

Identificación preliminar de microflora bacteriana en el ciego del cuy (*Cavia porcellus*)

Fernando Carcelen¹, Arnaldo Alvarado¹, Roxana Mires¹, Katerine Porturas¹, Jorge Rodríguez^{1,2,*}, Juan Agapito³, Rosa Gonzáles⁴, Felipe San Martín¹

¹ Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Circunvalación cda 29 S/N, Lima 41, Perú

² Unidad de Biotecnología Molecular. Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú

³ Laboratorio de Genómica, Instituto Peruano de Energía Nuclear. Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

⁴ Laboratorio de Patología Aviar, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Circunvalación cda 29 S/N, Lima 41, Perú

Resumen

Un análisis preliminar de la microflora bacteriana presente en el ciego de cuy fue realizado. Amplificación de un fragmento del gen ribosomal 16S fue realizado a partir de un pool de ADN genómico bacteriano. Clonamiento al azar de los productos de PCR fue realizado en el vector PGEM-T vector plasmid (Promega) y *Escherichia coli* JM109 y secuenciados en ABI 3130 Genetic Analyzer. El análisis de 16 secuencias únicas del gen 16S rDNA indicaron altos grados de similaridad (> 95%, > e-140) con secuencias de bacterias previamente descritas en bases de datos del GeneBank, Blast server for bacterial identification, Ribosomal database project y BiBi database. Los resultados sugieren la presencia de *Escherichia coli*, *Escherichia albertii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*, *Hafnia alvei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus equorum subsp. Equorum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas hibiscicola*, *Pseudomonas geniculata*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus succini* como parte de la microflora bacteriana del ciego del cuy.

Abstract

A preliminar study of bacterial microflora present in the cecum guinea pig was performed. Fragment amplification of ribosomal gene 16S were performed from bacterial genomic DNA pool. Random cloning of PCR products were performed into PGEM-T vector plasmid (Promega) and *Escherichia coli* JM109 and sequencing in ABI 3130 Genetic Analyzer. Analysis of 16 unique 16S rDNA sequences showed high similarity (> 95%, > e-140) with bacterial DNA previously described in Genebank database, Blast server for bacterial identification, Ribosomal database project and BiBi database. The results suggest the presence of *Escherichia coli*, *Escherichia albertii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*, *Hafnia alvei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus equorum subsp. Equorum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas hibiscicola*, *Pseudomonas geniculata*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus succinis* in the bacterial microflora from guinea pig cecum.

1. Introducción

La caracterización de la microbiota gastrointestinal en animales domésticos es la primera etapa en el desarrollo de biotecnologías aplicadas a la nutrición animal. Tradicionalmente, la microbiota bacteriana ha sido estudiada mediante cultivo, lo cual requería una intensa labor e información sobre requerimientos nutricionales y de crecimiento bacterianos. Estos métodos han sido sustituidos por técnicas moleculares, basadas en la amplificación y

secuenciamiento de regiones conservadas del gen ribosomal 16S [1,2].

La caracterización molecular de la microflora bacteriana se ha realizado con éxito en diferentes especies domesticas, como perros [3] conejos [4], ganado bovino [5]; sin embargo, se carece de reportes sobre especies bacterianas presentes en el ciego del cuy (*Cavia porcellus*).

* Correspondencia autor: fcarcelen@unmsm.edu.pe

El conocimiento de la constitución particular de la microflora bacteriana en el ciego del cuy, constituye el primer paso para el aislamiento de especies bacterianas con potencial aplicación probiótica [4].

2. Materiales y Método

Cien gramos de contenido cecal provenientes de 5 cuyes (*Cavia porcellus*) alimentados con heno de alfalfa fueron tamizados mediante una solución diluyente (NaCl al 0.1% y SDS 0.1%) a razón de 1 parte de contenido cecal y 9 partes de solución diluyente. Bacterias cecales fueron colectadas mediante centrifugación a 5000 g durante 30 minutos. ADN genómico bacteriano fue extraído mediante Qiamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen). La calidad y cantidad del ADN genómico extraído fue determinada por espectrofotometría utilizando un equipo NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific).

Cincuenta nanogramos de ADN genómico bacteriano fue utilizado para amplificar una región altamente conservada de 728 pares de bases del gen 16S rDNA mediante PCR utilizando los cebadores universales descritos para bacterias: 5'- CGC GCC GCA TTA GAT ACC CTG GTA GTC C -3' (*Escherichia coli* posición 787) [6,7] y 5' GCG GCC GCT ACC TTG TTA CGA CTT - 3' (*Escherichia coli* posición 1515) [6,7] y las condiciones descritas por [8]. Los productos de PCR fueron clonados dentro de un plásmido vector PGEM-T vector plasmid (Promega), seguidos de una transformación en células competentes *Escherichia coli* JM109. Un tamizado de las clonas con inserto fue realizado por α - complementación de β -galactosidasa mediante X-Gal e IPTG en medio LB (Luria Broth) con ampicilina.

ADN plasmídico fue extraído de 50 clonas mediante Miniprep Plasmid DNA (Promega) y se amplificaron los fragmentos insertados mediante PCR. Los insertos fueron secuenciados en ambas direcciones (5' - 3' y 3' - 5') usando ABI PRISM Big Dye Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Kit y un secuenciador automático ABI PRISM 3130 Genetic Analyser®. La edición de las secuencias y alineamiento se realizaron mediante Mega v4.0 [9]. Las secuencias de ADN fueron comparadas directamente con las bases de datos del

GeneBank mediante el uso del programa BLASTN (www.ncbi.nlm.nih.gov). Blast server for bacterial identification (<http://bioinfo.unice.fr/blast/>), Ribosomal database project (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp) y BiBi database (<http://umr5558-mq1.univ-lyon1.fr/qm?page=BibiDataBases>) para identificar el género y especie bacterianos en base a la similitud de secuencia (>95%), e-value (e^{-140}) y a su origen filogenético [10].

3. Resultados y Discusión

Un total de 16 secuencias únicas de un fragmento de 728 bp del gen 16S rDNA fueron obtenidas a partir de 50 colonias picadas y secuenciadas. El análisis de las 16 secuencias del gen 16S rDNA permitieron la identificación de bacterias en base a la similitud de secuencias, e-value y a origen filogenético [10]. Se identificaron 15 especies bacterianas previamente descritas en bases de datos del GeneBank, Blast server for bacterial identification, Ribosomal database project y BiBi database: *Escherichia coli* (AJ60511; e=0; 98% similitud), *Escherichia albertii* (AY696669; e=0; 98% similitud), *Shigella flexneri* (X96963; e=0, 98% similitud), *Shigella sonnei* (X96964; e=0; 99% similitud), *Shigella boydii* (X96965; e=0; 99% similitud) y *Hafnia alvei* (Z83203; e=0; 99% similitud), *Enterococcus faecalis* (Y18293, AF023101; e=0; 99% similitud), *Enterococcus hirae* (AB362597; e=0; 99% similitud), *Staphylococcus equorum* (DQ001314; e=0; 99% similitud), *Staphylococcus equorum subsp. Equorum*, (AF473545; e=0; 99% similitud), *Stenotrophomonas maltophilia* (AY785245; AB021405; e=0; 99% similitud), *Pseudomonas hibiscicola* (FJ888386; e=0; 100% similitud), *Pseudomonas geniculata* (EU407232; e=0; 99% similitud), *Staphylococcus xylosus* (GQ222240, AF041357; e=0; 99% similitud), *Staphylococcus succinis* (AF004219; e=0; 99% similitud).

4. Conclusiones

Los resultados preliminares indican la presencia de *Escherichia coli*, *Escherichia albertii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*, *Hafnia alvei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus*

equorum, *Staphylococcus equorum* subsp. *Equorum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas hibiscicola*, *Pseudomonas geniculata*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus succinis* en el ciego del cuy. Se recomienda continuar con el secuenciamiento de más clonas a partir de la biblioteca de genes 16S rDNA elaborada.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a las personas y organizaciones que apoyaron la realización del presente trabajo: Laboratorio de Patología Aviar, Facultad de Medicina Veterinaria – UNMSM, Laboratorio de Bioquímica y Nutrición Animal, Ing. Juan Olazabal y Josmel Pacheco.

Al Laboratorio de Geonómica del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN).

Este trabajo ha sido financiado por el Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

6. Bibliografía

- [1] Zoetendal E, *et al.* Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr.* 2004; 134(2):465-72.
- [2] Makkar H & McSweeney C. *Methods in gut microbiol ecology for ruminants.* New York: Springer; 2005.
- [3] Vanhoutte T, Huys G, De Brandt E, Fahey GC Jr, Swings J. Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. *FEMS Microbiol.* 2005; 249(1):65-71.
- [4] Linaje R, *et al.* Characterization of faecal enterococci from rabbits for the selection of probiotic strains. *J Appl Microbiol.* 2004; 96(4):761-71.
- [5] Tajima K, Aminov R, Nagamine T, Ogata K, Nakamura M, Matsui H, Benno Y. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology.* 1999; 29:159-169.
- [6] Wilson K, Blitchington R. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62:2273-78.
- [7] Pryde S, *et al.* Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen and cecal lumen of a pig. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65:5372-77.
- [8] Abecia L, Fondevila M, Balcells J, Edwards J, Newbold J, McEwan N. Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Letters.* 2005; 244:111-115.
- [9] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 2007; 24: 1596-99.
- [10] Mignard S, Flandrois J. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods.* 2006; 67:574-81.