

ESTUDIO DEL EFECTO DE DOS RÉGIMENES ALIMENTARIOS (*AD LIBITUM* FRENTE A LA RESTRICCIÓN) SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE CONEJOS DE CARNE

Velasco¹, M., Piles¹, M., Viñas¹, M., Rafel¹, O., González¹, O., Guivernau¹, M. y Sánchez¹, J.P.

¹Genética y Mejora Animal, IRTA, Torre Marimón, Caldes de Montbui, 08140 Barcelona, España. ²GIRO, IRTA, Torre Marimón, Caldes de Montbui, 08140 Barcelona, España. maria.velasco@irta.cat

INTRODUCCIÓN

La restricción de la cantidad de pienso suministrado a los animales durante el período de engorde se está convirtiendo en un método generalizado de manejo en granjas ya que resulta favorable para la salud del animal al reducir el riesgo de desarrollo de enteropatías (Gidenne et al., 2009). A pesar de que la restricción alimentaria penaliza el crecimiento animal, mejora la eficiencia de la alimentación y reduce el impacto ambiental, los costes de alimentación y el uso de antibióticos. Se ha demostrado que la restricción alimentaria modifica el patrón de fermentación bacteriano gastrointestinal (Gidenne y Feugier, 2009). Por lo tanto, cabe pensar que también podría provocar cambios en la composición y en la actividad microbiana. La microbiota intestinal desempeña un papel clave en el metabolismo, la nutrición, la velocidad de crecimiento y el estado del sistema inmune de los animales. A pesar de que la microbiota intestinal de los conejos es muy homogénea entre individuos (Combes et al., 2011) factores como la edad, la dieta o el régimen alimentario pueden provocar cambios en su composición y tener un impacto en la capacidad de absorción de nutrientes del animal o en su salud (Petersson et al., 2011; Drouilhet et al., 2011). El objetivo de este estudio es caracterizar, mediante la utilización de herramientas de secuenciación masiva (MiSeq), la microbiota cecal y fecal de dos grupos de conejos de carne que siguieron diferentes regímenes de alimentación durante el período de engorde, así como analizar la relación entre su microbiota y su crecimiento durante dicho periodo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental. Los animales utilizados en este trabajo proceden de un experimento desarrollado entre 2012 y 2015 con el objetivo de estimar la interacción entre el genotipo y el régimen alimentario sobre caracteres de crecimiento, eficiencia alimentaria, características de la canal y salud de los animales. Un total de 6.264 animales pertenecientes a la línea Caldes (Gómez et al., 2002) fueron criados bajo las mismas condiciones ambientales y alimentados con la misma dieta estándar de pellet pero con diferentes regímenes de alimentación: el 50% de los animales fueron alimentados *ad libitum* y el resto fueron alimentados bajo restricción (75% de la ingesta de alimento *ad libitum*). Para este trabajo se seleccionaron aleatoriamente 24 animales; 11 de los cuales fueron alimentados *ad libitum* y 13 bajo restricción. Cuando los animales fueron sacrificados (a la edad de 66 días), se recogieron muestras de heces duras y de ciego que fueron almacenadas a -80 °C hasta el momento de la extracción del DNA total.

Extracción de DNA y secuenciación. Se extrajo el DNA total de las muestras cecales y fecales utilizando un kit de extracción comercial con estrategia *bead-beating* (ZR Soil Microbe DNA MiniPrep™-Zymo Research). A partir de cada extracto, se amplificó un fragmento de 411 pares de bases correspondiente a las regiones hipervariables V4 y V5 del gen 16S rRNA utilizando el par de cebadores descrito por Parada et al. (2015). Las librerías para cada una de las 48 muestras se generaron mediante el protocolo del kit Nextera® XT y finalmente fueron secuenciadas en paralelo en una plataforma Illumina MiSeq 2x250.

Bioinformática y análisis estadístico. Las lecturas crudas generadas se analizaron con el paquete bioinformático QIIME (Caporaso et al., 2010) generando una tabla final que incluye las abundancias normalizadas de 1.823 OTUs, sin *singletons*, resultantes de la clusterización de 2.195.158 *contigs*. Se generaron curvas de rarefacción para los índices de diversidad Chao1, número de OTUs (*Operational Taxonomic Units*) observados y PD *whole tree* para determinar la variabilidad existente entre los cuatro niveles de la combinación régimen alimentario-origen de la muestra. Se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) a partir de la matriz de distancias filogenéticas ponderada *Unifrac* (Louzopone y Knight, 2005) para proyectar cada muestra, de acuerdo a su composición microbiana, en un punto determinado de un gráfico tridimensional. Por otro lado, se utilizó un modelo lineal

para estudiar el efecto de la composición microbiana sobre la ganancia media diaria de los animales durante el periodo de engorde. Finalmente, se estudió el efecto de la riqueza microbiana sobre la ganancia media diaria con un modelo lineal en el que los factores explicativos fueron el tratamiento alimentario y la regresión sobre el número de OTUs observados a un número fijo de lecturas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este estudio ha permitido poner a punto la tecnología de secuenciación MiSeq de Illumina para muestras de contenido cecal y heces de conejo. También se ha desarrollado un protocolo propio de filtrado de calidad y análisis de las muestras con el software QIIME que ha permitido un estudio preliminar del efecto del régimen alimentario y el origen de las muestras sobre la composición microbiana y su influencia sobre el crecimiento de los gazapos. La caracterización taxonómica de las muestras reveló que los filos predominantes fueron *Firmicutes* (76,31%), *Bacteroidetes* (7,61%) y *Tenericutes* (7,52%); este último no había sido descrito previamente en la literatura. Se identificó un único género del reino *Archaea* (*Methanobrevibacter*) con una abundancia relativa inferior al 1%. Para el índice de diversidad alfa, número de OTUs observados, se encontró un promedio de 504,57 OTUs por muestra para los cuatro niveles de la combinación estudiada. Las curvas de rarefacción generadas para los índices de diversidad Chao1, número de OTUs observados y PD *whole tree* no evidenciaron diferencias significativas entre los diferentes niveles de la combinación. El análisis PCoA (Figura 1) no mostró un patrón claro de separación entre las muestras en función del origen, ni del régimen alimentario, ni de la combinación de ambos. Sin embargo, este análisis evidenció cuatro muestras (correspondientes a las muestras cecales y fecales de dos animales) con una composición microbiana claramente diferente del resto. Estas muestras atípicas mostraron diferencias significativas respecto al resto de muestras para 6 filos y 27 familias. Además, 9 OTUs –clasificados dentro de las familias *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae* del filo *Firmicutes*– resultaron exclusivos de estas muestras. Aunque la composición microbiana de dichas muestras no parece propia de animales afectados por enteropatía, uno de ellos fue diagnosticado con problemas entéricos durante el engorde. Dado que en el otro animal no se observaron signos de enfermedad no puede afirmarse que la separación de las cuatro muestras en el PCoA se pueda atribuir a problemas entéricos pero tampoco puede descartarse. Además, en estudios previos (Bäuerl et al., 2014) se ha demostrado que la microbiota de conejos afectados por enteropatía es menos diversa que la de animales sanos. El estudio de asociación entre la composición microbiana y la ganancia media diaria mostró una asociación negativa ($p_{FDR}=0.015$) con el crecimiento para la familia *Mogibacteriaceae* (orden *Clostridiales*) y una asociación positiva ($p_{FDR}=0.012$) para un OTU de familia desconocida del orden *Clostridiales*. El estudio de asociación entre la ganancia media diaria y el número de OTUs observados (Figura 2) mostró una asociación positiva entre la riqueza y el crecimiento para el grupo de animales alimentado bajo restricción ($p_{FDR}=0.012$) en concordancia con los resultados obtenidos en un estudio con muestras de buche e íleon de pollos (Han et al., 2016) en el que determinaron que el número de OTUs observados estaba positivamente correlacionado con el peso corporal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bäuerl, C. 2014. PloS One 9: e105707.
- Combes, S. 2011. FEMS Microbiol. Ecol. 77: 680-689.
- Drouilhet, L. 2016. J. Anim. Sci. 94: 38-48.
- Gidenne, T. 2009. Animal 3: 509-515.
- Gidenne, T. 2009. Animal3: 501-508.
- Gómez, E.A. 2002. Rabbit Res. Med. Count. 38: 189-198.
- Han, G.G. 2016. SpringerPlus 5: 911-920.
- Parada, A.E. 2015. Environ. Microbiol. 18: 1403-1414.
- Pettersson, J. 2011. Am. J. Phys. Gast. Liv. Phys. 300: 327-333.

Agradecimientos: Financiado por el proyecto Feed-a-gene (H2020), se han usado datos generados en el proyecto RTA2011-00064-00-00. Se agradece la colaboración de Nicolas Boulanger y Armand Sánchez del CRAG y del personal de granja de cunicultura del IRTA-Torre Marimón.

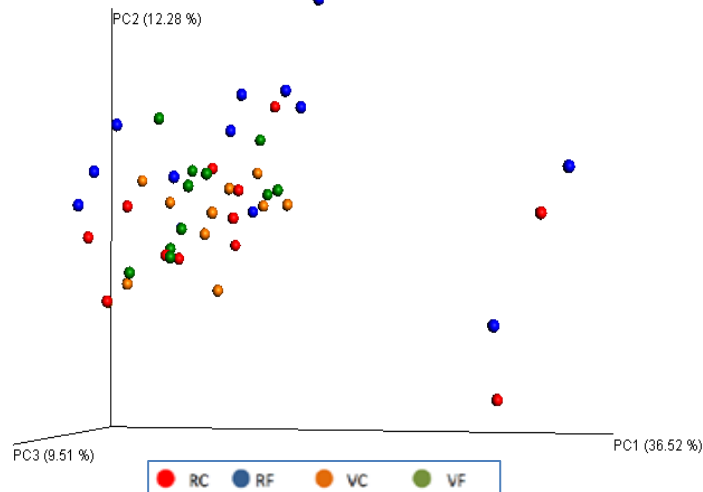


Figura 1. PCoA construido a partir de la matriz de distancias Unifrac ponderada. [Restricción-Ciego (RC), Restricción-Heces (RH), Ad libitum-Ciego (VC) y Ad libitum-Heces (VH)].

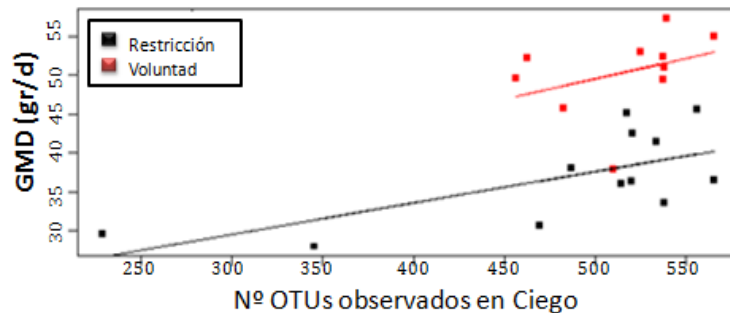


Figura 2. Asociación entre el número de OTUs observados en muestras cecales y la ganancia media diaria (GMD).

STUDY OF THE EFFECT OF TWO DIFFERENT FEEDING REGIMES (*AD LIBITUM* vs. RESTRICTION) ON MEAT RABBITS' GUT MICROBIOME

ABSTRACT: Aiming to study the effect of restricted and *ad libitum* feeding regimes on intestinal microbiome composition in rabbits, a 16S rDNA-based assessment through MiSeq platform was performed. Caecum and faeces samples from eleven 66-days-old animals fed *ad libitum* and thirteen fed under restricted (75%) standard diet were assessed. With a QIIME pipeline, a total of 1,823 OTUs non-singletons were clustered from 2,195,158 final contigs. Taxonomic assignment revealed that intestinal microbiota was dominated by *Firmicutes* (76.3%), followed by *Bacteroidetes* (7.5%) and *Tenericutes* (7.5%). No overall differences between feeding regimes and origin of the samples (faeces or caecum) were detected by a PCoA analysis based on weighted Unifrac distances. This analysis detected four samples clearly separated from the rest which had a different microbial composition and evidenced significant differences for 6 phyla and 27 families. In addition, 9 OTUs –classified within families *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae* from phylum *Firmicutes*– were exclusive of these atypical samples. A negative association ($p_{FDR}=0.015$) for the family *Mogibacteriaceae* (order *Clostridiales*) and a positive association ($p_{FDR}=0.012$) for one OTU of unknown family belonging to the order *Clostridiales* with average daily gain have been found. Moreover, OTU richness resulted positively ($p_{FDR}=0.012$) associated to average daily gain too.

Keywords: Microbiome, feed restriction, rabbit, enteropathy.