COMPARACIÓN DEL MUESTREO A TRAVÉS DE CÁNULA RUMINAL O SONDA ESOFÁGICA EN OVEJAS Y CABRAS: PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN Y MICROORGANISMOS DEL RUMEN

E. Ramos-Morales[1], A.I. Martín-García[1], E. Jiménez[1], A. Arco-Pérez[1], D.R. Yáñez-Ruiz[1], P. Frutos[2], G. Hervás[2]

[1]Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008, Granada
[2] Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-ULE, Finca Marzanas, 24346 Grulleros, León
eva.ramos@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

La canulación ruminal se considera el método de referencia para la obtención de muestras representativas de digesta del rumen sin necesidad de sacrificio y, por tanto, ha sido ampliamente utilizada en la investigación en nutrición de rumiantes. Sin embargo, otros métodos como la sonda esofágica permiten la toma de muestras de un mayor número de animales, reduciendo el coste y los problemas de bienestar asociados a la canulación. Aunque algunos autores argumentan que la toma de muestras mediante sonda esofágica puede conllevar a la contaminación con saliva (Duffield et al., 2004), otros exponen que los parámetros de fermentación ruminal determinados en muestras tomadas a través de la cánula o mediante la sonda resultaron similares (Shen et al., 2012). Este estudio se llevó a cabo con cabras y ovejas canuladas en el rumen para validar el uso de la sonda esofágica en la investigación con pequeños rumiantes. El objetivo principal de este estudio no fue la comparación directa entre métodos, sino comprobar si ambas técnicas podrían reflejar las diferencias, en cuanto a parámetros de fermentación y microbiología del rumen, debidas a la especie y a distintos momentos de muestreo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 4 ovejas segureñas y 4 cabras murciano-granadinas canuladas en el rumen, que se alimentaron con una dieta constituida por heno de alfalfa y concentrado (1:1). La dieta se administró en dos tomas, aproximadamente el 60% de la ración total diariaa las 9:00 h, y el 40% restantea las 16:00 h. El día 15 se tomaron muestras de digesta ruminal de cada animal, empleando sonda esofágica o a través de la cánula ruminal, antes del aporte de la ración de la mañana (Pre) y tras 4 horas (Post). Las muestras obtenidas se filtraron con una membrana de nailon de 400 μm de tamaño de poro, se midió el pH y se analizaron sus contenidos de amoníaco y lactato, por colorimetría, y de ácidos grasos volátiles, por cromatografía de gases. Además, se cuantificaron los grupos microbianos más abundantes (bacterias, protozoos y arqueas metanogénicas), así como una bacteria fibrolítica (*Ruminococcus flavefaciens*) empleando PCR a tiempo real (Denmanet al., 2007). El efecto de la especie (S) y el momento de muestreo (T) se analizaron mediante un análisis de varianza que incluía el animal como efecto aleatorio. Para ello, se utilizó el procedimiento MIXED del SAS 9.2(SAS Institute Inc., Cary, EE.UU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En relación a los parámetros de fermentación ruminal, las dos técnicas fueron capaces de detectar diferencias significativas entre momentos de muestreo, siendo la disminución del pH y el aumento de los ácidos grasos volátiles esperados cuando se muestrea tras la ingestión (Cantalapiedra-Hijar et al., 2009). En cambio, ninguna de ellas evidenció variaciones entre especies en la mayoría de losparámetros de fermentación, aunque las proporciones molares de acético fueron estadísticamente superiores (P=0,029) en las ovejas cuando se muestreó a través de la cánula, en tanto que la sonda solo detectó una tendencia (P=0,056). Ambos métodos, sonda esofágica y cánula ruminal, mostraron cantidades similares de bacterias totales en cabras y ovejas. Sin embargo, esta cantidad disminuyó significativamente cuando se muestreó tras la ingestión, lo cual solo fue patente en las muestras tomadas a través de la cánula (P=0,011) frente a las de la sonda esofágica (P=0,509). Esto podría ser debido al efecto de dilución que supone el consumo de la dieta

cuando la muestra de contenido ruminal se obtiene a través de la cánula, puesto que incluye tanto material líquido como sólido (Dehority, 2003). Los dos tipos de muestreo, sonda y cánula, evidenciaron diferencias significativas en la cantidad de protozoos entre especies (P=0,002 y P<0,001, para cánula y sonda, respectivamente), siendo este número mayor en cabras que en ovejas, como se ha observado en estudios anteriores (Yáñez-Ruiz et al., 2004). Igualmente, ambas técnicas reflejaron diferencias en el número de protozoos en función del momento de muestreo, siendo éste mayor (P=0,024 y P<0,001, para cánula y sonda, respectivamente) antes de la ingestión. En ningún caso se observaron variaciones en el número de arqueas metanogénicas y *R. flavefaciens.*La variación en los valores de cuantificación obtenidos por sonda es en general mayor que a través de la cánula, lo que podría explicarse por su posible menor representatividad (al recogerse una cantidad menor y de una zona más limitada) o quizás por una cierta contaminación con algo de saliva. En general, estos resultados indican que la técnica de muestreo mediante sonda esofágica permite detectar diferencias entre tratamientos (i.e., entre especies o momentos de muestreo) en los parámetros de fermentación y concentración de microorganismos del rumen, de forma similar a la técnica de la cánula ruminal.Por tanto, el empleo de sonda esofágica sería adecuado para el muestreo de digesta ruminal en pequeños rumiantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D.R., Martín-García, A.I., Molina-Alcaide, E. 2009. J. Anim. Sci. 87: 622-631. • Dehority B.A. 2003. Nottingham University Press (UK) • Denman S.E., Tomkins N.W., McSweeney C.S. 2007. FEMS Microbiol Ecol. 62: 313-22. • Duffield, T., Plaizier, J.C., Fairfield, A., Bagg, R., Vessie, G., Dick, P., Wilson, J., Aramini, J., McBride, B. 2004. J. Dairy Sci. 87: 59-66. • Shen, J.S., Chai, Z., Song, L.J., Liu, J.X., Wu, Y.M. 2012. J. DairySci. 95: 5978-5984. • Yáñez-Ruiz, D.R., Moumen, A., Martín-García, A.I., Molina-Alcaide, E. 2004. J. Anim. Sci. 82: 2023-2032.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proyectos AGL2011-27218 y AGL2011-23700).

COMPARISON OF SAMPLING BY RUMEN CANNULA OR STOMACH TUBE IN SHEEP AND GOATS: FERMENTATION PARAMETERS AND RUMEN MICROORGANISMS

ABSTRACT: Rumen cannulation is considered the most appropriate method for representative sampling of digesta and it has been widely used in research. However, other methods such as oral stomach probing represent an alternative to allow rumen sample collection from larger populations, reducing costs and welfare issues associated to cannulated animals. This experiment was conducted with ruminally cannulated sheep and goats to validate the use of the stomach probing in small ruminant nutrition research. Four sheep and four goats were fed a diet consisting of alfalfa hay and concentrate (1:1). On day 15, samples of rumen digesta were taken by stomach tube and rumen cannula, before (Pre) and 4 hours after the morning feeding (Post) and rumen fermentation parameters (pH, lactate, ammonia, and total VFA concentrations) were measured. Additionally, the three main rumen microbial groups (bacteria, protozoa and methanogenic archaea) anda fibrolytic bacteria (*Ruminococcus flavefaciens*) were quantified by real time PCR. Overall, sampling by rumen cannula or stomach tube was able to detect similar differences in fermentation parameters and numbers of microorganisms between sheep and goats sampled before and after feeding. These results suggest that stomach probing could be a suitable method for sampling rumen digesta from small ruminants.

Keywords: rumen cannula, stomach tube, goat, sheep

Tabla 1.*Capacidad de las dos técnicas de muestreo, sonda esofágica (SON) y cánula ruminal (CAN), para detectar diferencias en parámetros de la fermentación ruminal debidas al momento de muestreo (pre y post admistración de la dieta) y a la especie (cabra y oveja)*

		S		T			Prob.[2]		
	Método	**Cabra**	**Oveja**	**Pre**	**Post**	**eed[1]**	**S**	**T**	**S×T**
pH	CAN	6,67	6,42	6,93	6,16	0,139	0,183	0,000	0,991
	SON	7,02	7,04	7,31	6,75	0,121	0,883	0,002	0,732
Amoniaco(mg/L)	CAN	215,0	284,3	214,3	284,9	51,28	0,321	0,097	0,952
	SON	197,5	263,8	200,0	261,3	42,19	0,242	0,110	0,672
Lactato(mg/L)	CAN	210,4	204,3	185,8	228,9	16,79	0,766	0,019	0,095
	SON	148,5	131,5	113,3	148,5	21,28	0,559	0,006	0,063
AGV totales (mmol/L)	CAN	62,9	90,7	44,2	109,4	12,92	0,117	0,001	0,515
	SON	54,5	74,7	40,8	88,4	10,50	0,168	0,001	0,392
Acetato:_propionato	CAN	4,92	5,11	5,78	4,25	0,199	0,349	<0.001	0,439
	SON	5,06	5,27	6,00	4,34	0,217	0,417	<0,001	0,485
Proporciones molares (mol/mol)									
Acético	CAN	0,672	0,691	0,677	0,687	0,75	0,029	0,225	0,128
	SON	0,680	0,697	0,684	0,693	0,80	0,056	0,269	0,145
Propiónico	CAN	0,142	0,138	0,118	0,162	0,43	0,465	<0,001	0,066
	SON	0,139	0,136	0,115	0,160	0,42	0,439	<0,001	0,071
Butírico	CAN	0,118	0,117	0,125	0,109	0,41	0,812	0,002	0,674
	SON	0,113	0,115	0,122	0,106	0,45	0,679	0,004	0,879
Otros[3]	CAN	0,069	0,054	0,080	0,042	0,56	0,023	<0,001	0,005
	SON	0,068	0,053	0,080	0,041	0,54	0,018	<0,001	0,004

[1]eed, error estándar de la diferencia.
[2]Prob., nivel de significación. S, efecto de la especie; T, efecto del momento de muestreo; S×T, efecto de la interacción especie×momento de muestreo.
[3]Suma de isobutírico, valérico, isovalérico y caproico.

Tabla 2. *Capacidad de las dos técnicas de muestreo, sonda esofágica (SON) y cánula ruminal (CAN), para detectar diferencias en el recuento de los tres grupos microbianos mayoritarios en el rumen, así como en R. flavefaciens, debidas al momento de muestreo (pre y post admistración de la dieta) y a la especie (cabra y oveja)*

		S		T			Prob.[2]		
Log_{10} copias del gen/g MF	**Método**	**Cabra**	**Oveja**	**Pre**	**Post**	**eed[1]**	**S**	**T**	**S×T**
Bacterias Totales	CAN	11,4	11,3	11,4	11,2	0,069	0,162	0,011	0,359
	SON	11,3	11,2	11,3	11,2	0,164	0,653	0,509	0,868
Protozoos	CAN	10,5	10,3	10,5	10,3	0,079	0,002	0,024	0,732
	SON	10,5	10,1	10,4	10,2	0,050	<0,001	<0,001	0,291
Metanogénicas	CAN	8,99	9,05	9,14	8,91	0,150	0,690	0,151	0,576
	SON	8,86	8,72	8,94	8,64	0,251	0,600	0,249	0,714
R. flavefaciens	CAN	4,47	4,81	4,82	4,46	0,331	0,324	0,300	0,811
	SON	3,91	4,33	4,26	3,97	0,637	0,201	0,286	0,336

[1]eed, error estándar de la diferencia.
[2]Prob., nivel de significación. S, efecto de la especie; T, efecto del momento de muestreo; S×T, efecto de la interacción especie×momento de muestreo.