

¿SON DIFERENTES LOS PERFILES MICROBIANOS Y DE DIVERSIDAD SEGÚN LA PLATAFORMA DE SECUENCIACIÓN?

Biada^{1*}, I., Santacreu¹, M.A., D'Auria², G. e Ibáñez-Escriché¹, N.

¹Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universitat Politècnica de València, València 46022;

²Fundación FISABIO, Av. de Catalunya, 21, 46020 València *ibiada@posgrado.upv.es

INTRODUCCIÓN

El análisis del gen 16S rRNA es una herramienta clave para identificar las comunidades microbianas en la microbiota intestinal (Coughlan *et al.*, 2015). MiSeq Illumina es una plataforma de uso común para la secuenciación de amplicones de diferentes regiones del gen 16S rRNA. Esta plataforma produce longitudes de lectura más cortas, pero puede aumentar el número de lecturas (Mosher *et al.*, 2013). Una mejor alternativa podría ser el uso de la tecnología PacBio, que secuencia la longitud completa del gen 16S rRNA y produce lecturas más largas, pero podría tener una precisión menor (Mosher *et al.*, 2013). A diferencia de Illumina MiSeq, PacBio promete la identificación de taxones a nivel de especie, lo que permitiría comprender mejor la composición de la microbiota intestinal. Este estudio tiene como objetivo comparar las plataformas MiSeq y PacBio para ver si la tecnología PacBio es superior a la hora de proporcionar más información a nivel de especie. Asimismo, se quiere estudiar en qué medida son similares las comunidades microbianas proporcionadas por ambos métodos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se extrajo ADN de 5 muestras de heces blandas de conejos. Las muestras de ADN se secuenciaron primero, en Illumina MiSeq, utilizando las regiones V3-V4 del gen 16S rRNA. En segundo lugar, se secuenció la longitud completa del gen 16S rRNA utilizando la plataforma PacBio. Las lecturas MiSeq Illumina de extremo pareado (2*300 pb) y las lecturas PacBio de extremo único (~1450 pb) se procesaron en R utilizando el pipeline DADA2 (Callahan *et al.*, 2016). Para la anotación taxonómica, se utilizó un clasificador Naive Bayes (Silva). La diversidad alfa taxonómica se calculó con QIIME2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MiSeq y PacBio generaron un total de 1.028.791 y 419.345 secuencias, respectivamente. Se identificaron un total de 3.459 ASVs (Amplicon Sequence Variants) en MiSeq y 7.019 ASVs en PacBio. En MiSeq, el porcentaje de ASVs clasificados a nivel de filo, clase, orden, familia, género y especie fue del 95%, 93%, 86%, 84%, 57% y 29%, respectivamente. PacBio proporcionó una mejor resolución a todos los niveles, más del 98% de los ASVs se clasificaron a nivel de familia, el 83% a nivel de género y, por último, el 55% a nivel de especie. Sin embargo, hay que señalar que, a nivel de especie, aunque la resolución de la clasificación fue del 55%, la base de datos no ofrece los nombres de las especies para la mayoría de los ASVs. Al comparar los dos métodos a nivel de familia, al menos el 80% de los taxones identificados con PacBio también se identificaron en MiSeq. A nivel de género, desciende al 67% y finalmente al 46% a nivel de especie. Además, cuando se tiene en cuenta la abundancia, cuanto más bajo es el nivel taxonómico, mayor es la divergencia observada entre los dos métodos de secuenciación. A nivel de género, sólo cinco géneros de los diez más abundantes eran comunes entre los dos métodos de secuenciación. Por último, PacBio presentó una diversidad alfa significativamente mayor de acuerdo con el mayor número de ASVs identificados.

CONCLUSIÓN

A pesar de comenzar con menos lecturas totales, PacBio identificó un mayor número de ASVs que MiSeq. Además, PacBio mostró superioridad con mayor resolución en la anotación taxonómica a todos los niveles. Sin embargo, es posible que la resolución del 55% a nivel de especie aún deba ser mayor, y se necesitan bases de datos actualizadas. Por último, el estudio mostró resultados preocupantes en cuanto a las diferencias en los taxones más abundantes identificados entre los dos métodos. En consecuencia, cuando se compare la microbiota intestinal de diferentes estudios, debería tenerse en cuenta el método de secuenciación utilizado, ya que podría ser responsable de las diferencias en la diversidad y los taxones identificados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Mosher, J.J., *et al.* 2013. J. Microbiol Methods. 95: 175-181. • Coughlan, L.M., *et al.*, 2015. Front. Microbiol. 6: 672. • Callahan, B.J., *et al.*, 2016. Nat Methods. 13(7): 581-3.

Agradecimientos: Esta investigación ha sido financiada por el MEC (AGL2017-55921-C2-1-P y PID2020-115558GB-C21) y la Generalitat Valenciana (AICO/2020/349 and CIACIF/2021/005).