



Fotos: Irvin Rodríguez y Pablo Peraza

METAGENÓMICA: herramienta de investigación en la microbiota ruminal

Lic. Bioq. MSc Pablo Peraza
Lic. Biol. MSc. Beatriz Carracelas
Ing. Agr. PhD Gabriel Ciappesoni
Ing. Agr. PhD Elly Navajas

Sistema Ganadero Extensivo

En estos últimos años INIA inició la colecta de muestras de líquido ruminal y la generación de información en metagenómica ruminal en ovinos y bovinos. Este artículo presenta conceptos centrales de esta área de conocimiento y de las herramientas para estudiar microorganismos que habitan en el rumen y sus aplicaciones.

¿POR QUÉ EL RUMEN?

Los rumiantes tienen la capacidad de degradar y obtener nutrientes a partir de fibra vegetal, no utilizable por otros mamíferos, y transformarlo en carne, lana y leche. Esto es posible por la fermentación y degradación que realizan los microorganismos del rumen por intermedio de diferentes enzimas. El aprovechamiento del alimento consumido por bovinos y ovinos, que define la eficiencia de conversión, depende de los microorganismos presentes en el rumen y de sus funciones, así como la producción de metano entérico (ME), subproducto

de la fermentación ruminal. Estos microorganismos que habitan en el rumen son la microbiota ruminal.

¿CÓMO ESTÁ COMPUESTA LA MICROBIOTA RUMINAL?

Bacterias, protozoarios, hongos, levaduras y arqueas constituyen una comunidad o ecosistema en equilibrio dentro del rumen. Los microorganismos (microbiota), así como todo su entorno que incluye las proteínas, lípidos, metabolitos microbianos y el ambiente en el que se desarrollan constituyen el microbioma ruminal.

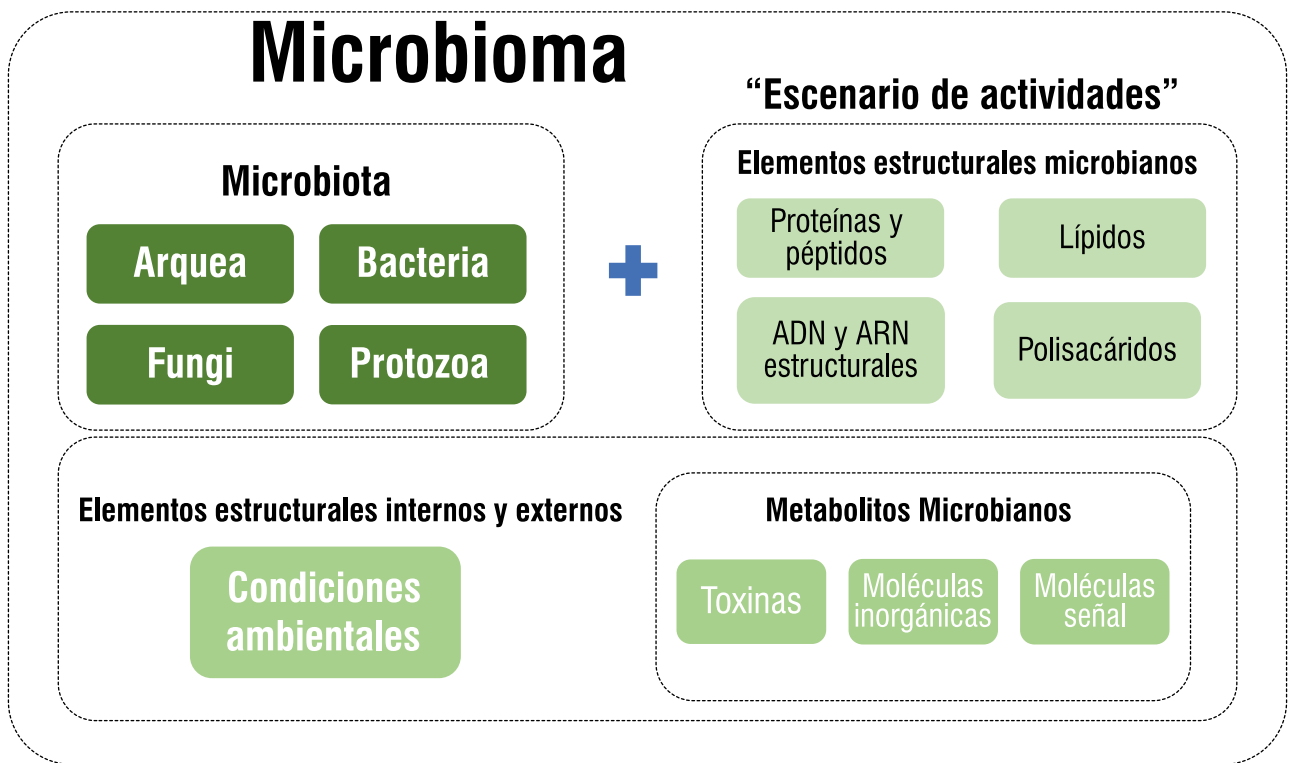


Figura 1 - Relación entre la microbiota, el microbioma y sus elementos asociados. Adaptación de Berg., 2020.

Los microorganismos predominantes en el rumen son las bacterias, que cumplen múltiples funciones. Las especies más relevantes y los productos finales obtenidos, de acuerdo con sus funciones principales, se presentan en el Cuadro 1.

Otros microorganismos importantes que componen la microbiota ruminal, como Protozoa, Fungi y Arqueas, se describen brevemente en el Cuadro 2. Estas últimas son las responsables de la producción de metano entérico (CH₄), uno de los gases de efecto

Cuadro 1 - Bacterias más relevantes en la microbiota ruminal. Adaptación de Xu *et al.*, 2021.

Tipo de bacterias según su función	Especie	Productos finales
Celulolíticas	<i>Fibrobacter succinogens</i> <i>Ruminococcus flavefaciens</i> <i>Clostridium longisporum</i> <i>Eubacterium cellulosolvens</i>	Acetato, formiato, etanol y propionato
Hemi celulolítica	<i>Eubacterium uniformis</i> <i>Prevotella ruminicola</i>	
Lipolítica	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	Acetato y propionato
Pectinolítica	<i>Treponema saccharophilum</i> <i>Lachnospira multiparus</i>	Acetato y formiato
Proteolítica	<i>Prevotella sp.</i> <i>Ruminobacter amylophilus</i>	Aminoácidos y Nitrógeno
Amilolítica	<i>Prevotella ruminicola</i> <i>Streptococcus Bovis</i> <i>Ruminobacter amylophilus</i>	Formiato, propionato y acetato
Sacarolítica	<i>Succinivibrio sp.</i> <i>Lactobacillus sp.</i> <i>Bifidobacterium ruminantium</i>	Lactato, acetato, fumarato y succinato
Taninolítica	<i>Streptococcus Caprinus</i> <i>Eubacterium oxidoreducens</i>	

Cuadro 2 - Otros microorganismos relevantes en la microbiota ruminal.

Dominio/Reino	Especie	Productos finales
Arquea	<i>Methanobacterium sp.</i> <i>Methanobrevibacter sp.</i>	Estrictamente anaeróbicos y productores de metano a partir de CO ₂ y H ₂
Protozoa	<i>Entodinium sp.</i> <i>Isotricha sp.</i> <i>Epidinium sp.</i>	Digestión lignocelulósica y degradación de compuestos complejos a azúcares reductores
Fungi	<i>Piromyces sp.</i> <i>Caecomyces sp.</i> <i>Anaeromyces sp.</i>	Actúan sobre las fibras de lignina y celulosa formando formiato, succinato, hidrógeno, acetato y lactato

invernadero responsable en los efectos del cambio climático. Las Arqueas utilizan la acumulación del CO₂ y H₂ provenientes de la fermentación ruminal, para la generación de CH₄, liberado por los rumiantes principalmente por exhalaciones (eructos).

TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN DEL MICROBIOMA RUMINAL

Las primeras técnicas para el estudio de la microbiota se basaban en el cultivo de microorganismos, lo que restringió la investigación a aquellos que efectivamente eran cultivables fuera de su ambiente natural. Estas técnicas generaron información valiosa sobre el genoma completo de varios microorganismos, pero actualmente se sabe que alrededor del 90 % de los microorganismos del rumen no son cultivables.

Gracias al avance de las técnicas de biología molecular, y en particular a la secuenciación del material genético, es posible analizar una muestra que incluya los genomas de varios microorganismos, lo que se denomina: metagenoma. El estudio del metagenoma mediante su secuenciación se denomina Metagenómica, permitiendo el estudio de todo el ecosistema ruminal a la vez.

Existen diferentes técnicas utilizadas en estudios metagenómicos, pero todas tienen en común los siguientes dos aspectos:

- 1) el punto de partida es la obtención del material genético contenido en una muestra biológica en forma de ADN;
- 2) la idea central es que cada muestra sea secuenciada, y cada secuencia de la muestra sea identificada utilizando bases de datos de genomas (totales o parciales) de microorganismos conocidos. De esta manera es posible determinar las especies presentes dentro de una muestra, y analizar diferencias y similitudes entre muestras de distintos animales, tipo de alimentación, etc., según el objetivo de cada investigación.

Distintas aproximaciones para la identificación del metagenoma del rumen son realizadas mediante secuenciación. Una de las técnicas más utilizadas es el *metabarcoding*, o la amplificación y secuenciación de una región del gen ribosomal 16S (16S rRNA). Este gen es muy conservado, aunque posee regiones que son muy variables que permiten identificar taxonómicamente distintos microorganismos.



Foto: Irvin Rodríguez

Figura 2 - Núcleos informativos de INIA Las Brujas.

Gracias al avance en la secuenciación del material genético, es posible analizar una muestra que incluya los genomas de varios microorganismos, lo que se denomina "metagenoma".



Figura 3 - Proceso desde que se obtiene el material ruminal hasta su análisis bioinformático.

Para la identificación de hongos, generalmente se utiliza la amplificación y secuenciación de otra región llamada ITS (*Internal Transcribed Spacer*, por sus siglas en inglés). Esta región, también en un gen ribosomal, posee una alta variabilidad en su secuencia logrando una gran capacidad de diferenciación entre especies de hongos altamente relacionadas. Con estos métodos, en realidad, solo tenemos una visión parcial de la microbiota, dado que no todos los microorganismos pueden ser secuenciados mediante solo uno de estos métodos. Otra técnica recientemente utilizada en metagenómica ruminal es la secuenciación mediante el uso de enzimas de restricción (RE-RRS, *restriction enzymes reduced representation sequencing*). Esta técnica permite fragmentar todo el metagenoma mediante enzimas en fragmentos más pequeños para que puedan

ser leídos, permitiendo de esta manera obtener un conjunto de secuencias de toda la comunidad de microorganismos.

Otra técnica, y de las más utilizadas con el fin de lograr identificar a todos los microorganismos que se encuentran en el metagenoma, es llamada secuenciación de genoma completo o *shotgun*. Esta técnica secuencia la totalidad del material genético de una muestra, obteniendo un gran volumen de información sobre la diversidad del metagenoma. Debido a esto, es posible incluso ensamblar “armar” genomas de microorganismos enteros, siendo esta técnica de las más costosas y de la que más tiempo de procesamiento de datos necesita. En el Cuadro 3 se resumen estas y otras de las características de cada una de las técnicas.

Cuadro 3 - Características principales de las diferentes aproximaciones al estudio del metagenoma.

Técnica de secuenciación	16S	ITS	RE-RRS	<i>shotgun</i>
Definición	Se amplifican secuencias específicas del DNA		Se amplifican secuencias de toda la microbiota Cualquier tipo de microorganismo de la microbiota	
Objetivo de identificación	Principalmente comunidades de Bacterias/Arqueas	Principalmente para hongos y levaduras		
Objetivo del estudio	Estudio de diversidad microbiana y filogenia	Estudio de diversidad en Hongos	Composición y diversidad de toda la comunidad microbiana	Análisis estructural y funcional de toda la comunidad microbiana
Resolución taxonómica	Genero/Familia	Especie	Especie Subespecie	Especie
Identificación de especies	Limitada	Alta		
Costos por muestra	Moderado			Alto
Tiempos de procesamiento	Bajo			Alto
Complejidad computacional	Bajo		Alto	

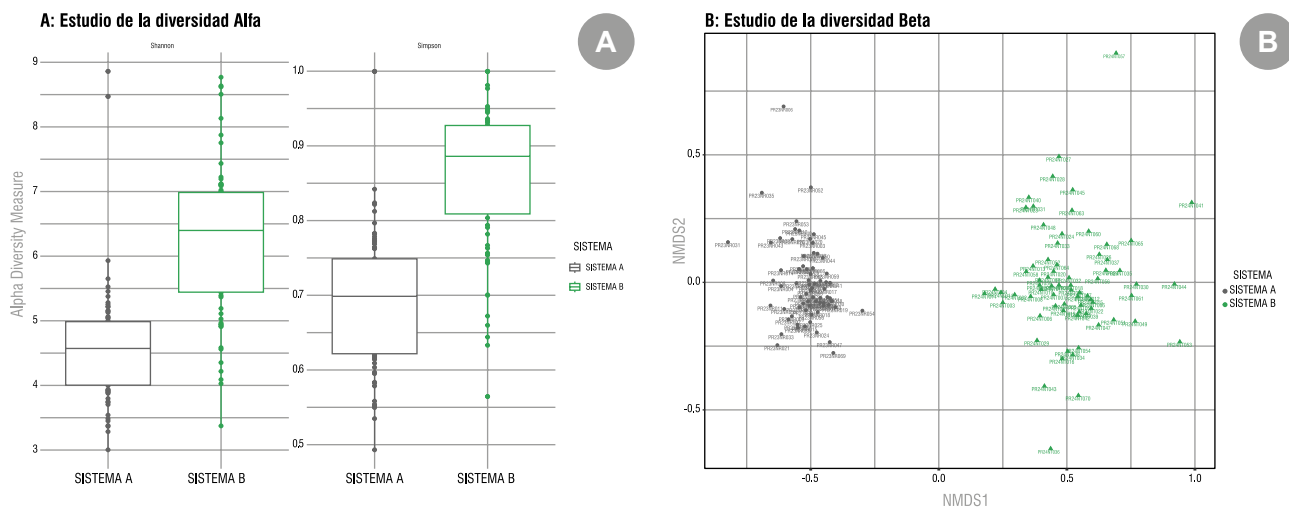


Figura 4 - En A se observa un análisis de diversidad *alfa* utilizando dos índices de riqueza de especies diferente (Shannon y Simpson) y en B se observa el análisis de diversidad *beta* realizado mediante un gráfico de NMDS utilizando distancias de Bray-Curtis.

Una vez obtenidas las secuencias por el método seleccionado, existen distintos análisis para su estudio. En la Figura 4 se muestran dos de los más utilizados que son los análisis de diversidad *alfa* y de la diversidad *beta*. Estos se basan en conocer la riqueza de especies en cada muestra (diversidad *alfa*) o las similitudes de especies entre muestras de distintos ensayos (diversidad *beta*).

FUTUROS APORTES DE LA METAGENÓMICA RUMINAL AL MEJORAMIENTO GENÉTICO

Los estudios metagenómicos del microbioma ruminal contribuyen a un mayor entendimiento de los procesos involucrados en la degradación de la fibra, la producción de metano y la eficiencia de conversión por parte del rumiante, características que además están relacionadas entre sí. Este conocimiento es relevante en la investigación de estrategias tendientes a la reducción de las emisiones de metano, teniendo en cuenta también el rol del microbioma para la producción y la eficiencia de conversión. Esto abarca diferentes alternativas como el impacto de diferentes tipos de alimentación, manipulaciones del microbioma (ej. desarrollo de vacunas), uso de aditivos inhibidores de la formación de metano, y la selección genética.

Este conocimiento es relevante en la investigación de estrategias tendientes a la reducción de las emisiones de metano, teniendo en cuenta también el rol del microbioma para la producción y la eficiencia de conversión.

Existe evidencia de que la microbiota ruminal está asociada con la genética del animal, y que la composición de la microbiota tiene heredabilidad media. Esto implica la posibilidad de seleccionar animales para lograr una microbiota “óptima”, considerando que los datos metagenómicos del rumen son predictores de la genética animal para emisiones de metano o eficiencia de conversión.

Varios proyectos de investigación de INIA se encuentran colectando información del microbioma ruminal en ovinos y bovinos en los cuales se están realizando mediciones de consumo, eficiencia de conversión de alimento y emisiones de metano entérico. Se busca caracterizar la microbiota ruminal asociada con animales eficientes y de baja emisión de metano, y el efecto que tienen dietas diferentes (ej. recría vs engorde). La información recolectada es también base para el estudio de la asociación de la genética del animal y el microbioma del rumen en las características mencionadas.

REFERENCIAS

Abbas, W., Howard, J. T., Paz, H. A., Hales, K. E., Wells, J. E., Kuehn, L. A., ... & Fernando, S. C. (2020). Influence of host genetics in shaping the rumen bacterial community in beef cattle. *Scientific reports*, 10(1), 15101.

Xu, Q., Qiao, Q., Gao, Y., Hou, J., Hu, M., Du, Y., ... & Li, X. (2021). Gut microbiota and their role in health and metabolic disease of dairy cow. *Frontiers in Nutrition*, 8, 701511.

Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & biology*, 5(10), R245-R249.

Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., ... & Schloter, M. (2020). Microbiome definition revisited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 1-22.