

Estudio de la composición bacteriana en cerdos expuestos a dietas con diferentes niveles de proteína y carotenos.

R González-Prendes¹, RN Pena¹, E Solé¹, AR Seradj¹, J Estany¹, Y Ramayo-Caldas²

¹ Departament de Ciència Animal, Universitat de Lleida–Agrotecnio Center, Lleida, Catalonia, España; Genética y Mejora Animal, IRTA, Torre Marimón, Caldes de Montbui, 08140 Barcelona, España.

Introducción

La microbiota forma un ecosistema heterogéneo con influencia directa sobre múltiples funciones fisiológicas del hospedador, como la absorción de nutrientes, la velocidad de crecimiento, el sistema inmunológico, así como la resistencia a enfermedades (Kim and Isaacson, 2015). Modificaciones en la composición de las poblaciones bacterianas podrían emplearse para mejorar la salud de los animales y / o mejorar la eficiencia de la producción (Richards et al., 2015; Yang et al. 2017). Estudios recientes en cerdos sugieren una relación entre la composición de la microbiota con la ganancia media diaria y el peso vivo en cerdos de 60 días de edad (Ramayo-Caldas et al., 2016). En este estudio utilizamos la secuencias del gen 16S rRNA para evaluar el impacto de la proteína y los niveles de carotenos incluidos en las dietas de 32 cerdos Duroc en términos de composición taxonómica y funcional a dos edades (165 y 195 días).

Material y Métodos

Diseño experimental: El estudio ha sido realizado en 32 cerdos Duroc provenientes del apareamiento entre 23 hembras y 7 machos. Todos los cerdos fueron criados bajo las mismas condiciones de manejo, pero alimentados con distintas dietas, de acuerdo con el diseño experimental descrito en Henríquez-Rodríguez et al (2017). Así, desde los 70 días (d) de edad a los 165 d los animales fueron divididos en dos grupos, de tal forma que 16 consumieron una dieta normal en proteína (RP) (17 % de 70 a 100 d, 16% de 100 a 130 d y 15 % de 130 to 160 d) y 16 una dieta con un nivel bajo de proteína (LP) (15% de 70 a 100 d, 14% de 100 a 130d y 13% de 130 a 165 d). Desde los 165 d hasta los 195 d, se les suministró una dieta LP a todos los animales, a la mitad (8 que consumieron RP más 8 que consumieron LP) con maíz enriquecido con caroteno (CE) y a la otra mitad con un maíz sin carotenos (NE).

Extracción de ADN, secuenciación: Un total de 64 muestras de heces fueron recogidas en dos tiempos, a los 165 d (T1) y 195 d (T2) de edad. Una vez tomadas las muestras se almacenaron a -80C^a para su conservación. El ADN bacteriano se extrajo con el DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Del ADN extraído se amplificó la región V3 del gen del ARN ribosomal 16S en la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA).

Bioinformática y análisis estadístico: El total de lecturas generadas se analizaron con el conjunto de programas disponibles en QIIME2 (<https://qiime2.org/>). Primero se unieron todos los fragmentos de lectura homólogos, después se realizó el control de calidad a las lecturas, para finalmente agrupar todas las secuencias pareadas en ASVs (*amplicon sequence variants*) y obtener la abundancia de cada ASVs por animal. Los índices de diversidad *alpha*, *beta* y *richness* se calcularon con el programa Vegan (Oksanen et al., 2018). Con el mismo programa se estudió la proyección de las muestras según su composición microbiana usando la NMDS (*non-metric multidimensional scaling*). Por otra parte, el efecto de la dieta se evaluó en cada edad (RP vs LP, en T1, y CE vs NE, en T2) sobre la diversidad y composición de la comunidad microbiana, así como las diferencias entre edades (T1 vs T2).

Clasificación por enterotipos: La detección de enterotipos se realizó utilizando la abundancia de los géneros en cada muestra. Todas las muestras se agruparon según su enterotipo y se clasificaron con una métrica de distancia de distribución de probabilidad relacionada con la divergencia de Jensen-Shannon y el *Partitioning Around Medoids* (Arumugam et al., 2011). El número óptimo de clústers se determinó siguiendo el índice Calinski-Harabasz (Calinski y Harabasz, 1974). Se contrastó además la estabilidad de las muestras en enterotipos al comparar la asignación del mismo animal en T1 en comparación con T2.

Resultados

Después del control de calidad se obtuvieron un total de 3.142 ASVs. La clasificación taxonómica de los ASVs permitió detectar un total de 16 *Phyla* y 65 de *Genera*. En ambas edades, los *Phyla* más abundantes fueron *Firmicutes* (50 %) y *Bacteroidetes* (35 %), mientras que los géneros encontrados con mayor frecuencia fueron *Prevotella* (26 %) and *Oscillospira* (7 %).

La comparación entre los índices de diversidad *alpha*, *beta* y *richness* no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre edades ni tampoco de dieta dentro de edad. Sin embargo, se detectó un claro efecto de la edad sobre la abundancia de la microbiota, de tal manera que, las muestras se separan claramente en función del tiempo (T1 vs T2) (**Figura 1**). También se detectó un efecto de la dieta con RP respecto a la LP sobre la proyección de los animales basado en la abundancia bacteriana por animal, a nivel de *Phylum* y *Genera*. Esto sugiere un efecto de la proteína sobre la abundancia bacteriana. En cerdos, Fan et al. (2017) concluyeron que la restricción moderada de proteínas en la dieta (13% de proteína cruda) puede alterar la comunidad bacteriana tanto en el íleon como en el colon y mejorar la función de la barrera intestinal.

Cuando evaluamos el efecto de la dieta (CE vs NE) en T2 no se detectaron diferencias significativas, lo que sugiere un débil impacto de los carotenos en T2, al menos en estas condiciones de tiempo y concentraciones. Estudios anteriores en humanos (Liu et al. 2017) y ratones (Cha et al., 2017) reportaron que la vitamina A tiene un efecto significativo sobre la microbiota aunque la suplementación se realizó con niveles mayores de vitamina A que la utilizada en nuestro estudio.

Todas las muestras fueron agrupadas en función de su enterotipo. En el grupo T1, 14 muestras se agruparon en el enterotipo 1 (EP1) y 13 en el enterotipo 2 (EP2). Cuando se evaluaron los enterotipos en el grupo T2, se mostró que la clasificación no permaneció estable (**Figura 2**) y se observó además que la distinción entre grupos fue menos evidente en comparación con T1. Por ejemplo, el 64% (9/14) de los animales identificados como EP1 en T1 se mantienen como EP1 en T2. Por otra parte el 61% (8/13) de los identificados como EP2 en T1 se mantienen en el mismo enterotipo en T2. Esto muestra una transición de animales entre enterotipos en un periodo relativamente corto (28 días) especialmente considerando que a esa edad la composición del ecosistema intestinal es estable (Mach et al., 2015).

Referencias bibliográficas

- Arumugam M. et al. 2011. *Nature*. 473:174–80.
- Calinski T y Harabasz J. 1974. *Commun Stat-Theory Methods*. 3:1–27.
- Kim H. y Isaacson R. 2015. *Vet Microbiol*. 177: 242–251.
- Mach N. et al. 2015. *Environ Microbiol Rep* 7:554–69.
- Oksanen J. et al. 2018. *Vegan: Community Ecology Package*. Version 2.4-6.
- Ramayo-Caldas et al. 2016. *ISME J*. 10:2973–7.
- Richards JD. et al. 2015. *Can J Anim Sci*. 85:421–35.
- Yang H. et al. 2017. *Front Microbiol* 8:1555.

Abstract

In this study we investigated the fecal microbial composition and its change during the last month of fattening in purebred Duroc pigs. From 70 to 165 d of age, 32 pigs were divided into two groups fed either a regular-protein (RP) or a low-protein (LP) diet. In the last month of fattening, from 165 to 195 d, all 32 pigs received a LP diet, either carotene-enriched (CE) (8 pigs from RP and 8 pigs from LP previous diets) or not (NE) (8 pigs from RP and 8 pigs from LP previous diets). Fecal samples were collected at 165 d (T1) and at 193 d (T2). Fecal microbiome composition was studied by high-throughput 16S ribosomal RNA sequencing in Illumina MiSeq platform. We evaluated the abundance of amplicon sequence variants (ASVs), its taxonomy classification and three diversity indexes (α -diversity, β -diversity and richness). After the sequence quality control, we identified a total 3,142 distinct ASVs. At taxonomic level, 16 phyla and 65 genera were detected. Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacterium were the most abundant phyla at both T1 and T2 time-points and the most abundant genera included *Prevotella* and *Oscillospira*. Significant differences were observed between T1 and T2 for the microbiome composition at ASVs, phylum and genus levels. In T1 group the composition of microbiome was affected by diet (RP vs LP) at ASVs and Phylum levels. Discriminant analysis evidenced two enterotype clusters with different stability across T1 and T2 time-points. In summary, a strong effect of the time was observed between T1 and T2 on the microbiota composition, which may explain the weak enterotype stability.

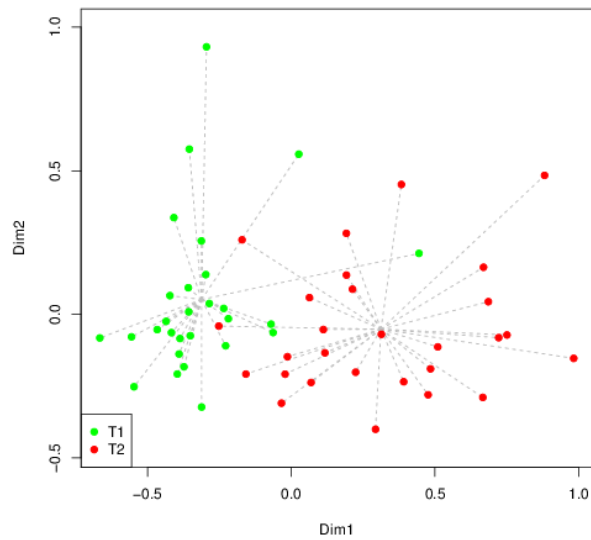


Figura 1. Distribución multidimensional no-métrica (NMDS, por sus siglas en inglés) de las muestras estimado sobre las distancias de Bray-Curtis evaluando el factor edad. Los puntos indican la cantidad de secuencia de cada animal.

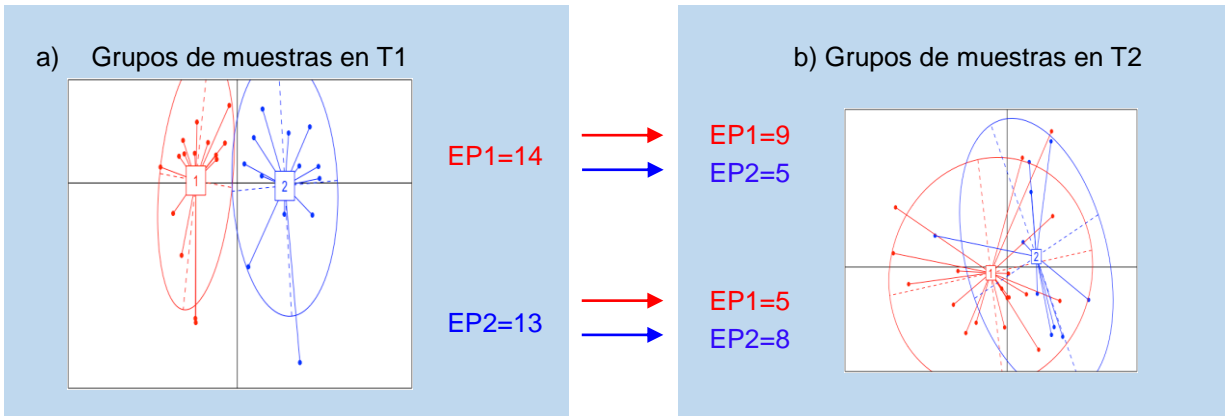


Figura 2. Evolución/transición de los animales desde edad T1 hasta edad T2. Color rojo representa al EP1: Enterotipo 1, Color azul representa al EP2: Enterotipo 2.