Biodiversidad microbiana en el ciego del conejo

L. Abecia, N.R. McEwan[1], M. Fondevila y J. Balcells
Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos,
Universidad de Zaragoza, M. Servet 177, 50013 Zaragoza
[1]: Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen, Reino Unido

INTRODUCCIÓN

El estudio de la diversidad microbiana del tracto digestivo, además de por su valor ecológico intrínseco, contribuye al estudio del metabolismo del animal hospedador. Recientes publicaciones estudian la composición y fluctuación de las poblaciones microbianas digestivas de varias especies domésticas, como cerdos (Leser *y col*. 2002), caballos (Daly *y col*. 2001) o pollos (Lu *y col*. 2003), así como de rumiantes (Edwards *y col*. 2004). La población microbiana del conejo es un modelo atractivo de estudio dado que su sistema de reciclaje microbiano mediante cecotrofia la diferencia de otras especies de herbívoros.

El análisis de secuencias *16S rRNA* como criterio para la descripción filogenética permite superar las deficiencias de otros métodos, como el cultivo *in vitro*, que sólo considera las especies cultivables, o métodos moleculares limitados a organismos descritos previamente (Bennegadi *y col*. 2002; Pérez de Rozas *y col*. 2004).

El objetivo de este trabajo es el estudio de la población microbiana del ciego de conejos en crecimiento mediante análisis de la secuencia del locus *16S rRNA* de los mismos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Dos conejos Neozelandeses sanos destetados a los 28 días y cebados durante 30 días fueron sacrificados por dislocación cervical. Se tomaron muestras (2 ml) de contenido cecal, que fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 ºC. Para su análisis, las muestras se descongelaron en hielo y se agruparon antes de la extracción del ADN, que se llevo a cabo usando QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN Ltd.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de la región *16S rRNA* fueron amplificados por PCR usando los oligonucleótidos universales de bacterias CAC GGA TCC GGA CGG GTG AGT AAC ACG (Embley *y col*.1988) y ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT (Lane, 1991). Las amplificaciones resultantes fueron clonadas en un vector TA (Invitrogen) y se seleccionaron al azar 96 clones. Los insertos fueron secuenciados en ambas direcciones utilizando ABI Prism BigDye kit en un equipo Beckman Coultard CEQ 8000 Genetic Analysizer. La búsqueda de identidades y de las mayores homologías se realizó mediante la aplicación informática del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Los 10 resultados de homología que mostraban más identidad con la nueva secuencia identificada, así como ésta, se utilizaron en la construcción de un árbol filogenético mediante el algoritmo de Neighbor-Joining (Saitou &Nei, 1987). La longitud de las ramas es una representación gráfica de la distancia genética entre diferentes microorganismos, cuanto mayor es la distancia entre dos unidades taxonómicas, mayor es la diferencia entre ambas secuencias. Las secuencias fueron alineadas utilizando la aplicación informática ClustalW del EBI (http://www.ebi.ac.uk/clustalw) y la alineación generada fue manualmente corregida usando GeneDoc (Nicholas, 1997) para lograr una longitud aproximada de 1kb. Las secuencias se analizaron mediante el paquete de programas estadístico de análisis filogenético PHYLIP (Felsenstein, 1989). La matriz de distancias genéticas se estimó mediante el algoritmo de Kimura de dos parámetros. La robustez del árbol filogenético generado se estimó mediante remuestreo de los datos originales por "bootstraping", usando 1000 iteraciones y mostrándose en el árbol los valores

iguales o superiores al 50 %. TreeView (Page, 1996) fue utilizado para la visualización del árbol filogenético construido a partir de la salida del programa Consense.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 96 secuencias consideradas a estudio, se identificaron 46 no descritas anteriormente, aunque basándonos en el umbral del 97% de homología tomado de la definición de especie (Stackebrandt y Goebel, 1994), este trabajo aportaría 44 nuevas secuencias. Han sido depositadas en la base de datos EBI (European Bioinfomatics Institute) con números de acceso AJ863512-AJ863557. Las secuencias generadas en este estudio se agrupan en 6 grupos distintos, tal como se presenta en el árbol filogenético (Figura 1).

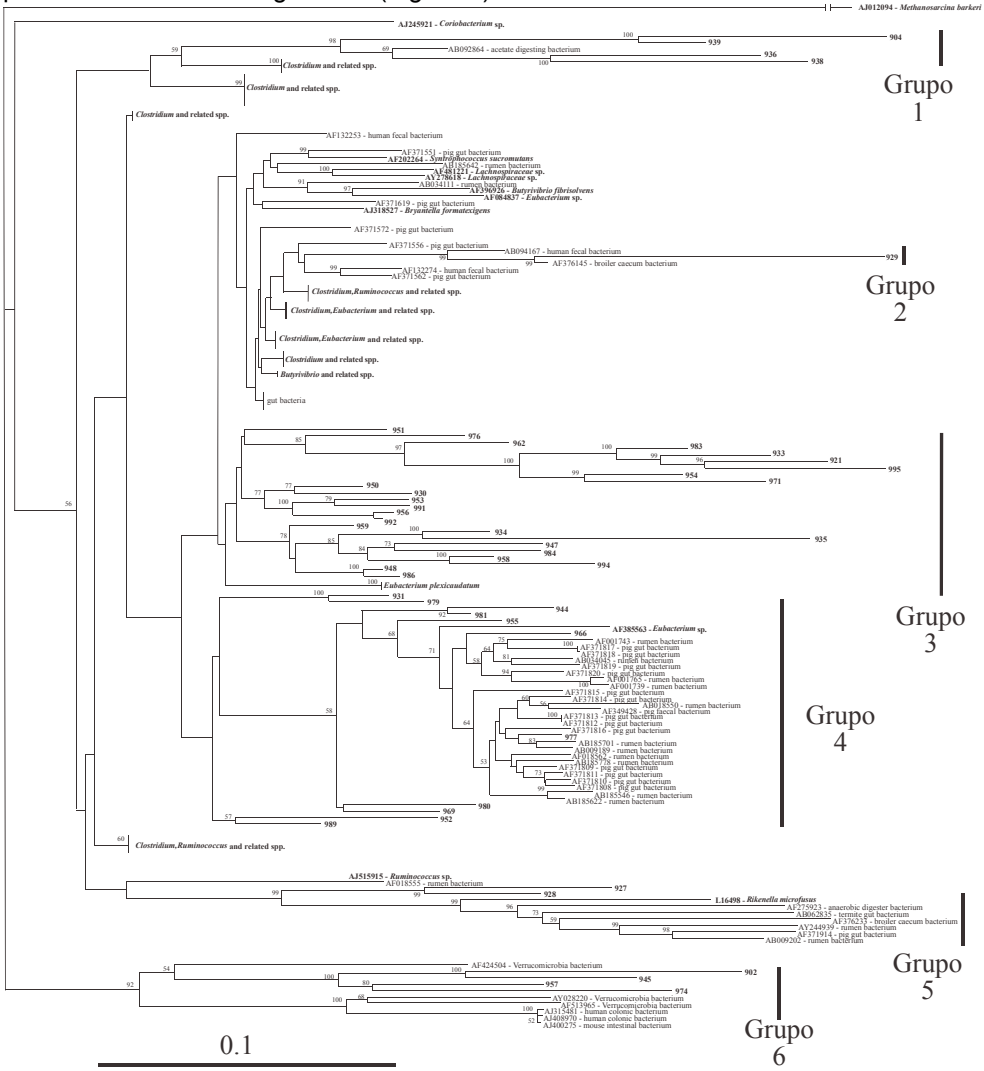


Figura 1. Resumen del árbol filogenético mediante el algoritmo de Neighbor-Joining para determinar la relación filogenética de las nuevas secuencias.

En general se puede afirmar que existe una gran biodiversidad microbiana por el gran número de microorganismos detectados a partir de sólo dos animales. Es especialmente destacable el Grupo 3, donde se localizan 24 de las 46 nuevas secuencias descritas, pero ninguna de las registradas en la base de datos. Dentro de este grupo los valores de bootstraping son fuertes y la longitud de las ramas muestra distancias relativas entre secuencias, por lo que este grupo podría indicar un nivel diferente, no descrito previamente en otros sistemas digestivos. Debido a su abundancia, se puede especular que estos organismos podrían estar relacionados con la fisiología digestiva de esta especie, necesitando para tal afirmación un estudio más específico y a mayor escala.

Otras secciones presentadas en la Figura 1 incluyen tanto secuencias previamente descritas en otros sistemas digestivos como las encontradas en este estudio. En el Grupo 4 están presentes secuencias descritas anteriormente y registradas como procedentes de material ruminal, así como de intestino y heces de cerdo, demostrando que algunos de los nuevos clones detectados en este análisis son al menos, similares a microorganismos presentes en otros sistemas digestivos. En los Grupos 1 y 2 el género conocido más abundante es *Clostridium.* En el Grupo 2 se encuentran secuencias procedentes de rumen y de intestino de cerdo, además de heces humanas y del ciego de pollos broilers.

En contraste con librerías de genes *16S rRNA* de ecosistemas digestivos de otros mamíferos, este estudio no detectó ningún clon que se uniera al grupo de *Prevotella/Bacteroides,* uno de los más abundantes en el tracto digestivo. A pesar de que tal relación ha sido descrita previamente en conejos mediante estudios de hibridación (Bennegadi y col. 2002) o RFLP (Pérez de Rozas y col., 2004), éstos se basan en el contraste con una secuencia conocida prefijada, y tanto ésta como las condiciones analíticas pueden no ser necesariamente específicas.

La microbiota cecal del conejo es diversa. La elevada proporción de clones del Grupo 3 sugiere que este ecosistema contiene linajes no próximos filogenéticamente a los de otros organismos superiores, indicando que especies cecotróficas como el conejo pudieran estar asociadas con una microflora diferente a la de otras especies, debido probablemente al funcionamiento fisiológico específico de su ciego.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Rowett Research Institute, financiado por el programa europeo de formación Marie Curie (ANAEROBE School Programme) y una beca para la formación de investigadores del Gobierno Vasco.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bennegadi N., Fonty G., Millet L., Gidenne T., Licois D., 2002. *Reprod. Nutr. Develop.* 42: S15.

Daly K., Stewart C.S., Flint H. J., Shirazi-Beechey S.P., 2001. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38: 141-151.

Edwards J.E., McEwan N.R., Travis A.J., Wallace R.J., 2004. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 263-281.

Embley, T.M., Smida, J. and Stackebrandt, E., 1988. *Journal of General Microbiology* 134: 961-966.

Felsenstein, J. 1989. PHYLIP- phylogeny inference package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.

Lane D.J. 1991.Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, pp. 115-175. Wiley, New York.

Leser T.D., Amenuvor J.Z., Jensen T.K., Lindecrona R.H., Boye M., Møller K., 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 673-690.

Lu J., Idris U., Harmon B., Hofacre C., Maurer J.J., Lee M.D., 2003. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6816-6824.

Nicholas, K.B., Nicholas, H.B. Jr and Deerfield, D.W., 1997. (Version 2.6.002) *EMBNEW.NEWS*, EBI Newsletter. 4:14.

Page R.D.M, 1996. TREEVIEW, *Comput. Appl. Biosci.* 12, 357–358.

Pérez de Rozas A.M. *y col*., 2004. *Reprod. Nutr. Develop.* 44: S4.

Saitou N. &Nei M. 1987.*Mol. Biol. Evol.* 4(4): 406-425.

Stackebrandt, E.and Goebel, B. M., 1994. *Int. J.Syst. Bacteriol*. 44: 846-849.