

Effect of a raw saponin extract on ruminal microbial population and *in vitro* methane production with star grass (*Cynodon nlemfuensis*) substrate

Efecto de un extracto crudo de saponinas en la población microbiana ruminal y en la producción de metano *in vitro* con sustrato de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*)

Juana Galindo¹, Niurca González¹, A. Luiz Abdalla², Mariem Alberto¹, R.C. Lucas², K. C. Dos Santos², M. Regina Santos², P. Louvandini², O. Moreira¹ and Lucía Sarduy¹

¹Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, Mayabeque, Cuba

²Centro de Energía Nuclear para la Agricultura (CENA), Universidad de São Paulo, Piracicaba, Brasil

Email: jgalindo@ica.co.cu

An experiment was conducted under *in vitro* conditions for determining the effect of a raw saponin extract on the ruminal microbial population and *in vitro* methane production with star grass (*Cynodon nlemfuensis*) substrate. Treatments were designed according to the quantity of saponin extract: 1) control, without saponins, 2) 0.6 %, 3) 1.2 % and 4) 1.8 % of the DM of raw saponin extract. The basal diet was star grass (*C. nlemfuensis*). The saponin extract was obtained from *Sapindus saponaria* fruit and its saponin content was of 139.5 mg, equivalent of diogenin.mL⁻¹. There was a reduction in protozoa population, regardless the saponin level. Its effect on the main cellulolytic bacteria, determined by PCR-RT, showed that the amount of *Fibrobacter succinogenes* was not modified while the values of *Ruminococcus albus* were 25.92; 26.72; 25.2 and 22.35 CT for the levels 0; 0.6; 1.2 and 1.8 %, respectively. The acetic acid concentration was not modified by the saponins; the propionic was reduced with 1.2 % inclusion. The concentration of valeric acid was 0.68; 0.62; 0.52 and 0.49 mmol.L⁻¹ for 0, 0.6; 1.2 and 1.8 % of saponin extract, respectively. Saponins increased methanogenic representation and methane production. It is concluded that the saponin extract modulates the fermentative process on reducing protozoa, does not modify the presence of *F. succinogenes* and decreases that of *R. albus*, probably due to the fact that both utilize the same resource, space and carbon source in the rumen. The quantity of methanogens was higher with 1.2 and 1.8 % coinciding with the highest methane production.

Key words: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, star grass, methanogens

Introduction

In recent years has been increased the use of trees and shrubs as diet supplement of domestic animals. One characteristics of these plants is that they possess secondary metabolites that can modify the degradation and passage rate of nutrients through the gastrointestinal tract (Pedraza 2000, García *et al.* 2008 and Delgado *et al.* 2011), as result of the direct effect on the ruminal ecology.

The presence of secondary metabolites, in particular saponins can act on the protozoa population and produce its lysis. The effect of these metabolites on fungi population, cellylolytic bacteria and methanogens is indirect because protozoa engulf huge amounts of these microbial groups and, consequently, improve the

Para determinar el efecto de un extracto crudo de saponinas en la población microbiana ruminal y producción de metano *in vitro* con sustrato de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) se condujo un experimento en condiciones *in vitro*. Los tratamientos se diseñaron de acuerdo con la cantidad de extracto de saponinas: 1) control, sin saponinas, 2) 0.6 %, 3) 1.2 % y 4) 1.8 % de la MS de extracto crudo de saponinas. La dieta base fue pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*). El extracto de saponinas se obtuvo a partir del fruto de *Sapindus saponaria* y su contenido en saponinas fue 139.5 mg, equivalente de diogenina.mL⁻¹. Se encontró reducción en la población de protozoos, independientemente del nivel de saponinas. Su efecto en las principales bacterias celulolíticas, determinadas mediante PCR-RT, mostró que la cantidad de *Fibrobacter succinogenes* no se modificó, mientras que los valores de *Ruminococcus albus* fueron 25.92; 26.72; 25.2 y 22.35 CT para los niveles 0; 0.6; 1.2 y 1.8 %, respectivamente. La concentración de ácido acético no se modificó por las saponinas, el propiónico se redujo con el 1.2 % de inclusión. La concentración de ácido valérico fue 0.68; 0.62; 0.52 y 0.49 mmol.L⁻¹ para los niveles de 0, 0.6; 1.2 y 1.8 % de extracto de saponinas, respectivamente. Las saponinas incrementaron la representación de metanógenos y la producción de metano. Se concluye que el extracto de saponinas modula el proceso fermentativo al reducir los protozoos, no modifica la presencia de *F. succinogenes* y disminuye la de *R. albus*, debido probablemente a que ambas utilizan el mismo recurso, espacio y fuente de carbono en el rumen. La cantidad de metanógenos fue superior con 1,2 y 1.8 %, lo que coincidió con mayor producción de metano.

Palabras clave: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, pasto estrella, metanógenos

Introducción

En los últimos años se ha incrementado el uso de árboles y arbustos como suplemento a la dieta de los animales domésticos. Una característica de estas plantas es que poseen metabolitos secundarios que pueden modificar la velocidad de degradación y pasaje de los nutrientes a través del tracto gastro- intestinal (Pedraza 2000, García *et al.* 2008 y Delgado *et al.* 2011), como resultado del efecto directo en la ecología ruminal.

La presencia de metabolitos secundarios, en particular las saponinas, pueden actuar en la población de protozoos y producir su lisis. El efecto de estos metabolitos en la población de hongos, bacterias celulolíticas y metanógenos es indirecto, debido a que

digestive efficiency of the feeds (Coleman 1980, La O *et al.* 2008 and Galindo *et al.* 2014).

Saponins are biomolecules that can affect ruminal fermentation in function of its structure, biological activity and concentration (Hart *et al.* 2008). The majority of the biological effects of these compounds can be attributed to its toxic action and to its defaunating effects in the rumen (Newbold *et al.* 1997), although there are evidences of the influence of these compounds on other microbial groups.

Probably the saponin capacity of joining to sterols provokes the lysis of the cell membranes of the protozoa, although there are also indications that these compounds affect the mobility of ciliate protozoa and the contraction of the holotrics, *Isotricha prostoma* and *Dasytricha ruminantium*. The referred effects are transitory and disappear when animals stop consuming this compound. In other studies it has been demonstrated that several of the main fungi species of the rumen are sensible to saponins and its growth is inhibited at very low concentrations of these secondary metabolites (Wina *et al.* 2005).

Cunningham (2009) indicated that protozoa ingest large volumes of bacteria and maintain constant its population in the rumen so that defaunation implicate the disappearance of the ecological relationships (predation and competition) affecting the type, genetic distribution and metabolic activity of the fungi and bacterial population of the ruminal ecosystem. The author reports that protozoa of type A, among them *Polyplastrum multivesiculatum*, act as predators of the cellulolytic bacteria *B. fibrisolvans*, *Ruminococcus flavefaciens* regarding the amylolytics *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis* or the acidophilic species as *Megasphaera elsdenii*. However, protozoa type B, including cellulolytic protozoa as *Epidinium ecaudatum*, *Eremoplastron bovis* and *Eudiplodinium maggii*, although acting also as predators of the cellulolytic bacteria are more slow regarding this process.

This study aimed at determining the effect of a raw saponin extract on the ruminal microbial population and *in vitro* methane production with star grass (*C. nlemfuensis*) substrate.

Materials and Methods

For fulfilling the objective of this research, a saponin extraction process was designed from *S. saponaria* fruit.

Fruits (30 in total) came from adult trees of approximately 3 m height from the Botanical Garden of Havana. Samples were collected in April-June, 2012. Once collected the fruits were taken to the laboratory of rumen microbiology of the Institute of Animal Science where the preparation process of the sample was carried out. For that, fruits were cut in small pieces with laboratory scissors. The cut material was sun-dried

los protozoos engolfan enormes cantidades de estos grupos microbianos y, consecuentemente, mejoran la eficiencia digestiva de los alimentos (Coleman 1980, La O *et al.* 2008 y Galindo *et al.* 2014).

Las saponinas son biomoléculas que pueden afectar la fermentación ruminal en función de su estructura, actividad biológica y concentración (Hart *et al.* 2008). La mayoría de los efectos biológicos de estos compuestos se pueden atribuir a su acción tóxica y a sus efectos defaunantes en el rumen (Newbold *et al.* 1997), aunque existen evidencias de la influencia de estos compuestos en otros grupos microbianos.

Es probable que la capacidad de las saponinas de unirse a los esteroides provoque la lisis de las membranas celulares de los protozoos, aunque también existen indicios de que estos compuestos afectan la movilidad de los protozoos ciliados y la contracción de los holotricos, *Isotricha prostoma* y *Dasytricha ruminantium*. Los referidos efectos son transitorios y desaparecen cuando los animales dejan de consumir este compuesto. En otros estudios se ha demostrado que varias de las principales especies de hongos del rumen son sensibles a las saponinas y su crecimiento se inhibe a muy bajas concentraciones de estos metabolitos secundarios (Wina *et al.* 2005).

Cunningham (2009) indicó que los protozoarios ingieren grandes volúmenes de bacterias y mantienen constante su población en el rumen, de modo que la defaunación implica la desaparición de las relaciones ecológicas (predación y competencia) que afectan el tipo, distribución genérica y actividad metabólica de la población fúngica y bacteriana del ecosistema ruminal. El autor informa que los protozoos del tipo A, entre ellos *Polyplastrum multivesiculatum*, actúan como predadores de las bacterias celulolíticas *B. fibrisolvans*, *Ruminococcus flavefaciens*, con respecto a las amilolíticas *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis* o las especies acidofílicas como *Megasphaera elsdenii*. Sin embargo, los protozoos del tipo B, que incluye a protozoos celulolíticos, como *Epidinium ecaudatum*, *Eremoplastron bovis* y *Eudiplodinium maggii*, aunque también actúan como predadores de las bacterias celulolíticas son más lentos en cuanto a este proceso.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de un extracto crudo de saponinas en la población microbiana ruminal y producción de metano *in vitro* con sustrato de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*)

Materiales y Métodos

Para cumplir con el objetivo de esta investigación, se diseñó un proceso de extracción de saponinas a partir del fruto de *S. saponaria*.

Los frutos (30 en total) procedían de árboles adultos, que tenían aproximadamente 3 m de altura, pertenecientes al Jardín Botánico de La Habana. Las muestras se recolectaron en abril-junio de 2012. Una vez recolectados los frutos, se trasladaron al laboratorio de microbiología del rumen del Instituto de Ciencia Animal, donde se

for three days and ground in a hammer mill with a 2 mm sieve until reducing its size to fine dust. This process was executed by ethanol extractions, evaporation, decanting with n-hexane, degreasing with n-butanol water saturated. For determining saponin concentration in the extract, the technique of Hansen *et al.* (2003) was used. The reaction was made with vanillin solution in acid mean and the determination with the standard curve of diosgenin.

Experimental procedure. The *in vitro* technique of gas production described by Theodorou *et al.* (1994) was used. For that, 24 bottles of 160 mL containing 0.5 g of the experimental diets, 50 mL of buffer solution and 25 mL of ruminal liquor (Bueno *et al.* 2005, Makkar 2005 and Longo 2006) were employed. Also two bottles, without substrate, were utilized as blanks for correcting the effect of the ruminal liquor on the volumes of gas produced. Gas pressure did not exceed 7 psi for avoiding the inhibition of the process of microbial fermentation.

The battery of experimental bottles was integrated by 24 units. For each experimental treatment six bottles were used. There were three replications.

As donor animals of the ruminal liquor three adult female sheep of Santa Inés breed castrated at the dorsal sac of the rumen were employed. The ruminal liquor was extracted to fasting animals through the cannula. With the help of a forceps the solid fraction was extracted and the liquid was collected with a vacuum pump. The ruminal liquor was kept in thermo for guaranteeing the temperature (39 °C) and anaerobic conditions during the transportation to the laboratory. To the solid fraction a small portion of the buffering solution of Menke and Steingass (1988) was added and agitated for some seconds in a domestic blender for detaching the microorganisms joined to the fiber. Later, the filtrate of this portion is incorporated to the liquid fraction and it was agitated before its use. The ruminal liquor obtained was maintained in CO₂ atmosphere until the preparation of the experimental units.

The experimental units were placed for incubation for 24 h in a forced air stove.

Treatments. Consisted of different saponin dosages determined as percentage of the incubation DM:

- 1) Control, star grass (SG), 0 % saponins
- 2) SG + 0.6 % saponin extract
- 3) SG + 1.2 % saponin extract
- 4) SG + 1.8 % of saponin extract

The saponin dosages were selected according to the results of Abreu *et al.* (2003), Guo *et al.* (2008).

The chemical composition of the star grass was established by AOAC (2012). The fibrous fraction was quantified according to the protocol described by van Soest *et al.* (1991). Its composition in g/kg DM was: OM (947.52), CP (89.47), EE (25.32), ash (52.44),

efectuó el proceso de preparación de la muestra. Para ello, los frutos se cortaron en pequeños pedazos con tijeras de laboratorio. Los materiales cortados se secaron al sol durante tres días y se molieron en molino de martillo con criba de 2 mm hasta reducir su tamaño hasta polvo fino. El proceso se ejecutó mediante extracciones etanólicas, evaporación, decantación con n-hexano, desengrasado con n-butanol saturado con agua. Para la determinación de la concentración de saponinas en el extracto, se utilizó la técnica de Hansen *et al.* (2003). La reacción se efectuó con solución de vainillina en medio ácido y determinación con la curva estándar de diosgenina.

Procedimiento experimental. Se utilizó la técnica *in vitro* de producción de gas, descrita por Theodorou *et al.* (1994). Para ello se utilizaron 24 botellas de 160 mL, que contenían 0.5 g de las dietas experimentales, 50 mL de solución tampón y 25 mL de fluido ruminal (Bueno *et al.* 2005, Makkar 2005 y Longo 2006). También se emplearon dos botellas, sin sustrato, como blancos para corregir el efecto del líquido ruminal en los volúmenes de gas producido. La presión de gas no excedió los 7 psi para evitar la inhibición del proceso de fermentación microbiana.

La batería de botellas experimentales estuvo integrada por 24 unidades. Para cada tratamiento experimental se utilizaron seis botellas. Se efectuaron tres réplicas.

Como animales donantes de líquido ruminal se utilizaron tres ovinos, hembras adultas de la raza Santa Inés, castradas en el saco dorsal del rumen. A los animales se les extrajo líquido ruminal en ayuno mediante la cánula. Con la ayuda de una pinza se extrajo la fracción sólida, y la líquida se colectó con una bomba de vacío. El líquido ruminal se guardó en termos con cierre hermético para garantizar las condiciones de temperatura (39 °C) y anaerobiosis durante el traslado al laboratorio. A la fracción sólida se le añadió una pequeña porción de la solución amortiguadora de Menke y Steingass (1988) y se agitó por unos segundos en una batidora doméstica para desprender los microorganismos unidos a la fibra. Luego, el filtrado de esta porción se incorporó a la fracción líquida y se agitó antes de su uso. El fluido ruminal que se obtuvo se mantuvo en atmósfera de CO₂ hasta la preparación de las unidades experimentales.

Las unidades experimentales se colocaron a incubar durante 24 h en una estufa de aire forzado.

Tratamientos. Consistieron en diferentes dosis de saponinas, determinadas como por ciento de la MS de incubación:

- 1) Control, pasto estrella (PE), 0 % de saponinas
- 2) PE + 0.6 % de extracto de saponinas
- 3) PE+ 1.2 % de extracto de saponinas
- 4) PE + 1.8 % de extracto de saponinas

Las dosis de saponinas se seleccionaron según los resultados de Abreu *et al.* (2003), Guo *et al.* (2008).

La composición química del pasto estrella se determinó mediante AOAC (2012). La fracción fibrosa

NDF (585.2) and lignin (85.2 g/kg DM), respectively.

Saponin concentration in the raw extract was 139.5 mg equivalent of diogenin.mL⁻¹.

Samplings. Sampling times for the determination of gas production in dynamics were 4, 8, 12 and 24 h. For determining CH₄, 2.5 mL of gas were collected in each of the hours in which gas production was measured for forming a pool. These were introduced in a vacuum test tube for establishing methane production during 24 h of fermentation.

Determinations. Gas and methane productions were determined. At 24 h of fermentation, bottles containing the samples were placed in ice for stopping the fermentative process. From the supernatant samples were taken for establishing SCFA (total and individual) and N-NH₃ and for quantifying the populations of *F. succinogenes*, *R. albus*, total methanogens and protozoa.

Molecular monitoring of the microorganism populations. The quantification of *F. succinogenes*, *R. albus* and total methanogens were carried out by PCR-RT, according to Makkar and McSweeney (2005). DNA was practiced with the extraction kit (Kit PowerLyzer™ Power Soil. MOBIO). The extracted DNA was amplified for each of the specific primers (total bacteria, fungi, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and methanogenic bacteria). The primers were used at a concentration of 10 mM and the Sybr Green 490 was used. The final volume of the reaction was 10 µL.

The DNA amplification was carried out through the following program: 1 cycle of 95 °C 10 min, 40 cycles of 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s and 1 cycle of 95 °C 15 s, 60 °C 1 min and 95 °C 15 s.

The amount of microbial populations studied was expressed as proportion of total bacteria (ΔCt). These values of ΔCt were calculated by the difference between the Ct value (threshold cycle) of the target gene and the reference gene (16S rRNA of bacterium). The ΔΔCt was determined by difference between the ΔCt of the target groups of the experimental diets and the ΔCt of the target groups of the control diet. The percentage of cellulolytic and methanogenic bacteria relative to the total bacteria population was calculated from the values of ΔCt as 100 x (2^{ΔCt})⁻¹ and the expression of the target groups, regarding the control treatment as 2^{-ΔΔCt} (Denman and McSweeney 2006).

Methane determination. Methane was determined by gas chromatography in a Philips PU-4400 chromatograph with a 25 m capillary column and DB-1 stationary phase. A FID detector was used and H₂ as carrier (1 mL.min⁻¹). The temperature of the detector and injector was of 200 °C and the column temperature was 60 °C. It was injected 1 mL of gas contained in the syringe. Calculations of the methane concentration were realized from the equation obtained in the calibration curve:

se cuantificó de acuerdo con el protocolo descrito por van Soest *et al.* (1991). Su composición en g/kg MS fue MO (947.52), PB (89.47), EE (25.32), cenizas (52.44), FND (585.2) y lignina (85.2 g/kg MS), respectivamente.

La concentración de saponinas en el extracto crudo fue de 139.5 mg, equivalente de diogenina.mL⁻¹

Muestreos. Los tiempos de muestreo para la determinación de la producción de gas en dinámica fueron de 4, 8, 12 y 24 h. Para determinar CH₄, se recolectaron 2.5 mL de gas en cada uno de los horarios en los que se midió la producción de gas y se conformó un pool. Estos se introdujeron en un tubo de ensayo al vacío para determinar la producción de metano durante 24 h de fermentación.

Determinaciones. Se determinó la producción de gas y metano. A las 24 h de fermentación, las botellas que contenían las muestras se colocaron en hielo para detener el proceso fermentativo. Del sobrenadante se tomaron muestras para determinar AGCC (totales e individuales) y N-NH₃ y para cuantificar las poblaciones de *F. succinogenes*, *R. albus*, metanógenos totales y protozoos.

Monitoreo molecular de las poblaciones de microorganismos. La cuantificación de *F. succinogenes*, *R. albus* y metanógenos totales se realizó por PCR-RT, según Makkar y McSweeney (2005). La extracción de ADN se realizó con el Kit de extracción (Kit PowerLyzer™ Power Soil. MOBIO). El ADN que se extrajo, se amplificó para cada uno de los iniciadores específicos (bacterias totales, hongos, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* y bacterias metanogénicas). Los iniciadores se utilizaron a una concentración de 10 mM y se empleó el Sybr Green 490. El volumen final de la reacción fue de 10 µL.

La amplificación del ADN se efectuó mediante el siguiente programa: 1 ciclo de 95 °C 10 min, 40 ciclos de 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s y 1 ciclo de 95 °C 15 s., 60 °C 1 min y 95 °C 15 s.

La cantidad de poblaciones microbianas estudiadas se expresó como proporción de bacteria total (ΔCt). Estos valores de ΔCt se calcularon mediante la diferencia entre el valor del Ct (threshold cycle) del gen diana y el gen de referencia (16S rRNA de bacteria). El (ΔΔCt) se determinó mediante la diferencia entre el ΔCt de los grupos diana de las dietas experimentales y ΔCt de los grupos diana de la dieta control. El por ciento de bacterias celulolíticas y metanogénicas, relativo a la población de bacterias totales, se calculó a partir de los valores de ΔCt como 100x(2^{ΔCt})⁻¹ y la expresión de los grupos diana, relativos al tratamiento control, como 2^{-ΔΔCt} (Denman y McSweeney 2006).

Determinación de metano. El metano se determinó por cromatografía gaseosa en un cromatógrafo Philips PU-4400, con columna capilar de 25 m con fase estacionaria DB-1. Se utilizó detector FID y como gas portador H₂ (1 mL•min⁻¹). La temperatura del detector y del inyector fue de 200 °C y la temperatura de la columna fue de 60 °C. Se inyectó 1 mL de gas contenido en la jeringuilla. Los cálculos de la concentración de metano

$$y = 0.0001x + 2.8515 \quad (R^2 = 0.99)$$

A completely randomized experimental design was applied. The statistical analysis was made according to the design used. For the particular case of gas production, results were analyzed as random blocks. Each incubation group was considered as a block. The levels of saponin extract were considered as treatments and the average value of the bottles per treatment of each incubation group as the experimental unit. Duncan (1955) multiple range tests was used for identifying differences between means.

For the variables of molecular indicators the theoretical suppositions of the analysis of variance were verified from the Shapiro's and Wilk (1965) tests for the normality of the errors and Levene (1960) test for the homogeneity of the variance, the variables analyzed did not fulfill the theoretical suppositions of ANAVA, therefore, the ln transformation was employed for the delta CT variables. The subsequent verification demonstrated the fulfillment of the suppositions. For the CT indicator it was unnecessary to realize transformations owing to the fact that the theoretical suppositions were accomplished.

The statistical INFOSTAT package version 2001 from Di Rienzo *et al.* (2001) was utilized.

Results and Discussion

The incorporation of 0.6; 1.2 and 1.8 % of raw saponin extracted from *S. saponaria* fruit in fermentations with star grass substrate reduced the protozoa population regarding the control treatment without saponins (table 1).

se realizaron a partir de la ecuación obtenida en la curva de calibración:

$$y = 0.0001x + 2.8515 \quad (R^2 = 0.99)$$

Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado. El análisis estadístico se efectuó de acuerdo con el diseño que se utilizó. Para el caso particular de la producción de gas, los resultados se analizaron como bloques al azar. La tanda de incubación se consideró como bloque. Los niveles de extracto de saponinas se entendieron como tratamientos y el valor promedio de las botellas por tratamiento en cada tanda de incubación, como unidad experimental. Se utilizó la dócima de Duncan (1955) para identificar diferencias entre medias.

Para las variables de indicadores moleculares se verificaron los supuestos teóricos del análisis de varianza, a partir de las dócimas de Shapiro y Wilk (1965) para la normalidad de los errores. Se aplicó la dócima de Levene (1960) para la homogeneidad de varianza. Las variables analizadas no cumplieron con los supuestos teóricos del ANAVA, por lo que se empleó la transformación ln para las variables delta CT. La posterior verificación demostró el cumplimiento de los supuestos. Para el indicador de las CT no fue necesario realizar transformaciones, debido a que cumplieron con los supuestos teóricos.

Se utilizó el paquete estadístico INFOSTAT versión 2001 de Di Rienzo *et al.* (2001)

Resultados y Discusión

La incorporación de 0.6; 1.2 y 1.8 % del crudo de saponinas extraídas del fruto de *S. saponaria* en fermentaciones con sustrato de pasto estrella redujo

Table 1. Effect of the saponin level on pH, ammonia concentration, SCFA (total and individual) with star grass as basal diet

.Indicators	Saponins, %				SE ±
	0	0.6	1.2	1.8	
Protozoa, 10 ⁶ cells.mL ⁻¹	1.93 ^d (6.95)	1.50 ^c (4.60)	1.25 ^b (3.55)	0.45 ^a (1.58)	0.07 P<0.001
Methane, %	4.79 ^a	5.73 ^b	5.92 ^b	6.72 ^c	0.14 P<0.001
pH	6.94	6.90	6.90	6.90	0.02
NH ₃ mmol.L ⁻¹	3.27 ^a	3.66 ^b	2.87 ^a	3.08 ^a	0.13 P<0.01
Total SCFA, mmol.L ⁻¹	72.53 ^b	71.54 ^b	66.55 ^a	68.60 ^{ab}	1.32 P<0.05
Acetic, mmol.L ⁻¹	46.80	45.81	42.66	43.76	1.59
Propionic, mmol.L ⁻¹	12.25 ^c	11.57 ^{bc}	10.64 ^{ab}	10.50 ^a	0.31 P<0.01
Isobutyric, mmol.L ⁻¹	0.47	0.45	0.41	0.40	0.02
Butyric, mmol.L ⁻¹	10.32	10.77	10.51	10.65	1.42
Isovaleric, mmol.L ⁻¹	1.28	1.22	1.13	1.06	0.09
Valeric, mmol.L ⁻¹	0.68 ^b	0.62 ^b	0.52 ^a	0.49 ^a	0.03 P < 0.001

^{abc}Different letters indicate significant differences at P < 0.05 (Duncan 1955)

According to Klita *et al.* (1996) a possible mechanism that could account for the negative effect of the saponins on ciliate protozoa is the mass change produced on the permeability of the cell membrane due to the formation of complexes with the cholesterol and some proteins of this membrane. Protozoa, among the ruminal microorganisms, are especially susceptible to this change in the properties of the cell wall. In studies of Galindo *et al.* (2000) it was demonstrated that the inclusion of *S. saponaria* leaves in *in vitro* fermentations with star grass reduced protozoa population and modified its representation in species. Investigations of González *et al.* (2007) reported the effect of this plant on gas and methane production coinciding with the studies of Abreu *et al.* (2003) referring the assessment of the effect of the pericarp and *S. saponaria* fruit on the ruminal Holotrics ciliate population.

Hess *et al.* (2003 and 2004) results suggest that the saponin effects on ruminal protozoa could depend on the quality of the diet consumed by the animals, mainly when the CP content is high. In any case, it is important to consider that defaunation reduces CH₄ enteric emissions due to the flow of microbial cells from the rumen and to the reduction of acetate/propionate relationship, which are events considered as electron sinks (Leng 2014).

In table 1 is shown that there were no effects of the saponin level on the ruminal pH ($P < 0.05$). This result agrees with those obtained by Abreu *et al.* (2003), Díaz *et al.* (1993) and Navas-Camacho *et al.* (1994) *in vivo*, as well as in studies realized *in vitro* by Hess *et al.* (2003) who did not find significant changes in the pH of the ruminal liquor by effect of the pericarp and the entire fruit of *S. saponaria*, respectively.

Ammonia concentration was increased with 0.6 % saponins, 1.2 and 1.8 % did not differ from the control. Similarly there was effect of the saponin extract on the SCFA concentration. Supplementation with 1.2 % saponins reduced the concentration of total SCFA in the rumen, while 0.6 % had no effects. The amount of 1.8 % showed intermediate values between the control without saponins and 1.2 %.

Regarding the concentrations of the different SCFA, the saponins did not produce effect on the concentration of acetic, isobutyric, butyric and isovaleric acids. However, from 1.2 % the concentrations of propionic and valeric acids were reduced. The SCFA decreased from 72.53 mmol.L⁻¹ to 66.55 with 1.2 %. Santoso *et al.* (2007) assessing the effect of 13, 19.5 and 26 mg of saponins kg LW⁻¹ reported reductions in the SCFA concentration while the percentage of butyrate and isoacids, as well as the number of protozoa was linearly reduced regarding the saponin contents.

The effect of the saponin level on gas production and total gas production accumulated in 24 h of fermentation on fermenting star grass is shown in figure 1. Net

la población de protozoos con respecto al tratamiento control sin saponinas (tabla 1).

Según Klita *et al.* (1996), un posible mecanismo que podría explicar el efecto negativo de las saponinas en los protozoos ciliados es el cambio masivo que se produce en la permeabilidad de la membrana celular, debido a que se forman complejos con el colesterol y algunas proteínas de esta membrana. Los protozoos, entre los microorganismos ruminales, son especialmente susceptibles a este cambio en las propiedades de la membrana celular. En trabajos de Galindo *et al.* (2000) se demostró que la inclusión de hojas de *S. saponaria* en fermentaciones *in vitro* con pasto estrella redujo la población de protozoos y modificó su representación en especies. Estudios de González *et al.* (2007) informaron el efecto de esta planta en la producción de gas y metano, lo que coincide con informes de Abreu *et al.* (2003), que refieren la evaluación del efecto del pericarpio y el fruto de *S. saponaria* en la población de ciliados Holotricos ruminales.

Los resultados de Hess *et al.* (2003, 2004) sugieren que los efectos de las saponinas en los protozoos ruminales podrían depender de la calidad de la dieta que consumen los animales, principalmente cuando el contenido en PB es alto. De cualquier manera, es importante considerar que la defaunación reduce la emisión entérica de CH₄ debido al flujo de células microbianas desde el rumen y a reducción en la relación acetato/propionato, eventos que se consideran sumideros de electrones (Leng 2014)

En la tabla 1 se muestra que no hubo efectos del nivel de saponinas en el pH del rumen ($P < 0.05$). Este resultado concuerda con los obtenidos por Abreu *et al.* (2003), Díaz *et al.* (1993) y Navas-Camacho *et al.* (1994) *in vivo*, así como en estudios realizados *in vitro* por Hess *et al.* (2003), quienes no encontraron cambios significativos en el pH del líquido ruminal por efecto del pericarpio y del fruto completo de *Sapindus saponaria*, respectivamente.

La concentración de amoníaco se incrementó con 0.6 % de saponinas, 1.2 y 1.8 % no difirieron del control. Igualmente se mostró el efecto del extracto de saponinas en la concentración de AGCC. La suplementación con 1.2 % de saponinas redujo la concentración de AGCC totales en el rumen, mientras que 0.6 % no tuvo efectos. La cantidad de 1.8 % mostró valores intermedios entre el control sin saponinas y 1.2 %.

Con respecto a las concentraciones de los diferentes AGCC, las saponinas no produjeron efecto en la concentración de ácido acético, isobutírico, butírico e isovalérico. Sin embargo, a partir de 1.2 % se redujeron las concentraciones de ácido propiónico y valérico. Los AGCC disminuyeron desde 72.53 mmol.L⁻¹ hasta 66.55 con 1.2%. Santoso *et al.* (2007), al evaluar el efecto de 13, 19.5 y 26 mg de saponinas kg PV⁻¹, informaron reducciones en la concentración de AGCC, mientras que el por ciento de butirato e isoácidos, así como el número de protozoos se redujo linealmente con respecto al contenido de saponinas.

El efecto del nivel de saponinas en la producción de gas, al fermentar pasto estrella se muestra en la figura

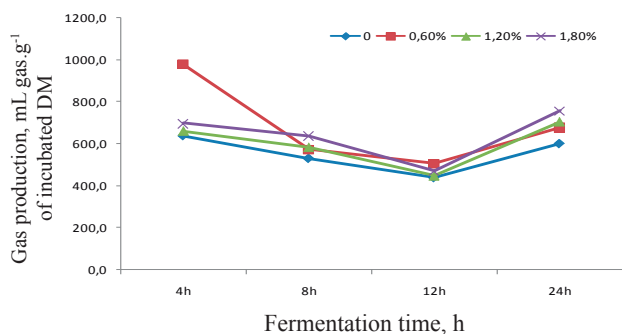


Figure 1. Effect of the saponin level on gas production with star grass substrate (mL of gas.g⁻¹ of incubated DM)

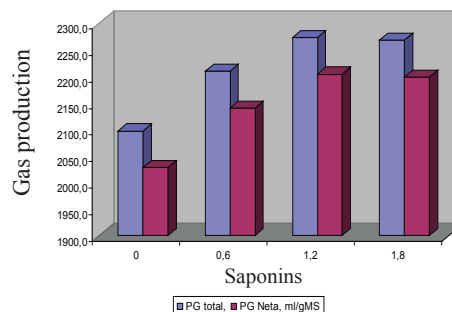


Figure 2. Effect of the saponin level on total gas production in 24 h and net production (mL of gas.g⁻¹ of incubated DM) with star grass substrate (SE \pm 21.5)

production (mL.g⁻¹ fermented DM) with star grass substrate is shown in figure 2.

In figure 3 can be observed the saponin effect on methane production at 24 h when star grass is used as fermentation substrate. In all treatments including saponins in the diet, methane production was increased.

1 y en la producción total de gas acumulada en 24 h de fermentación. La producción neta (mL.g⁻¹ MS fermentada) con sustrato de pasto estrella se muestra en la figura 2.

En la figura 3 se presenta el efecto de las saponinas en la producción de metano a las 24 h, cuando se utiliza pasto estrella como sustrato de fermentación. En todos

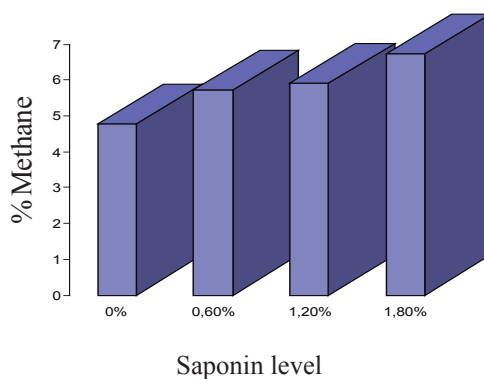


Figure 3. Effect of the saponin level on methane production (%) in 24 h with star grass substrate (SE \pm 0.14 P<0.001)

These results do not coincide with the reports of previous research studies in which saponins are indicated to reduce methane production at rumen level (Wang *et al.* 2006 and 2009). This is related to lower rumen protozoa population (Klita *et al.* 1996, Lila *et al.* 2003, 2005, Hess *et al.* 2004 and Wallace 2004).

In research studies conducted by González *et al.* (2007) the supplementation with 25 % *S. saponaria* to a *P. purpureum* cv. Cuba CT-115, found reductions in ruminal methane production. They attributed this fact to the high concentrations of saponins of *S. saponaria*.

Investigations of Rodríguez and Fondevilla (2012) who supplemented with *Enterolobium cyclocarpum* and raw saponin extracts demonstrated that these reduce methane production by direct effect on the protozoa population. Anyway, the complexity of these processes at the rumen led to the continuity of studies directed toward the assessment of saponin inclusion levels different to those used in this experiment, as

los tratamientos donde se incluyó saponinas en la dieta, la producción de metano se incrementó.

Estos resultados no coinciden con los informes de investigaciones previas, en los que se señala que las saponinas reducen la producción de metano a nivel de rumen (Wang *et al.* 2006 y 2009), lo que se relaciona con menor población de protozoos del rumen (Klita *et al.* 1996, Lila *et al.* 2003, 2005, Hess *et al.* 2004 y Wallace 2004).

En trabajos realizados por González *et al.* (2007), al suplementar con 25 % de *S. saponaria* una dieta de *P. purpureum* vc. Cuba CT-115, encontraron reducciones en la producción de metano ruminal. Atribuyeron este hecho a las altas concentraciones de saponinas que presenta *S. saponaria*.

Investigaciones de Rodríguez y Fondevilla (2012), quienes suplementaron con *Enterolobium cyclocarpum* y extractos crudos de saponinas a *P. purpureum*, demostraron que estos reducen la producción de metano por efecto directo en la población de protozoos. De cualquier manera, la complejidad de estos procesos a nivel del rumen induce a la continuidad de estudios encaminados a evaluar niveles

well as different nitrogen/energy relationships in the diets.

The use of the technique PCR-RT for monitoring two rumen species of cellulolytic bacteria, *F. succinogenes* and *R. albus* and the population of cellulolytic and methanogen fungi was previously described by Denman and McSweeney (2005, 2006). Since then, González *et al.* (2006) and González *et al.* (2010) used it in Cuba.

In this experiment, the identification and quantification by PCR-RT of the total bacteria and microorganism populations involved in fiber degradation in the rumen (*F. succinogenes*, *R. albus* and

de inclusión de las saponinas, diferentes a los utilizados en este experimento, así como distintas relaciones nitrógeno/energía en las dietas.

El empleo de la técnica de la PCR-RT para monitorear dos especies de bacterias celulolíticas del rumen, *F. succinogenes* y *R. albus*, y la población de hongos celulolíticos y metanógenos se describió previamente por Denman y McSweeney (2005, 2006). Desde entonces, González *et al.* (2006, 2010) la utilizaron en Cuba.

En este experimento, la identificación y cuantificación por PCR-RT de las poblaciones de bacterias totales y microorganismos que intervienen en la degradación de

Tabla 2. Effect of different inclusion levels of saponins on some ruminal microbial populations with stargras (CT) .

Indicator	Saponins, %				SE ±
	0	0.6	1.2	1.8	
Total bacteria	12.57	12.11	13.13	13.56	0.43
Fungi	27.83	28.63	29.42	29.24 ±1.61	1.31
Methanogens	19.72 ^a	19.84 ^a	21.87 ^b	20.81 ^{ab}	0.45
					p<0.05
<i>R. albus</i>	25.92 ^b	26.72 ^b	25.3 ^b	22.35 ^a	0.51
					p<0.01
<i>F. succinogenes</i>	19.35	20.94	23.25	26.37	1.59

^{ab}Means with different letters differ at P < 0.05 (Duncan 1955)

fungi) and of the total methanogen populations (table 2) showed that saponins did not have effects on the populations of total bacteria, fungi and the cellulolytic bacteria *F. succinogenes*.

There are study reports, developed by different groups of researchers, referring that saponins have antimicrobial activity against Gram+ bacteria, in relation to Gram- (Patra and Saxena 2009). Wallace (2004) reported that saponins inhibit the growth of *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Streptococcus bovis*. Patra and Yu (2013) observed that the addition of low doses of saponins, combined with nitrate, increase the population of *F. succinogenes*, while using high doses, the population is reduced. Zhou *et al.* (2011), when evaluating saponins extracted from tea (*Camellia sinensis*), confirmed a decrease of *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes*, and an increase of *B. fibrisolvens*, without any effect on *Ruminococcus albus*.

The 0.6 % level of saponin extract did not modify methanogen population regarding the control without this biomolecule. When 1.2 % of saponins were included there was an increase in the methanogen population. With 1.8 % this microbial group of the rumen attained intermediate population values. *R. albus* decreased its population in the rumen when 1.8 % saponins was incorporated in the star grass diet.

The representation percentage of methanogens, *R. albus* and *F. succinogenes*, regarding the total bacteria population is shown in table 3. As can be observed,

la fibra en el rumen (*F. succinogenes*, *R. albus*, hongos) y de las poblaciones de metanógenos totales (tabla 2) mostraron que las saponinas no tuvieron efectos en las poblaciones de bacterias totales, hongos y la bacteria celulolítica *F. succinogenes*.

Existen informes de trabajos, desarrollados por diferentes grupos de investigadores, en los que se refiere que las saponinas poseen actividad antibacteriana contra las bacterias Gram + en relación con Gram - (Patra y Saxena 2009). Wallace (2004) informó que las saponinas inhiben el crecimiento de *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Streptococcus bovis*. Patra y Yu (2013) observaron que la adición de dosis bajas de saponina combinada con nitrato, aumentan la población de *F. succinogenes*, mientras que al utilizar dosis altas se provoca su reducción. Zhou *et al.* (2011), al evaluar saponinas extraídas de té (*Camellia sinensis*) constataron disminución de *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes*, y aumento para *B. fibrisolvens*, sin ningún efecto sobre *Ruminococcus albus*.

El nivel de 0.6 % de extracto de saponinas no modificó la población de metanógenos con respecto al control sin esa biomolécula. Cuando se incluyó 1.2 % de saponinas, se produjo incremento en la población de metanógenos. Con 1.8 %, este grupo microbiano del rumen alcanzó valores poblacionales intermedios. *R. albus* disminuyó su población en rumen, cuando se incorporó en la dieta de pasto estrella 1.8 % de saponinas

El porcentaje de representación de metanógenos, *R. albus* y *F. succinogenes*, con respecto a la población

Table 3. Effect of different saponin inclusion levels in two cellulolytic rumen bacteria and methanogens regarding the total bacteria population (%)

Indicator	Saponins, %				SE ±
	0	0.6	1.2	1.8	
Methanogens	7.15	7.72	8.74	7.26	0.71
<i>R. albus</i>	13.35 ^{bc}	14.61 ^c	12.17 ^b	8.8 ^a	0.43
<i>F. succinogenes</i>	6.78	8.83	10.11	12.81	1.92

^{abc}Means with different letters differ at P < 0.05 (Duncan 1955)

Table 4. Difference between the control treatments and those including different levels of saponins for the different ruminal microbial populations studied (delta delta CT)

Indicator	Saponins, %			SE ±
	0.6	1.2	1.8	
Methanogens	0.57	1.59	0.1	1.08
<i>R. albus</i>	1.25 ^a	-1.19 ^b	-4.55 ^c	0.62
<i>F. succinogenes</i>	2.05	3.33	6.03	1.33

^{abc}Means with different letters differ at P < 0.05 (Duncan 1955)

Table 5. Percentage of methanogens and two ruminal cellulolytic bacteria relative to total bacteria

Indicator	Saponins, %				SE ±
	0	0.6	1.2	1.8	
Methanogens	-0.35 (0.74)	-0.75 (0.61)	-1.46 (0.29)	-0.42 (0.89)	0.49
<i>R. albus</i>	-4.64 ^{ab} (0.004)	-5.54 ^a (0.01)	-3.82 ^b (0.02)	-1.49 ^c (0.26)	0.31
<i>F. succinogenes</i>	-0.1 (2.13)	-1.52 (0.72)	-2.39 (0.29)	-4.31 (0.06)	1.33

¹Data transformed according to ln. ²() original means

^{abc}Means with different letters differ at P < 0.05 (Duncan 1955)

there was no effect of the saponins on the methanogens and *F. succinogenes*. However, there were interesting modifications in the *R. albus* population. With 0.6 % there was an increase of its representation although not differing from the treatment without saponins. The 1.2 % level produced a decrease regarding the 0.6 % level but no significant differences regarding the treatment without saponins. With the inclusion of 1.8 % saponins this cellulolytic rumen bacteria species reduced its representation.

Values of delta CT (table 4) and the expression related to the control of microbial populations of the rumen identified and quantified through molecular tools (table 5) indicated that all treatments including saponins showed the same difference and expression relative to the control treatment for the microbial populations of methanogens and *F. succinogenes*. On the contrary there were effects that decreased the *R. albus* population diminishing in the same magnitude as increasing levels of saponins were included in the diet.

de bacterias totales se muestra en la tabla 3. Como se puede observar, no hubo efecto de las saponinas en los metanógenos y *F. succinogenes*. Sin embargo, se produjeron modificaciones interesantes en la población de *R. albus*. Con 0.6 % hubo incremento de su representación, aunque no difirió del tratamiento sin saponinas. El nivel de 1.2 % produjo disminución con respecto al nivel de 0.6 %, pero sin diferencias significativas con respecto al tratamiento sin saponinas. Con la inclusión de 1.8 % de saponinas, esta especie de bacteria celulolítica del rumen redujo su representación.

Los valores de delta CT (tabla 4) y la expresión relativa al control de las poblaciones microbianas del rumen identificadas y cuantificadas mediante herramientas moleculares (tabla 5) indicaron que todos los tratamientos que incluyen saponinas mostraron la misma diferencia y expresión relativa al tratamiento control para las poblaciones microbianas de metanógenos y *F. succinogenes*. Contrariamente, hubo efectos que disminuyeron la población de *R. albus*, que decreció en la misma magnitud en

It is concluded that the raw saponin extract modulate the fermentative process by reducing protozoa. It does not modify the presence of *F. succinogenes*, decreases *R. albus*, probably due to the fact that both bacteria use the same resource, space and carbon source in the rumen. The quantity of methanogens was higher with 1.2 and 1.8 % coinciding with higher methane production.

que se incluyeron niveles crecientes de saponinas en la dieta. Se concluye que el extracto crudo de saponinas modula el proceso fermentativo al reducir los protozoos. No modifica la presencia de *F. succinogenes*, disminuye *R. albus*, debido probablemente a que ambas bacterias utilizan el mismo recurso, espacio y fuente de carbono en el rumen. La cantidad de metanógenos fue mayor con 1.2 y 1.8 %, lo que coincidió con mayor producción de metano.

References

- Abreu, A., Fornaguera, J. E. C., Kreuzer, M., Lascano, C. E., Díaz, T. E., Cano, A. & Hess, H.-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". *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 16 (2): 147–154, ISSN: 0120-0690.
- Bueno, I. C. S., Cabral Filho, S. L. S., Gobbo, S. P., Louvandini, H., Vitti, D. M. S. S. & Abdalla, A. L. 2005. "Influence of inoculum source in a gas production method". *Animal Feed Science and Technology*, 123–124: 95–105, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2005.05.003.
- Coleman, G. S. 1980. "Rumen ciliate protozoa". In: Lumsden W. H. R., Muller R. & Bakes J. R. (eds.), *Advances in parasitology*, vol. 18, London: Academic Press Inc. (London) Ltd., pp. 121–173, ISBN: 978-0-12-031718-9, Available: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/19812902063.html>>, [Consulted: February 21, 2016].
- Cunningham, J. G. 2009. *Fisiología veterinaria*. 4th ed., Barcelona: Elsevier, 720 p., ISBN: 978-84-8086-391-9, Available: <<https://www.amazon.es/Fisiolog%C3%ADa-veterinaria-incluye-evolve-Cunningham/dp/8480863919>>, [Consulted: May 3, 2016].
- Delgado, D. C., Galindo, J., González, R., González, N., Scull, I., Dihigo, L., Cairo, J., Aldama, A. I. & Moreira, O. 2011. "Feeding of tropical trees and shrub foliages as a strategy to reduce ruminal methanogenesis: studies conducted in Cuba". *Tropical Animal Health and Production*, 44 (5): 1097–1104, ISSN: 0049-4747, 1573-7438, DOI: 10.1007/s11250-011-0045-5.
- Denman, S. E. & McSweeney, C. S. 2005. "Quantitative (real-time) PCR". In: Makkar H. P. S. & McSweeney C. S. (eds.), *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants*, Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, ISBN: 978-1-4020-3790-0, Available: <<http://link.springer.com/10.1007/1-4020-3791-0>>, [Consulted: February 21, 2016].
- Denman, S. E. & McSweeney, C. S. 2006. "Development of a real time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen". *FEMS Microbiology Ecology*, 58 (3): 572–582, ISSN: 1574-6941, DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00190.x.
- Díaz, A., Avendaño, M. A. & Escobar, A. 1993. "Evaluation of *Sapindus saponaria* as a defaunating agent and its effects on different ruminal digestion parameters". *Livestock Research for Rural Development*, 5 (2): 1–6, ISSN: 0121-3784.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2001. *InfoStat*. version 2001, [Windows], Universidad Nacional de Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, Available: <<http://www.infostat.com.ar/>>.
- Duncan, D. B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". *Biometrics*, 11 (1): 1–42, ISSN: 0006-341X, DOI: 10.2307/3001478.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S. & Becker, K. 2002. "The biological action of saponins in animal systems: a review". *British Journal of Nutrition*, 88 (06): 587–605, ISSN: 1475-2662, DOI: 10.1079/BJN2002725.
- Galindo, J., Aldama, A. I., Marrero, Y. & González, N. 2000. "Efecto de *Sapindus saponaria* en los géneros de protozoos y poblaciones de bacterias ruminales". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 34: 353–358, ISSN: 2079-3480.
- Galindo, J., González, N., Marrero, Y., Sosa, A., Ruiz, T., Febles, G., Torres, V., Aldana, A. I., Achang, G., Moreira, O., Sarduy, L. & Noda, A. C. 2014. "Effect of tropical plant foliage on the control of methane production and in vitro ruminal protozoa population". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 48 (4): 359–364, ISSN: 2079-3480.
- García, D. E., Medina, M. G., Cova, L. J., Torres, A., Soca, M., Pizzani, P., Baldizán, A. & Domínguez, C. E. 2008. "Preferencia de vacunos por el follaje de doce especies con potencial para sistemas agrosilvopastoriles en el Estado Trujillo, Venezuela". *Pastos y Forrajes*, 31 (3): 1–1, ISSN: 0864-0394.
- González, N., Galindo, J., Aldana, A. I., Moreira, O., Abdalla, L. A. & Santos, M. R. 2010. "Evaluación de diferentes variedades de Morera (*Morus alba*) en el control de la metanogénesis ruminal en búfalos de río in vitro". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 44 (1): 37–41, ISSN: 2079-3480.
- González, N., Galindo, J., González, R., Sosa, A., Moreira, O., Delgado, D., Martín, E. & Sanabria, C. 2006. "Utilización de la técnica de PCR en tiempo real y de la producción de gas in vitro para determinar el efecto del ácido bromoetano sulfónico en la metanogénesis y la población microbiana ruminal". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 40 (2): 183–189, ISSN: 2079-3480.
- González, R., Delgado, D. & Cairo, J. 2007. "Efecto de la inclusión de *Sapindus saponaria* en la producción de gas y metano en la fermentación in vitro de *Pennisetum purpureum* cv Cuba CT-115". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 41 (1): 39–41, ISSN: 2079-3480.
- Guo, Y. Q., Liu, J. X., Lu, Y., Zhu, W. Y., Denman, S. E. & McSweeney, C. S. 2008. "Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms". *Letters in Applied Microbiology*, 47 (5): 421–426, ISSN: 1472-765X, DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02459.x.
- Hansen, I., Brimer, L. & Mølgaard, P. 2003. "Herbivore-deterrent secondary compounds in heterophyllous woody species of the Mascarene Islands". *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 6 (3): 187–203, ISSN: 1433-8319, DOI: 10.1078/1433-8319-00077.

- Hart, K. J., Yáñez-Ruiz, D. R., Duval, S. M., McEwan, N. R. & Newbold, C. J. 2008. "Plant extracts to manipulate rumen fermentation". *Animal Feed Science and Technology*, 147 (1–3): 8–35, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeeds.2007.09.007.
- Hess, H. D., Beuret, R. A., Lotscher, M., Hindrichsen, I. K., Machmuller, A., Carulla, J. E., Lascano, C. E. & Kreuzer, M. 2004. "Ruminal fermentation, methanogenesis and nitrogen utilization of sheep receiving tropical grass hay-concentrate diets offered with *Sapindus saponaria* fruits and *Cratylia argentea* foliage". *Journal of Animal Science*, 79 (1): 177–189, ISSN: 0021-8812, 1525-3163.
- Hess, H. D., Kreuzer, M., Díaz, T. E., Lascano, C. E., Carulla, J. E., Soliva, C. R. & Machmüller, A. 2003. "Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid". *Animal Feed Science and Technology*, 109 (1–4): 79–94, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/S0377-8401(03)00212-8.
- Klita, P. T., Mathison, G. W., Fenton, T. W. & Hardin, R. T. 1996. "Effects of alfalfa root saponins on digestive function in sheep". *Journal of Animal Science*, 74 (5): 1144–1156, ISSN: 0021-8812, DOI: /1996.7451144x.
- La O, O., García, R., Ruiz, O., Castillo, Y., Muro, A., Rodríguez, C., Arzola, C., González, H. & Ortiz, B. 2008. "In vitro ruminal fermentative potential of two trees (*Pithecellobium dulce* and *Tamarindos indica*) of importance for livestock rearing in fragile, saline ecosystems with high drought, located in the eastern part of Cuba". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 42 (1): 57–59, ISSN: 2079-3480.
- Latimer, G. W. 2012. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 19th ed., Gaithersburg, Md.: AOAC International, ISBN: 978-0-935584-83-7, Available: <http://www.amazon.com/Official-Methods-Analysis-OFFICIAL-ANALYSIS/dp/0935584838/ref=pd_sim_sbs_14_1?ie=UTF8&dpID=31iikC-xl2L&dpSrc=sims&preST=_AC_UL160_SR160%2C160_&refRID=101AB94246X0EM9N7XMW>, [Consulted: April 1, 2016].
- Leng, R. A. 2014. "Interactions between microbial consortia in biofilms: a paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation". *Animal Production Science*, 54 (5): 519–543, ISSN: 1836-0939, DOI: <http://dx.doi.org/10.1071/AN13381>.
- Levene, H. 1960. "Robust tests for the equality of variance". In: Olkin I., *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*, Stanford University Press, pp. 278–292, ISBN: 978-0-8047-0596-7, Available: <https://books.google.com/cu/books?hl=es&lr=&id=ZUSsAAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Contributions+to+Probability+and+Statistics&ots=GchNfCzOVQ&sig=-W3BeBmuWhTzrGRckktOdQjq0Di4&redir_esc=y#v=onepage&q=Contributions%20to%20Probability%20and%20Statistics&f=false>, [Consulted: April 19, 2016].
- Lila, Z. A., Mohammed, N., Kanda, S., Kamada, T. & Itabashi, H. 2003. "Effect of Sarsaponin on Ruminal Fermentation with Particular Reference to Methane Production in vitro". *Journal of Dairy Science*, 86 (10): 3330–3336, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73935-6.
- Lila, Z. A., Mohammed, N., Kanda, S., Kurihara, M. & Itabashi, H. 2005. "Sarsaponin effects on ruminal fermentation and microbes, methane production, digestibility and blood metabolites in steers". *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 18 (12): 1746, ISSN: 1011-2367.
- Longo, C. 2006. "Methane production from tannin rich plants incubated in vitro". In: *British Society of Animal Science Meeting*, York: British Society of Animal Science.
- Makkar, H. P. S. 2005. "In vitro gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals". *Animal Feed Science and Technology*, 123: 291–302, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeeds.2005.06.003.
- Makkar H. P. S. & McSweeney C. S. (eds.). 2005. *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 225 p., ISBN: 978-1-4020-3790-0, Available: <<http://link.springer.com/10.1007/1-4020-3791-0>>, [Consulted: April 19, 2016].
- 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 (1): 7–55, ISSN: 0340-3165.
- Newbold, C. J., el Hassan, S. M., Wang, J., Ortega, M. E. & Wallace, R. J. 1997. "Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria". *The British Journal of Nutrition*, 78 (2): 237–249, ISSN: 0007-1145, PMID: 9301414.
- Patra, A. K. & Saxena, J. 2009. "The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production". *Nutrition Research Reviews*, 22 (02): 204–219, ISSN: 1475-2700, DOI: 10.1017/S0954422409990163.
- Patra, A. K. & Yu, Z. 2013. "Effective reduction of enteric methane production by a combination of nitrate and saponin without adverse effect on feed degradability, fermentation, or bacterial and archaeal communities of the rumen". *Bioresource Technology*, 148: 352–360, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/j.biortech.2013.08.140.
- Pedraza, R. 2000. *Contribución al estudio del valor nutritivo de *Gliricidia sepium* en la alimentación de rumiantes*. Ph.D. Thesis, Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba.
- Rodríguez, R. & Fondevila, M. 2012. "Effect of saponins from *Enterolobium cyclocarpum* on in vitro microbial fermentation of the tropical grass *Pennisetum purpureum*". *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96 (5): 762–769, ISSN: 1439-0396, DOI: 10.1111/j.1439-0396.2011.01161.x.
- Santoso, B., Kilmaskossu, A. & Sambodo, P. 2007. "Effects of saponin from *Biophytum petersianum* Klotzsch on ruminal fermentation, microbial protein synthesis and nitrogen utilization in goats". *Animal Feed Science and Technology*, 137 (1–2): 58–68, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeeds.2006.10.005.
- Shapiro, S. S. & Wilk, M. B. 1965. "An analysis of variance test for normality (complete samples)". *Biometrika*, 52 (3-4): 591–611, ISSN: 0006-3444, 1464-3510, DOI: 10.1093/biomet/52.3-4.591.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B. & France, J. 1994. "A simple gas production method using

- a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds”. *Animal Feed Science and Technology*, 48 (3–4): 185–197, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/0377-8401(94)90171-6.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. 1991. “Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition”. *Journal of Dairy Science*, 74 (10): 3583–3597, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.
- Wallace, R. J. 2004. “Antimicrobial properties of plant secondary metabolites”. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63 (04): 621–629, ISSN: 1475-2719, DOI: 10.1079/PNS2004393.
- Wang, C. J., Wang, S. P. & Zhou, H. 2009. “Influences of flavomycin, ropadiar, and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation, and methane emission from sheep”. *Animal Feed Science and Technology*, 148 (2–4): 157–166, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2008.03.008.
- Wang, C., Wang, S., Zhou, H. & Glindemann, T. 2006. “Effects of forage composition and growing season on methane emission from sheep in the Inner Mongolia steppe of China”. *Ecological Research*, 22 (1): 41–48, ISSN: 0912-3814, 1440-1703, DOI: 10.1007/s11284-006-0191-9.
- Wina, E., Muetzel, S., Hoftman, E., Makkar, H. P. S. & Becker, K. 2005. “Effect of secondary compound in forages on rumen microorganisms quantified by 16S and 18S rRNA”. In: Makkar H. P. S. & Viljoen G. J. (eds.), *Applications of Gene-Based Technologies for Improving Animal Production and Health in Developing Countries*, Dordrecht: Springer Netherlands, ISBN: 978-1-4020-3311-7, Available: <<http://link.springer.com/10.1007/b105256>>, [Consulted: February 21, 2016].
- Zhou, Y. Y., Mao, H. L., Jiang, F., Wang, J. K., Liu, J. X. & McSweeney, C. S. 2011. “Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep”. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167: 93–100, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2011.04.007.

Received: November 30, 2015