



Efecto de una mezcla polihierbal en la producción de metano: estudio *in vitro*

Cesar Díaz Galván¹  , Germán D. Mendoza Martínez  , Pedro A. Hernández García²  ,
Enrique Espinosa Ayala²  , Gabriela Vázquez Silva³  , Pablo B. Razo Ortiz  ,
Adrián Gloria Trujillo  

Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, México.

Effect of a polyherbal mixture on methane production: an *in vitro* study

Abstract. Polyherbal mixtures elaborated with medicinal plants have shown positive effects in the reduction of greenhouse gases. Therefore, the objective of this study was to evaluate a polyherbal mixture elaborated with *Zingiber officinalis*, *Trachyspermum ammi*, *Terminalia chebolic* and *Trigonella foenum-graecum* on *in vitro* fermentation parameters. Pressure and gas volume readings were recorded at 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h, evaluating maximum gas volume, gas production rate, lag phase, dry matter degradability, CH₄ and CO₂. Data were analyzed using a completely randomized design, comparing means with a Tukey test (P<0.05). The observed results show a decrease in digestibility (P=0.0238) as well as an increase in CH₄ production (P=0.03) with the addition of the herbal mixture. Therefore, the use of the polyherbal mixture showed no effect on the decrease in maximum gas volume, CH₄ and CO₂.

Key words: Herbal mixture; ruminal fermentation; methane.

Resumen. Las mezclas polihierbales elaboradas con plantas medicinales han mostrado efectos positivos en la disminución de gases de efecto invernadero. Por lo cual, el objetivo de este estudio fue evaluar una mezcla polihierbal elaborada con *Zingiber officinalis*, *Trachyspermum ammi*, *Terminalia chebolic* y *Trigonella foenum-graecum* en parámetros de fermentación *in vitro*. Se registraron las lecturas de presión y volumen de gas a las 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h, evaluando volumen máximo de gas, tasa de producción de gas, fase lag, degradabilidad de la materia seca, CH₄ y CO₂. Los datos se analizaron mediante un diseño completamente al azar, comparando las medias con una prueba de Tukey (P<0.05). Los resultados observados muestran una disminución en la digestibilidad (P=0.0238) así como un aumento en la producción de CH₄ (P=0.03) con la adición de la mezcla herbal. Por lo tanto, el uso de la mezcla polihierbal no mostró efecto en la disminución de volumen máximo de gas, CH₄ y CO₂.

Palabras clave: Mezcla herbal; fermentación ruminal; metano.

Efeito de uma mistura de polióervas na produção de metano: um estudo *in vitro*

Resumo. As misturas de fitoterápicos feitas com plantas medicinais têm mostrado efeitos positivos na redução de gases de efeito estufa. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar uma mistura de fitoterápicos feita com *Zingiber officinalis*, *Trachyspermum ammi*, *Terminalia chebolic* e *Trigonella foenum-graecum* em parâmetros de fermentação *in vitro*. As leituras de pressão e volume do gás foram registradas em 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h, avaliando o volume máximo de gás, taxa de produção de gás, fase lag, degradabilidade da matéria seca, CH₄ e CO₂. Os dados foram analisados em delineamento inteiramente casualizado, comparando-se as médias com o teste de Tukey (P<0,05). Os resultados observados mostram diminuição da digestibilidade (P=0,0238) e aumento da produção de CH₄ (P=0,03) com a adição da mistura de ervas. Portanto, o uso da mistura de fitoterápicos não apresentou efeito na diminuição do volume máximo de gás, CH₄ e CO₂.

Palavras-chave: Mistura de ervas; fermentação ruminal; metano.

¹ Autor para la correspondencia: cesarwardi14@gmail.com

² Centro Universitario UAEM Amecameca, Universidad Autónoma del Estado de México, Amecameca, Estado de México, México.

³ Laboratorio de Limnobiología y Acuicultura, Departamento el Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, 04960, Ciudad de México.

Introducción

El ganado rumiante presenta un sistema digestivo altamente eficiente capaz de utilizar forrajes fibrosos y convertirlos en productos de alta calidad para la nutrición humana (Knapp *et al.*, 2014; Pulina *et al.*, 2017). Sin embargo, durante este proceso fermentativo se generan gases que son expulsados a la atmósfera causando el efecto invernadero, contribuyendo al calentamiento global (Gerber *et al.*, 2013). Entre estos gases se encuentra el metano, el cual es un gas de efecto invernadero que presenta un potencial de calentamiento 25 veces superior al CO₂ siendo el segundo gas más importante (Dong *et al.*, 2015). Ante esta situación se buscan alternativas nutricionales que ayuden a modular la fermentación ruminal disminuyendo de este modo las emisiones de gases de efecto invernadero, por lo cual ha incrementado el interés del uso de plantas y extractos para mitigar las emisiones de metano ruminal (Woodward *et al.*, 2001; Waghorn *et al.*, 2002) así como el uso de compuestos fitoquímicos como saponinas, taninos y aceites esenciales, los cuales forman parte estructural de plantas y que se les han conferido actividades inmunomoduladores, antimicrobianas, entre otras

(Huang *et al.*, 2018), con efectos positivos en disminución de metano, afectando el proceso de metanogénesis repercutiendo directamente en la población de bacterias metanogénicas (Tan *et al.*, 2011; Saminathan *et al.*, 2016; Ugbohu *et al.*, 2019).

Los estudios experimentales *in vitro* se han utilizado ampliamente para evaluar aditivos alimenticios con potencial en la disminución de gases de efecto invernadero, en este sentido para desarrollar aditivos herbales dado que los metabolitos secundarios de plantas han mostrado su efecto contra una gran diversidad de microorganismos reconociendo su potencial como inhibidores de metanógenos productores de metano (Patra, 2012; Cieslak *et al.*, 2013), sin embargo la eficacia de estos compuestos secundarios varía considerablemente dependiendo del tipo, fuente, dosis y del tipo de dieta (Patra *et al.*, 2017). Por lo anterior el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de una mezcla herbal en la cinética de producción de gas *in vitro*, así como la emisión de CH₄ y CO₂.

Materiales y Métodos

El estudio se realizó en las instalaciones de la Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca, México; en el Laboratorio Multidisciplinario de Investigación. Se empleó una mezcla herbal comercial compuesta por *Zingiber officinalis*, *Trachyspermum ammi*, *Terminalia chebulic* y *Trigonella foenum-graecum*, además de alfalfa (*Medicago sativa*); la cual se empleó como testigo. Se utilizó líquido ruminal colectado de forma prepandeal de dos bovinos con cánula ruminal, alimentados con 50% concentrado y 50% ensilado de maíz, se colocó en un termo a 39 °C y se trasladó al laboratorio donde se preparó con soluciones minerales y agua destilada, con incorporación continua de CO₂. En frascos ámbar (120 ml) se colocaron 500 mg de la mezcla herbal, así como heno de alfalfa como forraje de referencia incorporando 10 y 20 % del producto polihierbal. Se adicionó a cada frasco 90 ml de solución mineral reducida y líquido ruminal (9:1) con flujo constante de CO₂, fueron cerrados herméticamente incubándose a 39 °C.

Se midió la presión de gas a las 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h con un manómetro digital (SSI Technologies, Inc MG-15-A-9V-R). Los valores de presión fueron transformados a volumen de gas con ecuación de regresión lineal. Se estimaron los parámetros volumen máximo de gas (Vol max; ml/g MS), tasa de producción de gas (S, %/h) y fase Lag (L, h), con el modelo de modificado por Schofield (2000) usando el modelo logístico de Pitt *et al.* (1999): $V_0 = V_m / (1 + e^{(2.4 * s * (t_L))})$. A las 24 horas de incubación se filtró con papel Waltham No. 541 y se pesó el residuo para estimar la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS; Elmasry *et al.*, 2018). La emisión de CH₄ y CO₂ se obtuvo por la metodología descrita por Menke y Steingass (1988). Para el análisis estadístico se utilizó un diseño completamente al azar, tres tratamientos con tres repeticiones realizándose por triplicado, la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey empleando el software R (Mirman, 2016) con un nivel de significancia de P<0.05.

Resultados y Discusión

No se observaron efectos significativos en volumen máximo de gas, tasa de producción gas, fase Lag y CO₂ (P>0.05; Cuadro 1). Por su parte Patra y Yu (2012) al emplear aceite esencial de orégano (1.0 g/l) observaron una disminución en volumen de gas del 79.4 % y una

reducción del metano de hasta el 87 %. A su vez Singh *et al.* (2018) compararon plantas compuestas por taninos y saponinas en diferentes niveles (0, 1, 2, 3 %) encontrando variaciones en la producción máxima de gas sin efecto sobre la tasa de producción de gas, del mismo modo Tan

et al. (2011) evaluaron el extracto de taninos condensados de *Leucaena leucocephala in vitro* a dosis de 0, 10, 15, 20, 25 y 30 mg, reportando reducciones en la producción total de gas del 22.9, 30.9, 34.2, 38.4 y 42.3 %, respectivamente al aumentar las dosis, así mismo reportan una disminución en metano del 32.8, 46.9, 57, 59 y 63 %, Agarwal et al. (2009) al emplear aceite esencial de *Mentha piperita* a 0, 0.33, 1.0 y 2.0 µl/ml, reportaron una disminución en metano del 19.9, 46 y 75.6 % al aumentar la dosis, por el

contrario los resultados de este estudio muestran un incremento en la producción de CH₄ (P=0.03) al aumentar la inclusión de la mezcla herbal, esto debido a tal como menciona Patra et al. (2017) la eficacia de los metabolitos secundarios presentes en las plantas en la supresión de la producción de CH₄ varía considerablemente en función del tipo, fuente, peso molecular, dosis, así como el tipo de dieta.

Cuadro 1. Efecto de una mezcla polihierbal compuesta por *Zingiber officinalis*, *Trachyspermum ammi*, *Terminalia chebulic* y *Trigonella foenum-graecum* en producción de gas in vitro.

	Mezcla herbal, %			EEM	P
	0	10	20		
Vol max, ml	135.4	142.1	144.5	5.9100	0.5613
S, %/h	0.058	0.042	0.045	0.0048	0.1198
Lag, h	4.1	2.2	2.3	0.5700	0.1044
DIVMS, %	74.9 ^a	69.2 ^{ab}	65.6 ^b	1.7208	0.0238
CH ₄ , ml	15.1 ^b	31.6 ^a	25.3 ^{ab}	3.2603	0.03
CO ₂ , ml	69.6	55.6	57.2	3.6464	0.0643

Vol máx: producción de gas (ml g⁻¹ MS); S: tasa de producción de gas (ml g⁻¹ MS); Lag: fase Lag (h-1); DIVMS: digestibilidad in vitro de la materia seca; EEM: error estándar de la media; abmedias dentro de cada fila con diferente superíndice son significativamente diferentes, P<0.05

Se observó una disminución en la DIVMS (P=0.02) al aumentar la inclusión de la mezcla herbal, lo cual concuerda con Patra y Yu (2012) quienes observaron en su estudio que al aumentar la inclusión de aceites esenciales la digestibilidad disminuía, esto posiblemente a la presencia de metabolitos secundarios contenidos en las

plantas (saponinas, isoflavonoides, fenoles, α-muurolol, germacreno, γ-cadineno, cariofileno, spathulenol polifenoles, aceites esenciales, p-cimeno y carvacrol) los cuales afectaron directamente a los microorganismos (Vázquez et al., 2016).

Conclusiones

La mezcla polihierbal compuesta por *Zingiber officinalis*, *Trachyspermum ammi*, *Terminalia chebulic* y *Trigonella foenum-graecum* no presentó efecto en la cinética de producción de

gas, así como en disminución de CH₄ y CO₂, por lo cual se sugiere realizar futuras investigaciones para evaluar su efecto en estudios *in vivo*.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Nuproxa México S.A., Nuproxa Suiza e Indian Herbs Co. por abastecer el producto polihierbal para este experimento.

Conflicto de intereses: Los autores manifiestan que no existe ningún tipo de conflicto de intereses.

Literatura Citada

Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L. C., & Kamra, D. N. (2009). Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. Animal Feed Science and Technology, 148(2-4), 321-327. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.04.004>

Cieslak, A., Szumacher-Strabel, M., Stochmal, A., & Oleszek, W. (2013). Plant components with specific activities against rumen methanogens. animal, 7(s2), 253-265. <https://doi.org/10.1017/S1751731113000852>.



- Dong, L. F., Yan, T., Ferris, C. P., McDowell, D. A., & Gordon, A. (2015). Is there a relationship between genetic merit and enteric methane emission rate of lactating Holstein-Friesian dairy cows?. *animal*, 9(11), 1807-1812.
<https://doi.org/10.1017/S1751731115001445>.
- Elmasry, A. M. A., Mendoza, G. D., Miranda, L. A., Martínez, J. A., Vázquez, G., & Plata, F. X. (2018). *In vitro* gas production of high forage diets incubated with two live yeast (Biosaf SC47 and Procreatin 7). *Indian Journal of Animal Sciences*, 88(12), 1409-1411.
- Gerber, P. J., Hristov, A. N., Henderson, B., Makkar, H., Oh, J., Lee, C., Meinen, R., Montes, F., Ott, T., Firkins, J., Rotz, A., Dell, C., Adesogan, A. T., Yang, W. Z., Tricarico, J. M., Kebreab, E., Waghorn, E., Dijkstra, J., & Oosting, S. (2013). Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: A review. *Animal*, 7(s2), 220-234.
<https://doi.org/10.1017/S1751731113000876>.
- Huang, Q., Liu, X., Zhao, G., Hu, T., & Wang, Y. (2018). Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Animal Nutrition*, 4(2):137-150.
<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.004>.
- Knapp, J. R., Laur, G. L., Vadas, P. A., Weiss, W. P., & Tricarico, J. M. (2014). Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3231-3261.
<https://doi.org/10.3168/jds.2013-7234>
- 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.
- Mirman, D. (2016). Growth Curve Analysis and Visualization using R. Chapman & Hall/CRC The R Series. CRC Press. Taylor & Francis Group.
- Patra, A. K. (2012). An overview of antimicrobial properties of different classes of phytochemicals. *Dietary Phytochemicals and Microbes*, 1-32.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-3926-0_1.
- Patra, A. K., & Yu, Z. (2012). Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4271-4280.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00309-12>
- Patra, A., Park, T., Kim, M., & Yu, Z. (2017). Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8, 1-18.
<https://doi.org/10.1186/s40104-017-0145-9>.
- Pitt, R. E., Cross, T. L., Pell, A. N., Schofield, P., & Doane, P. H. (1999). Use of *in vitro* gas production models in ruminal kinetics. *Mathematical Biosciences*, 159(2), 145-163.
- Pulina, G., Francesconi, A. H. D., Stefanon, B., Sevi, A., Calamari, L., Lacetera, N., Dell'Orto, V., Pilla, F., Marsan, P. A., Mele, M., Rossi, F., Bertoni, G., Crovetto, G. M., & Ronchi, B. (2017). Sustainable ruminant production to help feed the planet. *Italian Journal of Animal Science*, 16(1), 140-171.
<https://doi.org/10.1080/1828051X.2016.1260500>
- Saminathan, M., Sieo, C.C., Gan, H.M., Abdullah, N., Wong, C.M.V.L., & Ho, Y.W. (2016). Effects of condensed tannin fractions of different molecular weights on population and diversity of bovine rumen methanogenic archaea *in vitro*, as determined by high-throughput sequencing. *Animal Feed Science and Technology*, 216:146-160.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.04.005>
- Schofield, P. (2000). Gas production methods. In: DMello, J.P.F. (Ed.), *Farm animal metabolism and nutrition*. CAB international, Wallingford, United Kingdom, pp. 319-341.
- Singh, I., Hundal, J. S., Wadhwa, M., & Lamba, J. S. (2018). Assessment of potential of some tannins and saponins containing herbs on digestibility of nutrients, fermentation kinetics and enteric methane production under different feeding systems: An *in vitro* study. *Indian Journal of Animal Sciences*, 88(4), 443-452.
- Tan, H.Y., Sieo, C.C., Abdullah, N., Liang, J.B., Huang, X.D., & Ho, Y.W. (2011). Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 169(3-4):185-193.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.07.004>.

- Ugbogu, E.A., Elghandour, M.M., Ikpeazu, V.O., Buendía, G.R., Molina, O.M., Arunsi, U.O., & Salem, A.Z. (2019). The potential impacts of dietary plant natural products on the sustainable mitigation of methane emission from livestock farming. *Journal of Cleaner Production*, 213:915-925. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.12.233>.
- Vázquez, E. G., Medina, L. H., Benavides, L. M., Caratachea, A. J., Razo, G. S., Burgos, A. J. A., & Rodríguez, R. O. (2015). Effect of fodder tree species with condensed tannin contents on *in vitro* methane production. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(1), 73-79 [https://doi.org/10.1016/S0025-5564\(99\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S0025-5564(99)00020-6).
- Waghorn, G. C., Tavendale, M. H., & Woodfield, D. R. (2002). Methanogenesis from forages fed to sheep. In *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 64:167-171. <https://doi.org/10.33584/jnzg.2002.64.2462>.
- Woodward, S. L., Waghorn, G. C., Ulyatt, M. J., & Lassey, K. R. (2001). Early indications that feeding Lotus will reduce methane emissions from ruminants. In *Proceedings-New Zealand Society of Animal Production*, 61:23-26.