH₄ hasta las 48 h con respecto a los tratamientos PN0.57 R3% y PN0.57 R6%. Estos resultados sugieren que cuando se incubaba ruda al 3% con mayor cantidad de MS (1.95 g y 2.18 g) el efecto de mitigación en la tasa de producción de CH₄ es mayor que cuando se incubaba a 0.57 g MS.

De acuerdo a la literatura, el presente, es el primer estudio en donde se reporta el efecto de las hojas de ruda sobre la mitigación de CH₄ *in vitro* y la DIVMS. Existen muchas especies de plantas que han sido probadas *in vitro* contra diversas cepas bacterianas, y se ha demostrado que existe un buen número de extractos de plantas y compuestos puros activos contra bacterias gram-positivas y gram-negativas; por ejemplo, en las hojas de ruda se han identificado compuestos tales como cumarinas, flavonoides, esteroides, ésteres, alcohólicos, monoterpénos, sesquiterpenos, compuestos fenólicos, proantocianidinas (taninos condensados) y flavonoides acetilados, alcaloides de piperidina 2,6-disustituidos (Virjamo y Julkunen, 2018). Esta mitigación de CH₄ puede explicarse por dos mecanismos de acción; el primero atribuido a que el uso de compuestos, tales como saponinas, taninos condensados y aceites esenciales reducen la síntesis de CH₄ en el rumen; y el segundo, a la acción conjunta de estos compuestos, que puede ser bacteriostática en lugar de bactericida; ya que pudieron haber inhibido el crecimiento logarítmico del organismo bacteriano que produce el CH₄ entre las 24 y 48 h postincubación (Vera-Ku *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

Las hojas de ruda presentaron mayor efecto de mitigación de

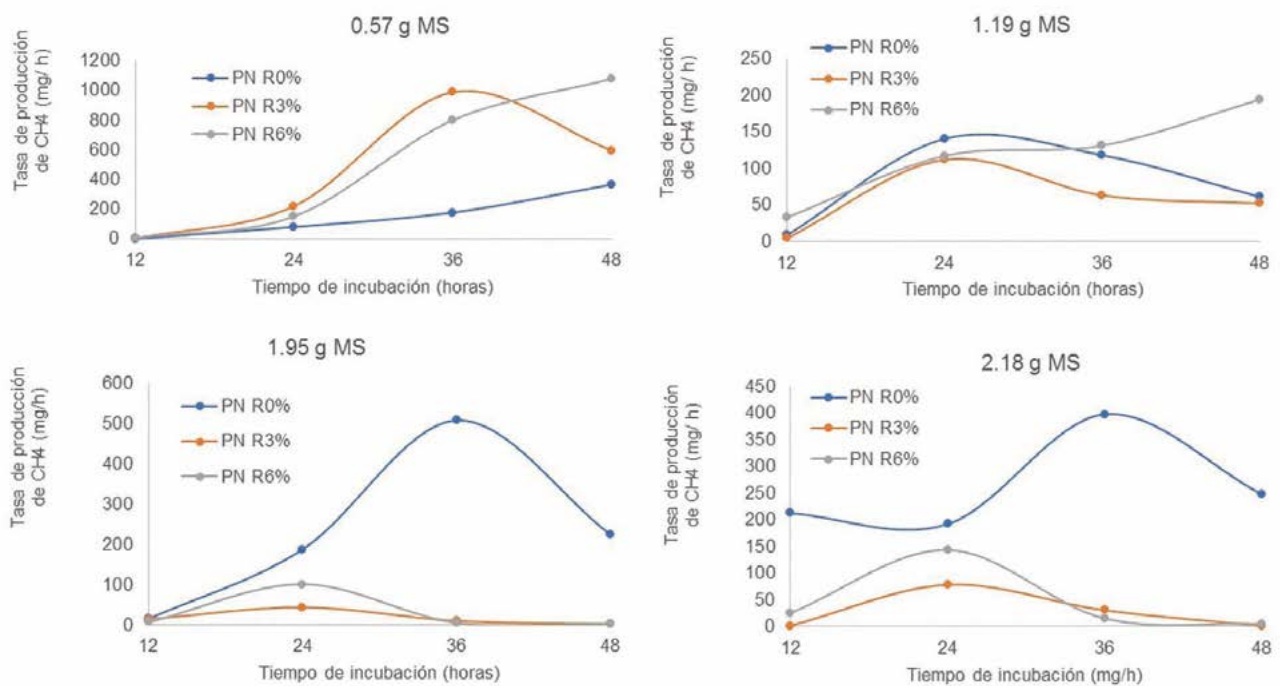


Figura 1. Efecto de la adición de ruda (*Ruta chalepensis* L.), sobre la tasa de producción de CH₄ *in vitro* por hora empleando pradera nativa dominado por *Penisetum clandestinum* (80%) y malezas (20%) como sustrato. PN R0%: pradera nativa sin hoja de ruda, PN R3%: pradera nativa + ruda 3%, PN R6%: pradera nativa + ruda 6%.

CH₄ dependiendo del nivel de materia seca incubada. En este sentido, ambos tratamientos PN1.95 R3% y PN2.18 R3% redujeron en 75% y 95% la tasa de producción de CH₄ a las 24 y 48 h, con respecto a los tratamientos sin hoja de ruda. En cuanto a la digestibilidad *in vitro* de la materia seca se observó un aumento de 5.6%, 7.9%, 28% y 17% en los tratamientos PN0.57 R3%, PN1.19 R3%, PN1.95 R3% y PN2.18 R3%; respectivamente, cuando se compararon con los tratamientos sin hoja de ruda.

LITERATURA CITADA

- AOAC. 2012. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 19th ed. AOAC: International, USA. pp: 34-36.
- Mavlonov G.T., Ubaidullaeva K.A., Rakhmanov M., Abdurakhmonov I. Y., Abdugarimov A. 2008. Chitin-binding antifungal protein from *Ficus carica* latex. Chemistry of Natural Compounds, 44, 216–219.
- Theodorou M.K., Williams B.A., Dhanoa M.S., McAllan A.B., France J.A. 1994. Simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feeds. Anim Feed Sci Technol; 48:185-197.
- Valencia S.S.S., Piñeiro V.A.T., Molina B.I.C., Lazos B.F.J., Uuh N.J.J., Segura C.M.R., Ramírez A.L., Solorio S.F.J., Ku V.J.C. 2018. Potential of Samanea saman pod meal for enteric methane mitigation in crossbred heifers fed low-quality tropical Grass. Agricultural and Forest Meteorology, 258, 108-116.
- Vera-Ku M., Méndez-González M., Moo-Pucc R., Rosado-Vallado M., Simá-Polanco P., Cedillo-Rivera R., Peraza-Sánchez S.R. 2010. Medicinal potions used against infectious bowel diseases in Mayan traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology, 132 (1), 303-308.
- Virjamo V., Julkunen-Tiitto R. 2018. Quality and quantity of piperidine alkaloids in needles and bark of Scotspine (*Pinus sylvestris*) seedlings. Phytochemistry Letters, 26, 106-109.

