

Efecto de un extracto de regaliz rico en flavonoides sobre la actividad protozoaria y la fermentación ruminal *in vitro*

Ramos-Morales, E., De La Fuente, G., Braganca, R., Newbold, C.J
Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences. Aberystwyth University.
Aberystwyth SY23 3DD, Gales. evr1@aber.ac.uk

INTRODUCCIÓN

La fermentación entérica ruminal supone una pérdida de aproximadamente el 12% de la energía consumida en la dieta, en forma de metano (Johnson y Johnson, 1995). La manipulación del ecosistema ruminal mediante el control de la población protozoaria para reducir las emisiones de metano es una de las principales vías utilizadas por nutricionistas y microbiólogos. Los protozoos están indirectamente implicados en la producción de metano al ser donantes del H₂ que utilizan las arqueas metanogénicas que viven en simbiosis con ellos. Por otro lado, los protozoos son los responsables de la mayoría de la degradación bacteriana en el rumen, causando un incremento en el reciclaje de nitrógeno dentro del rumen y una disminución del aporte de proteína bacteriana a tramos posteriores del aparato digestivo.

Se ha demostrado que ciertas plantas o extractos de plantas con alta concentración de compuestos secundarios, como las saponinas, aceites esenciales o flavonoides, presentan un gran potencial como moduladores de la fermentación ruminal (Hart et al., 2008). Entre los compuestos secundarios, los flavonoides han despertado un gran interés debido a su amplio espectro de actividad biológica y, en particular, debido a sus propiedades antimicrobianas (Oskoueian et al., 2013). El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la adición de distintas concentraciones de un extracto de regaliz rico en flavonoides sobre la actividad protozoaria y la fermentación ruminal *in vitro* utilizando como inóculo líquido ruminal de vacuno.

MATERIAL Y MÉTODOS

La actividad protozoaria *in vitro* se evaluó a partir de la degradación de bacterias marcadas radioactivamente con [¹⁴C], tal y como está descrito por (Newbold, 2010). *Streptococcus bovis* se cultivó en medio M2 (Hobson, 1969) con [¹⁴C]Leucina. Posteriormente, las bacterias se aislaron por centrifugación y se lavaron y resuspendieron en una disolución tampón con [¹²C]leucina. Las bacterias marcadas isotópicamente se utilizaron como inóculo en la incubación con líquido ruminal. El líquido ruminal, obtenido a partir de cuatro vacas Holstein-Friesian (4 réplicas), se filtró y se mezcló (1:1) con una disolución tampón (Williams y Coleman, 1992). Se incubaron 7,5 ml de líquido ruminal filtrado con 0,5 ml de bacterias marcadas en tubos que contenían diferentes concentraciones (0,25, 0,5, 1 y 2 mg/ml de incubación) de un extracto de regaliz rico en flavonoides. Las incubaciones se llevaron a cabo en anaerobiosis a 39 °C y se tomaron muestras (0,5 ml) a las 0, 1, 2, 3, 4 y 5 h de la incubación, que se acidificaron con ácido tricloroacético y se centrifugaron. La radioactividad en el sobrenadante se determinó mediante espectrometría de centelleo líquido. La digestión bacteriana para cada tiempo de incubación se expresó como el porcentaje de la radioactividad liberada con respecto a la radiactividad total medida en la suspensión bacteriana.

Para estudiar la fermentación ruminal se empleó un sistema *in vitro* de cultivo no renovado de microorganismos ruminales (Theodorou et al., 1994). Se incubaron 300 mg de una dieta control (heno de alfalfa y cebada, 60:40) en botellas Wheaton de 120 ml sin o con 0,5, 1 y 2 mg/ml de extracto de regaliz. Cada botella se inoculó con 30 ml de medio de cultivo compuesto por líquido ruminal filtrado y una disolución tampón (1:3) (Menke y Steingass, 1988). A las 0, 2, 4 y 8 h de la incubación, se tomaron muestras para determinar la motilidad protozoaria mediante microscopía. Transcurridas 24 h de incubación, se tomaron muestras para la medida de pH y determinación de ácidos grasos volátiles (AGV) por cromatografía de gases y nitrógeno amoniacal por espectrometría. El análisis de los datos experimentales se realizó mediante un ANOVA de una vía. Los datos de degradación bacteriana y motilidad protozoaria a distintos tiempos de incubación se analizaron mediante un diseño de medidas repetidas. Las diferencias entre medias se establecieron utilizando el test LSD de Fisher (P<0,05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La adición de 0,25 mg/ml de un extracto de regaliz rico en flavonoides no tuvo ningún efecto sobre la actividad de los protozoos a lo largo del tiempo, en comparación con el control (Figura 1). Sin embargo, las incubaciones con 0,5 mg/ml resultaron en la reducción de la digestión bacteriana por los protozoos a partir de las 3 horas de incubación ($P < 0,001$). Este efecto fue mayor en presencia de las concentraciones más elevadas de este extracto a partir de las 2 horas de incubación (1 y 2 mg/ml), observándose una inactividad de los protozoos a lo largo del tiempo.

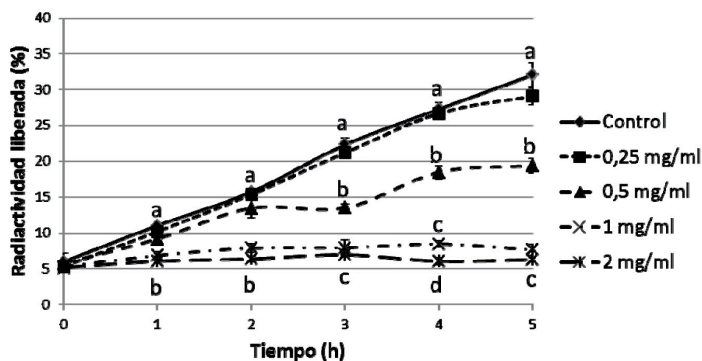


Figura 1. Radiactividad liberada relativa a la radiactividad total en las bacterias marcadas en ausencia (control) o presencia 0,25, 0,5, 1 y 2 mg/ml de extracto de regaliz. Para cada hora de incubación, medias con distinta letra difieren significativamente ($P < 0,05$)

Estos resultados están de acuerdo con la disminución de la motilidad de los protozoos observada en presencia de 1 y 2 mg/ml del extracto (Figura 2).

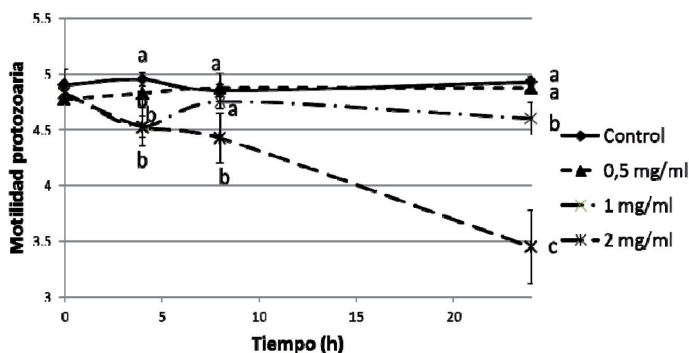


Figura 2. Motilidad de los protozoos en ausencia (control) o presencia de 0,5, 1 y 2 mg/ml de extracto de regaliz. Para cada hora de incubación, medias con distinta letra difieren significativamente ($P < 0,05$)

Con respecto a los parámetros de fermentación (Tabla 1), la adición de distintas cantidades de extracto de regaliz no modificó ni la concentración total de ácidos grasos volátiles ni la concentración de acético ($P > 0,05$). Sin embargo, la concentración de propiónico se incrementó ($P < 0,001$) cuando se incluyó 1 y 2 mg/ml de extracto de regaliz. Como consecuencia la relación acético/propiónico (A/P) disminuyó con niveles altos de inclusión del extracto. Igualmente, las dos concentraciones más altas del extracto redujeron la concentración de nitrógeno amoniacal ($P = 0,01$) en comparación con el control. Estos resultados muestran que determinadas dosis de un extracto de regaliz rico en flavonoides pueden tener un efecto antiprotozoario y modifican la fermentación ruminal de manera favorable. Por tanto, la adición de un extracto de regaliz rico en flavonoides a la dieta podría mejorar la eficiencia de la utilización de los nutrientes por los rumiantes.

Tabla 1. pH, nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y ácidos grasos volátiles (AGV) tras 24 h de incubación en ausencia (control) o presencia de 0,5, 1 o 2 mg/ml de extracto de regaliz rico en flavonoides.

	Tratamientos				eed ¹	P-valor
	Extracto de regaliz					
	Control	0,5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml		
pH	6,45 ^b	6,44 ^b	6,37 ^a	6,35 ^a	0,017	0,001
NH ₃ -N, mM	20,8 ^c	19,5 ^{bc}	18,2 ^{ab}	16,2 ^a	1,04	0,01
AGV totales, mM	75,2	77,7	79,4	77,9	3,92	0,77
Acético (A), mM	47,8	49,5	49,9	47,8	2,47	0,76
Propiónico (P), mM	14,2 ^a	15,1 ^{ab}	16,6 ^b	19,3 ^c	0,833	0,001
Isobutírico, mM	1,08 ^b	1,05 ^b	1,06 ^b	0,895 ^a	0,067	0,08
Butírico, mM	9,86 ^b	9,92 ^b	9,59 ^b	7,9 ^a	0,549	0,02
Isovalérico, mM	1,06 ^b	0,973 ^b	0,903 ^{ab}	0,743 ^a	0,077	0,02
Valérico, mM	0,964	1,032	1,067	1,037	0,064	0,46
Relación A/P	3,36 ^c	3,29 ^c	3,00 ^b	2,49 ^a	0,059	0,001

¹error estándar de la diferencia. En cada parámetro, medias con diferente letra difieren significativamente (P<0,05)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hart, K., et al., 2008. Anim. Sci. Technol. 147:8-35
- Hobson, P. N. 1969. Methods in Microbiology. Academic Press Inc, London.
- Johnson, K. A. & Johnson, D. E. 1995. J. Animal Sci. 73:2483-2492.
- Menke, K. H. & Steingass, H. 1988. Anim. Res. Develop., 7 – 55.
- Newbold, C. J. 2010. Assessing antiprotozoal agents. En: In vitro Screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants. 47-53. Vercoe, P. E., Makkar, H.P.S y Schilink A. C (eds).
- Oskoueian, E., et al., 2013. Biomed Res. Internat. Doi:10.1155/2013/349129
- Theodorou, M. K., et al., 1994. Anim. Feed Sci. Technol. 48: 185-197.
- Williams, A. G. & Coleman, G. S. 1992. The rumen protozoa. Springer-Verlag, New York

Agradecimientos: Este trabajo forma parte del proyecto “Ivy for Ruminants” (Ref:101097. Innovative UK).

IN VITRO EFFECT OF A LIQUORICE EXTRACT RICH IN FLAVONOIDS ON PROTOZOA ACTIVITY AND RUMEN FERMENTATION

Different doses (0.25, 0.5, 1 and 2 mg/ml) of a liquorice extract rich in flavonoids were incubated *in vitro* in diluted cow's rumen fluid with [¹⁴C] radioactive-labelled bacteria to study the effect on bacteria predation by protozoa. Additionally, 24 h *in vitro* incubations with this extract at 0.5, 1 and 2 mg/ml in diluted rumen fluid were carried out to determine the effect on fermentation and protozoa motility. Incubations of liquorice extract added at 0.5 mg/ml resulted in a reduction (P<0.001) of bacterial predation by protozoa, in comparison with the control. This effect was stronger (P<0.001) at 1 and 2 mg/ml, causing the complete abolition of protozoa. *In vitro* 24 h incubations with 1 and 2 mg/ml of liquorice extract resulted in a decrease of acetic/propionic ratio and ammonia concentrations (P<0.001 and P=0.01, respectively). Also, protozoa motility over time was reduced (P<0.001) when the highest concentration of the extract was incubated. These results showed the potential of a liquorice extract rich in flavonoids as a antiprotozoal agent causing a shift in rumen fermentation towards propionate and decreasing ammonia concentration. Therefore, the addition of a liquorice extract rich in flavonoids could potentially improve the efficiency of the feed utilization by ruminants.

Keywords: liquorice, flavonoids, protozoa.