

ESTUDIO MEDIANTE PIRO-SECUENCIACIÓN DE LA COMUNIDAD DE ARQUEAS EN EL RUMEN DE CABRAS TRAS LA INTERVENCIÓN CON UN COMPUESTO ANTIMETANOGENICO DURANTE EL PERIODO DE LACTACION

Abecia¹, L., Lewis², K., Martínez¹, G., Martín-García¹, A.I., Newbold², C.J. y Yáñez-Ruiz¹, D. R.

¹Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda, 1. 18008 Granada, España.

²IBERS, Aberystwyth University, Aberystwyth, SY23 3DA, Reino Unido.
leticia.abecia@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

En ruminantes, la producción de metano (CH₄) representa una pérdida de entre el 2 y el 12% de la energía bruta ingerida (Johnson y Johnson, 1995). En particular, en los animales lactantes de alta producción, se estima que la producción de metano constituye una pérdida de alrededor del 6% (Tamminga et al., 2007). Se han utilizado varias estrategias nutritivas para reducir las emisiones de metano en ruminantes, aunque hasta ahora con una aplicación limitada en el sector lechero. Por otro lado, se han testado *in vitro* varios compuestos con el potencial de modificar la fermentación del rumen a través de la manipulación del ecosistema microbiano, pero muy pocos se han utilizado con éxito *in vivo* y casi ninguno en animales en lactación (McAllister y Newbold, 2008). Uno de los mayores problemas del uso de aditivos antimetanogénicos *in vivo* está relacionado con la degradación de los compuestos activos por los microorganismos del rumen o con la adaptación de la microbiota del rumen al tratamiento (Hart et al., 2008). Además, Zhou et al. (2009) sugieren que más que el número, es la composición de especies metanogénicas presentes en el rumen lo que determina la metanogénesis del animal.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la administración de un compuesto, con probada actividad anti-metanogénica (Abecia et al. 2012), en la dieta de cabras lactantes sobre la comunidad de arqueas del rumen mediante piro-secuenciación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 18 cabras de raza murciano-granadina (43±1,7 kg de peso vivo) alojadas en habitáculos individuales en un establo alimentadas con heno de alfalfa y concentrado. Tras el parto se establecieron al azar 2 grupos experimentales de 9 cabras cada uno. Al grupo de cabras positivas (**Pos**) se le suministró durante el período de lactación de las crías (8 semanas) un hidrocarburo alifático halogenado, denominado bromoclorometano (BCM), envuelto en una matriz de α -ciclodextrina (May et al., 1995) en forma de polvo blanco con una riqueza en BCM de 10-12%. El preparado de BCM se administró a una dosis de 0,30 g/100 kg PV dos veces al día. Al grupo de cabras control (**Neg**) no se le suministró ningún aditivo. Se tomaron muestras del contenido ruminal mediante sonda esofágica en la semana 8. Tras la extracción de ADN total (QIAamp DNA Stool Kit), se amplificó la región hipervariable V6 del gen *ARNr 16S* de arqueas (set de primers: 958F and 1048arcR-major, Galand et al., 2009). Los amplicones fueron purificados (AMPure XP Kit) y la librería cuantificada en un BioAnalyser 2000 (Agilent). Las muestras fueron secuenciadas en un equipo Roche 454 FLX Titanium siguiendo el protocolo del fabricante. Los resultados se analizaron con el programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, v1.5.0) (Caporaso et al., 2010) y para corregir los errores de homopolimeros se utilizó el programa Acacia (v1.52) (Bragg et al., 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BCM es uno de los inhibidores de metano más eficientes, reduciendo su producción interfiriendo con la coenzima metil transferasa cobamida-dependiente en la ruta de la metanogénesis (Chalupa et al., 1977). El tratamiento de estos animales con este compuesto resultó en un descenso significativo de la producción de metano de un 30 % (21,6 vs. 14,4 l/kg MS ingerida) tal y como se muestra en Abecia et al. (2012).

El análisis taxonómico de la comunidad de arqueas (Figura 1A) utilizando el clasificador BLAST reveló que la adición de BCM modificó la abundancia relativa de la familia

Methanobacteriaceae. En concreto el género *Methanobrevibacter* incremento de 87 % a 92% al tratar con BCM. Como resultado, el género *Methanosphaera* decreció en proporción tras el tratamiento con BCM (de 11.6 a 7.6 %). Respecto a la familia Methanosarcinaceae, el tratamiento afectó al género *Methanimicrococcus* que desapareció en el rumen de los animales tratados.

El dendrograma de la Figura 1B confirma que la variación en la distribución de los distintos grupos de arqueas hace que las comunidades en las cabras control (Neg) y tratadas (Pos) sea diferente, puesto que están agrupados claramente en dos clados filogenéticamente muy distantes.

Las arqueas metanogénicas son un grupo diverso y complejo que aún es bastante desconocido. El desarrollo reciente de técnicas moleculares ha llevado a la identificación de un rango amplio de especies de la comunidad metanogénica y que en la actualidad no han logrado cultivarse en el laboratorio, como muestra la bibliografía reciente. Kim et al. (2011) describió que *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium* y *Methanosphaera* representaban el 50, 15 y 13 % de las secuencias totales analizadas del rumen mediante colección de clones, respectivamente. Por el contrario, en el estudio posterior de Lee et al. (2012) casi todas las secuencias de arqueas formaron un nuevo linaje filogenético distinto de los conocidos como metanogénicos hasta el momento y por ello casi todas las secuencias de arqueas fueron categorizadas como género sin clasificar. Sin embargo estos resultados difieren con trabajos previos que mostraban que *Methanobrevibacter* sp. o miembros de la familia *Methanobacteriaceae* son los que representan la mayoría de los grupos presentes en el rumen. Esto indica que todavía queda un gran campo por investigar. En cualquier caso, el análisis de las secuencias realizadas en este trabajo muestra un predominio del grupo *Methanobrevibacter*.

Mitsumori et al. (2012) concluyeron que la metanogénesis en cabras tratadas con BCM se inhibió en un 80%, incrementando la concentración ruminal de H₂ sin afectar la ingestión de materia seca ni la digestibilidad del alimento. La respuesta al BCM de las distintas especies de arqueas parece estar determinada por la presión parcial de H₂ en el ambiente ruminal como resultado de la inhibición de la metanogénesis. Aunque a nivel de estructura se observa una clara diferencia en la distribución de especies presentes en cada ambiente ruminal, el tamaño de amplicon utilizado en este trabajo no nos permite llegar a nivel de especie, lo que limita las conclusiones de este trabajo.

Los resultados de este trabajo (en conjunción con lo publicado en Abecia et al. 2012), muestran que la inhibición selectiva de algunos grupos de arqueas está detrás de la reducción de la producción de metano en el rumen y que en condiciones en que la presión parcial de H₂ se incrementa, otros grupos ocupan ese nicho sin afectar a la funcionalidad del rumen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia, L., Toral, P., Martín-García, A., Martínez, G., Tomkins, N., Molina-Alcaide, E., Newbold, C. & Yáñez-Ruiz, D. R. 2012. J. Dairy Sci. 95: 2027-2036.
- Bragg, L., Stone, G., Imelfort, M., Hugenholtz, P., Tyson, G.W. 2012. Nat Methods 9:425-426.
- Caporaso, J. G., et al. 2010, Nat Methods 7: 335-336.
- Chalupa, W. 1977. J. Anim. Sci. 46: 585-599.
- Galand P. E., Casamayor E. O., Kirchman D. L., Potvin M. & Lovejoy C. 2009. ISMEJ 3: 860-869
- Hart, K.J., Yáñez-Ruiz, D. R., Duval, S. M., McEwan, N. R., Newbold, C.J. 2008. Anim. Feed Sci. Technol. 147: 8-35.
- Johnson, K.A. & Johnson, D. E. 1995. J. Anim. Sci. 73: 2483-2492.
- Kim, M., Morrison, Yu. Z. 2011. FEMS Microb Ecol, 76: 49-63.
- Lee, H. J., Jung, J. Y., Oh, Y. K., Lee, S. S., Madsen, E.L., Jeon, C.O. 2012. Appl. Environ. Microbiol. 78: 5983-5993.
- May, C., Payne, A., Stewart, P. & Edgar J. 1995. International patent application no. PCT/AU95/00733.
- McAllister, T. A., Newbold, C. J. 2008. Aust. J. Exp. Agric. 48: 7-13.
- Mitsumori, M., Shinkai, T., Takenaka, A., Enishi, O., Higuchi, K., Kobayashi, Y., Nonaka, I., Asanuma, N., Denman, S. E., McSweeney, C. S. 2012. Br. J. Nutr. 108: 482-491.
- Tamminga, S., Bannink, A., Dijkstra, J., Zom, R. 2007. Feeding strategies to reduce methane loss in cattle. Report 34. Animal Sciences Group, Wageningen UR, Lelystad, the Netherland.
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E., Guan, L. L. 2010. Appl. Environ. Microbiol. 76: 3776-3786.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Europea (Marie Curie Reintegration Grant 224816–METANORUMEN). L. Abecia agradece la concesión de un contrato postdoctoral del programa JaeDoc del CSIC y a E. Jimenez y S.E. Girdwood la asistencia técnica.

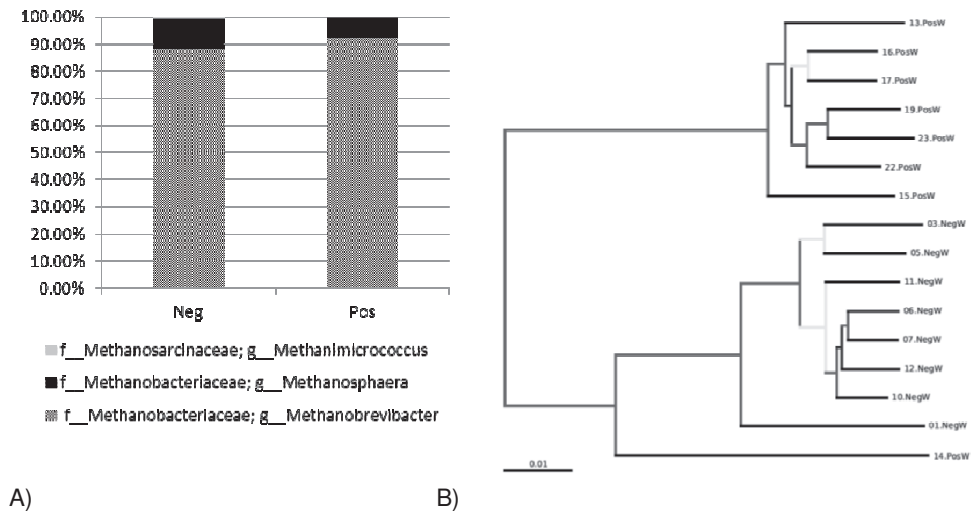


Figura 1. A) Abundancia relativa (% de secuencias) en el contenido ruminal de las hembras tratadas (Pos) o no (Neg) con bromoclorometano durante el periodo de lactación al destete B) Dendrograma representando la similitud de la comunidad metanogenica de arqueas en el rumen de las hembras al destete.

STUDY OF THE ARCHAEL COMMUNITY IN THE RUMEN OF GOATS AFTER NUTRITIONAL INTERVENTION WITH ANTI-METHANOGEN COMPOUND DURING LACTATION PERIOD BY PYRO-SEQUENCING

ABSTRACT: Several technologies have been tested to reduce enteric methanogenesis, but very few have been successfully used in practical conditions for livestock. Furthermore, the consequences of reducing rumen methane production on animal performance and milk quality are poorly understood. The aim of this work was to investigate the effect of feeding bromochloromethane (BCM), a halogenated aliphatic hydrocarbon with potential antimethanogenic activity, to dairy goats on rumen archaea community by pyrosequencing. Sixteen goats giving birth two kids were used. Eight goats were treated (Pos) with bromochloromethane after giving birth over the lactation period. The other 8 goats were not treated (Neg). Rumen samples from goats were collected from both experimental groups at weaning (8 weeks). Nutritional intervention with BCM affected the structure of methanogenic archaea species. Relative abundance of the family *Methanobacteriaceae* was modified with BCM. The genus *Methanobrevibacter* slightly increased and *Methanosphaera* decreased in Pos compared to Neg. Further research is needed in this field.

Keywords: bromochloromethane, ruminal colonization, goat, methanogens.