ESTUDIO PRELIMINAR DE LA MICROBIOTA Y METABOLOMA DEL RUMEN CUANDO SE INHIBE LA SINTESIS DE METANO EN CAPRINO

Abecia[1], L., Martin-García[1], A.I., Creevey[2], C., Pinloche[2] E., Newbold[2], C.J. y Yáñez-Ruiz[1], D.R.
[1]Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008, Granada
[2]IBERS, Aberystwyth University, Aberystwyth, SY23 3DA, United Kingdom
E-mail: david.yanez@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

En la última década se ha producido un avance considerable en el conocimiento de la diversidad existente en los distintos grupos filogenéticos del ecosistema microbiano del rumen y de los cambios que sufre como consecuencia de modificaciones en la dieta (Denmand & McSweeney, 2015). Sin embargo, estos cambios con frecuencia implican grupos desconocidos y no proporciona información suficiente que permita conocer las funciones específicas y los mecanismos de acción en los que cada grupo microbiano está implicado. Por otro lado, el avance de las técnicas de metabolómica está permitiendo conocer con más detalle la interacción entre distintas rutas metabólicas, además de la identificación de marcadores biológicos relacionados con alteraciones digestivas, como por ejemplo la acidosis ruminal (Mao et al., 2015). El estudio conjunto del metaboloma en el rumen y su relación con la diversidad de la microbiota aún no se ha explorado y podría proporcionar información valiosa sobre grupos microbianos clave y su implicación en cambios observados en metabolitos específicos ante determinadas modificaciones de la dieta. En este sentido la utilización del bromoclorometano (BCM) como inhibidor de la producción de metano ha resultado de gran utilidad en estudios de manipulación del microbioma ruminal (Abecia et al., 2012). El objetivo de este trabajo fue el estudio conjunto de la población de bacterias y del metaboloma del rumen tomando como modelo cabras adultas en las que la producción de metano estaba parcialmente inhibida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 16 cabras Murciano-Granadinas adultas en el primer tercio de lactación. Ocho cabras fueron tratadas con una dosis diaria de 0,30 g de BCM/100 kg de peso, mientras que otras 8 se emplearon como control. Tras 2 meses de tratamiento se recogieron aproximadamente 50 g de contenido ruminal mediante sonda esofágica, se congeló a -80 ºC y posteriormente se liofilizó. La extracción de ADN se realizó con el kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen Ltd, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir de cada muestra de ADN genómico se amplificó la región hipervariable V1-V2 del gen 16S bacteriano mediante PCR, utilizando cebadores bacterianos universales (27F y 357R) etiquetados con identificadores “multiplex”. Los amplicones fueron normalizados, mezclados y secuenciados en un pirosecuenciador Roche 454 GS FLX Titanium (Roche, EEUU), analizándose las secuencias mediante el programa informático QIIME (Caporaso et al., 2010). Las unidades taxonómicas operacionales (OTU) fueron asignadas al 97% de similitud. La clasificación taxonómica se llevó a cabo con el clasificador del Ribosomal Database Project (RDP).

Para el estudio de metabolómica se enviaron 200 mg de cada muestra a la empresa Metabolon Inc. (Research Triangle Park, North Carolina, EEUU) donde se sometieron al sistema de extracción con solvente orgánico MicroLab STAR® en el que se incluyeron patrones de recuperación. Cada extracto se sometió a análisis de cromatografía líquida (HPLC-MS/MS) y de gases (GC/MS). La identificación de picos se realizó estándares y el Sistema LIMS (Laboratory Information Management System), mientras que el análisis bioinformático se llevó a cabo a través del servidor Oracle 10.2.0.1 Enterprise Edition. La representación gráfica (“heatmap”) de la matriz de correlación calculada con la medida D de Hoeffding entre los metabolitos y los microorganismos detectados en el rumen de los animales se realizó usando el entorno de programación R (version 2.15; http//www.r-project.org/).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de pirosecuenciación de bacterias arrojó un total de 16.870 secuencias de alta calidad que se distribuyeron en 2.011 OTUs. La comunidad bacteriana del rumen de las cabras en las que la producción de metano estaba parcialmente inhibida presentó una

estructura que tendió a ser diferente a las del lote control (P<0,085. Hubo diferencias en las abundancias relativas de los géneros *Xylanobacter* y *Ruminobacter (P<0,05)*.

El análisis de metabolómica proporcionó un total de 473 metabolitos identificados pertenecientes a 7 grupos: aminoácidos, péptidos, carbohidratos, lípidos, nucleótidos, cofactores/vitaminas y xenobióticos, de los que 46 fueron distintos (P<0,001) entre las cabras con la producción de metano parcialmente inhibida y las control (11 aumentaron y 35 disminuyeron como consecuencia del tratamiento con BCM). De todos ellos, destaca el descenso de 22 metabolitos asociados al metabolismo de lípidos, incluyendo fundamentalmente ácidos grasos de cadena larga y lisolípidos.

Los valores de D más elevados se observaron para *Butyrivibrio* y 21 metabolitos, de los que 14 pertenecían al grupo de péptidos. Dos de los clados de metabolitos que se obtuvieron tuvieron una relación más estrecha con dos clados de microorganismos (Figura 1). Un clado incluía los géneros *Butyrivibrio* y *Mogibacterium* mientras que el segundo estaba compuesto por *Hallela, Ruminobacter, Xylanobacter y Lachnospiracea*.

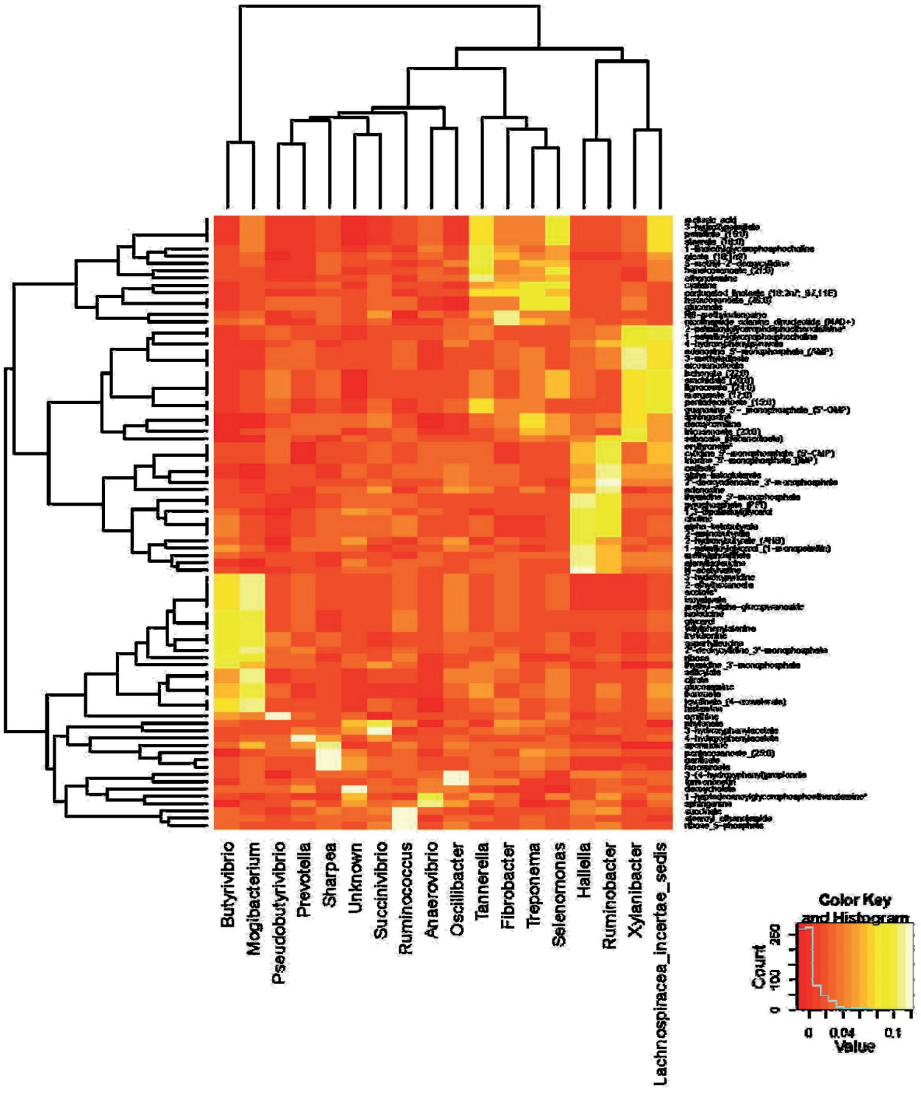


Figura 1. 'Heatmap' relacionando grupos bacterianos y cambios en metabolitos del rumen.

El ecosistema ruminal es complejo e interactivo. Algunas bacterias se consideran 'generalistas' ya que tienen la capacidad de fermentar un rango amplio de substratos (celulosa, hemicelulosa, pectina, almidón y proteína), como es el caso de *Butyrivibrio*. Otros, en cambio, están más 'especializados' en la utilización de un rango más estrecho de sustratos, como es el caso de *Xylanobacter* y *Ruminobacter*. *Xylanobacter* está implicado en el metabolismo de algunos de los lípidos afectados por el tratamiento con BCM, entre ellos lisolípidos, lo que sugiere un posible efecto negativo sobre la lipólisis. *Ruminobacter* incluye a microorganismos implicados en la degradación de carbohidratos estructurales. En particular el tratamiento con BCM produjo un incremento de este grupo, puesto que, como *F. succinogenes*, puede mantener una alta actividad metabólica con una baja producción de H_2 y alta formación de succinato que finalmente puede ser metabolizado a propionato, lo que concuerda con los parámetros de fermentación ruminales analizados y una mayor producción de leche (Abecia et al., 2012).
Los resultados de este trabajo sugieren que la combinación de genómica y metabolómica puede ser una herramienta útil para entender modificaciones del ecosistema microbiano del rumen que deriven en estrategias nutricionales exitosas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Abecia, L et al. 2012. J Dairy Sci. 95: 2027-36 • Caporaso COMPLETAR CITA • Denman, S & McSweeney C. 2015. Annu Rev. Anim. Biosci. (en prensa) • Caporaso et al. 2010. Nature Methods 7, 335–336 • Mao, et al. 2015. Environ. Microbiol. (en prensa)

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el CSIC (Proyecto Intramural, CSIC 201440E048).

PRELIMINARY MICROBIOME-METABOLOME ANALYSIS IN THE RUMEN OF GOATS WITH REDUCED METHANE EMISSIONS

ABSTRACT: Despite the large improvements in the study of the microbial ecosystem in the rumen, we still lack the knowledge of the function of many groups. This work aimed to combine genomic bacterial study with metabolomics profile to gain insight into the changes occurring in the rumen of goats treated with an antimethanogenic compound (bromochloromethane, BCM). Rumen digest samples were collected from control and treated goats after two months of treatment. Samples were subjected to 454 pyrosequencing to study the bacterial population and by GC-MS and HPLC-MS/MS for metabolomics study. The abundance of *Xylanobacter* and *Ruminobacter* groups differed between experimental groups and was correlated to a number of metabolites involved in lipids and carbohydrates metabolism. This study of microbiome and metabolome has shown its potential to help understanding microbial processes occurring in the rumen under different feeding strategies.

Keywords*:* rumen, metabolome, microbiome, methane