

ARTÍCULO TÉCNICO

Elizabeth Martín¹,
Edward Pérez¹,
Solains Cañón¹,
Jorge Rodríguez¹ y
Fernando Rodríguez¹

ABSTRACT

Title: Ruminant anaerobic microorganism recovery using an experimental oro-ruminal probe

Ruminal microbial ecosystem studies have traditionally required the use of cannulated animals. The high cost of animal surgery and their maintenance has limited many laboratories having easy access to rumen samples and exploring their microbial diversity. Methods like using oro-ruminal probes have been traditionally used for transfaunations from healthy animals to others having digestive disorders and metabolic diseases; they have also been used in diagnosing several diseases: abomasum reflex syndrome, acute lactic acidosis, chronic-latent acidosis, putrefaction and microbial inactivity. The earliest oro-ruminal probe was used by Pounden in 1954, consisting of a simple tube descending from the mouth or nose to the rumen. A large syringe was included later on for sucking up the flow of ruminal liquid.

Perforated metal suction accessories have sometimes been used. Another technique has allowed small quantities of ruminal fluid to be obtained by caudo-ventral aspiration of the rumen using a simple syringe. Even though rumenocentesis (as this process is known) leads to the risk of producing localized peritonitis in an animal, it is currently one of the most used methods on large-scale production dairy farms for monitoring abrupt and frequent changes in ruminal pH which are usually associated with lactoacidosis. This study proposes using an oro-ruminal probe for obtaining samples of ruminal content from non-cannulated animals and its use in isolating customary anaerobic microorganisms. Evaluating and implementing the oro-ruminal probe methodology became necessary due to the growing need for further studies orientated towards gaining knowledge of microorganisms from the gastrointestinal tract and increasing CORPOICA's germoplasm bank collection of ruminal bacteria and fungi from Colombian creole breeds.

Key words: ruminal ecosystem, anaerobic ruminal microorganism, oro-ruminal probe.

Recibido: enero 18 de 2005.
Aceptado: mayo 2 de 2005.

1. Investigadores Programa Nacional de Fisiología y Nutrición Animal, CORPOICA, C.I. Tibaitatá.
e-mail: simbiosis21@yahoo.com

Sonda oro-ruminal experimental como alternativa para la obtención de microorganismos anaeróbicos del rumen

INTRODUCCIÓN

LOS ESTUDIOS DEL ECOSISTEMA microbiano ruminal han requerido tradicionalmente la utilización de animales canulados (Wallace *et al.*, 1992). Los elevados costos de la cirugía y del mantenimiento de los animales han limitado a muchos laboratorios para acceder con facilidad a las muestras de rumen y explorar la diversidad microbiana que se encuentra en ellas.

Métodos como la utilización de sondas oro-ruminales han sido empleados para hacer transfaunaciones de animales saludables a otros con desórdenes digestivos y enfermedades metabólicas (Dirksen, 1986). También han sido utilizadas en el diagnóstico de varias enfermedades como el síndrome de reflujo del abomaso, la acidosis láctica aguda, la acidosis crónico-latente, la putrefacción y la inactividad microbiana (Radostitis *et al.*, 2002). El dispositivo reportado más antiguo en sondas oro-ruminales fue usado por Pounden en 1954 y consistía en un tubo simple que atravesaba desde la boca o la nariz hasta el rumen. Posteriormente se incluyó una jeringa grande para succionar el flujo de líquido ruminal, algunas veces utilizando aditamentos de succión perforados y fabricados en metal. Otra técnica que ha permitido obtener pequeñas cantidades de fluido ruminal es la aspiración caudo-ventral del rumen mediante la utilización de una jeringa simple. Aunque la rumenocentesis, como se conoce este procedimiento, conlleva riesgos de producir en el animal una peritonitis localizada (Holberg, 1984), es actualmente uno de los métodos más utilizados en hatos lecheros de alta producción para monitorear los cambios bruscos y frecuentes de pH usualmente asociados con lactoacidosis (Radostitis *et al.*, 2002).

En este estudio se propone la utilización de una sonda oro-ruminal para obtener muestras de contenido ruminal de animales no canulados, y su utilización en el aislamiento de microorganismos anaerobios obligados. A fin de continuar los estudios orientados al conocimiento

de los microorganismos del tracto gastrointestinal e incrementar la colección de bacterias y hongos ruminales de las razas criollas colombianas del Banco de Germoplasma de CORPOICA se creyó necesario diseñar, probar e implementar esta sonda oro ruminal.

Materiales y métodos

Diseño y construcción de la sonda. La implementación de una sonda oro-ruminal como herramienta para obtener muestras de contenido ruminal de bovinos, incluyó los siguientes elementos: 3 m de manguera con un diámetro externo de una pulgada y 3 mm de pared, una manguera interna rígida de 2,7 m que evita el colapso de la manguera externa. Fueron realizados varios agujeros en la parte distal de la sonda (últimos 30 cm) donde ya no hay manguera interna. Un tapón se colocó en la punta de la manguera externa y una cubierta de plástico. La sonda fue conectada a un recipiente de toma de muestra y a una bomba de succión a través de acoples herméticos (Figura 1).

Animales y toma de muestras. Dos vacas Holstein de 450 kg, de 4 y 6 años de edad y fistuladas, fueron las donantes de contenido ruminal. Los animales fueron estabulados y alimentados con heno de avena durante un período de acostumbamiento de 15 días, y otros nueve días de muestreo subsiguiente. Los animales se mantuvieron en ayuno desde la tarde anterior a la toma de muestra. A las 8:00 a.m. del día de muestreo se alimentó a uno de los animales y a los 10 minutos al otro, ambos tuvieron acceso al alimento durante una hora. Se condujo al primer animal a un brete para ser tranquilizado con una dosis de Xylazine equivalente a 0,01 mg·kg⁻¹ de peso vivo, y 10 minutos después se hizo lo mismo con el otro animal.

Inicialmente se tomó fluido ruminal vía cánula, en condiciones anaeróbicas, con una manguera de 90 cm de largo con perforaciones en el extremo que fue introducido en el saco ruminal. El extre-

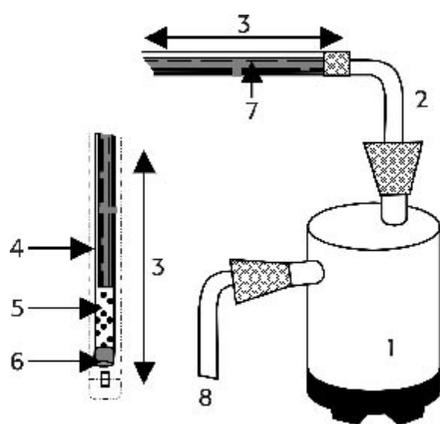


Figura 1: Montaje y sonda utilizados en la recuperación microbiana: 1) Recipiente de recolección, 2) Conexión a la sonda a introducir en el rumen, 3) Sonda (va al rumen), 4) Cubierta plástica temporal, 5) Agujeros, 6) Tapón, 7) Soporte interno de la sonda y 8) Conexión a la bomba de succión.

mo opuesto se conectó con el recipiente tradicional de toma de muestra, el cual a su vez fue conectado a una bomba de succión (Figura 1). El recipiente (montaje de toma de muestra) se colocó en hielo para facilitar el transporte de la muestra en refrigeración y el desprendimiento subsiguiente de las biopelículas bacterianas adheridas a las partículas de forraje por efecto del enfriamiento. La muestra destinada para la siembra de hongos fue colocada en tubos Hungate en un termo con agua a 39 °C.

Después de cerrar la cánula del animal se introdujo un abre bocas metálico cubierto con una banda de caucho para evitar laceraciones y/o fracturas bucales, se pasó la sonda por el tubo metálico, cuando se introdujeron aproximadamente 60 cm, se retiró la cubierta plástica sin retroceder la sonda hasta llegar al rumen (Figura 2, página opuesta). La sonda fue luego conectada al recipiente de toma de muestra, y éste fue llenado mediante el vacío generado. Un doblez en la sonda fue inmediatamente aplicado después del llenado del recipiente de toma de muestra con el fin de evitar el reflujo hacia el pulmón. La sonda fue extraída rápidamente y el abre bocas fue retirado (Figura 2). Las muestras fueron procesadas y cultivadas anaeróbicamente tal como fue descrito para los animales canulados.

Recuentos microbianos. Las poblaciones de bacterias y hongos ruminales fueron cuantificadas en muestras de contenido ruminal obtenido por dos vías: cánula y sonda oro-ruminal. Los medios de cultivo y las condiciones de procesamiento

anaeróbico han sido previamente descritos (Mojica, 1993; Ospina y col., 1994). En el laboratorio se realizó la siembra de los hongos a partir de 1 ml del fluido ruminal. Se diluyó la muestra 1/10 y 1/10.000 y se inoculó por triplicado en medio agar celobiosa-glucosa al 1,33%. Los tubos fueron llevados a *rolling* para formar las películas de agar y finalmente fueron incubados a 39 °C. El conteo de unidades formadoras de talo (UFT·ml⁻¹) fue realizado a las 72 horas.

El cultivo y recuento de bacterias ruminales se realizó después de mantener la muestra durante 4 horas a 4 °C, se licó durante un minuto a velocidad media, se filtró con gasificación continua, y del filtrado se tomó 1 ml para iniciar las diluciones y llevarlas hasta 10⁹. La siembra se realizó por triplicado en medio de agar celobiosa, se incubó a 39 °C durante 48 horas y se hizo el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC·ml⁻¹).

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza utilizando el paquete estadístico SAS® y de acuerdo con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \mu_{ijm}$$

Y = UFC y UFT μ = media poblacional, A = animal, B = vía toma de muestra AB = interacción, m = error experimental, i = animal 1, 2, j = sonda, cánula; k = 1, 2, 3,.....18.

Resultados y discusión

Mediante la utilización de la sonda oro-ruminal se recuperaron 9,37 x 10⁹ a UFC·ml⁻¹, y 9,63 x 10⁹ UFC·ml⁻¹ fueron

recuperados vía cánula (Tabla 1), lo cual no representa diferencias significativas (P > 0,05) entre los dos sistemas empleados. Con base en estos resultados se puede inferir que la toma de muestra de fluido ruminal no se ve afectada por la utilización de la sonda oro-ruminal. No obstante, fue notorio el efecto del animal sobre los recuentos poblacionales, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en los días 2, 3 y 8 del recuento de las bacterias celulolíticas, lo que se explica por las diferencias metabólicas que se pueden presentar entre animales.

No se encontraron diferencias significativas entre los conteos de hongos obtenidos por cada una de las dos vías de muestreo (P > 0,05). Recuentos microbianos de 3,06 x 10⁴ UFT·ml⁻¹ fueron obtenidos por la vía de la sonda y 3,22 x 10⁴ UFT·ml⁻¹ por la vía de la cánula (Tabla 2). Resultados similares (3,0 x 10⁴ UFT·ml⁻¹) fueron reportados por Hespel *et al.* en 1997, y en trabajos previamente realizados en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Nutrición Animal. Ospina y col. (1994) reportaron una recuperación de 4,6 x 10⁴ UFT·ml⁻¹ vía cánula, mientras Jiménez y col. (1999) encontraron una población de hongos de 3,09 x 10⁴ UFT·ml⁻¹ en animales suplementados con frutos de *Pithecellobium saman* y *Sapindus saponaria* y muestreados ruminalmente a través de la cánula. Estos resultados confirman los beneficios de utilizar la extracción de muestras de fluido ruminal por vía oro-ruminal, pues permiten sobrepasar

Tabla 1. Conteo de bacterias celulolíticas recuperadas de fluido ruminal de vacas Holstein obtenido mediante cánula o sonda oro-ruminal.

ANIMAL Y MÉTODO	PROMEDIO DIARIO DE UFC·ml ⁻¹ x 10 ⁹									
	Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 Sonda		3.3	4.8*	8.7*	11.5	11.9	9.8	12.1	9.3*	10.2
	Cánula	2.8	5.1*	9.1*	12.0	11.6	10.2	11.2	9.5*	11.7
2 Sonda		2.4	9.2*	12.9*	9.3	9.3	11.6	10.1	12.7*	10.6
	Cánula	3.5	8.8*	13.7*	10.4	9.2	12.2	10.4	12.1*	11.1

* Diferencias significativas a P > 0,05 entre animales.

Tabla 2. Conteo de hongos recuperados de fluido ruminal de vacas Holstein obtenido mediante cánula o sonda oro-ruminal.

ANIMAL Y MÉTODO	PROMEDIO DIARIO DE UFC·ml ⁻¹ x 10 ⁴									
	Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 Sonda		2.85	2.55	3.14	3.07	2.97	3.43	3.19	2.90	3.46
	Cánula	3.55	2.72	2.60	3.44	3.27	3.82	3.27	3.07	2.72
2 Sonda		2.73	3.75	3.18	2.80	3.28	3.14	3.07	2.73	2.90
	Cánula	3.32	3.73	3.20	3.45	3.67	2.77	3.15	3.15	3.20



Figura 2. Proceso de toma de muestra vía oro-ruminal: a) Introducción de la sonda a través del abrebocas metálico. b) Dispositivo de recolección de contenido ruminal completo. c) Contenido ruminal en la sonda. d) Transporte de muestras bajo condiciones de anaerobiosis para ser procesadas en el laboratorio.

las dificultades que conlleva canular el animal para obtener dichas muestras.

Para lograr éxito en la toma de fluido ruminal por vía oro-ruminal y obtener una recuperación satisfactoria de microorganismos ruminales, la sonda debe reunir ciertas características:

1) Tener un grosor en la pared adecuado para que con el vacío no se colapse e impida el paso del fluido hacia el recipiente de recolección.

2) La sonda interna no debe ser igual, ni en calibre ni en longitud, a la externa para permitir una succión adecuada.

3) Los agujeros de la parte distal de la sonda no deben ser de un diámetro menor a 0,7 mm para que puedan pasar partículas del alimento, principalmente porque en éstas hay bacterias que podrían ser recuperadas en el momento de la siembra.

La sonda debe también estar protegida con una cubierta plástica de forma temporal en el extremo que se va a introducir en el animal para evitar la contaminación con la saliva. También es importante tomar en cuenta las señales que indican que se está introduciendo la sonda por vía esofágica y no pulmonar, lo que podría causar daño al animal. Para esto lo más aconsejable es tener la cabeza del bovino por debajo de la altura de su propio lomo e introducir el abrebocas por el lado izquierdo de la boca y rápida e inmediatamente después la sonda. En caso que el animal presente síntomas de ahogo es mejor retirarla rápidamente tomando la precaución de doblar la sonda en forma de U y hacer presión empuñándola fuertemente con el objeto de no permitir el paso de algún líquido al pulmón. Si la sonda estuvo en el rumen no permitir que al retirarla valla fluido por vía pulmonar.

En caso que al tomar la muestra de fluido ruminal se observe presencia de saliva es mejor desechar la primera toma y sin retirar la sonda utilizar el aspirado producido después de la salivación. Según Dirksen 1996 para obtener una cantidad adecuada de fluido ruminal utilizable sin contaminación de saliva es importante aspirar el fluido de la bolsa ventral del rumen. Por consiguiente, la sonda para la colección del fluido del rumen de bovinos adultos debe ser por lo menos de 2.3 m. Algunas veces no se produce un flujo continuo del fluido al recipiente donde se recolecta y ello es debido a que parte de la sonda en la que no hay manguera interna esta contra una de las paredes del rumen, o se ha doblado sin permitir el paso del fluido, inconvenientes que se pueden superar sacando un poco la sonda.

Impacto tecnológico del muestreo oro-ruminal

Esta metodología hace posible incrementar las unidades experimentales utilizadas en los procesos de investigación y que están encaminados al conocimiento del ecosistema ruminal en el trópico, y específicamente al estudio en áreas como ecología microbiana, genética molecular, enzimología, biotecnología y nutrición animal. Con la utilización de la sonda se facilita la obtención de microorganismos del ecosistema ruminal sin recurrir a técnicas potencialmente nocivas para el animal. De igual forma, el sondeo oro-ruminal disminuye costos extras en la investigación, ya que no hay que incurrir en la fistulación y canulación de los animales.

Esta metodología abre la posibilidad de explorar la diversidad microbiana de un mayor número de ejemplares y razas bovinas. Además permite continuar con los estudios de caracterización adelantados en el Laboratorio de Microbiología Molecular (Martín *et al.*, 2003; Rodríguez y Martín, 2005). El objetivo es llegar al desarrollo y formulación de productos microbiales como extractos enzimáticos, probióticos y aditivos microbiales basados en microorganismos ruminales con aplicaciones industriales y agropecuarias como los propuestos por Bhat y Hazlewood, 2001; Michelet *et al.*, 2002).

BIBLIOGRAFÍA

Bhat, K.M. y Hazlewood, G.P. 2001. Enzymology and other characteristics of Cellulases and xilanases; Cap 2. En: *Enzymes in farm animal nutrition*. CABI Publishing, London, UK, p.p. 10-60.

Dirksen, G. 1986. Acquisition and analysis of bovine rumen fluid. *The bovine practitioner* 22.

Geishauser, T. y Gitzel A. 1996. A comparison of rumen fluid sampled by oro-ruminal probe versus rumen fistula. *Small Ruminant Research* 21(1): 63-69.

Hespel, R.B, et al., 1997. Bacteria, fungi, and protozoa of the rumen. En: *Gastrointestinal microbiology*. R.I. Mackie, B.A. White y R.E. Isaacson (eds.). Chapman and Hall. New York. pp. 59-141.

Holberg, W, 1984. Vergleichendle untersuchgen vos mittles Schambye – Sorensen – Sonde oder durch punktion des kaudovertralen pansesacks gewonneu pasensafproben desutsche tierazliche wochenschrift 66: 554-558.

Jiménez, Y. y Restrepo, C. 1999. Funcionamiento ruminal de animales

alimentados con forrajes de baja calidad y suplementados con frutos de saman (*Pithecellobium saman*). Tesis para optar al título de zootecnista. Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia.

Martín E. et al., 2003. Avances para el conocimiento de microorganismos ruminales aislados de bovinos de las razas criollas colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia* 16: 54.

Michalet D. et al., 2002. A comparison of enzymatic and molecular approaches to characterize the cellulolytic microbial ecosystem of the rumen and the cecum. *J. Anim. Sci.* 80: 790-796.

Mojica, J.R. 1993. Estandarización del método "Roll Tube" para el conteo y aislamiento de bacterias anaerobias ruminales. Tesis Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Ospina, M. 1994. Estandarización del método de roll-tube para el conteo y aislamiento de hongos anaeróbicos ruminales. Tesis facultad de bacteriología, Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia

Radostitis, O.M. et al., 2002. Medicina veterinaria, 9° edición, Mac Graw Hill Interamericana, México D.F., 1460 p.

Rodríguez, F. y Martín, E. 2005. Red de Recursos Forrajeros. Resúmenes de la primera reunión. Mosquera, C.I. Tibaitatá.

Wallace, R.J. 1992. Rumen microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: The application of research findings to a complex microbial ecosystem. F-E-M-S-microbial-LEET-FED-EUR-Microbial-Soc. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 100 (1/3): 529-534.