

## Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): una herramienta útil para valorar la dinámica y la diversidad de la población microbiana en aves y cerdos.

Gómez de Segura, A.; Castillo, M., Takahashi, S.E.; Choque-López, J.; Barroeta, A.C.; Baucells, M.D. y Martín-Orúe, S.M\*;

Grup de Recerca en Nutrició, Maneig i Benestar Animal. Dpt. Ciència Animal i dels Aliments. (\*susana.martin@uab.es). Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona

### INTRODUCCIÓN

El ecosistema intestinal es un medio complejo y dinámico que puede verse afectado puntualmente por numerosos factores propios del individuo pero también por numerosos factores ambientales o externos (como puede ser la dieta). La necesidad de conocer de una forma rápida y reproducible cómo es la dinámica de la población bacteriana, así como su estructura está siendo posible gracias al desarrollo de técnicas moleculares aplicadas como DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)<sup>1</sup>, TGGE (Temperatura Gradient Gel Electrophoresis)<sup>2</sup>, SSCP (Single Strand Conformation Polimorphism)<sup>3</sup> y T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polimorphism)<sup>4</sup>. Estas técnicas moleculares aprovechan la característica de universalidad del gen que codifica para el 16S ARNr, presente en prácticamente la totalidad de las especies bacterianas. La presencia de secuencias altamente conservadas hace posible el diseño de *primers* o cebadores que permitan la amplificación mediante PCR del total de la población bacteriana de la muestra. Son las regiones variables (polimórficas) del gen que codifica el 16S ARNr las que se aprovechan para la diferenciación.

En el T-RFLP, estas diferencias entre especies o géneros bacterianos se ponen de manifiesto tras la digestión con endonucleasas de restricción del producto de PCR marcado. Únicamente el fragmento del extremo terminal será visible por electroforesis capilar gracias al marcaje fluorescente de uno de los cebadores. El perfil que se genera (electroferograma) nos permite obtener información del número de fragmentos (riqueza), de su tamaño en pares de bases (bp) (para una posible inferencia de la especie bacteriana presente) y de su altura (lo que puede orientar sobre la importancia de un determinado grupo bacteriano dentro de una muestra), siempre sin olvidar las desviaciones inherentes propias de la PCR. Es posible también calcular la frecuencia de detección de un determinado pico (especie) respecto al total de muestras así como construir con ayuda de programas informáticos matrices de similitud o dendogramas.

Empleando herramientas disponibles en la red como: TAP-tRFLP del software Ribosomal Database Project II o ISPaR del software MiCA (Microbial Community Analysis) es posible hacer una asignación teórica de la especie o género bacteriano a cada uno de los picos en base a las secuencias depositadas por otros autores. Sin embargo un mismo pico puede tener su origen en distintas especies. Disponer alternativamente de secuencias propias obtenidas tras la clonación del 16S ARN de muestras de nuestros animales nos permite hacer una asignación teórica más firme, considerando únicamente aquellas especies mayoritarias encontradas.

### MATERIAL Y MÉTODOS

El ADN se extrajo a partir de muestras de contenido cecal congeladas a -80°C (250 mg), o de muestras de contenido digestivo (400 mg) conservadas en etanol 98% (1:3 p:v), empleando el kit comercial QiaAMP DNA Stool Mini Kit (Qiagen). Para aumentar la eficacia de la extracción se introdujo en el procedimiento una ruptura celular enzimática con lisozima (10 mg/ml, 37°C 30 min). Se amplificó un fragmento de 1497 bp del gen que codifica para el 16S ARNr, empleando los siguientes cebadores<sup>5</sup>: S-D-Bact-0008-a-S-20 marcado con fluoresceína (5'-6-FAM-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y el PH1552 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') empleando el siguiente programa en el termociclador: (95°C x 1 min) + (95°C x 30 s + 55°C x 1 min + 72°C x 1 min)\*30 + (72°C x 10 min). Tras comprobación de la amplificación en agarosa al 1%, el producto de PCR se purificó con el QIAquick PCR purification kit. El producto de PCR purificado fue cortado con la enzima de restricción *Hha* I (20 U) o *Rsa* I (10 U), en un volumen final de reacción de 20 µl. El producto de la restricción se purificó empleando el kit comercial QIAquick Nucleotide purification kit. Los fragmentos se visualizan tras electroforesis capilar en un secuenciador de DNA en modo Gene Scan, empleando como patrón del tamaño de los

fragmentos el GS-1000-ROX. Tras estandarizar el ADN cargado en el capilar<sup>6</sup> se procedió a la construcción de dendogramas con el programa Fingerprinting II (Informatix, Bio-Rad).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

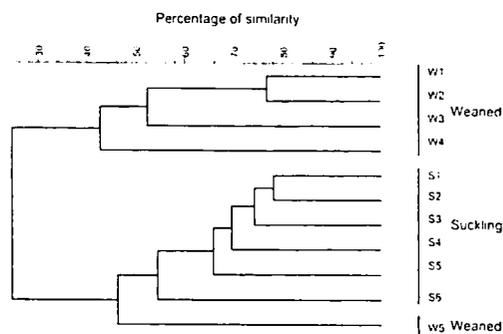
Mediante la metodología T-RFLP hemos podido evaluar la adaptación de la microflora de cerdos en crecimiento a dietas que presentaban diferentes niveles de almidón resistente. Las dietas produjeron cambios en los perfiles microbianos de los animales observándose una agrupación de los mismos según el tratamiento recibido en la representación con dendogramas<sup>7</sup>. La riqueza de picos en las dietas con un mayor nivel de almidón resistente aumentó en comparación con las muestras de almidón de maíz. Esta mayor riqueza de picos es asociada por algunos autores a una mayor resistencia del ecosistema a la colonización por patógenos oportunistas.

En otro estudio de nuestro grupo, evaluamos el efecto del destete en la flora microbiana de los lechones. Se pudo comprobar cómo el destete dominó sobre otros factores como la camada o el efecto del individuo ya que los dendogramas permitieron una clara separación de los animales por grupos experimentales (ver Fig.)<sup>8</sup>. Además se pudo observar, cómo los animales lactantes presentaron mayores similitudes entre ellos (54-78%).

Los animales destetados mostraron una flora más heterogénea, probablemente debida al estrés individual y la falta del efecto materno. La riqueza de picos en este caso fue similar entre ambos grupos estudiados. Mediante la herramienta TAP-tRFLP, y analizando la microflora que se considera habitual en el lechón, se pudieron inferir algunas de las especies bacterianas. La diversidad de especies del lactobacillus fue mayor para los animales lactantes.

Recientemente hemos comenzado a analizar los perfiles de la microbiota cecal de pollos a distintas edades, recibiendo dietas con diferentes niveles de grasas *trans*. Se pudieron observar que las mayores diferencias eran consecuencia de la edad de los animales, más que de los tratamientos recibidos. En este estudio se emplearon dos enzimas de restricción (*Hha* I y *Rsa* I), analizando los diferentes perfiles que se obtienen en cada caso.

En resumen, la utilización del T-RFLP permite evidenciar cambios en el ecosistema microbiano ligados al crecimiento de los animales y a diferentes tratamientos dietéticos. La técnica permite una inferencia teórica de bacterias en base a los resultados de digestión *in silico* con datos publicados en las bases de datos aunque esta aproximación debe ser considerada con precaución debido al carácter no concluyente de estas asignaciones.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Konstantinov, S. R. *et al.* *Animal Research* **53**, 317-324 (2004).
2. Ohashi, Y., Tokunaga, M. & Ushida, K. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **50**, 399-403 (2004).
3. Peu, P. *et al.* *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3578-3585 (2006).
4. Leser, T. D., Lindecrone, R. H., Jensen, T. K., Jensen, B. B. & Moller, K. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3290-3296 (2000).
5. Hojberg, O., Canibe, N., Poulsen, H. D., Hedemann, M. S. & Jensen, B. B. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 2267-2277 (2005).
6. Kitts, C. L. *Current issues intestinal microbiology* **2**, 17-25 (2001).
7. Martinez-Puig, D., Castillo, M., Nofrarias, M., Creus, E. & Pérez, J. F. *Journal of the science of food and agriculture*, in press (2006).
8. Castillo, M., Martín-Orúe, S. M., Manzanilla, E. G., Roca, M. & Gasa, J. *Joint Meeting of the ADSA, ASAS y PSA. Journal of Animal Science* **83** (supplement 1), 292 (2005).