



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLAS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“Extracción con DNAzol[®] como una alternativa para la
obtención de ADN de fluido ruminal para análisis PCR-SSCP.”**

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:
GABRIELA VILLEGAS RIVERA

ASESOR:
D.C. JUAN JOSÉ VALDEZ ALARCÓN

MORELIA, MICH.

DICIEMBRE, 2007

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Anatomía y fisiología del rumen	2
1.2. Anatomía del aparato digestivo de los rumiantes	2
1.3. Características ambientales del rumen	3
1.4. Microbiología del rumen	4
1.5. Producción de metano.....	5
1.6. Afecciones del aparato digestivo de los rumiantes causados por alteraciones en las poblaciones microbianas del rumen	6
1.7. Paredes celulares de los vegetales.....	10
1.8. Función de los ácidos fenólicos en el rumen y su efecto sobre las poblaciones de microorganismos	11
1.9. Grupos microbianos del rumen	12
1.10. Características de los hongos	12
1.11. Degradación de las paredes celulares por los hongos del rumen	14
1.12. Grupos de protozoarios en el rumen	15
1.13. Características del forraje relacionadas con su calidad nutricional	16
1.14. Utilización de los BMMU como suplemento	17
1.15. Efectos de los BMMU sobre el animal	18
1.16. Función de los BMMU en el rumen	18
1.17. La microbiología molecular para el estudio de la ecología microbiana del rumen	19
1.18. Amplificación de poblaciones de hongos a partir de comunidades microbianas complejas	20
1.19. Polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de los genes de ARN ribosomal	21
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1. Objetivo general	24
4.2. Objetivos específicos.....	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1 Toma de muestra	25

5.2. Extracción de ADN total de fluido ruminal con reactivo DNAzol® (Invitrogen); Chomczynsky et al (1997).....	25
5.3. Extracción de ADN total de fluido ruminal por el método de Krause et al. (2001).....	25
5.4. Limpieza del ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico	26
5.5. Limpieza de ADN por adsorción en partículas de sílice (Gene Clean)...	26
5.6. Concentración y estimación de la pureza del ADN por espectrofotometría...	27
5.7. Oligonucleótidos a utilizar para las reacciones de PCR-SSCP de hongos del rumen	28
5.8. Amplificación por PCR del fragmento de ARNr 18S.....	28
5.9. Preparación de gel de SSCP.....	29
5.10. Condiciones de corrida para un gel acrilamida para el análisis por SSCP..	29
5.11. Tinción de geles de acrilamida con nitrato de plata (Lee et al., 1999)....	29
6. RESULTADOS.....	31
6.1. Extracción de ADN con DNAzol® y Krause de fluido ruminal.....	31
6.2. Rendimiento y estimación de la pureza del ADN de fluido ruminal por espectrofotometría	32
6.3. Purificación del ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y por adsorción en partículas de sílice (Gene Clean).....	32
6.4. Amplificación de los fragmentos de ARN ribosomal 16S con los oligonucleótidos Fnl1 y Fnu1.....	35
6.5. Comparación de los métodos de extracción de ADN en la generación de patrones de PCR-SSCP de genes de ARNr.....	36
7. DISCUSIÓN	38
8. CONCLUSIONES.....	40
9. BIBLIOGRAFIA	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2. Tracto digestivo de un rumiante y sus compartimentos.....	3
Figura 2. Fundamento de la técnica de SSCP	22
Figura 3. Extracción de ADN de fluido ruminal con el método de DNAzol® y Krause	31
Figura 4. Limpieza del ADN con dos protocolos (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y por adsorción en partículas de sílice, Gene Clean)	33
Figura 5. Limpieza del ADN por adsorción en partículas de sílice (Gene Clean)	34
Figura 6. Limpieza del ADN con el método con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico	34
Figura 7. Comparación de los métodos de Krause y DNAzol en la amplificación por PCR.....	35
Figura 8. Comparación de los métodos de Krause y DNAzol en la obtención de productos de PCR utilizando ADN almacenado por un mes.	36
Figura 9. Patrones de PCR-SSCP de productos de PCR de hongos.....	37
Figura 10. Análisis por SSCP de productos de PCR de ARN ribosomal de hongos.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de géneros bacterianos	13
Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos utilizados	28
Tabla 3. Composición de la reacción de PCR.....	28
Tabla 4. Composición del gel de poliacrilamida para SSCP	29
Tabla 5. Evaluación comparativa de la pureza y rendimiento del ADN de dos protocolos de extracción de ADN de muestras de fluido ruminal	32
Tabla 6. Evaluación comparativa de la pureza del ADN limpiado por dos métodos.....	34
Extracción con DNAzol® como una alternativa para la obtención de ADN de fluido ruminal para análisis PCR-SSCP de poblaciones microbianas.	

RESUMEN

Los microorganismos ruminales se encargan de oxidar los componentes de la pared de la célula vegetal a moléculas estructuralmente más simples. Una comunidad compleja en el ecosistema del rumen de microorganismos incluye hongos, bacterias y protozoarios compartiendo sus nichos metabólicos. En la presente investigación se pretende comparar diferentes métodos de extracción y de limpieza del ADN y demostrar como influyen en la calidad con que este sea obtenido para el estudio de la diversidad de poblaciones de hongos en el rumen y así identificar y evaluar cómo su dinámica es afectada por el contenido de la dieta mediante análisis PCR-SSCP de genes de ARN ribosomal. Los resultados se analizaron mediante un ensayo de PCR-SSCP, en la que se señalan diferencias en el efecto entre sustratos. Al evaluar los métodos de extracción, los resultados arrojados nos muestran que la extracción de ADN con DNAzol fue la mejor, por consecuente los productos de PCR-SSCP nos muestran bandas mejor definidas, mayor cantidad del producto de amplificación que el método de extracción de Krause. El ADN extraído con perlas de silica no se observaron bandas de producto de PCR en geles de agarosa.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Anatomía y fisiología del rumen

El rumen es una cámara grande en el aparato digestivo de los rumiantes que contribuye a su actividad digestiva y a la retención selectiva de partículas de alimento grande por el retículo. El omaso incrementa el tiempo de resistencia de material alimenticio fibroso. La rumia activa el flujo de saliva (contiene bicarbonatos y fosfatos), que genera un pH favorable para los microbios y el animal. Las contracciones musculares mezclan el alimento fresco con los microorganismos y expulsan metano (Russell y Rychlik, 2001), la fermentación en el rumen resulta de actividades físicas y microbiológicas que transforman los componentes de la dieta en productos útiles para el rumiante (ácidos grasos volátiles, proteínas microbianas, vitaminas del complejo B).

1.2. Anatomía del aparato digestivo de los rumiantes

Los rumiantes emplean un proceso denominado “rumia” en el que el animal regurgita el alimento, parcialmente digerido y tragado, para su remasticación después de sufrir un proceso de fermentación microbiana en el primer compartimiento del estómago. Esto les permite pastar, comer, masticar y digerir completamente. Luego de regurgitado y vuelto a masticar, el alimento forma el bolo constituido por partículas más pequeñas. En los rumiantes el estómago es poligástrico. Las dos primeras cámaras, rumen y retículo, se encargan del proceso de la digestión, mientras que en las dos últimas, omaso y abomaso, son las encargadas de la absorción. La figura 1 muestra el aparato digestivo de los rumiantes y sus compartimentos que lo componen. Estas cuatro cámaras: rumen, retículo, omaso y abomaso (nombradas de la región anterior a la posterior) se describen a continuación. El rumen por su parte, llena casi por completo el lado izquierdo de la cavidad abdominal, y podemos distinguir dos grandes divisiones: los compartimientos dorsal y ventral (Frandsen y Spurgeon, 1992). El rumen, actúa como una cámara de fermentación anaeróbica que recibe los alimentos más o menos triturados por la masticación (tamaño de partículas variadas dependiendo de la dieta). Los microorganismos presentes (bacterias, protozoos y hongos) prosperan y se desarrollan en las partículas de alimento fermentándolos, causando así una degradación digestiva, obteniendo

en el proceso energía y sustratos que los mismos microorganismos aprovechan para multiplicarse y desarrollarse, generando como subproductos ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena corta, metano y CO₂ (Preston *et al.*, 1990). El retículo presenta una mucosa con muchos pliegues, a modo de panal de abejas y su función es disminuir el tamaño de las partículas; participa también en el proceso de la rumia, eructo y retención de elementos extraños. Los AGV son absorbidos por la pared de retículo-rumen, con distintos destinos metabólicos, el metano y el CO₂ son eliminados a través del eructo y la masa microbiana permanece adherida al alimento avanzando por el tracto digestivo. El omaso presenta en su interior una serie de láminas musculares y la mucosa de estas presentan papilas que ayudan a digerir aun más los alimentos y aumentan la superficie de absorción. La primera porción glandular del aparato digestivo de los rumiantes es el abomaso o estómago verdadero. Comienza en el orificio omaso abomasal y lo cierra el esfínter pilórico. Sus regiones glandulares son muy similares a las del estómago de los monogástricos (González, 1990, Russell y Rychlik, 2001)

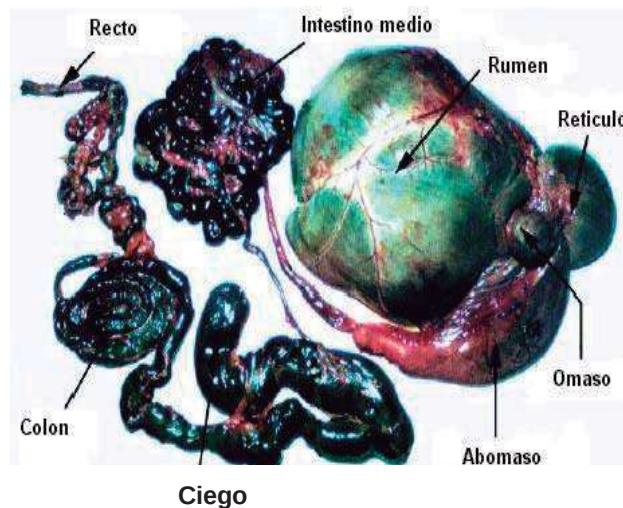


Figura 1. Tracto digestivo de un rumiante y sus compartimentos. (rumen, retículo, omaso, abomaso, intestino medio, ciego, colon, recto). Modificado por Russell y Rychlik, 2001.

1.3. Características ambientales del rumen

El rumen es una porción del tracto digestivo de los rumiantes, que es altamente especializado, el cual facilita el almacenamiento y procesamiento microbiano del forraje consumido. La degradación y utilización del material ingerido por el rumiante están reguladas por la planta, el animal y las características de las

poblaciones microbianas. Este órgano aporta un ambiente adecuado para el crecimiento de microorganismos anaerobios, los cuales son responsables de la degradación del forraje que el animal ingiere (Trinci *et al.*, 1994; Sellinger *et al.*, 1996). Entre las condiciones ambientales del rumen se encuentran: la temperatura mantenida entre 38 a 41°C, potencial redox de -250 a -450 mV, pH entre 5.8 a 6.8, favorables al crecimiento microbiano. La composición de los gases del rumen es variable, pero contiene 65% de CO₂, 27% de CH₄; 7% de N₂; 0.6% de O₂; 0.2% de H₂ y 0.1% de H₂S (Lin *et al.*, 1985). El ambiente ruminal se mantiene estable, debido a la presencia de ácidos orgánicos, producidos por la fermentación de varios alimentos y el flujo de saliva, que actúan como solución amortiguadora en el órgano (Hobson y Wallace, 1982).

1.4. Microbiología del rumen

Los microorganismos en el aparato digestivo de los rumiantes son capaces de degradar componentes estructurales de la pared celular de las plantas (celulosa, hemicelulosa y pectina); esta no es fácilmente disponible para el uso animal, debido a que éste no posee los componentes enzimáticos requeridos para la degradación de las moléculas poliméricas que la componen. Gracias a la presencia en el rumen de un grupo de microorganismos especializados estos compuestos son degradados a moléculas más simples.

La fermentación de los polímeros constituyentes del material vegetal por los microorganismos del rumen resulta en carbohidratos simples y en la producción de varios ácidos grasos de cadenas corta (o AGVs), encontrándose principalmente en una concentración de 56 a 70% de acetato, 17 a 29% de propionato y 9 a 19% de butirato, CO₂ y metano (Taylor *et al.*, 1974; Lin *et al.*, 1985).

Los microorganismos se han clasificado en relación con los sustratos que utilizan, algunos grupos microbianos degradan la celulosa, otros utilizan el almidón o la maltosa, la hemicelulosa y azúcares simples (Marounek y Bartos, 1987; Coughian, 1989).

Los constituyentes de las paredes celulares, al ser digeridos por los microorganismos del rumen, son desdoblados progresivamente en moléculas más sencillas, disminuyendo también su contenido de energía. Las rutas

metabólicas, que realizan la mayoría de los microorganismos del rumen son comunes entre ellos, aunque los sustratos y los productos finales dependen de las dietas (Hungate, 1966; Baldwin y Allison, 1983; Czerkawski, 1986). Los microorganismos del rumen son predominantemente anaerobios estrictos, aunque también existen anaerobios facultativos.

La flora microbiana del rumen comprende poblaciones con las siguientes características metabólicas (Russell y Rychlik, 2001):

- 1) Microorganismos celulolíticos: bacterias (*Fibrobacter* spp., *Ruminococcus* spp.), hongos (*Neocallimastix* spp., *Orpynomyces* spp.) y protozoarios.
- 2) Microorganismos que utilizan otros polisacáridos vegetales (pectina, hemícelulosa, almidón) y azúcares solubles: principalmente bacterias (*Prevotella* spp., *Megasphaera* spp., *Selenomonas* spp., *Succinivibrio* spp.) y algunos protozoarios.
- 3) Bacterias que fermentan lactato y succinato: *Streptococcus* spp., *Eubacterium* spp., *Lachnospira* spp., *Succinivibrio* spp., *Anaerovibrio* spp., *Wolinella* spp., *Prevotella* spp., *Megasphaera* spp.
- 4) Bacterias que utilizan péptidos y aminoácidos: *Peptostreptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Prevotella* spp.
- 5) Bacterias metanogénicas: principalmente arqueas, de los órdenes *Methanobacteriaceae*, *Methanococcaceae*, *methanosarcinales*; algunas se encuentran como simbioses de protozoarios.

La gran mayoría de los reportes acerca de la ecología microbiana molecular del rumen son meramente descriptivos; presentan las colecciones de secuencias de genes de ARNr de microorganismos presentes en la microflora ruminal, pero sin ningún enfoque ecológico, el cual debe contribuir al entendimiento de los procesos de digestión en el rumen (Zoetendal *et al.*, 2003).

1.5. Producción de metano

La producción de metano por los bovinos y otros rumiantes se ha convertido en sujeto de debate de conocimiento científico por el calentamiento global. Los bovinos son los más comprometidos en la emisión de este gas, estimándose que son responsables entre un 15 y un 30% de la producción total de metano que se produce en todo el mundo (Mc Caughey *et al.*, 1997).

La producción de metano por los rumiantes es una consecuencia ineludible de la fermentación de carbohidratos dentro del rumen. La producción de metano por el ganado estabulado es un fenómeno global, y es aparente que la reducción substancial de las emisiones requiere un esfuerzo conjunto entre rumiante y microorganismo, pero muchas de las estrategias promovidas en la actualidad para alcanzar este objetivo, son imprácticas para los países en desarrollo, donde los forrajes de baja calidad, son usados como fuente primaria de alimentación (Mc Allister *et al.*, 1994).

Los avances en la ciencia de la nutrición animal, en la optimización de la energía, se han enfocado sobre los hallazgos de diferentes métodos para reducir las emisiones de metano y sus efectos negativos. Al parecer algunos de los métodos publicados para este propósito son variados y el objetivo se ha alcanzado de diferentes maneras: manipulación de la composición de la dieta y la adición de diferentes compuestos químicos tales como la monensina (Van Nevel y Demeyer., 1977), el clorhidrato (Van Nevel *et al.*, 1969) y algunos otros compuestos análogos del metano (Richarson *et al.*, 1976)

1.6. Afecciones del aparato digestivo de los rumiantes causados por alteraciones en las poblaciones microbianas del rumen

La comunidad microbiana en el rumen es tan importante para el proceso digestivo del rumiante que cuando la dieta altera la flora microbiana provoca algunas afecciones a la digestión. A continuación se describen algunos ejemplos.

Meteorismo o timpanismo. Son términos usados indistintamente para denominar un desorden de los animales rumiantes causado por la excesiva retención de los gases de la fermentación microbiana, provocando una distensión anormal en el retículo-rumen (Clarke y Reid, 1973; Howarth *et al.*, 1986; Cheng *et al.*, 1998).

La producción de gas en el retículo-rumen es constante y abundante, y su eliminación mediante el eructo se realiza, en general, sin problemas. La composición de la mezcla gaseosa presente en el rumen es CO₂, CH₄, N₂, O₂, H₂ y H₂S. La propia fermentación microbiana del rumen da lugar como productos finales ácidos grasos volátiles (AGV), gases (CO₂ y CH₄), calor y

energía bajo forma de adenosín trifosfato (ATP), por lo que es la propia fermentación la principal responsable de la producción de gas del rumen. El exceso de poder reductor generado durante la conversión de una hexosa a acetato o butirato es utilizado, en parte, durante la formación del propionato pero, sobre todo, para la conversión a metano. Las bacterias metanogénicas como *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum* o *Methanomicrobium mobile*, presentes en el rumen utilizan el H_2 para reducir el CO_2 a metano y así obtener ATP.

La degradación de los carbohidratos en el rumen se da en varias etapas: hidrólisis de los polímeros complejos, acidogénesis por fermentación de los monómeros produciendo acetato, propionato, butirato, succinato, alcoholes, H_2 y CO_2 , Acetogénesis por fermentación secundaria generando acetato, H_2 , CO_2 a partir de los sustratos anteriores y metanogénesis a partir de H_2 , CO_2 , acetato. Los organismos clave en la conversión de compuestos orgánicos complejos a metano son los fermentadores secundarios, especialmente las bacterias que oxidan los ácidos grasos o los alcoholes que producen H_2 , pues utilizan estos compuestos como fuente de energía en cultivos mixtos, junto con un consumidor de H_2 a través de una relación sintrófica (sintrofia = comiendo juntos). La energía libre asociada a las conversiones de los ácidos grasos es positiva, pero si la concentración de H_2 se mantiene muy baja debido al consumo constante por los metanógenos se vuelve negativa lo que determina su factibilidad. En la mayoría de los ecosistemas anóxicos, la acetogénesis limita el proceso global porque la velocidad de crecimiento de los microorganismos que intervienen es generalmente muy lenta (Madigan et al., 2003). Los metanógenos están muy extendidos en la tierra a pesar de su metabolismo especializado. Aunque la producción de metano se produce en gran cantidad en los ambientes claramente anaeróbicos como pantanos, zonas encharcadas o el rumen, el proceso también se lleva a cabo en lugares como los suelos de bosques o praderas que podrían ser considerados aerobios, debido a la formación de microambientes anóxicos en el interior de las partículas de suelo (Fredrickson y Onstott, 1996).

El meteorismo es un componente importante de la mortalidad asociada a los trastornos digestivos. El meteorismo es un desorden que ocurre cuando el animal no puede expulsar el gas producido en el rumen, causando ello una

presión sobre el diafragma y los pulmones que impide la respiración, el animal muestra distensión del lado izquierdo, inflamación y puede llegar a causar la muerte del animal. Existen dos tipos fundamentales de meteorismo: gaseoso y espumoso (Cheng et al., 1998). En el meteorismo gaseoso se asocia a una u otra forma de obstrucción del esófago o cardias. Cuando el meteorismo es espumoso la responsabilidad de la dificultad en expulsar el gas recae sobre la producción de espuma estable en el rumen. Aunque existen diferentes productos preventivos y curativos del meteorismo, las buenas prácticas de manejo del ganado, ya sea en el pasto como en el cebadero, constituyen, sin duda, la mejor forma de prevenir este trastorno digestivo (Stanford et al., 2001).

Acidosis ruminal y sus consecuencias. Esta enfermedad es una consecuencia de la alimentación con dietas con alto contenido de grano, alimento con alto contenido de almidón, de fácil degradación y que conduce a la acidogénesis. Los rumiantes generalmente tienen su metabolismo adaptado al consumo de forraje, que contiene paredes celulares vegetales ricas en celulosa, hemicelulosa y pectina, cuya asimilación es menos eficiente (Krause et al., 2006). La alimentación con dietas altas en concentrado (arriba de 75%) aumenta la producción de leche, sin embargo, si se administran estas dietas por periodos largos, se compromete la salud del animal. La acidosis ruminal cobra importancia no solo por razones económicas, si no también, por el bienestar. La acidosis de la panza se produce por la ingestión desmesurada de forrajes ricos en hidratos de carbono o la falta de hábito al comerlos. Se caracteriza por la formación rápida y absorción de ácido láctico en el rumen. La ingestión brusca y excesiva de alimentos a base de hidratos de carbono, como son los granos de cereales, la remolacha azucarera, las patatas, las mazorcas de maíz, las manzanas o las acelgas, que contienen grandes cantidades de dextrosa, fructosa y sacarosa, origina repentinamente ácidos orgánicos de cadena corta sobre todo el láctico, que el organismo no puede eliminar con sus recursos propios mediante la absorción, la neutralización y la regulación del pH. Estos cambios se modifican bruscamente la flora y la fauna de la panza y aparece el proceso patológico (Krause et al., 2006).

De esta manera, los rumiantes tienen manifestaciones clínicas graves, que se presentan especialmente después de pacer en rastros de cereales o en campos de remolacha azucarera y de papas tras la recolección. El cuadro

patológico adquiere su fisonomía a las 3-6 horas después de la ingestión de alimentos azucarados. Además existen factores que agravan el cuadro clínico y el curso de la enfermedad, como son el llevar los animales a los abrevaderos después del pastoreo, y la falta de habituamiento a los alimentos hidrocarbonados. La enfermedad sigue un curso sobreagudo y produce una gran letalidad (Krause *et al.*, 2006).

En condiciones normales el pH del líquido ruminal varía según la composición de la ración en un rango de 6.2 a 7.0 al momento de la ingesta de alimento y con la subsecuente producción de ácidos grasos volátiles, el pH desciende, alcanzando su valor más bajo en 2 a 4 horas y aumenta hasta la siguiente comida. Los mecanismos regulatorios de la acidez del contenido preestomacal están dirigidos a nivelar el pH al punto más conveniente para la lisis microbiana de los nutrientes, de esta manera será alto en raciones ricas en celulosa (forraje) y bajo en raciones ricas en almidón/azúcares. En raciones altas en carbohidratos de fácil fermentación, aumenta la energía y disminuye el componente estructural (fibra), por lo que disminuye la secreción de saliva y con ello la afluencia de sustancias amortiguadora del pH en el rumen, por lo que el pH cae a un nivel favorable para la flora amilolítica y sacarolítica. Pero al descender el pH a un rango de 5 a 5.5, la flora preestomacal se encuentra lábil, de tal manera que pequeñas oscilaciones de la acidez pueden ser el estímulo para la multiplicación de las bacterias productoras de ácido láctico. En este segmento crítico la estabilización del pH depende en su mayoría de la capacidad de absorción del epitelio del rumen para ácidos grasos volátiles.

En concentraciones crecientes de ácido butírico y ácido propiónico en el epitelio se inician procesos proliferativos masivos de las papilas ruminales, aumentando su superficie y con ello la capacidad de absorción para los ácidos grasos volátiles. Para adaptar paulatinamente una mucosa baja (papilas pequeñas) a un alimento concentrado, es decir para inducir un estado proliferativo, se requiere de 4 a 5 semanas (Krause *et al.*, 2006).

Existen dos tipos de acidosis: aguda y subaguda, las cuales parten de la misma etiología, sus signos clínicos son muy diferentes. En la acidosis ruminal aguda es provocada por un excesivo consumo de carbohidratos rápidamente fermentables, lo que resultará en una repentina y descompensada baja en el pH ruminal y aumento en la concentración de ácido láctico. Esta disminución de pH

por debajo de 5.0 acarrea consecuencias fatales. Las vacas que no están adaptadas al consumo de dietas altas en granos, son por lo general más susceptibles a sufrir acidosis ruminal aguda, probablemente porque no han desarrollado una población adecuada de microorganismos que utilicen el ácido láctico y además sus papilas ruminales pueden ser cortas e incapaces de absorber grandes cantidades de ácidos grasos volátiles. La alimentación del ganado con dietas altas en grano después de un periodo de privación de alimento, puede también disparar la acidosis ruminal aguda (Krause *et al.*, 2006).

Acidosis ruminal subaguda. SARA, por sus siglas en inglés, se presenta en periodos de depresiones moderadas del pH ruminal (sobre 5.0-5.8) con una duración entre aguda y crónica. El ácido láctico no se acumula consistentemente en los fluidos ruminales; la depresión en el pH ruminal del ganado con SARA se debe a la acumulación de (AGV) totales y no a la acumulación de ácido láctico.

1.7. Paredes celulares de los vegetales

La fijación de bióxido de carbono por el proceso de la fotosíntesis en la biosfera rinde aproximadamente 1.4×10^{12} g de material vegetal por año, el cual presenta la forma de biomasa mas abundante de la tierra. Las constituyentes mas abundantes de esta biomasa son los polímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina, referidos como biomasa lignocelulosica, o simplemente lignocelulosa. La lignocelulosa se degrada en el ecosistema por los microorganismos, principalmente hongos y bacterias desasimilando una proporción de celulosa (20-30%) y lignina (18-30%) del material ingerido (Breznak, 1994). Las paredes celulares constituyen la mayor fuente de carbohidratos en el forraje.

La variedad de características químicas y estructurales de la pared celular limitan su degradación; las moléculas de lignina, celulosa, hemicelulosa, moléculas de polisacáridos, grupo acetilos y compuestos fenólicos, son los factores mas consistentemente asociados a la limitación de la digestión de la pared celular por los microorganismos del rumen. Existe evidencia de que la lignina y los ácidos fenólicos también son los responsables de la resistencia de las plantas a las enfermedades, a las temperaturas bajas y otros factores

estresantes (Buxton y Casler, 1993). La hemícelulosa es uno de los carbohidratos constituyentes de la dieta de los animales consumidores de plantas y su presencia está en relación directa con la de la celulosa y la lignina. La fracción de hemícelulosa comprende del 20-30% del total de carbohidratos de la pared celular de las plantas, por lo que también representa una importante fuente de energía para el rumiante (Atalla, 1993).

La importancia de los ácidos fenólicos fue descubierta con los trabajos de Higuchi et al. (1967). Los ácidos fenólicos mas abundantes son el ácido p-coumárico (PCA) y el ácido ferúlico (AF), se encuentran unidos a la lignina por enlaces éter y éster. Encontrándose en forrajes a una concentración de 93% de PCA y de 75% de AF (Harthey y Keene, 1984).

1.8. Función de los ácidos fenólicos en el rumen y su efecto sobre las poblaciones de microorganismos

Los ácidos fenólicos derivados de las paredes celulares lignificadas (secundarias), especialmente el ácido p-cumárico, inhiben el crecimiento de los protozoarios entodiniomorfos, limitan la degradación de la celulosa de las paredes celulares y reducen el crecimiento de las bacterias y los hongos (Akin et al., 1986). Los compuestos fenólicos son a menudo metabolizados incompletamente dentro del rumen y su metabolismo parcial puede alterar potencialmente su toxicidad. Altas concentraciones de ácidos fenólicos libres y mezclados son desprendidas por la acción de las hidrolasas en el sorgo y también, es probable que sean desprendidos por la acción de los tratamientos químicos aplicados al forraje para incrementar la digestibilidad, ocasionando una alta concentración de estos compuestos que disminuyen la degradación del forraje. Además, si estos compuestos son arrastrados durante la extracción de ADN de muestras de contenido ruminal y no son eliminados, pueden inhibir la acción de las enzimas de restricción o la ADN polimerasa, dificultando el análisis molecular (Chemey et al., 1992).

1.9. Grupos microbianos del rumen

Cada mililitro de contenido ruminal alberga alrededor de 10,000 a 50,000 millones de bacterias, siendo estos los microorganismos más abundantes. Las bacterias se encuentran en una gran variedad de géneros y especies. Por lo menos 28 especies se consideran funcionalmente importantes, las cuales se agrupan de acuerdo a su actividad. La mayoría de las bacterias son anaerobias estrictas, que no pueden sobrevivir en presencia de oxígeno, sin embargo también se encuentran presentes organismos facultativos (González, 1990; Nava y Díaz, 2001).

1.10. Características de los hongos

En el ecosistema ruminal existe una población microbiana que comprende, bacterias anaeróbicas y protozoarios (Hungate, 1966), junto con los hongos anaeróbicos descritos por (Orpin, 1975). Estos microorganismos se encuentran irregularmente distribuidos en las fracciones líquidas o adheridas al material sólido y paredes del rumen. Las bacterias y protozoarios han sido estudiados con detalle considerable, siendo su contribución al contexto de la fermentación ruminal más o menos conocido, la noción que se tiene sobre los hongos anaeróbicos es limitada y su participación en los procesos ruminales no está todavía bien aclarada.

Los resultados de investigaciones *in vitro* señalan que los hongos anaeróbicos del rumen son digestores de fibra (Bauchop y Mountfort, 1981; Gordon y Ashes, 1984, Hebraud y Fèvre 1988; Orpin y Letcher, 1979; Orpin y Hart, 1980; Pearce y Bauchop, 1985). Sin embargo, aunque estos estudios indican que los hongos poseen los componentes enzimáticos para degradar los polisacáridos de la pared celular, se conoce muy poco sobre la extensión de su actividad en la fermentación ruminal.

Tabla 1. Grupos de géneros bacterianos

Celulolíticos: » <i>Bacteriodes succinogenes</i> » <i>Ruminococcus flavefaciens</i> » <i>Ruminococcus albus</i> » <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Hemicelulolíticos: » <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> » <i>Bacteriodes ruminicola</i> » <i>Ruminococcus sp.</i>
Utilizadores de azúcar: » <i>Treponema bryantii</i> » <i>Lactobacillus vitulinus</i> » <i>Lactobacillus ruminus</i>	Utilizadores de ácidos: » <i>Megasphaera elsdenii</i> » <i>Selenomonas ruminantium</i>
Pectinolíticos: » <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> » <i>Bacteriodes ruminicola</i> » <i>Lachnospira multiparus</i> » <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> » <i>Treponema bryantii</i> » <i>Streptococcus Boris</i>	Utilizadores de lípidos: » <i>Anaerovobrio lipolytica</i> » <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> » <i>Treponema bryantii</i> » <i>Eubacterium sp.</i> » <i>Fusocillus sp.</i> » <i>Micrococcus sp.</i>
Amilolíticos: » <i>Bacteriodes amylophilus</i> » <i>Bacteriodes ruminicola</i> » <i>Streptococcus Boris</i> » <i>Succinimonas amylolytica</i>	Proteolíticos: » <i>Bacteriodes amylophilus</i> » <i>Bacteriodes ruminicola</i> » <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> » <i>Streptococcus Boris</i>
Productores de amoniaco: » <i>Bacteriodes ruminicola</i> » <i>Selenomonas ruminantium</i> » <i>Megasphaera elsdenii</i>	Productores de metano: » <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> » <i>Methanobacterium formicicum</i> » <i>Methanomicrobium mobile</i>
Ureolíticos: » <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> » <i>Bacteriodes ruminicola</i> » <i>Selenomonas sp.</i> » <i>Ruminococcus bromii</i> » <i>Butyrivibrio sp.</i> » <i>Treponema sp.</i> Church DcC(ed):The Ruminant Animal, Digestive Physiology and Nutrition. Englenwood Cliffs. Nj, Prentice Hall,1988.	

La habilidad de los hongos anaerobios del rumen para degradar y utilizar los carbohidratos estructurales de las paredes celulares ha sido investigada en aislamientos de fluido ruminal (Akin y Benner, 1988). Al parecer los hongos tienen una distribución amplia. Se han aislado hongos en varios países y los

aislamientos son similares en que ellos secretan una alta cantidad de celulasas y xilanasas extremadamente activas (Wood y Jonson, 1986).

Los hongos anaerobios del rumen son parte de las poblaciones degradadoras del rumen dentro de este ecosistema. Debido a sus características su clasificación de acuerdo a su género y especie es la siguiente: *Neocallimastix patriciarum*, *N. frontalis*, *N. hurleyensis*, *N. variabilis*, *N. joyonii*; *Piromyces communis*, *P. mae*, *P. dumbonica*, *P. minutus*, *P. spiralis*, *P. rhizinflata*; *Caecomycetes communis*, *C. equi*; *Orpinomyces joyonii*; *Anaeromyces mucronatus*, *A. elegans*.

1.11. Degradación de las paredes celulares por los hongos del rumen

Aunque la principal dieta de los herbívoros mamíferos son los materiales de los vegetales, los animales son incapaces de producir enzimas tales como las xilanasas y celulasas para digerir los forrajes. Ellos dependen totalmente de los microorganismos presentes en su tracto digestivo, para desdoblar los complejos de nutrientes a moléculas absorbibles (Gordon y Phillips, 1988; Li *et al.*, 1993; Agnes *et al.*, 1996).

Los estudios sobre la degradación de las paredes celulares de las plantas dentro del rumen, sugieren que la presencia de los hongos anaerobios depende de la dieta ofrecida al animal. Se ha observado que las poblaciones de hongos son muy abundantes en dietas conteniendo tallos de forraje, mientras que éstos no son destacados en dietas basadas en pastos como la cebada (Grenet *et al.*, 1989).

La ingestión de alimento en los animales rumiantes es la fase inicial de una serie compleja de eventos microbianos, los cuales incluyen colonización, fermentación, crecimiento, multiplicación y muerte de los microorganismos. La gran cantidad de bacterias, hongos y protozoarios presentes dentro del rumen, asegura una colonización rápida y el inicio de la degradación de los substratos insolubles (Bauchop, 1989; Bohatier *et al.*, 1990).

Se ha estimado que los hongos representan por lo menos el 8% de la biomasa del rumen y ocasionan que el material vegetal sea mas accesible para la colonización bacteriana (Li *et al.*, 1993; Mc Allister *et al.*, 1994).

Los hongos anaerobios pueden contribuir al desdoblamiento físico de las partículas de las plantas en el rumen. Orpin (1984) reporta una reducción significativa en el tamaño de las partículas de paja cuando se incuban con cultivos de hongos anaerobios y ha estimado que son los responsables de entre el 40 y el 70% de la digestión *in vivo* de las paredes celulares de las plantas (Akin *et al.*, 1990).

Después de periodos de fermentación prolongados (mas de 72 hrs), los hongos policéntricos y monocéntricos (se le llama monocéntrico al talo que tiene un solo centro de desarrollo, crecimiento y estructura reproductora, y policéntrico al talo que tiene un numero de centros de crecimiento, desarrollo y más de un órgano reproductivo) producen feruloil y p-coumaril esterases y estas enzimas tienen una función en la degradación del ácido ferúlico y el ácido p-cumárico, a partir de los complejos moleculares de la pared celular y pueden aumentar considerablemente la degradación de esta (Bomeman *et al.*, 1989).

1.12. Grupos de protozoarios en el rumen

La población de protozoarios en el rumen es menor al de las bacterias, encontrándose en concentraciones de 1 millón por ml de contenido ruminal. Aunque su número es menor en comparación con las bacterias, estos microorganismos tienen un mayor volumen individual, dando lugar a una masa celular de protozoarios semejante a la masa de las bacterias. Los protozoarios en el rumen se clasifican de acuerdo a su género y especie de la siguiente manera: *Entodinium bursa*, *E. caudatum*; *Eodinium lobatum*; *Diplodinium dentatum*; *Eremoplastron rostratum*; *Eudiplodinium maggii*, *E. affine*; *Ostracodinium mammosum*, *O. dentatum*; *Polyplastron multivesiculatum*; *Diploplastron affine*; *Metadinium medium*, *M. ypsilon*, *M. affine*; *Epidinium ecaudatum*; *Enoploplastron triloricatum*; *Ophryoscolex caudatus*, *O. purkynjei*, *O. inermes*; *Epiplastron*; *Elytroplastron*; *Caloscolex*; *Opisthotricum*; *Parentodinium africanum* (Montalbetti, 1999; Nava y Díaz, 2001).

1.13. Características del forraje relacionadas con su calidad nutricional

La calidad del forraje puede ser evaluada en términos de la digestibilidad o capacidad de fermentación de los constituyentes de las plantas y en términos de la calidad de consumo voluntario del rumiante. En primera instancia los carbohidratos estructurales y no estructurales son catabolizados dentro del rumen rindiendo como productos finales a los AGV's los cuales proveen de energía al animal, y después por medio de la integración de las actividades metabólicas del animal y de los microorganismos se efectúa la degradación física de la planta a componentes más simples, para promover el flujo de los componentes a través del tracto intestinal. En ambas situaciones existen barreras naturales tales como la estructura y la composición química de las paredes celulares que impiden la fermentación y la degradación de los nutrimentos potenciales (Akin *et al.*, 1989).

La mayor influencia del ambiente sobre la calidad de los forrajes es la temperatura; los pastos de ambiente tropicales pueden reducir su digestibilidad entre un 5 a 10% sobre los pastos de clima templado. Por cada grado centígrado del incremento de la temperatura de crecimiento, el porcentaje de digestibilidad disminuye, los pastos tropicales 0.60%, los pastos de clima templado 0.56%, las leguminosas tropicales 0.28% y 0.21% para leguminosas de clima templado (Wilson y Minson, 1980).

En los hongos ha sido posible caracterizar genes de hidrolasas de polisacáridos (endo-exo-glucanasa, xilanasas, pectinasas, celulasas, celobiohidrolasas, mananasas, esterasas, amilasas, liqueninasas); las proteínas que codifican aparentemente pudieran estar asociadas en partículas multiproteicas conocidas como celulosomas, responsables de la degradación de celulosa. Estos estudios pretenden conocer los mecanismos de hidrólisis de los polisacáridos de la pared celular, para tratar de modificarlos por ingeniería genética y así mejorar la digestibilidad de los esquimos agrícolas (Flint, 1997; Krause *et al.*, 2003).

Estas son algunas de las estrategias para mejorar la utilización de los forrajes por los rumiantes (Krause *et al.*, 2003; Sansoucy, 1995).

1. Inoculación del rumen con microorganismos nativos o modificados génicamente.

2. Tratamientos químicos y/o mecánicos de la fibra para facilitar la digestión.
3. Uso de plantas transgénicas con alteraciones en la estructura y composición en la pared celular.
4. Adición de microorganismos celulolíticos y lignolíticos durante el ensilado.
5. Adición de enzimas durante el ensilado.
6. Uso de bloques multinutricionales de melaza y urea (BMMU) como suplemento de la alimentación basada en el suministro de forraje.

1.14. Utilización de los BMMU como suplemento

De una de las estrategias anteriores, la más accesible para su utilización en países de vías en desarrollo, por su bajo costo, es el uso de bloques multinutricionales de melaza y urea (BMMU) como suplemento de la alimentación basada en el suministro de forraje.

Las ventajas que proporciona este tipo de suplemento son (Forsberg *et al.*, 2002; Sansoucy, 1995; Sansoucy *et al.*, 1995; Waruiru *et al.*, 2003):

1. Aporte de fuentes de carbono y nitrógeno de fácil asimilación, para un buen establecimiento de la microflora bacteriana con la consecuente utilización eficiente de la fibra vegetal.
2. Aporte de minerales en la formulación del bloque.
3. Aporte de vitaminas de origen microbiano, cuya abundancia se incrementa por el consumo del bloque.
4. Mayor consumo de fibra vegetal por la mejora de la palatabilidad.
5. Mejora en la digestibilidad de la fibra vegetal.
6. Mayor consumo de agua, posiblemente por el incremento en la ingesta de materia seca.
7. Disminución de la conducta del lamido de tierra y paredes de concreto por el aporte de minerales en el bloque.
8. El animal presenta una apariencia más saludable.
9. Se puede usar como medio para suministrar medicamentos.

El uso de bloques multinutricionales constituye una posibilidad para mejorar la ganancia de peso y el estado de los rumiantes en crecimiento. Los BMMU

representan una alternativa económica para mejorar la productividad del productor. Es importante destacar que el suministro de los BMMU controla el consumo de alimento y es un buen suplemento que parece indicar mejores pesos de los rumiantes en fase de crecimiento con una menor inversión diaria.

1.15. Efectos de los BMMU sobre el animal

El papel principal de los BMMU al suministrar nitrógeno fermentable (NNP) es mejorar el ecosistema del rumen, ya que regula el nivel de amoníaco de éste, permitiendo incrementar la población de algunos microorganismos, lo cual permite ser más eficiente al incrementar la degradación o digestión de la fibra y lograr una mejor degradación de la proteína que entra al rumen. Ambos procesos estimulan el consumo del alimento base con efecto beneficioso para el estado energético del animal (Leng *et al.*, 1991).

Los bloques multinutricionales se pueden elaborar fácilmente en la propia finca, con componentes locales de tamaño y peso adecuado para su manipulación y transporte, de alta palatabilidad para los animales y sin desperdicio.

1.16. Función de los BMMU en el rumen

El papel principal de los bloques BMMU es mejorar el ecosistema del rumen, ya que aporta nutrientes, lo que incrementan la población de microorganismos, y permite ser más eficiente al incrementar la digestión de la fibra y lograr una mejor degradación de la proteína que entra al rumen. Estos procesos estimulan el consumo del alimento base con efecto benéfico para el estado energético del animal (Sansoucy, 1986; Leng *et al.*, 1991; Mata y Combellas, 1992). Moujahed *et al.*, (2003), afirma que la suplementación con BMMU no induce modificaciones del pH; por lo contrario, el consumo de BMMU aumenta la concentración de NH_3 debido a la solubilidad de la urea y la alta velocidad de degradación de la misma. No obstante, Mata y Cambellas, (1992) afirman que el principal efecto del BMMU es un incremento en el consumo de forraje que se asocia a concentraciones muy bajas de N amoniacal; por lo tanto, una menor concentración de amoníaco en el rumen, es indicativo de un mejor aprovechamiento del NH_3 para producir proteína bacteriana.

Además de su precio de elaboración, los BMMU proporcionan una fuente fácilmente fermentable de carbono, el nitrógeno, y minerales, promoviendo un ajuste de las poblaciones rumen microbianas que proporcionan vitaminas y enzimas para la digestión de fibra (Sansoucy, 1995; Sansoucy *et al.*, 1995 Forberg *et al.*, 2002).

Los BMMU estimulan la fermentación ruminal al aumentar la concentración de AGV's (Moujahed *et al.*, 2003). El patrón de fermentación ruminal de los ácidos acético, propiónico y butírico, se encuentran en una proporción 70:20:10, respectivamente, que son propios para dietas que se basan en fibra (Shimada, 2003).

Los bloques multinutricionales son mezclas de melaza, urea, minerales y un agente solidificante como constituyentes básicos y cualquier otra materia prima disponible localmente, resultan muy palatables, por consiguiente el animal puede lamer el bloque casi constantemente, y hacer los ingredientes disponibles para los microorganismos ruminales de una manera casi continua (Sansoucy, 1986).

La principal función de los BMMU es suplementar la pobre calidad de dietas a base de forrajes; contiene nitrógeno fermentable y carbohidratos que por la consistencia del bloque se suministra lenta y continuamente, aumenta la síntesis de la proteína microbiana (Sansoucy, 1986; Mata y Combellas, 1992; Sansoucy *et al.*, 1995) y minimiza el riesgo de intoxicación (Sansoucy, 1986).

1.17. La microbiología molecular para el estudio de la ecología microbiana del rumen

Mediante el uso de técnicas de biología molecular para el estudio de la diversidad de las poblaciones bacterianas del rumen, basadas en la caracterización de las secuencias de los genes de ARN ribosomal 16S, fue posible establecer la diversidad de la microbiota de los grupos de G positivos con bajo contenido en G+C y algunas bacterias metanogénicas, del dominio de las arqueas (Flint, 1997; Whitford, 2001). Utilizando oligonucleótidos específicos dirigidos hacia los genes de ARNr de especies particulares de bacterias del rumen, fue posible detectar cambios en su diversidad poblacional en respuestas a cambios en la calidad de la dieta (Tajima *et al.*, 2001).

Se sabe que los hongos celulolíticos pueden ser sustrato de los protozoarios del rumen, y que estos a su vez contienen a las bacterias metanogénicas como simbiontes. Dadas las estrechas relaciones tróficas, simbióticas, o metabólicas entre los microorganismos del rumen, es de esperarse que cambios en la fisiología del mismo ocasionen a su vez cambios en la diversidad y abundancia de especies microbianas particulares. Por ejemplo, el cambio drástico de una dieta rica en carbohidratos de difícil utilización que provee el rastrojo, por una dieta suplementada con granos para incrementar el contenido proteico del alimento, pero que a su vez contiene almidón, que es un carbohidrato de fácil utilización, ocasiona cambios drásticos en el pH del contenido ruminal por efecto del metabolismo microbiano. Esto genera una acidosis subaguda que puede incluso ocasionar inflamación del epitelio del rumen, carente de mucosa (Kleen *et al.*, 2003; Russell y Rychlik, 2001).

La diversidad microbiana existente es influenciada por la dieta del animal (Flint, 1997). El análisis del Polimorfismo en la Conformación de las Cadenas Sencillas (SSCP) de secuencias de genes de ARN ribosomal, se ha utilizado para el estudio de fluctuaciones de las poblaciones microbianas participantes en el proceso de fermentación de la composta en distintos tiempos (Peters *et al.*, 2000). En el laboratorio de Biología Molecular de Microorganismos Asociados a la Producción en Bovinos en el C.M.E.B. – F.M.V.Z., U.M.S.N.H. se lograron estandarizar el protocolo para el análisis de PCR-SSCP con muestras de ADN de fluido ruminal de bovino, utilizando oligonucleótidos cebadores diseñados para diversos microorganismos, logrando amplificar secuencias que corresponden a los genes de ARN ribosomales de hongos (Vargas-Cabrera, 2004; Gonzalez-Silva, 2004; Aguilera-Garcia, 2003).

1.18. Amplificación de ARNr de hongos a partir de comunidades microbianas complejas

Se ha reportado el uso de diferentes juegos de oligonucleótidos para la amplificación específica de ARNs ribosomales de hongos, algunos de ellos amplificando genes de ARNr de poblaciones muy específicas de hongos y otros amplificando de otros eucariotes como protistas o algas rojas y verdes (Dams *et al.*, 1988; White *et al.*, 1990)

1.19. Polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de los genes de ARN ribosomal

Las estrategias basadas en el uso de secuencias de genes de ARNr para el estudio de la diversidad y la fluctuación de las poblaciones microbianas, implica la generación de pequeñas genotecas de productos de amplificación para su secuenciación y análisis, o el uso de geles desnaturizantes en gradiente de concentración o de temperatura, o el uso de equipo especializado para el PCR de tiempo real (Tajima *et al.*, 2001).

La técnica de análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas (single strand conformation polymorphism, SSCP), originalmente utilizada para la detección de mutaciones puntuales, tiene la sensibilidad para detectar, en geles no desnaturizantes de acrilamida, las diferencias en migración dadas por la conformación de la cadena sencilla, como lo muestra la figura 2. Esta metodología no requiere ni de equipo especializado ni de la formación de gradientes y puede revelarse mediante tinción con plata (Schwieger y Tebbe, 1998).

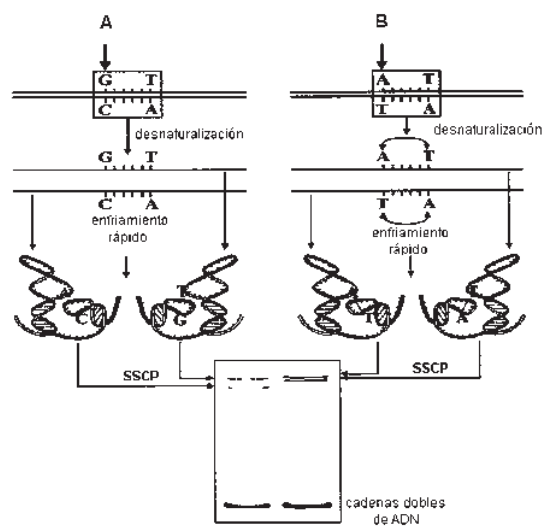


Figura 2. Fundamento de la técnica de SSCP. A) Las cadenas de ADN amplificadas por la PCR se desnaturizan, posteriormente se enfrían súbitamente en un ambiente fisicoquímico propicio para la formación de estructuras secundarias o conformómeros, los cuales se mueven en el gel nativo de poliacrilamida de acuerdo a su conformación tridimensional. B) Cuando una de las cadenas muta en un solo nucleótido el conformómero adquiere una conformación diferente teniendo una movilidad distinta en el gel nativo de poliacrilamida.

Recientemente el PCR–SSCP de genes de RNAr se ha utilizado para estudiar fluctuaciones de las poblaciones microbianas participantes en el proceso de fermentación de la composta (Peters *et al.*, 2000), para identificación de bacterias patógenas en sangre (Turene *et al.*, 2000), la identificación de mutaciones espontáneas de resistencia a rifampicina en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Scarpellini *et al.*, 1997), y para identificar arqueas de suelo (Bintrim *et al.*, 1997) o de rumen (Whitford *et al.*, 2001).

En nuestro laboratorio se ha estandarizado previamente la metodología para realizar estudios de PCR-SSCP (Aguilera-García, 2003; González-Silva, 2004; Vargas-Cabrera, 2004), sin embargo, la calidad del ADN ha dificultado la reproducibilidad del método. Por lo anterior en este trabajo se pretende establecer la eficiencia del método de DNAzol® frente al protocolo de Krause *et al.*, (2001) y complementar con algunos métodos de limpieza del ADN como son adsorción a partículas de sílice y extracción con fenol:cloroformo.

2. JUSTIFICACIÓN

En el presente trabajo de investigación se estandarizó una metodología de aislamiento de ADN total de fluido ruminal, utilizando un método de extracción de ADN y pureza apropiado, que posteriormente será utilizado para la amplificación de secuencias de genes de ARNr 18S (eucariontes), lo cual permitirá llevar a cabo el análisis mediante PCR-SSCP a partir de ADN sin tener que cultivarlo, podemos decir que la biología molecular es el método más rápido y sencillo para identificar y analizar diferentes poblaciones de microorganismos presentes en el rumen.

Para la realización de un estudio de análisis de poblaciones es importante hacer una buena extracción de ADN. Krause *et al* (2001) reportó un método de extracción de ADN de fluido ruminal por medio la lisis mecánica las células y liberando el ADN (Krause *et al.*, 2001). Chomczynski *et al* (1997) reportaron un método de extracción de ADN mas simple y sencillo en el que una pequeña muestra de fluido ruminal se mezcla con un reactivo llamado DNAzol® (Invitrogen), sucediendo así una lisis química de la membrana en la que se libera el ADN sin fragmentarlo tanto como el método de Krause. Ambos métodos serán utilizados para el estudio de la dinámica de las poblaciones de microorganismos ruminales.

3. HIPÓTESIS

La elección pertinente de los métodos de extracción y limpieza de ADN de contenido ruminal afecta la calidad del análisis por PCR y SSCP.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

Contrastar la eficacia de dos métodos de extracción de ADN de alta calidad para ensayos de PCR-SSCP.

4.2. Objetivos específicos:

1. Evaluar los métodos de extracción de ADN ruminal empleando DNAzol®. (Chomczynski *et al.*, 1997) y mediante el método de Krause (Krause *et al.*, 2001).
2. Realizar un análisis comparativo de las estrategias para el análisis por PCR-SSCP en electroforesis en gel en placa.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Toma de muestra

La muestra de fluido ruminal fue tomada directamente de los toretes que tienen insertada una fístula que cuenta con una cánula en el rumen. Estas muestras extraídas fueron proporcionadas por D.C. Ernestina Gutiérrez Vázquez del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (I.I.A.F.). Estos animales se encontraban sometidos a una dieta a base de rastrojo de maíz, suplementada con bloques multnutricionales de melaza-urea. Las muestras fueron tomadas y colocadas en hielo donde posteriormente fueron conservadas a -88°C hasta su utilización. Las muestras se utilizaron para la extracción de ADN y análisis de PCR-SSCP.

5.2. Extracción de ADN total de fluido ruminal con reactivo DNAzol® (Invitrogen); Chomczynski *et al* (1997).

A 1 ml de fluido ruminal se le agregaron 4 ml de reactivo de DNAzol®, se agitaron en un agitador de vórtice durante 1 min y se dejaron reposar por 10 min, se centrifugaron a 4°C a 10,000 rpm por 15 min. La fase acuosa se separó por decantación, por cada ml de fase acuosa se agregaron 0.5 ml de alcohol absoluto, se centrifugó a 4°C 10,000 rpm por 15 min, se lavó con 1 ml de etanol al 70% mezclándose suavemente por inversión. La pastilla que contiene el ADN se secó en un concentrador de vacío a 45°C el tiempo necesario, por último el ADN se resuspendió en tubos de 1.5 ml con 200 µl de TE_{10/1} (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0). La concentración de ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en amortiguador TAE 1X (solución stock 50X; pH 8.5: 242 g Tris base; 57.1 ml ácido acético glacial; 37.2 g Na₂ EDTA-2H₂O; H₂O cbp 1Lt).

5.3. Extracción de ADN total de fluido ruminal por el método de Krause *et al* (2001).

Se pesaron 0.5 gr de perlas en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, se agregaron 1 ml de fluido ruminal, se centrifugó a 10,000 rpm por 2 min y se tiró el sobrenadante, se agregaron 1 ml de metanol y se agitaron en agitador por 1

min, se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min y se eliminó el sobrenadante. Al paquete celular y las perlas de vidrio se le adicionaron 300 µl de fenol:cloroformo (1:1 equilibrado con 100 mM Tris-HCl, pH 7.0), 200 µl de amortiguador ADEM (50 mM de acetato de sodio, 10 mM de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 1% DMSO, 1% de metanol, pH 7.0), y 100 µl de solución PEG al 35% (35% de polietilenglicol (PM=400), 100 mM Tris -HCl, pH 7.0), y se agitaron en agitador de vórtice por 2 minutos para que se lisaran las células y liberará el ADN, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min, se recuperó la fase acuosa, se removió el fenol con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugaron 10 minutos a 10,000 rpm. El sobrenadante se recuperó y se transfirió a otro tubo nuevo y se agregó 1/5 de volumen de NaCl 5M y 1/10 de volumen de CTAB al 10%, se incubaron a 65°C de 5 a 10 minutos, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos para remover y precipitar los polisacáridos, se recuperó el sobrenadante y para precipitar el ADN se le adicionaron 1/10 de volumen de acetato de sodio al 3M y un volumen equivalente de 100% de isopropanol. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se dejó secar y se resuspendió en TE, la integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

5.4. Limpieza del ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico

A 200 µl de ADN se le adicionaron 200µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) equilibrado con 100 mM Tris-HCl (pH 7.0). La mezcla se agitó suavemente y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos, se recuperó la fase acuosa (superior). Posteriormente, el fenol residual se eliminó con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó por 10 minutos a 10,000 rpm, el sobrenadante se recuperó y se transfirió a otro tubo nuevo, se agregaron 35 µl de acetato de sodio 3 M (concentración final 0.3 M) y un volumen equivalente de isopropanol. El ADN se precipitó mediante centrifugación por 10 minutos a 10,000 rpm, se tiró el sobrenadante y dejó secar la pastilla y se resuspendió en TE, la concentración de ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

5.5. Limpieza de ADN por adsorción en partículas de sílice (Gene Clean)

A 200 µl de ADN de fluido ruminal, se agregaron 200 µl de yoduro de potasio 2M se mezclaron suavemente, se incubaron a 55°C durante 10 minutos, se

agregarón 50 µl de partículas de sílice. Posteriormente se incubaron en hielo durante 10 minutos agitándose cada 10 segundos, se centrifugarón 30 segundos a 10,000 rpm, se tiró sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 300 µl solución de New Wash (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM de EDTA, 0.1 M NaCl, 50 ml de etanol, 50 ml de H₂O), la pastilla se resuspendió en agitador de vórtice, se centrifugó 30 segundos a 10,000 rpm. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió. Se centrifugó 30 segundos a 10,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar. Posteriormente se resuspendió en 30 µl de H₂O, se incubaron a 55°C durante 5 minutos. Se centrifugarón 30 segundos a 10,000 rpm, se recuperó sobrenadante (fase superior) en otro tubo nuevo sin llevar perlas de silica, se repitieron los pasos desde que se resuspende en H₂O.

5.6. Concentración y estimación de la pureza del ADN por espectrofotometría

Para determinar la concentración y pureza del ADN se hicieron lecturas de absorbancia a 260 nm, 280 nm y 320 nm con el espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 100) para hacer los cálculos de pureza mediante la formula:

$$\text{Pureza del ADN} = A_{260} / A_{280}$$

Un cociente con un valor entre 1.8 y 2.0 indica buena pureza.

El cálculo de la concentración se hizo con la siguiente formula:

$$(A_{260}) (\epsilon) (FD) / 1000 = \text{ADN mg/ml}$$

Donde:

A_{260} es el valor de la lectura de absorbancia a 260 nm., donde ϵ es la constante de proporcionalidad, o coeficiente de extinción para el ADN de doble cadena y su valor es de 50 µg por cada unidad de absorbancia a 260 nm., FD representa el factor de dilución que se obtiene mediante el inverso de la dilución, para las lecturas de ADN de doble cadena y el valor de 1000, es el factor de conversión para convertir el valor a mg/ml.

5.7. Oligonucleótidos a utilizar para las reacciones de PCR-SSCP de hongos del rumen

Para el análisis de PCR-SSCP se utilizaron oligonucleótidos de genes de ARNr de hongos diseñados por Vargas-Cabrera (2004) a partir de las secuencias de hongos de rumen e incluyendo secuencias de protozoarios para encontrar secuencias específicas de los hongos.

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos utilizados

NOMBRE	SECUENCIA	TAMAÑO (pb)
FNU1	5' Acc Agg Tcc AgA cAY RDT A 3'	294
FNL1	5' gTT ATT gcc TcA AAc TTc cA 3'	294

NOTA: Donde R representa un nucleótido de purina, Y uno de pirimidina y D representa A,G o T.

5.8. Amplificación por PCR del fragmento de ARNr 18S

Para la reacción de PCR se mezclaron los componentes de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 3. Composición de la reacción de PCR

REACTIVO	CONC. FINAL	STOCK	ADICIONAR
ADN	100 ng	Calcular	Calcular
H ₂ O	c.b.p. 50 µl		Calcular
DNTPs	200 mM	2.5 mM	2.5 µl
Buffer 10X	1X	10 X	5 µl
MgCl ₂	1.5 mM	50 mM	1.5 µl
Oligo FNL1	500 nm	Calcular	1 µl
Oligo FNU1	500 nm	Calcular	1 µl
Taq DNA Pol.	5 U	300 U	0.5 µl

La amplificación se llevó a cabo con el siguiente programa: 1 ciclo a 95°C por 3 minutos; 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 50°C por 1.5 minuto y 72°C por 1 minuto; 1 ciclo de 72°C por 5 minutos; un ciclo sostenido de enfriamiento a 4°C. La amplificación se verificó mediante electrofóresis en gel de agarosa al 2% (Peters *et al.*, 2000).

5.9. Preparación de gel de SSCP

Preparar la mezcla para el gel de acrilamida: bisacrilamida al 8% (acrilamida-grado secuenciación, 38.9 g; N,N'-metilenbisacrilamida, 1.07 g; H₂O destilada c.b.p. 100 ml) con 7% glicerol, suficiente para un gel de 20 X 20 cm y un espaciador de 0.75 mm, de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 4. Composición del gel de poliacrilamida para SSCP

Componentes	Volumen
Amortiguador de TBE 10X	4 ml
Solución de acrilamida bisacrilamida(37:5:1)	8 ml
Glicerol	2 ml
H ₂ O	c. b.p. 40 ml
TEMED	30 ml
Persulfato de amonio 10%	400 ml

5.10. Condiciones de corrida para un gel acrilamida para el análisis por SSCP

Los carriles se limpiaron con una jeringa generando corrientes de amortiguador de corrida TBE 1X (Tris-base, 108 g; ácido bórico, 55g; EDTA 0.5 M pH 8.0, 40 ml; ajustar el volumen a 1 L con H₂O destilada), antes de cargar las muestras. Las muestras se dializaron con membranas VSWP 02500 (Millipore) de 0.025 µm por 10 min, la suspensión se recuperó en tubos para PCR y se mezclaron con un volumen igual de amortiguador de carga (Formamida, 95%; NaOH, 10mM; EDTA 20mM; azul de bromófenol, 0.02%; xilen-cianol, 0.02%), se calentaron las muestras en H₂O en ebullición durante 12 minutos y se enfriaron por 5 min en agua con hielo antes de cargar, las muestras se cargaron en geles de acrilamida: bisacrilamida al 10% con 8% de glicerol en una cámara de electroforesis vertical (DCode Universal Mutation Detection System; Bio-rad) en condiciones controladas a 4°C y se corrió a potencia constante de 3 Watts por 24 horas, los geles se revelaron por tinción con nitrato de plata.

5.11. Tinción de geles de acrilamida con nitrato de plata (Lee *et al.*, 1999)

Los geles se sumergieron en una solución fijadora (5% de ácido acético glacial; 10% de alcohol absoluto y agua c.b.p. 1 litro); manteniéndola en agitación suave y constante por 15 minutos sobre un agitador orbital (Daigger, modelo

22406A) posteriormente se enjuagaron dos veces con agua destilada desionizada. Enseguida se sumergió en una solución de tinción con nitrato de plata al 2% por 15 minutos en agitación suave y constante en un cuarto oscuro, se enjuagaron nuevamente dos veces con agua destilada y desionizada y por último se sumergieron en una solución de revelado (3% de hidróxido de sodio, 0.09% de formadehído) hasta lograr ver la definición de las bandas del marcador de tamaño molecular (1 Kb landder plus, Invitrogen) como control en la tinción. Al final se enjuagó con agua destilada desionizada 2 minutos y se colocó sobre una hoja de acetato para su mejor manipulación.

6. RESULTADOS

6.1. Extracción de ADN con DNAzol® y Krause de fluido ruminal

La extracción de ADN se llevo a cabo a partir de muestras de fluido ruminal de los toretes fistulados, donde se tomaron 3 muestras diferentes realizando tres extracciones con DNAzol® (Invitrogen) y tres extracciones con el método de Krause. DNAzol® es un reactivo compuesto de un detergente (laurilsulfato de sodio, SDS) y un agente caotrópico (tiocianato de guanidina) que se encarga de la lisis tanto de bacterias, hongos y protozoarios que se encuentran en fluido ruminal, mientras que el método de Krause es proceso de extracción mas largo y se basa en la lisis por medio del golpeteo mecánico con perlas muy finas que lisan la pared de los microorganismos que se encuentran en el rumen y liberan el ADN y su posterior extracción con fenol:cloroformo:isoamílico.

La integridad se verificó en un gel de agarosa al 1.2%. El ADN obtenido con DNAzol® fue de mejor integridad, mayor pureza y mayor rendimiento obteniendo bandas bien definidas y pocos productos de degradación (Figura 3). El método de Krause da un ADN del que solo se observa un ligero barrido en todo el carril. Tal parece que el método de extracción es un poco agresivo con el ADN y lo fragmenta tanto durante la misma, sin observar banda definida, como si la muestra extraída estuviera completamente degradada y esto sucede en todas las muestras. Por lo que podemos decir que este método da resultados de un ADN de mala calidad.

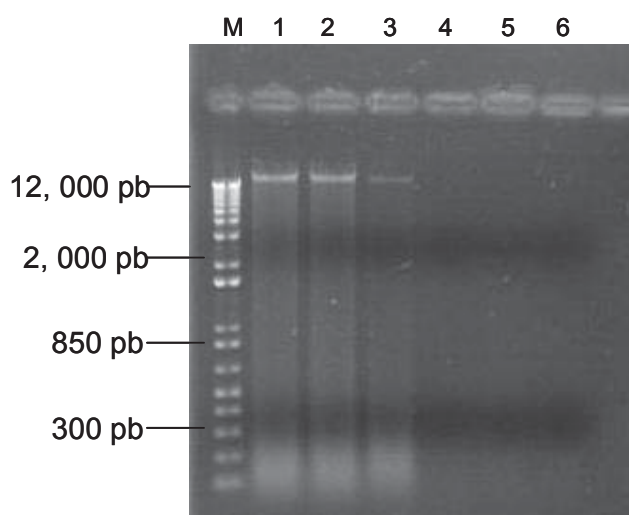


Figura 3. Extracción de ADN de fluido ruminal con los métodos de DNAzol® y Krause. El carril M, marcador de 1 Kb plus; carriles 1,2 y 3 corresponde al ADN de de fluido ruminal extraído con el método de DNAzol®; los carriles 4,5 y 6 corresponde al ADN extraído con el método de Krause. Gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.

6.2. Rendimiento y estimación de la pureza del ADN de fluido ruminal por espectrofotometría

Después de la extracción de ADN se prosiguió a la estimación de pureza y rendimiento, en donde los resultados nos indica que el ADN extraído por el método de DNAzol® tiene mejor pureza, al calcular los promedios de los cocientes de las absorbencias de 260 nm / 280 nm (que se encuentra dentro del rango entre 1.8 y 2.0) y mejor rendimiento dándonos como resultado un ADN integro, y al compararlo con el método de Krause, las lecturas son arriba del 2.0 y en un gel de agarosa se puede observa en los carriles bandas degradadas y barridas por completo, que no se observa ninguna banda integra. Por lo que lo hace un método de poca confiabilidad.

Tabla 5. Evaluación comparativa de la pureza y rendimiento del ADN de dos protocolos de extracción de ADN de muestras de fluido ruminal

Técnica	DNAzol	Krause
Rendimiento**	141.6 ± 52.9	50.6 ± 14.9
Pureza*	1.69 ± 0.18	1.92 ± 0.55

*Como cociente de las absorbencias a 260 nm y 280 nm.

**µg de ADN / ml de fluido ruminal

6.3. Purificación del ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y por adsorción en partículas de sílice (Gene Clean)

La purificación del ADN realizada con el método de adsorción en partículas de sílice (Gene Clean), que se basa en atracción electrostática del ADN cargado negativamente y las partículas de sílice cargadas positivamente que tienen una gran afinidad por el ADN para así eliminar de este otras macromoléculas. Ésta técnica ha resultado mas rápida, y eficiente que la del método con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. En ella se forman dos fases, en la primera fase, se quedan atrapados los lípidos con ayuda del fenol, los carbohidratos y las proteínas se desnaturalizan y se quedan en la interfase (fase inferior) y por último se encuentra el ADN formando la fase acuosa (fase superior). La extracción en ambos casos fue realizada de ADN con DNAzol®. Los resultados se observan en la Figura 4. En la extracción con el método de Krause, se sigue observando el mismo barrido y solo en el segundo carril de la Figura 5 se observa una ligera banda después de hacer la limpieza con Gene Clean,

mientras tanto las muestras extraídas de ADN con DNAzol® y limpiadas con Gene Clean son mejores. Observando la Figura 6 podemos decir que el método de limpieza con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico se sigue presentando un barrido después de la limpieza con este, tanto en la extracción de ADN con DNAzol® y Krause. Podemos decir que el ADN extraído con Krause y purificado con cualquiera de los dos métodos genera un ADN de baja integridad, inapropiado para las reacciones de PCR. La tabla 6, muestra que el ADN extraído por el método de DNAzol® y limpiado con el método de Gene Clean tiene mejor pureza, al calcular los promedios de los cocientes de las absorbencias de 260 nm / 280 nm, y al comprar el ADN extraído por el método de DNAzol® y limpiado con el método de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico los cocientes son bajos.

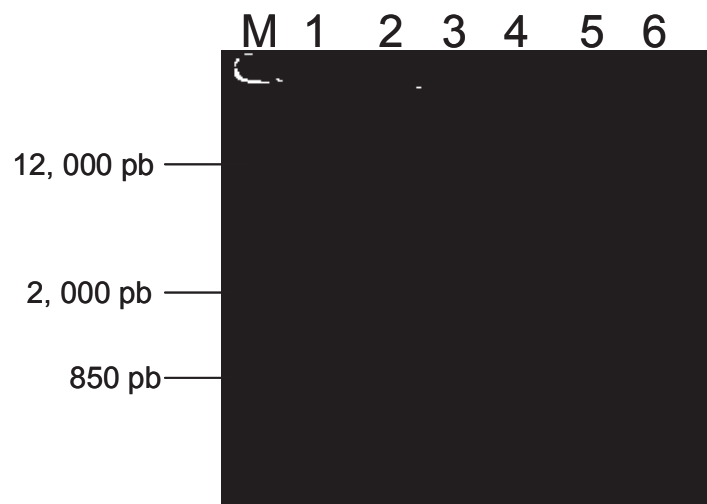


Figura 4. Limpieza del ADN con dos protocolos (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y por adsorción en partículas de sílice (Gene Clean)). El carril M, marcador de 1 Kb plus; en los carriles 1,2 y 3 corresponden a las extracciones de ADN con DNAzol® limpiadas con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico; y en los carriles 4,5 y 6 corresponden a las extracciones con DNAzol®, pero con el método (Gene Clean).

Tabla 6. Evaluación comparativa de la pureza del ADN limpiado por dos métodos.

Pureza	
DNAzol F:Cl:I	1.06 ± 0.05
DNAzol Gene Clean	1.75 ± 0.17

Pureza: As260 / As280

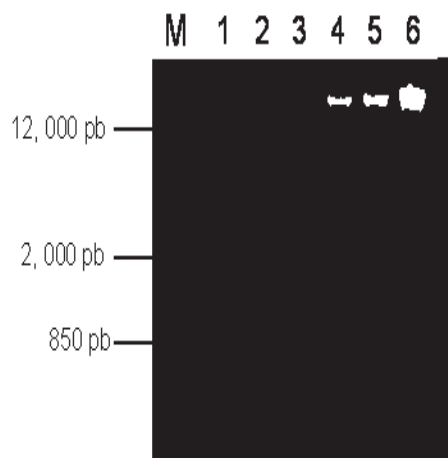


Figura 5. Limpieza del ADN por adsorción en partículas de sílice (Gene Clean). En los carriles 1,2 y 3 corresponden a las muestras que se les realizaron la limpieza con el método de Gene Clean con extracción de ADN de Krause; y en los carriles 4,5 y 6 corresponden a las muestras que se limpiaron con Gene Clean con extracción de ADN con DNAzol®.

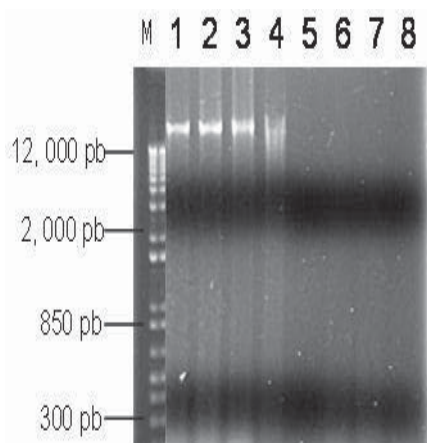


Figura 6. Limpieza del ADN con el método con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. En los carriles 1,2,3 y 4 corresponden a las muestras que se les realizo la limpieza con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico con extracciones de ADN con DNAzol®; en los carriles 4,5 y 6 corresponden a las muestras que se limpiaron con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico con extracción de ADN de Krause.

6.4. Amplificación de los fragmentos de ARN ribosomal 16S con los oligonucleótidos Fnl1 y Fnu1

La amplificación de fragmentos de genes de ARNr de hongos a partir de muestras de fluido ruminal, se realizó bajo las condiciones diseñadas por Vargas-Cabrera (2004) con los oligonucleótidos Fnl1 y Fnu1. Observando la figura 7, a partir de las muestras de ADN extraídas con el método de Krause se obtuvieron productos de amplificación con un tamaño de 294 pb, con bandas poco definidas y menor cantidad de producto de amplificación. También se observó un segundo subproducto de amplificación de 700 pb. Esto posiblemente debido a que durante la extracción el ADN se rompió formando fragmentos quiméricos (unión de dos fragmentos no relacionados pero que se empalman por uno de sus extremos), o debido a que existan más de una copia del gen de ARNr, una produce el fragmento esperado de 294 pb y la otra el fragmento de 700 pb. En cambio en las muestras de ADN extraído con DNAzol® los productos de amplificación dan como resultado bandas mejor definidas, mayor cantidad de producto de amplificación y el tamaño esperado de 294 pb. En la figura 8 podemos observar los productos amplificados de ADN con DNAzol® en los carriles del 1 al 3 y del 7 al 9, mientras que en los carriles del 4 al 6 no se observa producto de amplificación, que se debe a que las muestras extraídas de ADN con el método de Krause después de un mes ya no da productos de amplificación. Por lo que resulta ser un método poco aceptable.

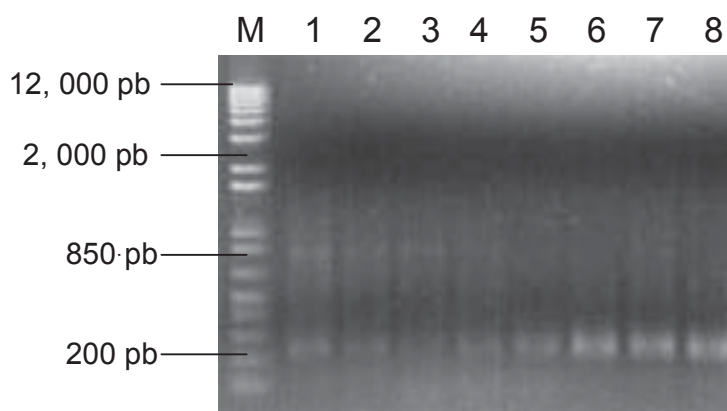


Figura 7. Comparación de los métodos de Krause y DNAzol en la amplificación por PCR. El carril M, corresponde al marcador de 1 Kb plus; los carriles 1, 2,3 y 4 corresponden a las amplificaciones de muestras con ADN extraído de Krause; los carriles 5, 6,7 y 8 corresponden a las muestras amplificaciones con ADN extraído con DNAzol®. Gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.

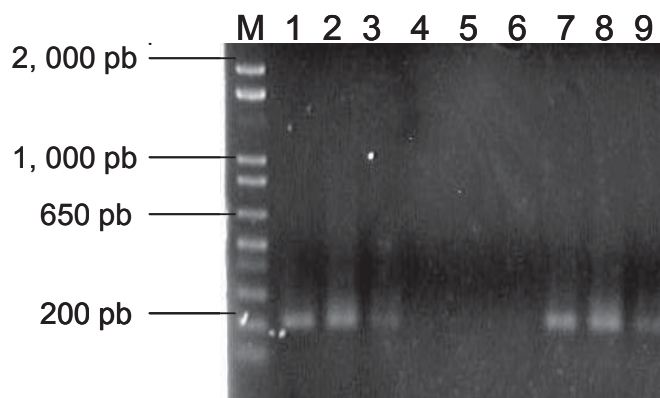


Figura 8. Comparación de los métodos de Krause y DNAzol en la obtención de productos de PCR utilizando ADN almacenado por un mes. El carril M, corresponde al marcador de 1 Kb plus; los carriles 1,2, y 3 corresponden a los productos amplificados de ADN con DNAzol® limpiado con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico; en los carriles 4,5 y 6 corresponden a los productos amplificados de ADN de Krause limpiados con (Gene Clean); en los carriles 7,8 y 9 corresponde a los productos amplificados de ADN con DNAzol® limpiado con (Gene Clean).

6.5. Comparación de los métodos de extracción de ADN en la generación de patrones de PCR-SSCP de genes de ARNr

Los fragmentos de amplificación de los genes de ARNr 18S obtenidos con los oligonucleótidos Fnl1 y Fnu1 se cargaron en un gel nativo de poliacrilamida bajo las condiciones ya mencionadas. En la figura 9 las primeras cuatro muestras corresponden a los productos de PCR del ADN extraído con el método de Krause y las siguientes cuatro corresponde a los productos de PCR del ADN extraído con el método de DNAzol®, o podemos observar pequeños cambios en los patrones de PCR-SSCP, lo cual refleja cambios en la composición de los hongos que están relacionados al tipo de dieta, también podemos observar que las muestras extraídas con DNAzol® da bandas mejor definidas y mas intensas.

En esta figura 10 las primeras tres muestras corresponden a productos amplificados de un ADN extraído con DNAzol® y limpiado con Gene Clean, mientras que en las siguientes tres muestras corresponden a productos amplificados de un ADN extraído con DNAzol® y limpiado con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Aquí podemos observar bandas más intensas y definidas a las que se limpiaron el método de Gene Clean. A lo que se puede decir que el ADN extraído, purificado, amplificado y analizado por PCR-SSCP con DNAzol® resulto ser el método mas rápido, eficaz, aceptable y confiable.

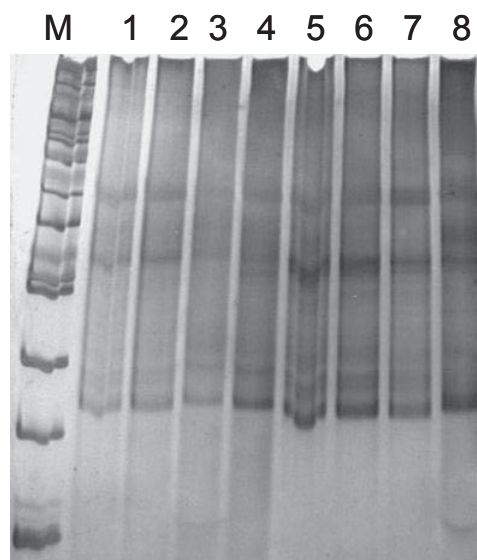


Figura 9. Patrones de PCR-SSCP de productos de PCR de hongos. El carril M, corresponde al marcador de 1 Kb plus; los carriles 1,2,3 y 4 corresponden a los productos amplificados de ADN extraído con Krause; los carriles 5,6,7 y 8 corresponden a los productos amplificados de ADN extraído con DNAzol®.

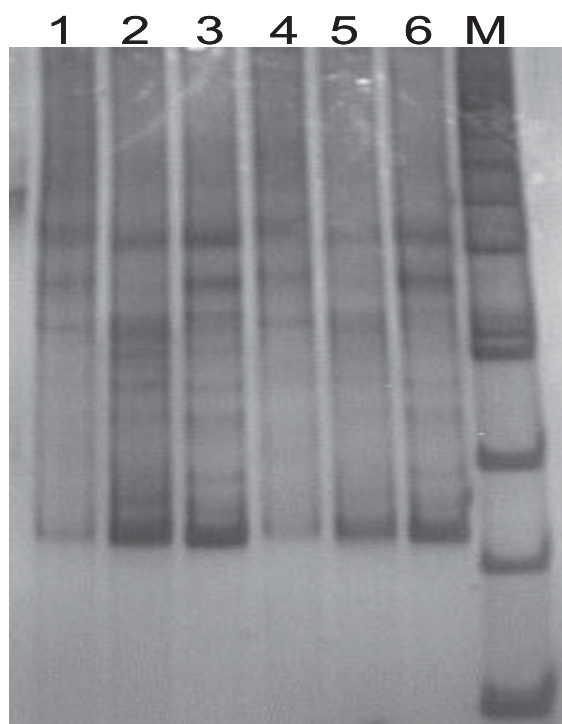


Figura 10. Análisis por SSCP de productos de PCR de ARN ribosomal de hongos. El carril M, corresponde al marcador de 1 Kb plus; los carriles 1,2 y 3 corresponden a los productos de PCR de ADN limpiado con (Gene Clean); los carriles 4,5 y 6 corresponden a los productos de PCR limpiado con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico.

7. DISCUSIÓN

El presente trabajo se realizó para llevar a cabo una evaluación de los diferentes métodos de extracción y purificación del ADN de muestras de fluido ruminal. Se realizó la extracción de ADN con los métodos de DNAzol y de Krause (2001). El ADN extraído con DNAzol da un ADN íntegro, con mayor pureza e integridad, mientras que en el ADN extraído con el método de Krause solo se observa un barrido.

El ADN extraído con DNAzol se purificó con los métodos de Gene Clean y fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. En ambos casos se observaron bandas integras, definidas y mejor pureza al comparar con el ADN extraído con el método de Krause con el cual se seguía presentando el mismo barrido sin observarse bandas definidas y con un cociente muy elevado de absorbancias a 260 nm / 280 nm. El cociente de As_{260nm}/As_{280nm} esperado para ADN puro se encuentra entre el intervalo de valores de 1.8 a 2.0. Lo observado para el método de Krause puede sugerir que no obstante ser un ADN poco íntegro tiene un alto grado de pureza. Al comparar los dos métodos de limpieza (GeneClean y extracción con fenol:cloroformo:isoamílico) se observó que el GeneClean permitió aumentar la pureza del ADN extraído (Tabla 6).

Con el método de Krause, después de un mes de ser realizada la extracción y almacenado el ADN, no se obtienen productos de amplificación, muy seguramente debido a ciertas contaminaciones arrastradas durante la extracción. Las contaminaciones posibles pudieran ser nucleasas que no fueron eliminadas durante la extracción o compuestos oxidantes como los compuestos fenólicos, que reaccionen con el ADN degradándolo. Estos compuestos son aparentemente eliminados en la combinación de los métodos de extracción con DNAzol y la limpieza con GeneClean, ya que el ADN extraído después de un mes continúa siendo un buen sustrato para amplificación.

En las amplificaciones de ADN extraído con el método Krause y limpiado con Gene Clean, se observa la banda esperada a 294 pb y una segunda banda de amplificada a 700 pb, esto demuestra una vez más que este método no es adecuado para este tipo de análisis ya que de él se obtienen productos de amplificación no esperados. Aunque no se realizó la secuenciación del fragmento para conocer su identidad, el producto de 700 pb no era el esperado.

Por el contrario, en las amplificaciones realizadas con DNAzol® y limpiado con (Gene Clean) se obtienen bandas intensas a 294 pb, mejor definidas. Los dos métodos se compararon mediante un análisis de PCR-SSCP, en electroforesis en gel en placa.

De esta manera, se logró estandarizar el protocolo para el análisis de PCR-SSCP con muestras de ADN de fluido ruminal, utilizando oligonucleótidos cebadores Fnl1 y Fnu1, logrando amplificar secuencias que corresponden a los genes de ARN ribosomales de hongos de un ADN extraído con el método de DNAzol® y Krause, y como la elección de un mal método de extracción y purificación de ADN de fluido ruminal afecta la calidad del análisis de cambios en los patrones PCR-SSCP, siendo nuevamente mejor las bandas analizadas con el ADN extraído con el método de DNAzol®.

8. CONCLUSIONES

- El ADN extraído con DNAzol® de fluido ruminal demostró tener mayor pureza, mejor calidad e integridad que el de Krause.
- El ADN extraído con DNAzol® y purificado con Gene Clean antes y después del PCR da productos de amplificación de calidad y no genera productos inesperados.
- Los patrones de PCR-SSCP de genes de ARNr 18S de hongos fueron ligeramente diferentes para los dos métodos.

9. BIBLIOGRAFIA

- Agnes T. H., Blis A. S. and Matthiesen S. D.** 1996. Digestibility and rumen fermentation in reindeer feed baled silage in summer and winter. *J. Agric. Sci.* **127**:517-523.
- Aguilera-García F.** 2003. Identificación de poblaciones de hongos y protozoarios del rumen de bovinos mediante el polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de los genes de ARN ribosomal. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Akin D. E.** 1986. Interaction to slide technique for the study of forage anatomy and digestibility. *Crop Sci.* **22**:517-523.
- Akin D. E. and Benner R.** 1988. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1117-1125.
- Akin D. E., Borneman E. S. and Lyon, C. E.** 1990. Degradation of leaf blades and stems by monocentric and polycentric isolates of ruminal fungi. *Animal Feed Sci. Technol.* **31**:205-221.
- Akin D. E., Borneman W. S. and Van Eseltine W. P.** (1986). Effect of phenolic monomers on ruminal bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **52**(6):1331-9.
- Akin D. E., Lyon C. E., Winham W. R. and Rigsby L. L.** 1989. Physical degradation of lignified stem tissues by ruminal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:611-616.
- Atalla R. H.** 1993. Cell walls degradation by rumen fungi enzyme *Trichoderma reesei*. Cellulase and other Hydrolases. Souminen P., Reinikainen T. (Eds.). *Foundation of Biotechnical and Industrial Fermentation*, pp. 25-39.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K.** 1999. Short protocols in molecular biology. 4a Ed. WILEY. pp. 2-12.
- Baldwin R. L. and Allison M. J.** 1983. Rumen Metabolism. *J. Anim. Sci.* **57**:461-476.
- Bauchop T.** 1989. Colonization of plant fragment by protozoa and fungi. In: *the Role of Protozoa and fungi in Ruminant Digestion* (J. V. Nolan, R. A. Leng D. I. Demeyer) (Eds) (OECD/UNE) International Penambul; Armidale, New South Wales, pp. 83. Australia.
- Bauchop T. and Mountfort D. O.** 1981. Cellulose fermentation by rumen anaerobic fungus in both the absence and presence of rumen methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 1103-1110.
- Bintrim S. B., Donohue T. J., Handelsman J., Roberts G. P. and Goodman R. M.** 1997. Molecular phylogeny of archaea from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 277-282.
- Bohatier J., Sénaud J. and Benyahya M.** 1990. *In situ* degradation of cellulose fibres by the entodiniomorph rumen ciliate *Polyplastron multivesiculatum*. *Protoplasma.* **154**: 122-131.
- Bomeman W. S., Akin D. E. and Ljungdhal L.G.** 1989. Fermentation products and plant cell wall degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1066-1073.
- Breznak J. K.** 1994. Acetogenesis from Carbon Dioxide in termite gut. In *Acetogenesis*. Drake H. L. (Ed). Chapman and Hall, 687. New York.

- Buxton D. R. and Casler M. D.** 1993. Environmental and genetic effects on cell wall composition and digestibility Forage cell wall structure and digestibility. ASAcssa, 677 Segoe Rd., Madison W. L. **53**:711-USA.
- Chemey D. J. R., Chemey J. H., Patterson J. A. and Axtell J. D.** 1992. *In vitro* ruminal fiber digestion as influenced by phenolic-carbohydrate complexes from sorghum cell walls. Animal Feed Sci. Tehcnol. **39**:79-93.
- Chemey J. H., Anlicker K. S., Albrecht K. A. and Wood K. V.** 1989. Soluble monomers phenolic. J. Agric. Food Chem. **37**: 345-350.
- Cheng K. J., McAllister T. A., Popp J. D., Hristov A. N., Mir Z. and Shin H. T.** (1998). A review of bloat in feedlot cattle. J. Anim. Sci. **76**: 299-308.
- Chomczynski P. and Sacchi N.** 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. **162**: 156-159.
- Clarke R.T.J. and Reid C.S.W.** (1973). Foamy bloat of cattle. A review. J. Dairy Sci. **57**: 753-785.
- Coughian M. P.** 1989. Enzyme Systems for Lignocellulose degradation. Elsevier Applied Science. London and N.Y.
- Czerkawski J. W.** 1986. Trasnsfer of metabolic Hidrogen the rumen. In a introduction to rumen studies. Cap 10. Pergamon Press (Eds). Pp. 167. New York.
- Dams E. , Hendriks L., Van de Peer Y., Neefs J. M., Smits G. and Vandenbempt I.** 1988. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. Nucleic Acids Res. **16**(sup.)r87-r173.
- Flint H. J.** 1997. The rumen microbial ecosystem – some recent developments. Trends Microbiol. **5(12)**:483-488.
- Forsberg N. E., al-Maqbaly R., al-Halhali A., Ritchie A. and Srikandakumar A.** 2002. Assesment of molasses-urea blocks for goat and sheep production in the Sultanate of Oman: intake and growth studies. Trop. Anim. Health Prod. **34(3)**:231-239.
- Frandsen R. D., y Spurgeón T. L.** 1992. Anatomía y fisiología de los animales domésticos. Interamericana, Mc Graw Hill. 5ª edición. México D. F.
- Fredrickson JK. and Onstott TC.** 1996. Vida en las profundidades de la Tierra. Investigación y Ciencia **243**: 22-28.
- González C. J.** 1990. Alimentación de bovinos, ovinos y caprinos. MUNDI PRENSA. Madrid España.
- González-Silva N.** 2004. Estudio molecular de poblaciones bacterianas del rumen mediante PCR-SSCP de genes de ARN ribosomal. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Gordon G. L. R. and Ashes J. R.** 1984. In vitro digestion of wheat straw by different rumen anaerobic fungi. Can. J. Animal Sci. **64**:156-157.

- Gordon G. L. R. and Phillips M. W.** 1988. Comparative properties of anaerobic fungus from the rumen. In the role of protozoa and fungi in ruminant. J. V. Nolan, R. A. Leng and D. I. Demeyer (Eds). Pp. 127-138. Penambul: Australia.
- Grenet E., Breton A., Barry P. and Fonty G.** 1989. Rumen anaerobic fungi and plant substrate colonization is affected by diet composition. *Animal Feed Sci. Technol.* **26**: 55-70.
- Hartley R. D. and Keene A. S.** 1984. Aromatic aldehyde constituent of graminaceous cell walls. *Phytochemistry*. **23**: 1305-1307.
- Hébraud M. and Fèvre M.** 1988. Characterization of glycoside and polysaccharide hydrolases secreted by the rumen anaerobic fungi *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* and *Pyromonas communis*. *J. Gen. Microbiol.* **134**:1123-1129.
- Higuchi T., Ito Y. and Kawrama Y.** 1967. p-Hydroxyphenylpropane component of grass lignin and role of tyrosine ammonia lyase in its formation. *W. Sci. Technol.* **6**: 875-881.
- Hobson P. N. and Wallance R. J.** 1982. Microbial Ecology and activities in the rumen. Part V. CRC. *Critical Rev. Microbiol.* **9**: 165-225.
- Howarth A., Aked D., Foster S. J., McCormick M. E. and Potts H. C.** (1986). The inflammatory response of rabbit skin to topical arachidonic acid and its pharmacological modulation. *J. Pharmacol.* **89(2)**:431-8.
- Hungate R. E.** 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, N. Y.
- Jung H. G. and Fahey G. C.** 1983. Nutritional implication of phenolic monomers and lignin: *Rev. J. Animal Sci.* **1**: 206-219.
- Kleen J. L., Hooijer G. A., Rehage J. and Noordhuizen J. P. T. M.** 2003. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review *J. Vet. Med. Assoc.* **50**: 406-414.
- Krause D. O., Bunch R. J., Conlan L. L., Kennedy P. M., Smith W. J., Mackie R. I. and McSweeney C. S.** 2001. Repeated ruminal dosing of *Ruminococcus* spp. does not result in persistence, but changes in other microbial populations occur that can be measured with quantitative 16S-rRNA-based probes. *Microbiol.* **147(7)**:1719-29.
- Krause D.O., Smith W.J., and McSweeney C.S.** 2001. Extraction of microbial DNA from rumen contents containing plant tannins. *BioTechniques* **31**: 294-298
- Krause D. O., Denman S. E., Mackie R. I., Morrison M., Rae A. L., Attwood G. T. and McSweeney C. S.** 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology and genomics. *FEMS Microbiol. Lett. Rev.* **27**:663-693.
- Krause M. and Oetzel G.** 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds a review. *Animal Feed Sci. Technol.* **126**: 215-236.
- Leng R., Preston T., Sansoucy R. and Kunju G.** 1991. Multinutrient blocks as a strategic supplement for ruminants. *World Anim. Rev.* **62 (2)**: 11-19.
- Li J., Heath I. B. and Packer L.** 1993. The phylogenetic relationships of the anaerobic *Chytridiomycetous* gut fungi (*Neocallimasticaceae*) and the *Chytridiomycota*. II. Cladistic analysis of structural data and description of *Neocallimasticales* ord nov. *Can. J. Bot.* **71**: 393-407.

- Lin K. W., Paterson J. A. and Ladisch M. R.** 1985. Anaerobic fermentation: microbes from ruminant. *Enz. Microbiol. Technol.* **7**: 98-107.
- Madigan M. T., Martinko J. M. and Parker J. B.** 2003. *Biology of Microorganisms*. 10° ed. Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Marounek H. B. and Bartos S.** 1987. Interaccions between rumen amylolytic and lactate-utilizing bacteria in growth on starch. *J. Appl. Bacteriol.* **63**: 233-238.
- Mata D. and Combellas J.** 1992. Influence of multivitamin blocks on intake and rumen fermentation of dry cows fed basal diets of *Trachypogon sp.* and *Cynodon plechostachyus* hays. *Livestock Research for Rural Development* (**4**): 40 -48.
- McAllister T. A., Bae H. D., Jones G. A. and Cheng K. J.** 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.* **72**: 3004-3018.
- McCaughey W. P., Wittenberg K. and Corrigan D.** 1997. Methane production by steer on pasture. *Can. J. Anim. Sci.* **77**: 519-524.
- Montalbetti A.** 1999. Microbiología del rumen.[en línea]. Argentina. <http://www.monografias.com/trabajos7/rumen/rumen.html>.
- Moujahed N., Ben Mostfa. and Ch. Kayouli C.** 2003 Effect of Maturity stage on chemical composition, in sacco degradation and in vitro fermentation of acorn (*Quercus coccifera* L.). The First Joint Seminar FAO-CIHEAM, Granada, Spain, October: 2-4.
- Nava C. C. and Díaz C. A.** 2001. Introducción a la digestión ruminal (Apuntes en línea) F.M.V.Z., U.N.A.M. <http://www.veterin.unam.mx/fmvz/enlinea/ruminal/digestuminal.htm>.
- Orpin C. G.** 1975. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. General Microbiol.* **91**: 249-262.
- Orpin C. G.** 1984. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Anim. Feed Sci. Technol.* **10**: 121-143.
- Orpin C. G. and Letcher A. J.** 1979. Utilization of cellulose, starch, Xylan, and other hemicelluloses for growth by the rumen Fungi *Neocallimastix frontalis*. *Curr. Microbiol.* **3**: 121-124.
- Orpin O. G. and Hart Y.** 1980. Digestion of plant Narices by rumen Fungi *Neocallimastix frontalis*. *J. Appl. Bacteriol.* **49**:10.
- Pearce P. D. and Bauchop T.** 1985. Glycosidases of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* grown on cellulosic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1265- 1269.
- Peters S., Koschinsky S., Schwieger F., and Tebbe C. C.** 2000. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(3):930-936.
- Preston R. T. y Leng R.** 1990. Adecuando los sistemas de producción pecuaria a los recursos disponibles. 2ª edición. Consultoría para el desarrollo rural integrado en el trópico (CONDRIT) Ltda. Cali Colombia.

- Richarson L. F., Raun P., Potter E. L., Cooley C. O. and Rathmacher R. P.** 1976. Effect of Monensin on Rumen Fermentation *In vitro* and *in vivo*. *J. Anim. Sci.* **43**: 657-664.
- Rusell J. B. and Rychlik J. L.** 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* **292**:1119-1122.
- Sambrook J., and Russel D. W.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. U.S.A.
- Sansoucy R.** 1986. Fabricación de bloques de melaza y urea. *Revista Mundial de Zootecnia.* (57): 40-48.
- Sansoucy R.** 1995. New developments in the manufacture and utilization of multinutrient blocks. *World Animal Review* **82**: [en línea] <http://www.fao.org/livestock/aga/agap/FRG/ECONF95/PDF/MUB.PDF>
- Sansoucy R., Aarts D. and Leng R. A.** 1995. First FAO Electronic Conference on Tropical Feeds and Animal Feeding Systems. [en línea] <http://www.fao.org/ag/aga/agap/FRG/ECONF95/PDF/MUB.PDF>
- Scarpellini P., Braglia S., Brambilla A. M., Dalessandro M., Cichero P., Gori A. and Lazzarin A.** 1997. Detection of rifampin resistance by single-strand-conformation-polymorphism analysis of cerebrospinal fluids of patients with tuberculosis of the central nervous system. *J. Clin. Microbiol.* **35 (11)**: 2802-2806.
- Schwieger F. and Tebbe C. C.** 1998. A new approach to utilize single-strand-conformation-polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64 (12)**: 4870-4876.
- Sellinger L. B., Forsberg C. W. and Cheng K. J.** 1996. The rumen: A unique source of enzyme for enhancing livestock production. *Anaerobe.* **2**: 263-284.
- Shimada, H.** 2003. Report of a sighting survey of winter distribution of western North Pacific Bryde's whale off the Marshall Islands conducted in January-March 2002. Paper SC/55/RMP2 presented to the IWC Scientific Committee, May 2003, Berlin (unpublished). 5pp. [Paper available from the Office of this Journal].
- Stanford, K., Wang, Y., Berg, B. P., Majak, W., McCartney, D. H., Baron, V. and McAllister, T. A.** (2001). Effects of Alcohol Ethoxylate and Pluronic Detergents on the Development of Pasture Bloat in Cattle and Sheep. *J. Dairy Sci.* **84**: 167-176.
- Tajima K., Aminov R. I., Nagamine T., Matsui H., Nakamura M. and Benno Y.** 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67 (6)**: 2766-2774.
- Taylor C. D., McBride B C., Wolfe R. S. and Bryant M. P.** 1974. Coenzima M, essential for growth of a rumen strain of *Methanobacterium ruminantium*. *J. Bacteriol.* **20**: 974-975.
- Trinci P. J. A., Davies D. R., Gull K., Lawrence M. I., Nielsen B. B., Rickers A. and Theodoru M. K.** 1994. Anaerobic fungi in herviborous animals. *Mycology Res.* **98**: 129-152.
- Turenne C. Y., Witwicki E., Hoban D. J., Karlowsky J. A., and Kabani A. M.** 2000. Rapid identification of bacteria from positive blood cultures by fluorescence-based PCR-single-

- strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 513-520.
- Van Nevel C. J. and Demeyer D. Y.** 1977. Effect of monensin on rumen Metabolism *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**:251-257.
- Van Nevel C. J., Henderickx H. K., Demeyer D. Y. and Martin J.** 1969. Effect of Chloralhydrate on methane and propionic acid in the rumen. *Appl. Microbiol. Bacteriol.* **17**: 695-700.
- Vargas-Cabrera Y.** 2004. Análisis de la dinámica poblacional de hongos del rumen de bovinos mediante polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas (SSCP) de genes de ARN ribosomal. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Wariuri R. M., Onyando C. O. and Machuka R. O.** 2003. Effect of feeding urea-molasses blocks with incorporated febendazole on grazing dairy heifers naturally infected with gastrointestinal nematodes. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **74(2)**: 49-52.
- White T. J., Bruns T., Lee S. and Taylor J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic In: *PCR protocols a guide to methods and applications*. Academic Press inc.
- Whitford M., Teather R. M. and Forster R. J.** 2001. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiol.* **1**: 5-9.
- Wilson J. R. and Minson D. J.** 1980. Prospects for improving the digestibility and intake of tropical grasses. *Tropic Grasslands.* **14**: 253-259.
- Wood T. G. and Jhonson R.A.** 1986. The biology, physiology and ecology of termites. In: *Economic impact and control of social insects*, S. B. Vinson (Eds.), pp: 1-68. Praeger, New York.
- Zoetendal E. G., Koike S. and Mackie R. I.** 2003. A critical view on molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract. In: *Mannetje L.'t, Ramírez-Avilés L., Sandoval-Castro C., Ku-Vera J.C. (eds). Proceedings of the VI International Symposium on the Nutrition of Herbivores: Matching herbivore nutrition to ecosystems diversity. Mérida, Yucatán, México. 19-24 october. pp 59-78.*

