

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Alba Lucía Santos¹,
Hugo Jiménez¹ y
Adalgiza Cano¹

ABSTRACT

Title: The effect of saponine extracts from *Pithecellobium saman* and *Sapindus saponaria* on *in vitro* ruminal cellulolytic bacterial growth

An experiment was carried out to evaluate the effects of saponin-rich extracts (SRE) from three tropical fruits on the growth of two rumen bacterial species. *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* were cultured in a defined medium that contained 0, 3.0 and 5.0 mg·ml⁻¹ SRE from *Sapindus saponaria* and *Pithecellobium saman* fruit and also purified saponin from *Quillaja saponaria*. Bacterial growth was spectrophotometrically measured at 620nm. Adding 3 and 5 mg·ml⁻¹ of *S. saponaria* SRE concentrations and 5 mg·ml⁻¹ of *P. saman* SRE reduced ($P < 0.05$) *R. flavefaciens* growth whilst *F. succinogenes* growth, was completely inhibited ($P < 0.05$) by 3 and 5 mg·ml⁻¹ *S. saponaria* SRE and 5 mg·ml⁻¹ *P. saman* SRE. Reduced *F. succinogenes* growth was only observed with 5 mg·ml⁻¹ purified *Q. saponaria* saponin. Results from this experiment showed that SRE from three tropical fruits affected the growth of two of the most important cellulolytic rumen bacteria, especially Gram negative bacteria *F. succinogenes*.

Key words: *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*, saponins, *Quillaja saponaria*, *Sapindus saponaria*, *Pithecellobium saman*.

Recibido: febrero 5 de 2005.
Aceptado: mayo 2 de 2005.

1. Investigadores, Programa Nacional de Fisiología y Nutrición Animal, CORPOICA, C.I. Tibaitatá. A.A. 240142 Las Palmas, Bogotá, Colombia. e-mail: hjimenez@corpoica.org.co.

Efecto *in vitro* de extractos ricos en saponinas de *Pithecellobium saman* y *Sapindus saponaria* sobre el crecimiento de dos bacterias celulolíticas ruminales

RESUMEN

Se evaluó el efecto de extractos ricos en saponinas (ERS) provenientes de frutos de árboles nativos sobre el crecimiento de dos especies de bacterias celulolíticas del rumen. *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes* se cultivaron en medios de cultivo que contenían 0, 3 y 5 mg·ml⁻¹ de ERS de los frutos de *Sapindus saponaria*, *Pithecellobium saman* y saponinas purificadas de *Quillaja saponaria*. Se determinó la curva de crecimiento de las bacterias por cuantificación espectrofotométrica a 620 nm. La utilización de 3 y 5 mg·ml⁻¹ de ERS de *S. saponaria* y 5 mg·ml⁻¹ de ERS de *P. saman* redujeron ($P < 0,05$) el crecimiento de *R. flavefaciens*; mientras que la adición de 3 mg·ml⁻¹ de ERS de *P. saman* incrementó el crecimiento de la bacteria después de la hora 11 en comparación con el tratamiento control. Por otro lado, el crecimiento de *F. succinogenes* fue inhibido ($P < 0,05$) completamente por la utilización de 3 y 5 mg·ml⁻¹ de ERS de *S. saponaria* y 5 mg·ml⁻¹ de *P. saman*. La adición de ERS de *Q. saponaria* sólo afectó el crecimiento de *F. succinogenes* cuando se adicionaron 5 mg·ml⁻¹. Los resultados muestran que la adición de ERS provenientes de frutos de árboles tropicales afectan el crecimiento de dos de las más importantes bacterias celulolíticas del rumen, en especial, de la bacteria Gram-negativa *F. succinogenes*.

Palabras clave: *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*, saponinas, *Quillaja saponaria*, *Sapindus saponaria*, *Pithecellobium saman*.

INTRODUCCIÓN

LAS SAPONINAS PRESENTES EN EL FOLLAJE y frutos de plantas arbóreas como *Sapindus saponaria* y *Pithecellobium saman* han sido utilizadas en experimentos *in vivo* e *in vitro* como agentes defaunadores (Díaz y col., 1993; Navas-Camacho y col., 1994; Galindo y col., 2000; Abreu y col., 2003; Hess y col., 2003). La defaunación ocasionada por estos metabolitos ocurre usualmente por su interacción con el colesterol y otros esteroides de la membrana celular de los protozoarios causando lisis y muerte celular (Cheeke, 1999). Aunque el efecto más conocido de las saponinas sobre los microorganismos del rumen es la defaunación de protozoarios, las saponinas tienen algunos efectos benéficos como el estímulo al crecimiento de bacterias (totales y celulolíticas) y hongos en el rumen (Díaz y col., 1993; Galindo y col., 2000), el incremento del aporte de proteína microbiana al duodeno (Goetsch y Owens, 1985) y una mayor tasa de degradación de la materia orgánica y el almidón (Valdez y col., 1986; Wang y col., 2000). Sin embargo, existen hallazgos contradictorios respecto del efecto

de las saponinas sobre el desempeño y número de las bacterias del rumen. Wallace y col., 1994 observaron que las saponinas de *Yucca schidigera* reducen el crecimiento de la bacteria Gram-positiva *Streptococcus bovis* sin afectar a la bacteria Gram-negativa *Prevotella ruminicola*. Por otro lado, Wang *et al.* (2000) sugieren que las saponinas de *Yucca schidigera* podrían estimular la actividad degradativa de las bacterias ruminales utilizadoras de almidón predominantemente, mientras que impedirían la actividad de bacterias involucradas en la degradación de la fibra.

Actualmente, existe poca información relacionada con el efecto de saponinas provenientes de frutos de especies arbóreas tropicales y su efecto sobre las principales bacterias celulolíticas del rumen, las cuales desempeñan un papel determinante en la degradación de los forrajes tropicales. Por lo tanto, este experimento se realizó con el fin de evaluar el efecto que estos compuestos tienen sobre dos de las principales especies de bacterias celulolíticas ruminales: *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes*.

Materiales y métodos

Obtención de extractos ricos en saponinas. Los extractos ricos en saponinas (ERS) del pericarpio de *S. saponaria* y del fruto entero de *P. saman*, se obtuvieron después de realizar una marcha fitoquímica al material vegetal para determinar la presencia de saponinas, según el procedimiento de Wall (1952). A partir de 50 g de cada material la fracción lipídica se removió con éter de petróleo; luego, el material se percoló en etanol (96%) y la fase etanólica resultante se concentró en un rotavapor a 1/3 del volumen original. Posteriormente, el residuo etanólico se resuspendió en agua destilada y a continuación se adicionó isobutanol, agitando para extraer las saponinas de la fase orgánica. El extracto soluble en isobutanol se secó y redisolvió en metanol para luego precipitar el extracto rico en saponinas con éter etílico. El precipitado se secó y, a partir de éste, se prepararon las soluciones de los ERS en agua. Como estándar comercial se utilizó saponina purificada de *Quillaja saponaria* Sigma S-4521; el polvo que contenía la saponina fue resuspendido en agua destilada para su utilización.

Organismos y condiciones de cultivo. Las bacterias *Ruminococcus flavefaciens* (19208) y *Fibrobacter succinogenes* (19169) fueron obtenidas de la colección de la ATCC (American Type Culture Collection). El medio basal utilizado para el crecimiento de las bacterias es una modificación del medio elaborado por Bryant (1972). El medio contenía celobiosa 0.1%, Sal I (K_2HPO_4 y H_2O), 15 ml de Sal II $NaCl$, $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 , $CaCl_2$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 40 ml de fluido ruminal clarificado, 1.5 g de agar, 1.5 g de bacto-casitona, 0.25 g de extracto de levadura, 0.033 g de glucosa, 0.06 g de almidón, 0.067 g de xilán, 0.1 ml de solución 0.1% de resazurín, 0.1 g de HCl cisteína, 0.6 g de $NaHCO_3$, 1 ml de vitaminas y 50 ml de H_2O). Las bacterias celulolíticas fueron mantenidas en el medio de cultivo sin extractos ricos en saponinas hasta el inicio del ensayo.

Las bacterias se inocularon por triplicado en medios de cultivo que contenían 0 (control), 3 y 5 $mg \cdot ml^{-1}$ de extracto de las saponinas (tratamientos) y se incubaron durante 12 horas a 39 °C. Para determinar el efecto del tratamiento de los extractos ricos en saponinas, se midió el crecimiento microbial mediante espectrofotometría (Spectronic 21 Milton Roy Company) a una densidad óptica de 620 nm, entre 0 y las 15 horas.

Análisis estadístico. Para el análisis estadístico se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 2x3x3, en donde se utilizaron dos bacterias (*Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes*), se evaluaron tres ERS (*Sapindus saponaria*, *Pithecellobium saman* y *Quillaja saponaria*) con tres concentraciones diferentes (0, 3 y 5 $mg \cdot ml^{-1}$). Los datos fueron analizados utilizando la comparación de medias del procedimiento GLM de SAS.

Resultados

Los ERS provenientes de los frutos de especies arbóreas afectaron el crecimiento de las bacterias celulolíticas *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes*. En la Figura 1 se observan los cambios en la curva de crecimiento de *R. flavefaciens* después de la inclusión de 3 $mg \cdot ml^{-1}$ de ERS proveniente de *P. saman*, *S. saponaria* y *Q. saponaria*. La utilización de ERS de *P. saman* estimuló el crecimiento ($P < 0,05$) de *R. flavefaciens* después de 11 horas en comparación con el cultivo control, el cual no recibió ERS. Por otro lado, la adición de ERS provenientes de *S. saponaria* redujo ($P < 0,05$) el crecimiento de *R. flavefaciens* a partir de 9 horas, disminuyendo el tiempo de desarrollo de la fase exponencial de crecimiento de la bacteria. La adición de ERS provenientes de *Q. saponaria* no afectaron ($P > 0,05$) las curvas de crecimiento de *R. flavefaciens*.

Las concentraciones más altas (5 $mg \cdot ml^{-1}$) de los ERS provenientes de los frutos *P. saman* y *S. saponaria* redujeron ($P < 0,05$) aún más el crecimiento de *R. flavefaciens* (Figura 2, página siguiente), en comparación con el tratamiento de 3 $mg \cdot ml^{-1}$ (Figura 1). La adición de los ERS de *P. saman* redujeron ($P < 0,05$) el crecimiento de la bacteria a partir de la hora 8; mientras que con *S. saponaria* se observó inhibición a partir de la hora 9 (Figura 2); igualmente, se presentó una disminución en el tiempo de desarrollo de la fase exponencial de la bacteria, con un inicio precoz de la fase estacionaria en comparación con el tratamiento control.

Al comparar el efecto de la adición de 3 $mg \cdot ml^{-1}$ de ERS provenientes de *P. saman*, *S. saponaria* y *Q. saponaria* sobre el crecimiento de *F. succinogenes* (Figura 3, página siguiente), se observó que los ERS de *P. saman* redujeron ($P < 0,05$) el crecimiento de la bacteria entre la hora 5 y la hora 9 en comparación con el tratamiento control; después de la hora 10 se observó una drástica reducción ($P < 0,05$) en la densidad óptica. Por otro lado, la inclusión de 3 $mg \cdot ml^{-1}$ de ERS de *S. saponaria* inhibió ($P < 0,05$) completamente el crecimiento de *F. succinogenes*. El ERS de *Q. saponaria* no afectó ($P > 0,05$) el crecimiento de *F. succinogenes*.

La inclusión de 5 $mg \cdot ml^{-1}$ de ERS provenientes de *Q. saponaria* redujo ($P < 0,05$) el crecimiento de *F. succinogenes* entre

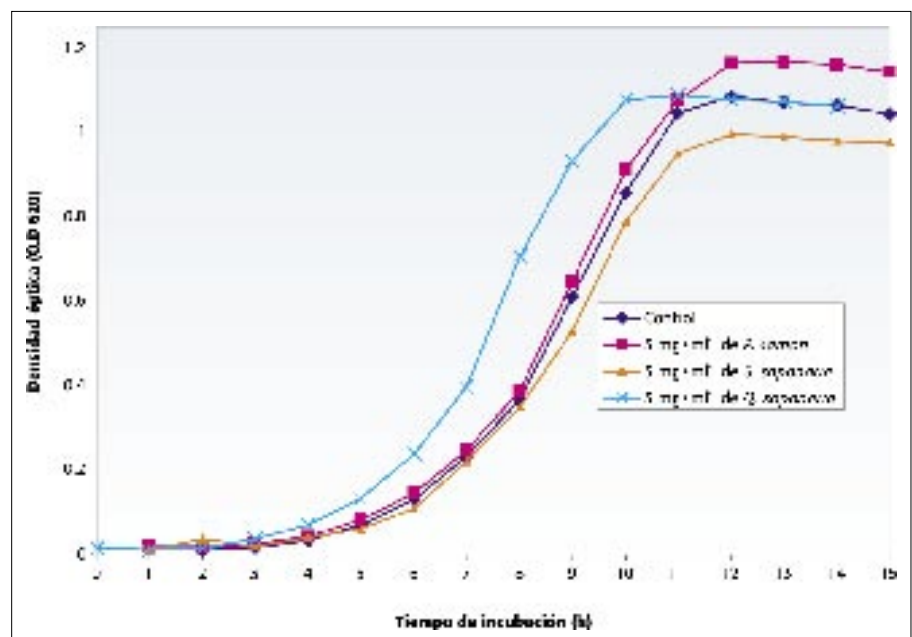


Figura 1. Efecto de los ERS (3 $mg \cdot ml^{-1}$) proveniente de frutos de especies arbóreas (*P. saman* y *S. saponaria*) y saponinas purificadas de *Q. saponaria* sobre la curva de crecimiento de *Ruminococcus flavefaciens* en medio de cultivo. En la gráfica se observan los símbolos que corresponden a cada uno de los tratamientos evaluados. Los resultados son la media de incubaciones por triplicado.

la hora 5 y la hora 9, prolongándose la fase exponencial del microorganismo. Por otro lado, la exposición a los ERS de *P. saman* y *S. saponaria* inhibieron ($P < 0,05$) completamente el crecimiento bacterial.

A fin de corroborar todo lo expuesto anteriormente, los datos de crecimiento

de las bacterias fueron ajustados con el modelo logístico $y=a/[1+b*exp(-cx)]$, y se calcularon los siguientes parámetros:

$$w \text{ (dato ajustado por el modelo logístico)} = a/[1+b*exp(-c*HORA)]$$

$$\text{Vel abs (velocidad de crecimiento absoluta)} = c*w(1-w/a)$$

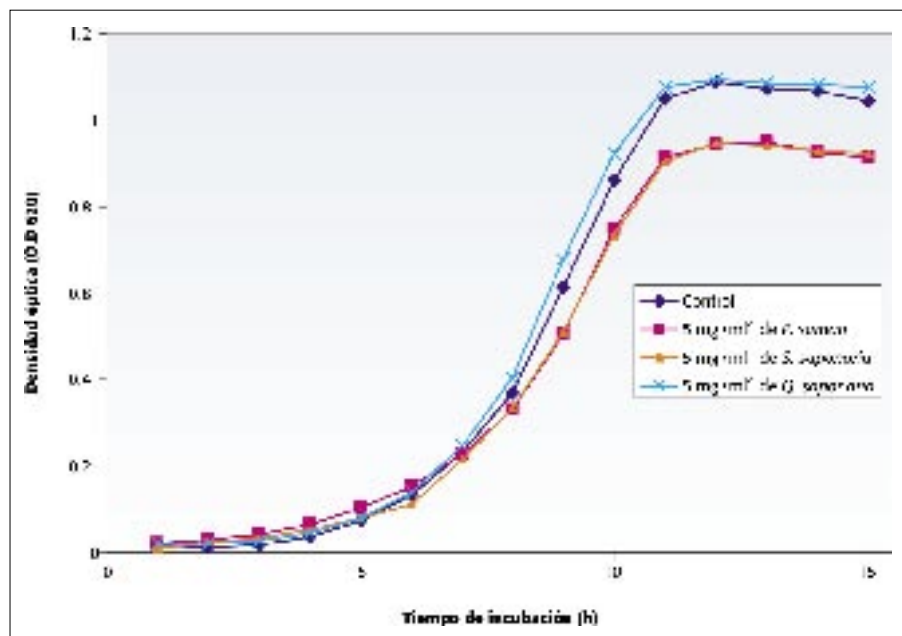


Figura 2. Efecto de los ERS (5 mg·ml⁻¹) proveniente de frutos de especies arbóreas (*P. saman* y *S. saponaria*) y saponinas purificadas de *Q. saponaria* sobre la curva de crecimiento de *Ruminococcus flavefaciens* en medio de cultivo. En la gráfica se observan los símbolos que corresponden a cada uno de los tratamientos evaluados. Los resultados son la media de incubaciones por triplicado.

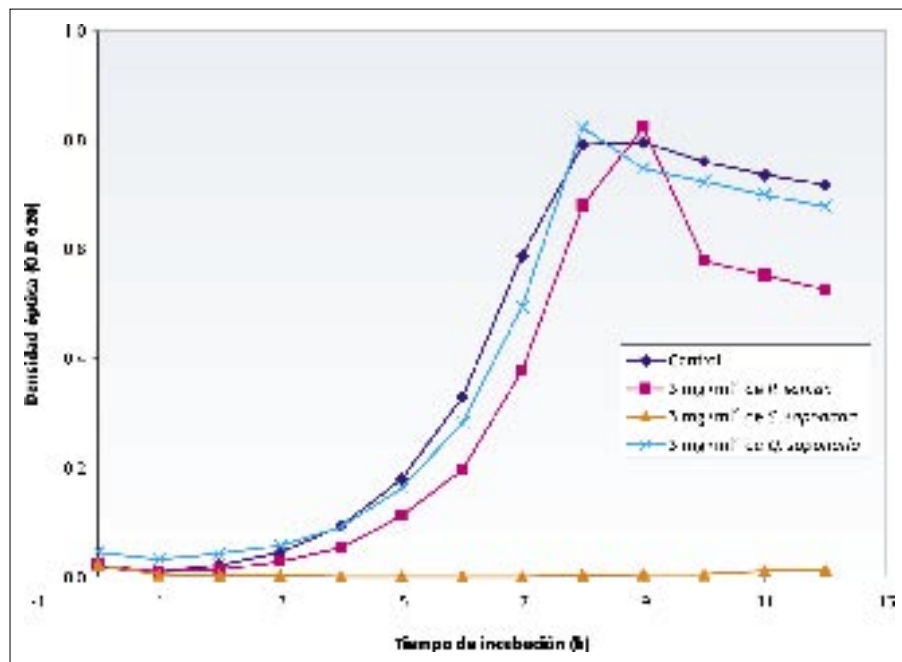


Figura 3. Efecto de los ERS (3 mg·ml⁻¹) proveniente de frutos de especies arbóreas (*P. saman* y *S. saponaria*) y saponinas purificadas de *Q. saponaria* sobre la curva de crecimiento de *Fibrobacter succinogenes* en medio de cultivo. En la gráfica se observan los símbolos que corresponden a cada uno de los tratamientos evaluados. Los resultados son la media de incubaciones por triplicado.

Biomasa (50% de la producción total de biomasa) = $a/2$
 POI (hora donde la tasa de crecimiento es máxima) = $(LN(((a/biomasa)-1)/b))/-c$
 Fase Lag (tiempo de estructuración, horas) = $biomasa (-POI*Vel abs)/Vel abs$

La aplicación práctica de este modelo requiere la conversión de los coeficientes matemáticos (a,b,c) en parámetros con significado biológico, los cuales fueron: Biomasa, POI y Fase Lag. Como se puede observar en el modelo, las mediciones de POI y Fase Lag dependen directamente de la medición de Biomasa. En consecuencia, solamente se escogió en este último parámetro, que es además uno de los de mayor importancia en términos de nutrición animal.

Se presentaron grandes diferencias en la parametrización del modelo ajustado al crecimiento de las bacterias (Tabla 1). Debe aclararse que los datos mostrados en la Tabla 1 son el promedio de todos los datos registrados en este experimento. Al comparar entre sí las bacterias se observó que el crecimiento de *F. succinogenes* fue solamente el 40% del de *R. flavefaciens*. Esto se debió al menos a dos factores: primero, el crecimiento de *R. flavefaciens* bajo condiciones óptimas (sin la presencia de ERS) fue más alto que el de *F. succinogenes*, lo que sugiere que la primera es una bacteria de mayor crecimiento, al menos bajo las condiciones que se usaron en este experimento. Segundo, *F. succinogenes* mostró ser más susceptible a la presencia de ERS (ver discusión posterior) lo que condujo a que en la Tabla 1 se reporte menor crecimiento total de *F. succinogenes*.

En la Tabla 1 también se muestra el resultado promedio obtenido con las diferentes dosis de ERS utilizados en el presente estudio. A medida que aumentó la dosis de ERS se observó una disminución en el crecimiento de ambas bacterias por la siguiente ecuación: $y = -0,0305x + 0,4752$, $R^2 = 0,9832$, donde y es igual a la biomasa de las bacterias y x es la dosis agregada en mg·ml⁻¹.

Al comparar entre los diferentes ERS evaluados en este estudio, se observó que la adición del extracto de *Q. saponaria* no tuvo un efecto significativo en el crecimiento de ambas bacterias con respecto al control. Por el contrario, la adición de extractos de *P. saman* y *S. saponaria* produjo una reducción significativa en este crecimiento, siendo el efecto de *S. saponaria* el más pronunciado de todos ($P < 0,05$).

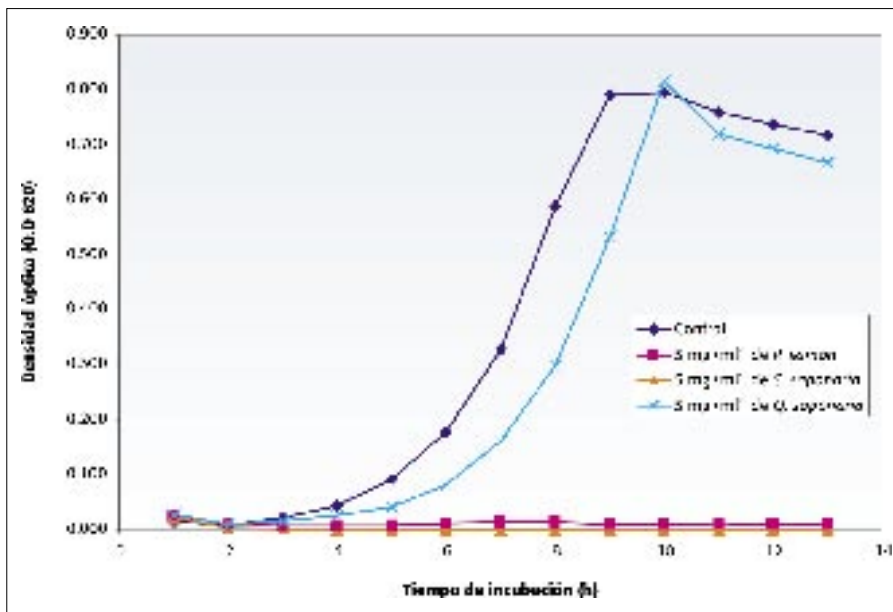


Figura 4. Efecto de los ERS (5 mg·ml⁻¹) proveniente de frutos de especies arbóreas (*P. saman* y *S. saponaria*) y saponinas purificadas de *Q. saponaria* sobre la curva de crecimiento de *Fibrobacter succinogenes* en medio de cultivo. En la gráfica se observan los símbolos que corresponden a cada uno de los tratamientos evaluados. Los resultados son la media de incubaciones por triplicado.

Tabla 1. Parametrización de la función logística para la curva de crecimiento de dos bacterias ruminales con y sin la adición de ERS de distinta procedencia a diferentes dosis.

	POI (horas)	Biomasa	Fase Lag (horas)
Bacteria			
<i>R. flavefaciens</i>	7.5595 a	0.5326 a	4.9066 a
<i>F. succinogenes</i>	3.7242 b	0.2115 b	2.8428 b
Dosis (mg·ml⁻¹)			
0	6.7853 a	0.4706 a	4.8487 a
3	5.9223 b	0.3953 b	4.1674 b
5	4.9803 c	0.3160 c	3.2574 c
ERS			
Control	6.7853 b	0.4706 a	4.8487 a
<i>Q. saponaria</i>	7.0576 b	0.4645 a	5.1717 a
<i>P. saman</i>	5.4612 c	0.3544 b	3.5428 b
<i>S. saponaria</i>	3.8651 d	0.2481 c	2.4226 c

a,b,c,d: Medias en una columna con diferente letra son diferentes estadísticamente ($P < 0,05$). Los parámetros analizados fueron: tiempo al punto de inflexión (POI, horas), biomasa al punto de inflexión (densidad óptica 620 nm) y Fase Lag o establecimiento microbiano (horas).

Tabla 2. Parametrización de la función logística para la curva de crecimiento de *Ruminococcus flavefaciens* con y sin la adición de ERS de distinta procedencia a diferentes dosis.

	POI (horas)	Biomasa	Fase Lag (horas)
Dosis (mg·ml⁻¹)			
0	7.4826 a	0.5464 a	5.1926 a
3	7.5794 a	0.5523 a	5.0508 a
5	7.5653 a	0.5084 b	4.6670 a
ERS			
Control	7.4826 ab	0.5464 a	5.1926 ab
<i>Q. saponaria</i>	7.4036 b	0.5530 a	5.2689 a
<i>P. saman</i>	7.6432 a	0.5417 a	4.4625 b
<i>S. saponaria</i>	7.6703 a	0.4963 b	4.8452 ab

a,b: Medias en una columna con diferente letra son diferentes estadísticamente ($P < 0,05$). Los parámetros analizados fueron: tiempo al punto de inflexión (POI, horas), biomasa al punto de inflexión (densidad óptica 620 nm) y Fase Lag o establecimiento microbiano (horas).

Al evaluar la consecuencia de la adición de diferentes dosis de los tres ERS sobre el crecimiento de *R. flavefaciens*, se demostró que esta bacteria no fue tan susceptible, tanto a las diferentes dosis usadas, como a los diferentes ERS aplicados. De hecho, sólo se observó una reducción del 7% en el crecimiento de esta bacteria cuando se agregaron 5 mg·ml⁻¹ de ERS. Adicionalmente, la adición de ERS de *S. saponaria* sólo logró una reducción de 10% en el crecimiento de *R. flavefaciens*.

Al contrario de lo observado con *R. flavefaciens*, el crecimiento de *F. succinogenes* fue significativamente reducido ($P < 0,05$) con la adición de diferentes dosis de ERS (Tabla 3). La relación entre estas dos variables está descrita por la relación $y = -0,0541x + 0,3964$, $R^2 = 0,9993$, donde y es biomasa y x es las dosis de ERS agregada al medio de cultivo.

En lo referente al efecto de los ERS en el crecimiento de *F. succinogenes*, en la Tabla 3 se muestra que mientras la adición de *Q. saponaria* no afectó el crecimiento de esta bacteria, la adición de ERS de *P. saman* y *S. saponaria* sí lo redujo significativamente ($P < 0,05$). Cabe anotar que en la presencia de ERS de *S. saponaria* no se detectó ningún crecimiento de *F. succinogenes*.

Discusión

Los ERS obtenidos de los frutos de *P. saman* y *S. saponaria* afectaron el crecimiento de dos de las principales bacterias celulolíticas del rumen: *R. flavefaciens* y *F. succinogenes*. Entre los principales efectos de los ERS sobre el crecimiento de las bacterias celulolíticas, se encontró: reducción del crecimiento bacteriano e inhibición completa del crecimiento de *F. succinogenes*. La reducción en el crecimiento microbiano por la presencia de saponinas en los cultivos puros de bacterias ha sido reportada en los trabajos de Wallace y col., 1994 y Wang y col., 2000. Wallace y col. observaron que la adición de 1% (v/v) de *Yucca schidigera* al medio de cultivo reducía el crecimiento de las bacterias Gram-positivas *Streptococcus bovis* y *Butyrivibrio fibrisolvens*, pero incrementaba el crecimiento de la bacteria Gram-negativa *Prevotella bryantii*, resultados que sugerían que las saponinas de *Y. schidigera* podían afectar más a las bacterias Gram-positivas que a los organismos Gram-negativos, lo que posiblemente está asociado con la ultraestructura de la pared celular. Sin embargo, Wang et al. (2000) observaron

Tabla 3. Parametrización de la función logística para la curva de crecimiento de *Fibrobacter succinogenes* con y sin la adición de ERS de distinta procedencia a diferentes dosis.

	POI (horas)	Biomasa	Fase Lag (horas)
Dosis (mg·ml⁻¹)			
0	6.0881 a	0.3948 a	4.5048 a
3	4.2653 b	0.2382 b	3.2840 b
5	2.3952 c	0.1236 c	1.8477 c
ERS			
Control	6.0881 b	0.3948 a	4.5048 b
<i>Q. saponaria</i>	6.7116 a	0.3760 a	5.0745 a
<i>P. saman</i>	3.2792 c	0.1670 b	2.6231 c
<i>S. saponaria</i>	0.0000 d	0.0000 c	0.0000 d

a,b,c,d: Medias en una columna con diferente letra son diferentes estadísticamente ($P < 0.05$). Los parámetros analizados fueron: tiempo al punto de inflexión (POI, horas), biomasa al punto de inflexión (densidad óptica 620 nm) y Fase Lag o establecimiento microbiano (horas).

que la adición de 250 µg de la saponina esteroideal de *Y. shidigera* reducía el crecimiento de *Streptococcus bovis* (Gram-positiva) y de *Prevotella bryantii* (Gram-negativa). La influencia definitiva de las saponinas sobre el crecimiento de las bacterias ruminales puede ser difícil de esclarecer, pero es posible relacionar estos resultados con diferencias en la composición de la envoltura bacteriana (Wallace *et al.*, 1994; Sen y col., 1998). En general, se conoce que las saponinas se unen con lípidos de la membrana celular (colesterol y otros esteroides) ocasionando un desajuste de las funciones de la membrana con la consecuente detención del crecimiento celular (Glauert y col 1962; Bangham y Horne, 1962; Gögelein y Hüby, 1984; Francis y col., 2002). Se ha sugerido que la formación de poros sobre la membrana es el resultado del reordenamiento de los componentes de la membrana celular, particularmente del colesterol y otros esteroides. Es probable que la presencia de una pared celular rígida y densa constituida principalmente por polisacáridos en las bacteria Gram-positivas, como *R. flavefaciens*, puede prevenir o reducir la unión de las saponinas presentes en los extractos de *P. saman* y *S. saponaria*, mientras que las bacterias Gram-negativas como *F. succinogenes* poseen dos membranas celulares compuestas por fosfolípidos con una barrera intermedia muy delgada de polisacáridos (Neidhardt y col., 1990; Wallace y col., 1994; Sen y col., 1998) lo que las haría más vulnerables a la acción de las saponinas.

Por otro lado, el efecto de la adición de saponinas provenientes de *Q. saponaria* (Sigma S-4521) fue discreto frente al efecto de los otros ERS provenientes de los frutos de *P. saman* y *S. saponaria*. Su reducida actividad inhibitoria pudo

estar ocasionada por la concentración de sapogenina (~25%) presente en el reactivo y a su heterogénea mezcla de carbohidratos. Sen y col., 1998, sugirieron que comercialmente es factible encontrar saponinas del mismo tipo y origen, pero con diferente actividad biológica. Ellos han sugerido, que estas diferencias obedecen a las discrepancias en los procedimientos de preparación y purificación de estas. Adicionalmente, se ha sugerido que la actividad biológica de las saponinas de *Q. saponaria* puede estar influenciada por la presencia de isómeros de la saponina en la misma preparación. Higuchi y col., 1987 encontraron que las saponinas de *Q. saponaria* podrían contener hasta dos estructuras químicas diferentes en el mismo batch de preparación, estas diferencias son el resultado de la sustitución de una molécula de glucosa por una ramnosa.

El entendimiento de las diferencias en crecimiento de las bacterias del rumen observadas después de la adición de ERS, puede ser aún más complejo de lo que se conoce referente a la interacción de estos compuestos con los lípidos de la membrana celular. Las saponinas están constituidas por unidades de carbohidratos unidas a un aglicon (sapogenina), el cual puede ser de naturaleza triterpenoide o esteroideal (Francis y col., 2002; Haralampidis y col., 2002). La longitud en la cadena de carbohidratos ha mostrado influenciar diferentes cambios en la actividad fisiológica de las saponinas (Kuznetzova y col., 1982), ya que las saponinas esteroideas o triterpénicas con una sola cadena lateral de carbohidratos (monodesmosídica) tiene una mayor actividad hemolítica que las saponinas con dos cadenas laterales de carbohidratos (bidesmosídicas) (Fukuda y col., 1985; Wodelmichael y Wink.,

2001). Adicionalmente, otro factor que parece ser importante en la actividad e interacción de la saponina con la membrana celular, es la estereoquímica del azúcar terminal sobre la cadena de carbohidratos (Gee y col., 1998). Aunque la condición estructural y química de las saponinas encontradas en los ERS de *P. saman* y *S. saponaria* aún no se ha clarificado, Santos, 2004 encontró que los ERS de *P. saman* contenían una mezcla de por lo menos dos diferentes saponinas de tipo triterpénico, mientras que, los ERS de *S. saponaria* contenía una mezcla de al menos seis diferentes saponinas; cuatro de las cuales revelaron ser triterpénicas y dos esteroidales de acuerdo con la tinción LB. Es probable, que la respuesta diferencial de las bacterias ruminales a la acción de los ERS en este experimento, este asociada a la presencia de diversas saponinas en los ERS obtenidos de *P. saman* y *S. saponaria*.

Conclusiones

El crecimiento de las bacterias celulolíticas *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes* se vio afectado negativamente por los ERS de *Pithecellobium saman* y *Sapindus saponaria*. La mayor actividad inhibitoria se observó en *F. succinogenes* con ERS de *S. saponaria* en las concentraciones de 3 y 5 mg·ml⁻¹ y para *P. saman* en 5 mg·ml⁻¹. La presencia de compuestos antibacteriales como las saponinas en los frutos de arbóreas utilizados en la alimentación de rumiantes pueden reducir el número de bacterias celulolíticas, lo cual podría repercutir en la actividad degradativa del rumen. Los ERS de frutos de arbóreas inhibieron el crecimiento bacterial preferencialmente sobre la bacteria Gram-negativa.

AGRADECIMIENTOS

A Rolando Barahona Rosales (PhD) del Programa Nacional de Fisiología y Nutrición Animal, C.I. Tibaitatá. Al Dr. Doctor Jorge Arguelles (MSc) del Programa Nacional de Biometría, C.I. Tibaitatá. Al Dr. Yesid Avellaneda, Zootecnista. A los integrantes de Programa de Fisiología y Nutrición Animal.

BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, A.; Carulla, J.; Kreuzer, M.; Lascano, C.; Díaz, T.; Cano, A. y Hess, D. 2003. 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. Rev. Col. Cienc. Pec. 16: 2.

- Bangham A.D and Horne R.W. 1962.** Action of saponins on biological cell membranes. *Nature* 196:952-953.
- Bryant, M.P. 1972.** Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 25:1324-1328.
- Cheeke, P.R. 1999.** Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins. Proceedings of the American Society of Animal Science, ASAS annual meetings (Indianapolis, Indiana).
- Díaz, A.; Avendaño, M. y Escobar, A. 1993.** Evaluation of *Sapindus saponaria* as a defaunating agent and its effects on different ruminal digestion parameters. *Livest. Res. Rural Dev.* 5: 1-6.
- Francis, G.; Kerem, Z.; Makkar, H. and Becker, K. 2002.** The biological action of saponins in animal systems: a review. *Brit. J. of Nut.* 88(6): 587-605.
- Fukuda, K.; Utsumi, H.; Shoji, J. and Hamada, A. 1985.** Saponins can cause the agglutination of phospholipid vesicles. *Bioch. et Bioph. Acta.* 820: 199-206.
- Galindo, J.; Aldama, A.; Marrero, Y. y González, N. 2000.** Efecto de *Sapindus saponaria* en los géneros de protozoos y poblaciones de bacterias ruminales. *Rev. Cub. Cienc. Agríc.* 34: 353-358.
- Gee, J.M.; Price, K.R.; Johnson, I.T. and Rhodes, M.J. 1998.** The relationship between saponin structure and bioactivity: a preliminary study. In *Cost 98: Effects of Antinutrients on the Nutritional Value of Legume Diets.* No. 4: 8-14 [S. Bardocz & A. Pustai, eds.]. Luxemburg: European Commission.
- Glauert, A.M.; Dingle, J.T and Lucy, J.A. 1962.** Action of saponin on biological membranes. *Nature* 196: 953-955.
- Goetsch, A. L. and F. N. Owens. 1985.** Effects of saponin on digestion and passage rates in cattle fed medium to low concentrate. *J. Anim. Sci.* 68: 2377-2384.
- Gögelein, H. and Hüby, A. 1984.** Interaction of saponin and digitonin with black lipid membranes and lipid monolayers. *Bioch. et Bioph. Acta* 773: 32-38.
- Haralampidis, K.; Trojanowska, M. and Osbourn, A.E. 2002.** Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv. Bioch. Engin. Biotech.* 75: 31-49.
- Hess, H.D.; Kreuzer, M.; Díaz, T.E.; Lascano, C.E.; Carulla, J.E.; Soliva, C.R. and Machmüller, A. 2003.** Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Anim. Feed Sci. Tech.* 109: 79-94.
- Higuchi, R.; Tokimitsu, Y.; Fujioka, T.; Komori, T.; Kawasaki, T. and Oakenfull, D.G. 1987.** Structure of desacylsaponins obtained from bark of *Quillaja saponaria*. *Phytochemistry* 26: 229-235.
- Kuznetzova, T.A.; Anisimov, M. and Popov, A. 1982.** A comparative study *in vitro* of physiological activity of triterpene glycosides of marine invertebrates of echinoderm type. *Comp. Bioch. Physiol.* 73C: 41-43.
- Navas, A.; Laredo, M.; Cuesta, P.A.; Ortega, O. y Romero, M. 1994.** Evaluation of tropical trees with high or medium saponin content as dietary alternative to eliminate ciliate protozoa from the rumen. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 3: 204.
- Neidhardt, F.; Ingraham, J. and Schechter, M. 1990.** Physiology of the bacterial cell. A molecular approach. Sinauer associates. USA.
- Santos, A. 2004.** Perfil cromatográfico y evaluación de la actividad antiprotozoaria de los frutos de *Sapindus saponaria* y *Pithecellobium saman*. Tesis para optar al título de Licenciada en Química, Facultad de Ciencias y Educación, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá, Colombia.
- Sen, S.H.; Makkar, S.; Muetzel, T. and K. Becker. 1998.** Effect of *Quillaja saponaria* saponins and *Yucca schidigera* plant extract on growth of *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 35-38.
- Valdez, F. R.; Bush, L. J.; Goetsch, L. A and Owens, F. N. 1986.** Effect of steroidal saponin on ruminal fermentation and on production of lacting dairy cows. *J. Dairy Sci.* 69: 1568-1575.
- Wall, M.E.; Krider, M.M.; Rothman, E.S. and Eddy, C.R. 1952.** Steroidal saponin. I. Extraction, isolation and identification. *J. Biol. Chem.* 198: 533-543.
- Wallace, R.J.; Arthaud, L. and Newbold, C.J. 1994.** Influence of *Yucca schidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. *Appl. Environ. Microb.* 60: 1762-1767.
- Wang, Y.; McAllister, T. A.; Yanke, L.J. and Cheeke, P.R. 2000.** Effect of steroidal saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes. *J. Appl. Microb.* 88: 887-896.
- Woldemichael, G.M. and Wink, M. 2001.** Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. *J.I Agric. Food Chem.* 49: 2327-2332.