

Efecto del fruto, del pericarpio y del extracto semipurificado de saponinas de *Sapindus saponaria* sobre la fermentación ruminal y la metanogénesis *in vitro* en un sistema RUSITEC

Andrés Abreu¹, Zoot; Juan E Carulla¹, Zoot, MS, PhD; Michael Kreuzer², PhD; Carlos E Lascano³, Zoot, MS, PhD; Tito E Díaz⁴, PhD; Adalgiza Cano⁴, Zoot; Hans-Dieter Hess², PhD

¹Departamento de Producción Animal, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
aas73@gmx.net*

²Institute of Animal Sciences, Animal Nutrition, Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zürich, CH-8092, Zürich, Switzerland
dieter.hess@inw.agrl.ethz.ch

³Proyecto de Gramíneas y Leguminosas, CIAT, Cali, Colombia

⁴Programa Nacional de Fisiología y Nutrición Animal, Corpoica, Bogotá, Colombia

(Recibido: 3 de abril, 2003; aceptado: 24 de junio, 2003)

Resumen

Se realizó un experimento in vitro utilizando un sistema Rumen Simulation Technique (RUSITEC) con el objetivo de evaluar el efecto del fruto completo, del pericarpio y del extracto de saponinas semipurificadas de Sapindus saponaria sobre la fermentación ruminal y la liberación de metano. Como sustrato básico se utilizó una mezcla compuesta por 60% de Brachiaria dictyoneura cv. Llanero (una gramínea de baja calidad) y 40% de hojas de Cratylia argentea (una leguminosa de calidad media), y se observó el efecto de la inclusión de 8% de fruto, 5% de pericarpio ó 1.2% de extracto de saponinas semipurificadas de Sapindus saponaria (pureza aprox. 95%) en base seca. El suministro diario de materia seca se mantuvo constante para la evaluación de los 4 tratamientos durante 2 periodos de 10 días cada uno. Los datos se analizaron como un diseño de bloques completos al azar. No hubo efecto ($p>0.05$) de los tratamientos sobre la concentración de amoníaco en el líquido ruminal. El fruto y el pericarpio redujeron el recuento de protozoos ciliados en 50% con respecto al control ($p<0.05$), mientras el recuento de bacterias fue similar en todos los tratamientos ($p>0.05$). No hubo cambios en la degradación de los nutrientes ($p>0.05$), excepto de fibra en detergente neutro que fue 9.3% menor en el tratamiento con fruto ($p<0.05$). No hubo efecto de los tratamientos sobre la liberación diaria de metano por fermentador ($p>0.05$). Sin embargo, el fruto, el pericarpio y el extracto de saponinas redujeron la liberación de metano por gramo de materia orgánica degradada en 9.5, 5.6, y 4.5% respectivamente ($p<0.05$). La reducción que se observó en la liberación de metano en relación con la cantidad degradada de MO podría traducirse en condiciones prácticas, en una reducción de metano emitido por unidad de proteína animal producida que sería útil aun cuando la cantidad total de metano emitido no disminuya. La reducción significativa de la población de protozoos ciliados confirma el potencial defaunante del fruto completo y del pericarpio de Sapindus saponaria, y aun cuando esto no esté asociado necesariamente con una disminución de la metanogénesis, podría ser beneficioso en otros aspectos, como la utilización del nitrógeno, en los cuales se han reportado efectos positivos de la defaunación completa o parcial.

Palabras clave: *Brachiaria dictyoneura, Cratylia argentea, defaunación, fibra, protozoos.*

Introducción

En países tropicales, en donde se ubica la mayor parte de la población mundial de rumiantes, los sistemas de producción se basan principalmente en pasturas y residuos de cosecha de escaso valor nutritivo. En estas condiciones, la productividad de los animales es baja y, a su vez, la emisión de gas metano, que ejerce un fuerte efecto invernadero, es alta cuando se expresa en relación con la unidad de producto animal (carne o leche), lo cual se debe a la baja digestibilidad y a la deficiencia de nutrientes esenciales (por ejemplo proteína cruda) que se presenta en este tipo de forrajes (11), cuya utilización se puede mejorar modificando la fermentación ruminal a través del manejo de la dieta (uso de leguminosas), o afectando de manera selectiva las poblaciones microbiales del rumen (4, 6, 18).

La eliminación total de los protozoos ciliados del rumen (defaunación) se ha considerado como una alternativa promisoriosa para reducir la metanogénesis (5, 8, 17), puesto que se han descrito interacciones específicas de los protozoos ciliados con metanogénicas endo- y ectosimbióticas (7). Sin embargo, considerando las dificultades que implica la defaunación total en condiciones prácticas de campo (17), se ha propuesto la reducción en vez de la eliminación total de la población de ciliados del rumen como una vía para mejorar la productividad con dietas tropicales (6, 18, 19). Muchas plantas tropicales han desarrollado metabolitos secundarios, probablemente como mecanismo de defensa contra hongos y bacterias patógenas y contra el pastoreo y el ramoneo por herbívoros. Entre estos compuestos se encuentran las saponinas, que ejercen un efecto negativo sobre los protozoos ruminales mientras el resto de la biomasa microbiana del rumen se mantiene inalterada (13). Se ha reportado que tanto el follaje (19, 21) como los frutos (4, 9, 18) de varios arbustos y árboles tropicales y subtropicales multipropósito tienen un efecto adverso sobre los protozoos ruminales. Hess *et al* (8) evaluaron los efectos de los frutos enteros de tres especies arbóreas sobre la fermentación ruminal y la metanogénesis *in vitro*, y solo el fruto de *Sapindus saponaria*, con una concentración de saponinas de 120 g/kg materia seca, redujo significativamente los recuentos de protozoos ciliados y la liberación de metano. En estudios anteriores *in vivo* Díaz (3) y Navas Camacho *et al* (19) suministraron a los animales el pericarpio del fruto de *S. saponaria* y obtuvieron una reducción significativa en los recuentos de

protozoos, que se asoció con un aumento en la eficiencia de la conversión alimenticia (3) y en la ganancia de peso (19). No obstante, la separación del pericarpio del resto del fruto es un proceso muy lento y engorroso, y probablemente no sería práctico en condiciones de campo. El presente trabajo tuvo como objetivo comparar el efecto del fruto completo de *Sapindus saponaria* sobre la metanogénesis y la fermentación ruminal *in vitro* en relación con el pericarpio y el extracto de saponinas semipurificadas, puesto que esto permite establecer si los efectos del fruto se deben solo a las saponinas o a otros componentes del mismo.

Materiales y métodos

Se utilizó un sustrato basal constante de 60% de heno de *Brachiaria dictyoneura* cv. Llanero (CIAT 6133) (una gramínea de baja calidad) y 40% de hojas de *Cratylia argentea* (CIAT 18516 / 18668) (una leguminosa arbustiva de calidad media). Como control se utilizó el sustrato basal sin aditivo. En los otros tratamientos se reemplazó parte del sustrato basal por fruto completo molido de *Sapindus saponaria* (8% de la materia seca), pericarpio del fruto (5%), o extracto semipurificado (pureza aprox. 95%) de saponinas (1.2%). El suministro diario de materia seca se mantuvo constante a 15 g. En general, la composición del sustrato fue similar en los cuatro tratamientos, a excepción de la fracción fibrosa que fue ligeramente menor (-4%) en el tratamiento con fruto en relación con el control, y del contenido estimado de saponinas que fue nulo en el control y alrededor del 1% en los demás tratamientos (véase Tabla 1). Los cuatro tratamientos se evaluaron durante 2 periodos de 10 días c/u (4 días de ajuste y 6 de medición) en un sistema RUSITEC equipado con 8 fermentadores, utilizando dos fermentadores por tratamiento en cada periodo.

Los forrajes provenían de la estación experimental del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en Santander de Quilichao, Cauca. El *Brachiaria dictyoneura* fue cosechado a un tiempo de rebrote de 6 meses y presentó un bajo contenido de proteína cruda (PC, 3% en base seca) y altos contenidos de fibra (78% de fibra en detergente neutro (FDN) y 41% de fibra en detergente ácido (FDA)). La *Cratylia argentea* se cosechó aproximadamente a los 5 meses de rebrote y presentó un alto contenido de PC (18%) y medianos contenidos de fibra (65%

de FDN y 38% de FDA). Los dos forrajes fueron picados y después secados a 60°C por 48 horas. Posteriormente fueron molidos en molino Wiley de cuchillas con malla de 5 mm, y se tamizaron con malla de 0.25 mm. Las partículas finas (< 0.25 mm) se descartaron porque pueden atravesar el poro de las bolsas de incubación del RUSITEC y esto ocasionaría pérdidas de sustrato y llevaría a una sobreestimación de la fracción degradada.

Obtención del extracto semipurificado de saponinas

El extracto semipurificado de saponinas de *Sapindus saponaria* se obtuvo en el laboratorio de Fisiología y Nutrición Animal de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) en Tibaitatá (Bogotá). Los frutos, provenientes de Montería Córdoba (costa norte colombiana), se recolectaron en período de sequía. Se secaron en horno de aire forzado a 60°C hasta peso constante, aproximadamente 48 horas. Se determinó el contenido de humedad y materia seca (105°C por 24 h). El pericarpio se separó de la semilla y se utilizó para la extracción de las saponinas totales. Se molió en molino de martillo con criba de 2 mm. El pericarpio seco y molido (5200 g) se sometió a percolación con etanol al 96% (5 L por 5 veces), hasta agotar la extracción (menos de 2% de MS). El extracto etanólico obtenido se concentró en rotavapor hasta quedar seco (3450 g). Se tomaron 574 g del extracto etanólico seco, se disolvieron en un litro de agua destilada y se extrajeron las saponinas por partición con isobutanol (200 ml por 8 veces), hasta finalizar la extracción de saponinas; para esto, se hizo un seguimiento mediante pruebas de formación de espuma y hemólisis. La fase orgánica isobutanólica corresponde a las saponinas totales, esta fase se concentró en rotavapor hasta sequedad. El extracto isobutanólico se disolvió en 300 ml de metanol y se precipitó con 3 L de éter etílico, se aisló por filtración, nuevamente se disolvió en 300 ml de metanol, se concentró a sequedad, y se obtuvo un polvo de color amarillento, suelto y altamente higroscópico que corresponde a las saponinas totales.

Técnica in vitro y mediciones

La técnica RUSITEC (2,14) se utilizó para monitorear los efectos de los diferentes sustratos sobre la fermentación. Los fermentadores se llenaron con 890 ml de líquido ruminal, obtenido de dos novillos cebú que pastoreaban *Cynodon nlemfuensis* (pasto estrella), filtrado a través de cuatro capas de gasa y 110 ml de saliva artificial (15). Inicialmente se introdujeron 15 g de sustrato experimental en base

seca por fermentador y aproximadamente 60 g de contenido ruminal sólido fresco en bolsas separadas de nylon (NITEX 03-100/32, SEFAR, Heiden, Suiza) con poro de 100 mm y 70 mm ´ 130 mm de tamaño. La tasa de flujo de saliva artificial fue de 500 ml/d en promedio, equivalente a una tasa de dilución de 0.5 l/d. Después de 24 h, las bolsas con contenido ruminal se reemplazaron por bolsas con sustrato. Posteriormente estas bolsas con sustrato que se habían incubado por 48 h se reemplazaron diariamente.

Después de cambiar las bolsas, el aire dentro de los fermentadores se reemplazó por nitrógeno gaseoso para restablecer las condiciones anaeróbicas. Una vez retiradas de los fermentadores, las bolsas se lavaron con agua fría hasta que el agua salía clara. Enseguida los residuos de fermentación se congelaron y se mantuvieron a -20°C para posterior análisis. Los gases de fermentación liberados en cada fermentador se recolectaron en bolsas a prueba de gas (TECOBAG, 5 L, PETP/AL/PE-12/12/75 quality, Tesseraux Container GmbH, Bürstadt, Germany) y el volumen se cuantificó mediante desplazamiento del correspondiente volumen de agua.

En las muestras de gas se determinó el porcentaje de metano (CH₄) por cromatografía de gases (12, 21). Se utilizó un cromatógrafo (GC14A, Shimadzu Corporation, Tokio, Japan) equipado con detector FID (flame ionization detector), una precolumna de 1 m y una columna principal de 3 m, ambas con tubo de 1/8 de pulgada en acero inoxidable relleno con Poropak Q, malla 80. Las temperaturas de la columna, el inyector y el detector fueron 60, 80 y 320°C respectivamente. Se utilizó N₂ (grado 5) como gas de arrastre a una tasa de flujo de 25 ml/min. Los tiempos de retención del CH₄, análisis (lectura) y entre inyecciones fueron de 1.3, 3 y 5 minutos respectivamente. Se utilizó un software (CLASS VP, Shimadzu Corporation, Tokio, Japan) tanto para controlar el funcionamiento del equipo como para procesar las señales generadas por el detector. El gas patrón utilizado para determinar las concentraciones de CH₄ en el gas de fermentación fue de 8.25% de CH₄ (véase Figura 1).

Diariamente, cuatro horas antes de cambiar las bolsas con sustrato, se tomaron muestras del líquido de los fermentadores. Inmediatamente después de la toma se determinaron pH, potencial redox y concentración de NH₃ con un potenciómetro (ORION Research Inc., modelo 720 A Plus, Beverly, MA, USA) equipado con los electrodos respectivos. Se realizaron recuentos de protozoarios ciliados y

bacterias en cámaras de recuento (Bürker Blau Brand®, Wertheim, Germany) de 0.1 mm y 0.02 mm de profundidad respectivamente. Antes del recuento las muestras se fijaron con 0.1 ml/ml (protozoos) y 0.99 ml/ml (bacterias) de solución Hayem (HgCl₂, 2.5; Na₂SO₄, 25.0; NaCl, 5.0 g/l). Los protozoarios se clasificaron en entodiniomorfos y holotrichas, sin embargo en los resultados se presenta el total, puesto que los holotrichas representan una proporción muy baja del total de ciliados. Con excepción de los recuentos de bacterias, que se hicieron solamente cuatro veces por periodo, todos los parámetros se midieron diariamente para cada fermentador. En los sustratos y en los residuos de incubación que se secaron previamente a 60°C por 48 horas y se molieron en molino Wiley con malla de 1 mm, se determinó el contenido de materia orgánica, ceniza (500°C por 3 horas), nitrógeno total (por Kjeldahl, AOAC, # 70033 y 70037 (1)), y FDN y FDA (según Van Soest *et al* (25)).

Análisis estadístico

Se utilizó el sistema SAS (23) para el análisis estadístico de la información. Los datos se analizaron utilizando un diseño de bloques completos al azar (2 bloques y 4 tratamientos) con dos observaciones por tratamiento en cada bloque. Las dos observaciones dentro de cada bloque se promediaron antes de realizar el análisis de varianza (n = 2). En los casos en donde hubo efecto de tratamiento se realizó una prueba Duncan para comparar las medias.

Resultados

El pH promedio en el líquido ruminal fue 6.89 y no hubo diferencias significativas entre tratamientos (véase Tabla 2). La concentración (mmol/l) y la producción (mmol/d) de amoníaco en el líquido ruminal promedio para todos los tratamientos fue 3.26 y 1.63 respectivamente. Con respecto al control la concentración de amoníaco se redujo numéricamente en 24 y 26% por efecto del fruto y el pericarpio respectivamente, sin embargo esta reducción no fue significativa (p > 0.05) (véase Tabla 2). La degradación de la materia seca (MS), la materia orgánica (MO), la proteína cruda (PC) y la fibra en detergente ácido (FDA) fue similar en todos los tratamientos (véase Tabla 2) mientras que la degradación de la fibra en detergente neutro (FDN) fue 9.3% menor (p < 0.05) en el tratamiento con fruto que en el control. El fruto y el pericarpio redujeron el recuento de protozoos ciliados en aproximadamente 50% (p < 0.05) con respecto al control, mientras que el extracto de saponinas no tuvo efecto sobre el mismo. El recuento de bacterias fue similar entre tratamientos (p > 0.05)

(véase Tabla 2). La liberación diaria de metano fue similar (p > 0.05) para todos los tratamientos (véanse Tabla 2, Figura 1). Sin embargo, con respecto al control, el fruto y el pericarpio disminuyeron la producción de metano en relación con la MS degradada (mmol/g) en 8.7 y 4.3% (p < 0.01) respectivamente. Además el extracto, el fruto y el pericarpio redujeron la liberación de metano por gramo de MO degradada en 4.5, 9.5 y 5.6% (p < 0.05) respectivamente. Ninguno de los tratamientos afectó la liberación de metano por gramo de FDN degradada (p > 0.05).

Tabla 1. Composición (g/kg MS) de los sustratos completos y contenido de saponinas del extracto, el pericarpio y el fruto de *S. saponaria*

Tratamientos	Control	Extracto	Fruto	Pericarpio
Ingredientes				
B. dictyoneura	600	593	552	570
C. argentea	400	395	368	380
Extracto	-	12	-	-
Pericarpio	-	-	-	50
Fruto	-	-	80	-
Composición química				
MO	880	882	885	885
PC	110	110	109	104
FDN	737	728	698	722
FDA	413	404	392	410
Contenido de Saponinas en las fuentes (g/kg)				
Total aporte	-	950	120	217
Sustrato completo ¹⁾	-	11.4	9.6	10.8

¹⁾ Se supone que las saponinas provienen únicamente de la fuente correspondiente

Discusión

El comportamiento del pH del líquido ruminal en el presente estudio concuerda con lo obtenido por Díaz *et al.* (4) y Navas-Camacho *et al.* (19) *in vivo* y por Hess *et al.* (8) *in vitro*, quienes no observaron cambios significativos en el pH del líquido ruminal por efecto del pericarpio y del fruto completo de *Sapindus saponaria* respectivamente. La concentración de amoníaco que se observó en el líquido ruminal (3.26 mmol/l) fue relativamente alta con respecto a lo que encontraron Hess *et al.* (9) (1.76 mmol/l) al incubar un sustrato compuesto por 1/3 de *Cratylia argentea* y 2/3 de *Brachiaria dictyoneura* en un sistema RUSITEC. Sin embargo, está por debajo de la concentración sugerida por Satter y Slyter (24) de 3.6 mmol/l para maximizar la síntesis de proteína microbiana en el rumen. El contenido de proteína cruda (promedio

10.5%) y la degradabilidad de la proteína (promedio 44%) en este experimento fueron similares entre tratamientos, y esto concuerda con el comportamiento de la concentración de amoníaco que no tuvo diferencias significativas entre tratamientos. De la misma manera, Díaz *et al* (4) y Hess *et al* (8) no obtuvieron cambios significativos en la concentración de amoníaco en el líquido ruminal por efecto del pericarpio del fruto *in vivo* y del fruto completo *in vitro* respectivamente.

En lo referente a la degradación de nutrientes, el efecto negativo del fruto de *Sapindus saponaria* sobre la degradación de FDN observado en el presente estudio se podría explicar, al menos parcialmente, porque el sustrato con fruto de *S. saponaria*, a pesar de tener un 4% menos de FDN, es posible que el contenido de carbohidratos no estructurales (por ejemplo azúcares del fruto) fuese proporcionalmente mayor, de hecho el fruto contiene 22.1% de azúcares totales (Abreu *et al*, 2002 datos sin publicar), y hubiese desviado el uso del nitrógeno hacia la síntesis de aminoácidos cuyas cadenas carbonadas provenían de la fermentación de dichos carbohidratos en vez de la fracción fibrosa (16). De acuerdo con los presentes resultados, Díaz *et al* (4) tampoco encontraron diferencias en la degradación de MS de *Cynodon nlemfuensis*, a 48h *in situ* al suministrar 25 y 50 g de pericarpio del fruto de *S. saponaria* (2.4 y 4.5% de la dieta respectivamente). Así como Navas-Camacho *et al* (19) al suministrar 2 g/kg peso vivo (6.5% de la dieta) de pericarpio a ovinos en una dieta basada en tamo de trigo. Sin embargo, ellos también obtuvieron una disminución significativa de 14% en la degradación de FDN y un aumento en la degradación de PC con dicho tratamiento. De igual manera Hess *et al* (8) encontraron una reducción de 15% en la degradación de FDN *in vitro* utilizando 100 g/kg de fruto de *Sapindus saponaria*.

El comportamiento de la población de protozoos ciliados ruminales que se observó en este experimento concuerda con ensayos anteriores en los cuales se ha demostrado el efecto negativo del pericarpio y del fruto completo de *Sapindus saponaria* sobre la población de protozoos ciliados (9, 18, 19). Según Klita *et al* (10), un posible mecanismo que podría explicar el efecto negativo de las saponinas sobre los protozoos ciliados es un cambio masivo en la permeabilidad de la membrana celular debido a que forman complejos con el colesterol y con algunas proteínas de membrana, y los protozoos, entre los microorganismos ruminales, son especialmente susceptibles a este cambio en las propiedades de la membrana celular. Por otra parte, los resultados de Hess *et al* (9) sugieren que los

efectos del fruto de *S. saponaria* sobre los protozoos ruminales podrían depender de la calidad de la dieta, debido a que el número de protozoos se redujo por efecto de los frutos de *S. saponaria* solo cuando se agregaron a un sustrato suplementado con una leguminosa de alta calidad (*Arachis pintoi*) pero no con *C. argentea*. Este no sería el caso en el presente estudio, puesto que la calidad del sustrato basal fue constante, y de hecho contenía 40% de *C. argentea*. Sin embargo, no es del todo descartable que el aporte nutricional del fruto o del pericarpio (carbohidratos no estructurales) como tal haya intervenido en el efecto negativo sobre los protozoos, puesto que el fruto contiene 22.1% de azúcares (Abreu *et al*, 2002, datos sin publicar).

Tabla 2. Efecto del fruto, pericarpio y extracto de saponinas de *S. saponaria* sobre el patrón de fermentación ruminal (promedios días 5 a 10)

Item	Tratamientos				
	Control	Extracto	Fruto	Pericarpio	ESM
Degradabilidad %					
Materia seca	37.03 ^a	37.19 ^a	37.94 ^a	38.15 ^a	0.378
Materia orgánica	38.12 ^a	38.96 ^a	39.20 ^a	39.61 ^a	0.300
Proteína cruda	45.56 ^a	43.69 ^a	43.46 ^a	44.57 ^a	1.177
Fibra en detergente neutro	32.71 ^a	32.11 ^a	29.65 ^b	32.69 ^a	0.421
Fibra en detergente ácido	27.29 ^a	26.49 ^a	24.50 ^a	29.00 ^a	1.011
Parámetros de Fermentación					
pH	6.90 ^a	6.88 ^a	6.89 ^a	6.88 ^a	0.018
Amoníaco mmol/L	3.82 ^a	3.50 ^a	2.91 ^a	2.81 ^a	0.242
Amoníaco mmol/d	1.89 ^a	1.75 ^a	1.45 ^a	1.42 ^a	0.116
Recuentos Microbiales					
Protozoos ciliados (10 ³ /ml)	4.81 ^a	4.15 ^a	2.44 ^b	2.47 ^b	0.372
Bacterias (10 ⁸ /ml) ¹	14.52 ^a	18.27 ^a	19.90 ^a	19.90 ^a	0.943
Liberación de Metano					
CH ₄ (mmol/d)	8.79 ^a	8.60 ^a	8.23a	8.68a	0.106
CH ₄ (mmol/g MS _{degradada})	1.61 ^a	1.57 ^{ab}	1.47c	1.54 ^b	0.011
CH ₄ (mmol/g MO _{degradada})	1.78 ^a	1.70 ^b	1.61c	1.68 ^b	0.009
CH ₄ (mmol/g FDN _{degradada})	2.47 ^a	2.51 ^a	2.71 ^a	2.52 ^a	0.068

Valores promedio en la misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes $p < 0.05$. ESM: error standard de la media. ¹ Promedios de los días 7 y 10 únicamente.

En este experimento no se observó ningún efecto del fruto, pericarpio o extracto de saponinas de *S. saponaria* sobre la liberación diaria de CH₄ (mmol/d), mientras Hess *et al* (8) obtuvieron una disminución de 14% en la liberación diaria de metano (mmol/d) *in vitro* al agregar 100 g/kg de fruto de *Sapindus saponaria* al sustrato incubado en líquido ruminal faunado. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, ellos también observaron disminución en la cantidad de metano liberada por gramo de MO degradada al utilizar el fruto, y tampoco encontraron cambios en la liberación de metano por gramo de FDN degradada. Esto sugiere que la disminución en la emisión de metano por gramo de MO degradada en este experimento se debe, por lo menos parcialmente,

a una menor degradación de la fibra. De hecho la degradación de la fibra fue significativamente menor en el tratamiento con fruto, mientras que la degradación de la MO no cambió, lo cual indica que la reducción en la degradación de la fibra fue compensada por una mayor degradación de otros componentes de la dieta (como azúcares del fruto) y la fermentación de estos componentes ocasionó una menor liberación de metano por gramo de MO fermentada. Aunque el efecto de los tratamientos sobre la metanogénesis no fue muy contundente en este experimento, se observó una reducción significativa en la liberación de metano en relación con la cantidad degradada de MS y MO. En condiciones *in vivo*, esto

podría reflejarse en una reducción de metano emitido por unidad de proteína animal producida que sería útil aun cuando la cantidad total de metano emitido por animal no disminuya.

Con el fruto completo y el pericarpio de *S. saponaria* se obtuvo una reducción significativa de la población de protozoos ciliados, lo cual confirma el potencial de defaunación de estos materiales, y aun cuando esto no esté asociado necesariamente con una disminución de la metanogénesis, podría ser beneficioso en otros aspectos, como la utilización del nitrógeno, en los cuales se han reportado efectos positivos de la defaunación completa o parcial.

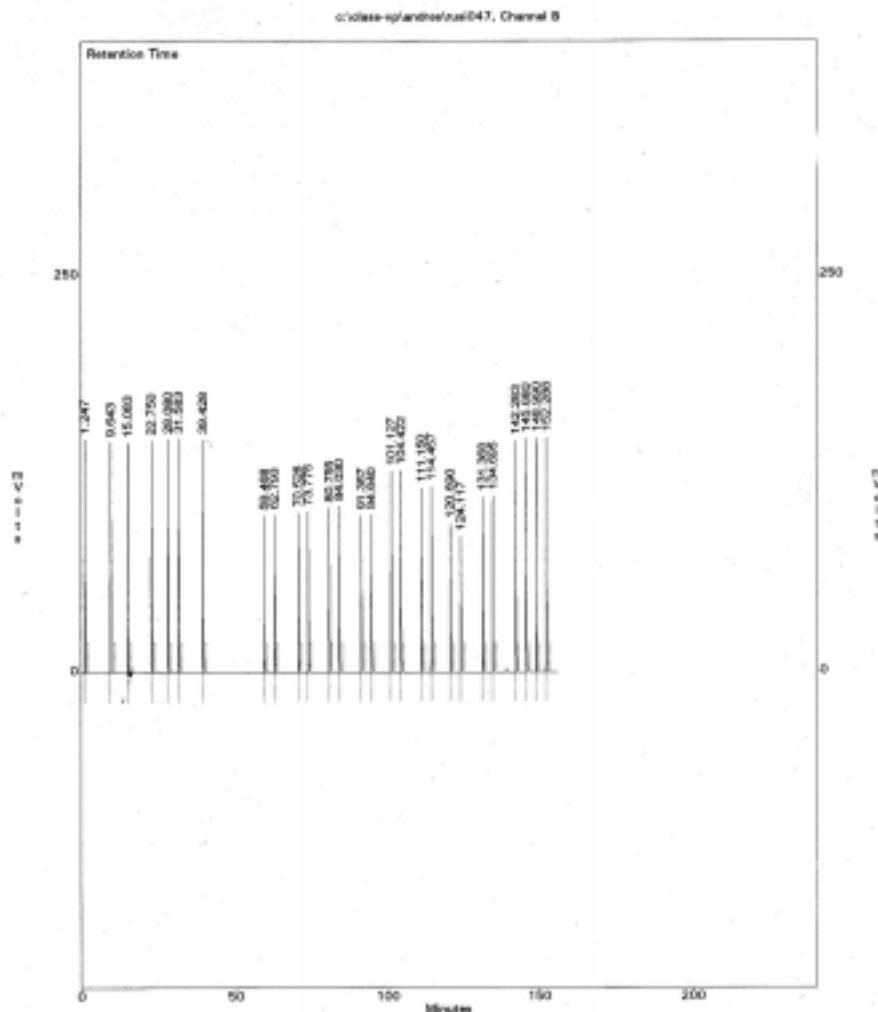


Figura 1. Cromatograma de metano correspondiente al tercer día de medición.

Los picos del 1 al 7 y del 24 al 27 corresponden al gas patrón (8.25% CH₄); y del 8 al 23 a las muestras de gas ruminal inyectadas por duplicado. El set de inyección fue de 200 minutos, controlado por un software Class VP.

Agradecimientos

Los autores expresan su gratitud a la Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (Swiss Agency for Development and Cooperation, SDC) por el apoyo económico, así como al Instituto Federal de Tecnología de Zürich (ETH), al CIAT, a CORPOICA, y a la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo logístico.

Summary

Effect of whole fruit, pericarp and saponins extract of Sapindus saponaria on ruminal fermentation and methanogenesis in vitro using RUSITEC

Ruminal fermentation pattern and methane release were determined in a RUSITEC (Rumen Simulation Technique) system using as control substrate 60% Brachiaria dictyoneura cv. Llanero hay (a low quality grass) and 40% Cratylia argentea leaves (a medium quality shrub legume). The effects of the addition of 8% fruit, 5% pericarp and 1.2% semipurified saponins extract of Sapindus saponaria in a dry matter basis to the system were tested. Daily dry matter supply was kept constant to evaluate the four treatments during two 10 days-term periods. Data were analyzed as a randomized complete-block design. There was no effect of treatments on ammonia concentration ($p > 0.05$). As compared to control, fruit and pericarp reduced ciliate protozoa counts by 50% ($p < 0.05$) but bacteria counts remained unchanged ($p > 0.05$). Neutral detergent fiber degradation of the fruit-added treatment was 9.3% lower than control ($p < 0.05$) but degradation of dry matter, organic matter, protein and acid detergent fiber were not different than control ($p > 0.05$). Daily methane release (mmol/d) was unaffected by treatments ($p > 0.05$). However, the addition of fruit and pericarp reduced methane release per gram of degraded dry matter by 8.7 and 4.3% respectively ($p < 0.05$). Methane release per gram of degraded organic matter decreased by 4.5, 9.5 y 5.6% with the addition of the semipurified saponin extract, the fruit and the pericarp respectively ($p < 0.05$). The decrease in methane emission per gram of DM and OM degraded, is most likely explained by lower fiber degradation and suggests that there will be less methane emission per unit of edible animal protein produced, eventhough the total amount of methane released is not reduced. The reduction of ciliate protozoa population confirms the defaunation potential of the whole fruit and pericarp of Sapindus saponaria, that may not reduce the production of methane but will definitely result in a more efficient utilization of nitrogen.

Key words: *Brachiaria dictyoneura, Cratylia argentea, defaunation, fiber, protozoa*

Referencias

1. AOAC. Official Methods of Analysis (14th Ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. 1984.
2. Czerkawski JW, Breckenridge G.. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). British Journal of Nutrition 1977; 38:371-384.
3. Díaz A. Evaluación de *Sapindus saponaria* como agente defaunante, su influencia sobre la digestión ruminal y el crecimiento de ovinos. Trabajo de ascenso, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, 1993.
4. Díaz A, Avendaño MA, Escobar A. Evaluation of *Sapindus saponaria* as a defaunating agent and its effects on different ruminal digestion parameters. Livestock Research for Rural Development 1993; 5:1-6.
5. Dohme F, Machmüller A, Estermann BL, Pfister P, Wasserfallen A, Kreuzer M. The role of the rumen ciliate protozoa for methane suppression caused by coconut oil. Letters in Applied Microbiology 1999; 29:187-192.
6. Dominguez Bello MG, Escobar A. Rumen manipulation for the improved utilization of tropical forages. Animal Feed Science and Technology 1997; 69:91-102.
7. Finlay BJ, Esteban G, Clarke KJ, Williams AG, Embley TM, Hirt RP. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. FEMS Microbiology Letters 1994; 117:157-162.
8. Hess HD, Kreuzer M, Díaz TE, Lascano CE, Carulla JE, Soliva CR, Machmüller A. Saponin rich tropical

- fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology* 2003; accepted.
9. Hess HD, Monsalve LM, Lascano CE, Carulla JE, Díaz TE, Kreuzer M. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* rumen nitrogen turnover and methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research* 2003; 54(7), in press.
 10. Klita PT, Mathison GW, Fenton TW y Hardin RT Effects of alfalfa root saponins on digestive function in sheep. *Journal of Animal Science* 1996; 74, 1144-1156.
 11. Leng RA. Factors affecting the utilization of poor quality forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutrition Research Reviews* 1990; 3:27-303.
 12. Lotfield N, Flessa H, Augustin J, Beese F. Automated gas chromatographic system for rapid analysis of the atmospheric trace gases methane, carbon dioxide, and nitrous oxide. *Journal of Environmental Quality* 1997; 26:560-564.
 13. Lu CD, Jorgensen NA. Alfalfa saponins affect site and extent of nutrient digestion in ruminants. *Journal of Nutrition* 1987; 117:919-927.
 14. Machmüller A, Soliva CR, Kreuzer M. *In vitro* ruminal methane suppression by lauric acid as influenced by dietary calcium. *Canadian Journal of Animal Science* 2002; 82, in press.
 15. McDougall E. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal* 1948; 43:99-109.
 16. Mehrez AZ, Ørskov ER, McDonald I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *British Journal of Nutrition* 1977; 38:437-443.
 17. Moss AR, Jouany JP, Newbold J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie* 2000; 49:231-253.
 18. Navas-Camacho A, Laredo MA, Cuesta A, Ortega O, Romero M. Evaluation of tropical trees with high or medium saponin content as dietary alternative to eliminate protozoa from the rumen. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* 1994; 3:204.
 19. Navas-Camacho A, Cortés JE, Gutiérrez EA. Efecto de la reducción de la población de protozoarios ciliados sobre el funcionamiento ruminal en ovinos alimentados con tamo de trigo. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 1997; 5 (Suplemento 1), 98-101.
 20. Newbold CJ, El-Hassan SM, Wang J, Orgega ME, Wallace RJ. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *British Journal of Nutrition*, 1997; 78:237-249.
 21. Rondón MA. Land use change and balances of greenhouse gases in colombian tropical savannas. A Dissertation, Ph.D. Thesis, Cornell University, Ithaca, N.Y. 2000.
 22. Rosales M, Laredo M, Cuesta A, Anzola H, Hernández L. Uso de árboles forrajeros para el control de protozoarios ruminales. *Livestock Research for Rural Development*, 1989; 1:79-85.
 23. SAS (Statistical Analysis System)/STAT User's Guide (4th ed.) SAS Inst., Inc., Cary, NC. 1990
 24. Satter LD, Slyter LL. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *British Journal of Nutrition* 1974; 32:199-208.
 25. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 1991; 74:3583-3597.