



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



MASTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA
ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Caracterización del microbioma digestivo de una línea de conejo sometida a dos tratamientos alimentarios diferentes

Tesis de Master

Valencia, Septiembre 2016

María Velasco Galilea

Director:

Juan Pablo Sánchez Serrano

Codirector:

María Mercedes Piles Rovira



AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que, de una forma u otra, me han acompañado en este camino de elaboración de mi tesis de máster:

A mi director Juan Pablo Sánchez, por haberme permitido formar parte del proyecto en el que se encuadra esta tesis incluso antes de que esta comenzara cuando me ofreciste participar en la recogida de muestras del experimento. Gracias por estar siempre dispuesto a enseñarme cosas nuevas y animarme a que aprendiera otras muchas por mí misma. Gracias por tu comprensión, apoyo y paciencia cuando el camino se tornó gris.

A mi codirectora Miriam Piles, por tus comentarios siempre útiles y tus acertadas correcciones de la memoria. Gracias por ayudarme cuando lo he necesitado, por estar siempre dispuesta a enseñarme todo lo que sabes y también gracias por tus ganas de querer aprender siempre cosas nuevas.

A Marc Viñas del programa *Gestión Integral de Residuos Orgánicos*, gracias por haberme ayudado a entender tantos conocimientos de microbiología nuevos para mí y a ampliar o refrescar otros tantos relacionados con la genética molecular. Gracias por tu accesibilidad y tu ayuda en la revisión final de esta memoria.

A Armand Sánchez y Nicolas Boulanger del *Centro de Investigación en Agrigenómica*, por habernos ayudado a poner a punto el protocolo de generación de librerías y de secuenciación masiva.

A todas las personas que forman parte del programa de *Mejora Genética Animal* del IRTA. A Olga González por todas las técnicas que me ha enseñado y sus buenos consejos sobre cómo trabajar de manera correcta en un laboratorio. A Mohamed Ragab, gracias por tu compañía durante toda la tesis y por intentar sacarme una sonrisa todos esos días que tú, siempre tan atento, sabías que se me estaban haciendo cuesta arriba.

A mi hermana Marta, gracias por apoyar mis decisiones y creer siempre en mí. Aunque somos muy diferentes, sé que gran parte de lo que soy es porque tú siempre has sido mi referente; a quien me quería parecer cuando fuera mayor. Y aún lo sigo queriendo; porque recuerda que *hoy es siempre todavía y ahora es el momento de cumplir las promesas que nos hicimos*.

A mis padres Toñi y Luis, gracias porque sin vosotros todo esto hubiese sido imposible. Soy consciente de que quizás os habría gustado que hubiese tomado otro camino pero al final sé que siempre puedo contar con vuestro apoyo. Este año ha sido

muy difícil para nosotros pero luchamos y hemos vencido. Espero haberlos demostrado que, a pesar de la distancia que nos separa, os quiero y para mí sois lo primero.

A Dafne, el miembro más reciente de mi familia, mi *cuquicu* a quien quiero con locura. Tú me haces ser consciente de lo rápido que pasan los años cada vez que te veo...el año que tú naciste yo comenzaba mis estudios en Barcelona y no podría estar a tu lado para verte crecer cómo habría querido. Hoy cumples 5 años, empiezas tu tercer curso en el cole y, aunque ahora no estoy contigo, sabes que estoy orgullosa de ti y siempre tendrás a tu tía para lo que necesites.

A Quique, porque eres parte de mi familia y sé que puedo llamarte y contar contigo siempre que lo necesite. Eres imprescindible porque sé que sin ti los Reyes Magos no se seguirían acordando de mí cada año y las navidades sin cerditos vietnamitas no serían lo mismo. Gracias *zoque*.

A mis amigos de siempre porque cada vez que regreso es como si nunca me hubiese marchado. En especial a ti Isabel, gracias por tu infinito cariño.

A William, quien me ha acompañado de la mano en todo el camino y no me la soltó cuando los baches aparecieron. Tú lo has iluminado en los días oscuros y no has permitido que me rindiese nunca. Gracias por confiar siempre en mí, por tu amor y tu paciencia. Hemos alcanzado juntos esta meta y sé que no será la última.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	X
SUMMARY	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. ¿Cómo se estudia la diversidad microbiana?.....	5
2.1.1. PCR cuantitativa (qPCR)	7
2.1.2. Técnicas de <i>fingerprinting de secuencias diferentes en genes de 16S rRNA</i> ...	8
2.1.3. Hibridación de sondas	8
2.1.4. Secuenciación.....	9
2.2. Diversidad de la microbiota intestinal del conejo	13
2.3. Factores que influyen en la composición de la microbiota intestinal del conejo .	15
2.3.1. Edad	15
2.3.2. Dieta y régimen alimentario	16
2.3.3. Determinismo genético	19
2.4. Influencia de la microbiota gastrointestinal en el hospedador	21
2.4.1. Sistema inmune.....	21
2.4.2. Fisiología y patologías intestinales	22
2.4.3. Caracteres productivos.....	23
3. OBJETIVOS	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1. Animales y diseño experimental	29
4.2. Extracción de DNA microbiano presente en ciego y heces.....	31
4.3. Generación de librerías masivas de gen 16S rRNA de las muestras y secuenciación con la plataforma MiSeq.....	33
4.4. Elección del software para el filtrado y análisis bioinformático de las lecturas obtenidas en el equipo MiSeq.....	35
4.5. Análisis de la diversidad microbiana.....	40
4.6. Análisis de la beta diversidad	42

4.7. Análisis del efecto de la microbiota sobre el crecimiento y el peso al destete	44
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
5.1. Análisis de los resultados de secuenciación	47
5.2. Resultados de los diferentes análisis de diversidad microbiana	52
5.3. Análisis multivariante de la composición	56
5.4. Caracterización taxonómica en función del origen (heces/ciego) de la muestra .	60
5.5. Caracterización taxonómica en función del régimen alimentario	67
5.6. Diferencias en la composición microbiana entre las 4 muestras atípicas y las restantes	73
5.7. Efecto de la composición microbiana sobre el peso al destete y el crecimiento .	77
6. CONCLUSIONES	82
7. REFERENCIAS	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparativa de los tres principales métodos de secuenciación masiva (NGS).	10
Tabla 2. Técnicas empleadas para caracterizar la microbiota gastrointestinal en animales	12
Tabla 3. Tiempo medio de retención de fluidos y partículas de alimento en el tracto gastrointestinal de diferentes animales.	13
Tabla 4. Velocidad de tránsito en conejos de 45 días de edad en función de la cantidad de alimento ingerido.....	17
Tabla 5. Actividad microbiana cecal de conejos de 45 días de edad, 5 horas después de la distribución del alimento, según el nivel de alimento ingerido	18
Tabla 6. Composición del pellet con que se alimentó a los animales del experimento durante el periodo de engorde.	29
Tabla 7. Concentración (ng/uL) y pureza (A260/280) del DNA extraído con el kit ZR Soil.	32
Tabla 8. Promedios, desviaciones típicas, mínimos y máximos de los caracteres peso ajustado a los 31 días (P31) y ganancia media diaria (GMD).....	44
Tabla 9. Datos de las lecturas resultantes del proceso de secuenciación, filtrado y procesado con el software QIIME en muestras de origen cecal.	49
Tabla 10. Datos de las lecturas resultantes del proceso de secuenciación, filtrado y procesado con el software QIIME en muestras de origen fecal.	50
Tabla 11. Comparativa de los resultados de diversos estudios de secuenciación del gen 16S rRNA en diferentes especies y los resultados del presente estudio.	51
Tabla 12. Comparación del índice número de OTUs observados para los cuatro niveles de la combinación origen/régimen alimentario.....	54
Tabla 13. Efectos del origen de la muestra, tratamiento y combinación de ambos sobre la composición, expresada en porcentaje, de los distintos filos.....	63
Tabla 14. Efectos del origen de la muestra, tratamiento y combinación de ambos sobre la composición, expresada en porcentaje, de los distintos filos (excluyendo del análisis las 4 muestras atípicas).....	65
Tabla 15. Efecto del origen de la muestra sobre la composición, expresada en unidades taxonómicas normalizadas, a nivel de OTU (excluyendo del análisis las 4 muestras atípicas)	65

Tabla 16. Efecto del tratamiento alimentario sobre la composición, expresada en unidades taxonómicas normalizadas, a nivel de OTU	68
Tabla 17. Efecto del tratamiento alimentario sobre la composición, expresada en unidades taxonómicas normalizadas, a nivel de OTU (excluyendo del análisis las 4 muestras atípicas).....	70
Tabla 18. Efecto del tipo de muestra (normal/atípica) sobre composición relativa, expresada en porcentaje, a nivel de filo.	74
Tabla 19. Efecto del tipo de muestra (normal/atípica) sobre la composición relativa, expresada en porcentaje, a nivel de familia	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución del estudio de la diversidad microbiana a lo largo del tiempo: desde los primeros estudios de Leeuwenhoek hasta las técnicas NGS más modernas.	5
Figura 2. Estructura de un ribosoma 70S.....	6
Figura 3. Estructura de la molécula 16S rRNA.....	6
Figura 4. Extracción de DNA y amplificación de los genes 16S rRNA	7
Figura 5. Microarray de DNA.....	9
Figura 6. Edad asociada a la variabilidad de la composición de las comunidades bacterianas en el ciego de conejo	16
Figura 7. Separación basada en las secuencias de 16S rRNA de las comunidades microbianas de la línea no seleccionada (G0), la línea seleccionada por ganancia media diaria (ADGRestrict) y la línea seleccionada por consumo de alimento residual (ConsoResidual).....	24
Figura 8. Esquema que describe la preparación de librerías en el contexto del kit de secuenciación en paralelo Nextera® XT	34
Figura 9. Diagrama de flujo de los pasos seguidos para el procesado de secuencias, generación de OTUs y análisis posteriores con QIIME.	39
Figura 10. Registros de peso de los 24 animales del estudio en 6 edades diferentes comprendidas entre el destete y el sacrificio.	44
Figura 11. Curva de rarefacción generada para el índice Chao 1.....	53
Figura 12. Curva de rarefacción generada para el índice PD Whole Tree.	53
Figura 13. Curva de rarefacción generada para el índice número de OTUs observados.	54
Figura 14. Diagrama de caja del número de OTUs observados para los cuatro niveles de la combinación origen/régimen alimentario.	55
Figura 15. PCoA, construido a partir de la matriz de distancias Unifrac, que representa las muestras del estudio con diferentes colores en función de la combinación dieta/origen: Restricción-Ciego (RC), Restricción-Heces (RH), Voluntad-Ciego (VC) o Voluntad-Heces.....	56
Figura 16. a) PCoA que representa las muestras del estudio con diferentes colores en función de la dieta a la que estuvo sometido el animal (restricción o voluntad). b) PCoA que representa las muestras del estudio con diferentes colores en función del origen de la muestra (ciego o heces).	57

Figura 17. PCoA que representa las muestras del estudio, excluyendo las 4 muestras atípicas, con diferentes colores en función del origen de la muestra (ciego o heces).	59
Figura 18. Diversidad taxonómica a nivel de filo en las muestras fecales.	60
Figura 19. Diversidad taxonómica a nivel de filo en las muestras cecales.	60
Figura 20. Diversidad taxonómica a nivel de familia del orden Bacteroidales en muestras de heces y ciego.	61
Figura 21. Diversidad taxonómica a nivel de familia del orden Clostridiales en muestras de heces y ciego.....	62
Figura 22. Diversidad taxonómica a nivel de orden de la clase Mollicutes en muestras de heces y ciego.....	62
Figura 23. Diversidad taxonómica a nivel de filo en las 43 muestras.	73
Figura 24. Diversidad taxonómica a nivel de filo en las 4 muestras atípicas.....	73
Figura 25. Efecto de la composición de las familias a) Desconocida perteneciente al orden <i>YS2</i> , b) <i>Dehalobacteriaceae</i> , c) Desconocida perteneciente al orden <i>Bacteroidales</i> y d) <i>Anaeroplasmataceae</i> sobre la ganancia media diaria	78
Figura 26. Efecto de la composición de a) la familia <i>Mogibacteriaceae</i> en ciego y b) el OTU de familia desconocida perteneciente al orden <i>Clostridiales</i> en heces sobre la ganancia media diaria	79
Figura 27. Asociación entre GMD y el número de OTUs observados en a) heces y b) ciego	80

Resumen

La restricción alimentaria durante el cebo es un método de manejo favorable para la salud del animal pues reduce el riesgo de aparición de problemas digestivos tales como la enteropatía mucoide. Aunque penaliza el crecimiento del animal mejora la eficiencia alimentaria, reduce el impacto medioambiental y disminuye los costes del pienso y del uso de antibióticos. El racionamiento modifica el perfil de fermentación bacteriano gastrointestinal y, por tanto, podría también modificar la composición y actividad microbianas. El objetivo de esta tesis es la caracterización de las comunidades microbianas cecal y fecal de dos grupos de conejos que fueron alimentados con distinto nivel de ingesta durante el periodo de engorde, y estudiar la asociación de estas comunidades con el crecimiento. Para ello se extrajo, con un kit de tipo *bead-beating*, el DNA total del ciego y de las heces de 24 animales de la línea Caldes, 13 alimentados bajo restricción y 11 a voluntad. De las 48 muestras, se amplificó un fragmento de 411 bases del gen 16S rRNA (regiones V4 y V5). Siguiendo el protocolo del kit Nextera® XT se generaron las librerías que fueron secuenciadas en paralelo en un secuenciador Illumina MiSeq. Las lecturas generadas fueron analizadas con el paquete bioinformático QIIME obteniéndose una tabla de abundancias normalizadas de 1.823 OTUs. Se empleó un modelo lineal para estudiar los efectos del régimen alimentario, el origen de la muestra y la interacción de ambos sobre la abundancia relativa a nivel taxonómico de OTU, familia y filo. Se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) de la matriz de distancia filogenética Unifrac ponderada. También se empleó un modelo lineal para estudiar el efecto de la composición microbiana sobre los caracteres ganancia media diaria (GMD) y peso ajustado a 31 días de edad (P31). Finalmente, se estudió el efecto de la diversidad microbiana sobre la GMD con un modelo lineal en el que los factores explicativos fueron el tratamiento alimentario y la regresión sobre el número de OTUs observados. El proceso de secuenciación generó un total de 5.820.828 lecturas con gran variabilidad entre muestras (rango=40.025-240.333) que, tras el filtrado de calidad, fueron agrupadas en 2.195.158 contigs. Las curvas de rarefacción obtenidas para los índices de diversidad no mostraron diferencias entre los niveles de la combinación, régimen alimentario-origen de la muestra. En este análisis se detectaron 4 muestras que se separaban claramente del resto. La caracterización taxonómica de las muestras reveló que los filos predominantes son *Firmicutes* (76,31%), *Bacteroidetes* (7,61%) y *Tenericutes* (7,52%); este último no había sido descrito previamente en la literatura. Se identificó un único género del reino *Archaea* (*Methanobrevibacter*) con una abundancia del 1%. A pesar de que el análisis PCoA no mostró un patrón claro de separación entre las muestras en función de la combinación entre origen y tratamiento, cuando se analizó el efecto del origen de la muestra sobre la composición microbiana se encontraron diferencias significativas para los filos *Cyanobacteria* y *Actinobacteria*; para las familias *Lachnospiraceae*, *Clostridiaceae*, *Coriobacteriaceae*, una familia no clasificable del filo *Proteobacteria* y una familia desconocida del orden YS2 perteneciente al filo *Cyanobacteria*. Cuando se estudió el efecto del régimen alimentario sobre el

microbioma de ciego y heces se encontraron diferencias significativas para los filos *Cyanobacteria* y *Tenericutes*; para una familia desconocida del orden *YS2* y para una familia desconocida del orden *RF39* (filo *Tenericutes*). El PCoA evidenció 4 muestras con una composición microbiana claramente diferentes al resto, estas muestras atípicas mostraron diferencias significativas para 6 filos y 27 familias. Además, 9 OTUs –clasificados dentro de las familias *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae* del filo *Firmicutes*- resultaron exclusivos de ellas. Aunque la composición microbiológica de dichas muestras no es propia de animales enfermos de enteropatía, uno de ellos fue diagnosticado con problemas entéricos durante el engorde. El estudio de asociación entre la composición microbiana y la ganancia media diaria mostró una asociación negativa con el crecimiento para la familia *Mogibacteriaceae* (orden *Clostridiales*) y una asociación positiva para un OTU de familia desconocida del orden *Clostridiales*. El estudio de asociación entre GMD y el número de OTU observados mostró una asociación positiva entre la diversidad y la GMD para el grupo de animales alimentado bajo restricción. Con este estudio, se ha puesto a punto de la tecnología de secuenciación MiSeq de Illumina de contenido cecal y heces de conejo y se ha desarrollado un protocolo de filtrado de calidad y análisis de las muestras con el software QIIME, lo que ha permitido un estudio preliminar del efecto del régimen alimentario y el origen de la muestras sobre la composición microbiana y cómo esta influye sobre el crecimiento.

Summary

Feed restriction during the fattening period is a widespread method of management that is favorable for animal health because it reduces the risk of digestive problems such as mucoid enteropathy. Although feed restriction penalizes animal growth, it improves feed efficiency and reduces environmental impact, feeding costs and the use of antibiotics. Feeding restriction modifies gastrointestinal bacterial fermentation pattern and therefore it could change the microbial composition and activity. The aim of this thesis is the characterization of caecal and faecal microbial communities that belong to two groups of meat rabbits which were fed with different intake levels during the fattening period, as well as to study the existence of possible associations of some microorganisms with growth. Total DNA from caecum and faeces –belonging to 24 Caldes line rabbits; 11 fed *ad libitum* and 13 under restriction- was extracted with a bead-beating kit. A 411 bases fragment corresponding to the hypervariable regions V4 and V5 of the 16S rRNA gene was amplified. Libraries of the 48 samples were generated following manufacturer's instructions of kit Nextera® XT and then sequenced in parallel in a MiSeq Illumina sequencer. Readings generated were analyzed with the bioinformatic package QIIME yielding a table that includes the normalized abundances of 1.823 OTUs. A linear model was implemented to study the effects of feeding treatment, the origin of the sample and the interaction of both on the relative abundance of bacteria at different taxonomic levels: OTU, family and phylum. A principal coordinate analysis (PCoA) was performed from weighted Unifrac phylogenetic distance matrix. A linear model was also used to study the effect of microbial composition on average daily gain (ADG) and weight at 31 days of life (P31). Finally, the effect of microbial diversity on ADG was studied with a linear model in which the explanatory factors were the feeding treatment and the regression on number of observed OTUs. The sequencing process generated 5.820.828 readings with large variability between samples (range=40.025-240.333) which after filtering yielded 2.195.158 contigs. Rarefaction curves obtained for diversity index showed no difference between the levels of the combination feeding treatment-origin of the sample. This analysis detected four samples clearly separated from the rest. The taxonomic characterization of the samples revealed that the dominant phyla were *Firmicutes* (76,31%), *Bacteroidetes* (7,61%) and *Tenericutes* (7,52%); last one hadn't been described in the literature before. A unique genus of the kingdom *Archaea* (*Methanobrevibacter*) was presented (0,65‰). Although the PCoA analysis did not show a clear pattern of separation between samples depending on the combination of feeding treatment-origin; when the effect of the origin of the sample on the microbial composition was analyzed, significant differences were found for phyla *Actinobacteria* and *Cyanobacteria*; for families *Lachnospiraceae*, *Clostridiaceae*, *Coriobacteriaceae*, an unknown family belonging to phylum *Proteobacteria* and an unknown family belonging to order *YS2* (*Cyanobacteria*). When the effect of feeding regimen on the microbial composition was studied, significant differences were found for phyla *Cyanobacteria* and *Tenericutes*; for an unknown family belonging to order *YS2* and for an unknown

family belonging to order *RF39 (Tenericutes)*. PCoA showed that four atypical samples had a microbial composition different from the rest and evidenced significant differences for 6 phyla and 27 families. In addition, 9 OTU -classified within families *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae* from phylum *Firmicutes*- were exclusive of them. Although the microbial composition of these 4 samples is not typical of animals affected by enteropathy, one of them was diagnosed with enteric problems during the fattening period. The association study between microbial composition and average daily gain, showed a negative association for the family *Mogibacteriaceae* (order *Clostridiales*) and a positive association for one OTU of unknown family belonging to the order *Clostridiales*. The study of association between ADG and the number of observed OTUs was only significant for the group of animals fed under restriction showing a positive association between diversity and ADG. This study has tuned up MiSeq sequence technology for the study of microbial composition of caecal and faecal rabbit samples, we have also developed a pipeline based on the software QIIME. These achievements have allowed a preliminary study of the effect of feeding treatment and the origin of the samples on the microbial composition and its influence on growth.

1. Introducción

La microbiota (o microbioma) gastrointestinal es el conjunto de poblaciones microbianas asociados al tracto digestivo de un animal que forman un complejo ecosistema capaz de autorregular su homeostasis a nivel ambiental, inmunitario y nutricional. La microbiota desempeña un papel fundamental en la salud digestiva de los mamíferos contribuyendo a la absorción de nutrientes, la síntesis de vitaminas y la especialización del sistema inmunitario del aparato digestivo del animal. Existe una relación hospedador/microbiota basada en una simbiosis que beneficia a ambas partes: los microorganismos crecen rápidamente gracias a las condiciones favorables del tracto digestivo del hospedador y éste obtiene los productos resultantes de la fermentación microbiana de ciertos materiales que, de otra manera, no sería capaz de digerir. Esta simbiosis entre el animal y su microbioma recibe el nombre de modelo combinado de competición-cooperación (Mackie, 2002). Al conjunto de microorganismos que coexisten en el mismo espacio y tiempo formando una unidad ecológica estrechamente integrada con el hospedador se le denomina comunidad microbiana (Begon y col., 1986). En particular, la comunidad microbiana que compone el tracto gastrointestinal del conejo se caracteriza por una elevada concentración, una amplia diversidad y una gran complejidad de interacciones entre microorganismos que influyen en aspectos inmunológicos, nutricionales y fisiológicos del hospedador (Gaskins, 1997).

Estudios con animales monogástricos gnotobióticos, libres de microorganismos en su tracto gastrointestinal, demuestran que un animal carente de microbiota tiene su tracto menos desarrollado y es menos eficiente a la hora de asimilar nutrientes (Pedroso y Lee, 2013). Podemos afirmar que la microbiota de un organismo ayuda al animal a tener una vida más sana y productiva gracias al control de patógenos y a la aceleración de la digestión; por lo que su estudio es importante para mejorar la productividad y rentabilidad de un animal.

Para estudiar cómo la microbiota de un animal influye en diferentes caracteres productivos (crecimiento, consumo, índice de conversión, etc.) es importante conocer la diversidad microbiana presente en su tracto gastrointestinal y las herramientas que nos hacen posible su caracterización. El estudio de las comunidades microbianas ha cambiado enormemente desde que Leeuwenhoek (recogido en la revisión de Schierbeek, 1959) escribiera sobre sus observaciones de la microbiota oral o Robert Koch consiguiera aislar microorganismos utilizando diferentes medios de cultivo (Koch, 1882). Durante los últimos diez años ha sido factible la inclusión de técnicas metagenómicas a gran escala basadas en el estudio de fragmentos concretos de genomas del conjunto de microorganismos que habitan el tracto gastrointestinal de animales (mediante DGGE, T-RFLP, ARDRA), o el uso de metodologías alternativas emergentes como la secuenciación masiva de librerías masivas del gen 16S rRNA mediante pirosecuenciación 454 o en plataformas MiSeq e Ion Torrent

Es importante tener en cuenta que el microbioma que estudiamos de un compartimento específico del tracto gastrointestinal o de las heces de un animal sólo representa una “instantánea” de su comunidad microbiana en un tiempo determinado que corresponde al momento en el que se extrajo el DNA, pues el microbioma no permanece estable a lo largo del tiempo sino que va experimentando cambios en su composición y actividad metabólica (expresión génica) en cuanto a diversidad (número total de diferentes especies de una comunidad) y abundancia relativa de cada especie (proporción de la abundancia total correspondiente a cada especie).

El control de la composición de la microbiota de un animal puede ser una manera eficaz de mejorar ciertos caracteres relevantes en producción animal; uno de ellos sería la eficiencia alimentaria. Esto se podría conseguir por ejemplo cuando cierta composición del microbioma permita, o esté vinculado, a una mejor digestión de los nutrientes de la dieta, pero también porque el microbioma tiene una influencia muy importante sobre el estado del sistema inmune y en particular sobre la salud digestiva del animal, de manera que un desequilibrio en su composición suele ser causa de importantes trastornos digestivos y enfermedades (Bagoné y col., 2014).

La microbiota está constituida por cientos de especies pero utilizando las técnicas clásicas de microbiología dependientes de cultivo solo es posible la identificación de un 25-40% de la totalidad o incluso menos (Bagoné y col., 2014). La disponibilidad de métodos y técnicas de análisis genómicos permite una completa y detallada descripción de dicho ecosistema con una resolución mejor que la alcanzada con otras técnicas moleculares ya existentes (PCR-DGGE, T-RFLP, FISH). En el siguiente apartado se realiza una revisión bibliográfica en la que se exponen las diferentes metodologías moleculares que pueden ser empleadas para caracterizar la microbiota gastrointestinal de un animal. A continuación, se explica con mayor detalle la microbiota intestinal de un conejo adulto en términos de composición, diversidad y abundancia relativa de las diferentes especies de microorganismos que habitan su tracto gastrointestinal. Seguidamente se tratan los principales factores que pueden provocar variaciones en la composición de la microbiota intestinal del conejo y, finalmente, se comenta la influencia de la microbiota en algunos caracteres productivos.

2. Revisión bibliográfica

2.1. ¿Cómo se estudia la diversidad microbiana?

A continuación se repasa brevemente la evolución que ha tenido el estudio de la variabilidad de métodos de caracterización microbiana desde los métodos clásicos dependientes de cultivo, seguidos del posterior desarrollo de diferentes técnicas moleculares independientes de cultivo hasta el nacimiento de la metagenómica y técnicas de secuenciación masiva también conocidas como NGS (Next Generation Sequencing).

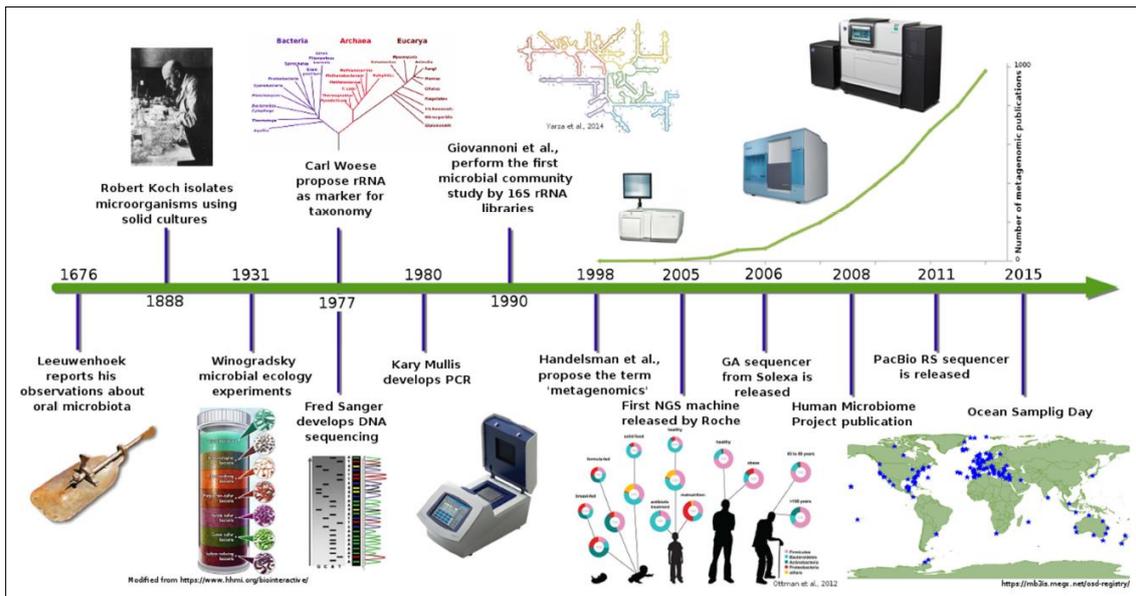


Figura 1. Evolución del estudio de la diversidad microbiana a lo largo del tiempo: desde los primeros estudios de Leeuwenhoek hasta las técnicas NGS más modernas. (Extraído de Escobar-Zepeda y col., 2015)

Durante muchos años, la caracterización de los microorganismos se basaba en el estudio de sus características morfológicas (visibles por microscopía), en su crecimiento en medios de cultivo y en la selección de algunos perfiles bioquímicos (Roszak y col., 1984; Colwell y col., 1996).

El estudio de la microbiota gastrointestinal estaba limitado a técnicas de cultivo hasta que, a finales de los setenta, se planteó el uso de los genes ribosomales (Woese y Fox, 1977), secuenciados por el método automático de Sanger (Sanger y col., 1977), como marcadores moleculares, esto permitió la clasificación de los diferentes microorganismos presentes en una comunidad microbiana, incluso los no cultivables.

Los ribosomas son las estructuras celulares donde tiene lugar la síntesis proteica. Estas estructuras, en las bacterias, se encuentran dispersas en el citoplasma de la célula bacteriana y cuando no están disociadas tienen una velocidad de sedimentación en una ultra-centrífuga de 70S. Los ribosomas pueden disociarse en una subunidad grande (50S) y en una subunidad pequeña (30S). La subunidad 50S está formada por 31 proteínas diferentes y dos moléculas de RNA ribosómico (rRNA 23S y

rRNA 5S); y la subunidad 30S se compone de 21 proteínas diferentes y de una molécula de RNA ribosómico: 16S rRNA (**Figura 2**).

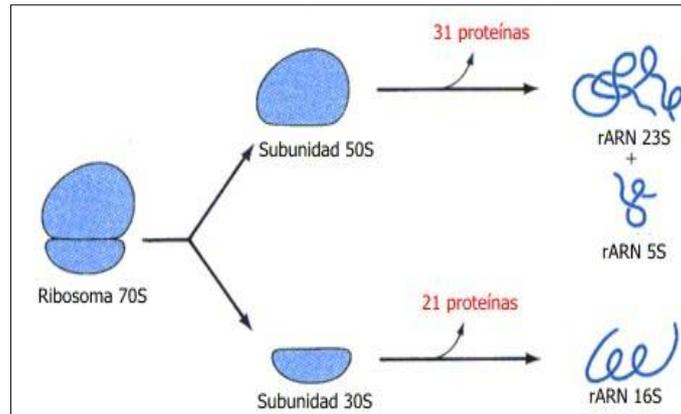


Figura 2. Estructura de un ribosoma 70S. (Extraído de www.guatequimica.com, visitado 08/02/2016).

Estas moléculas de RNA ribosómico son ubicuas y fácilmente detectables gracias a su amplio número de copias y, además de tener regiones muy conservadas en las distintas especies bacterianas, contienen regiones altamente variables que han permitido la distinción filogenética a nivel de familia, género y, aunque más difícilmente, de especie.

De los tres genes ribosómicos bacterianos, el gen 16S rRNA de la subunidad pequeña o 30S (cuya función consiste en iniciar y extender la síntesis de proteínas) presenta una combinación de regiones conservadas y variables, óptima (**Figura 3**) para el diseño de cebadores y por ese motivo su uso en estudios de la microbiota es preferente sobre los genes rRNA 5S y 23S de la subunidad grande 50S (Clarridge, 2004; Rajendhran y Gunasekaran, 2011).

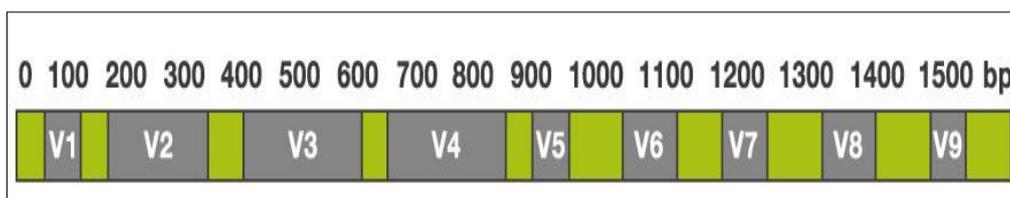


Figura 3. Estructura de la molécula 16S rRNA. Tiene una longitud aproximada de 1.500 pares de bases (pb) y contiene nueve regiones variables (segmentos grises) intercaladas entre diez regiones conservadas (segmentos verdes). (Extraído de www.alimetrics.net/en/index.php/dna-sequence-analysis, visitado 21/01/2016).

A continuación se describirán brevemente algunos métodos moleculares basados en el estudio de la secuencia del gen que codifica para el 16S rRNA aplicado al estudio de comunidades microbianas. La mayoría de ellos parten de la extracción del DNA total de la muestra (tejido + microorganismos asociados) y una amplificación selectiva mediante PCR del gen 16S rRNA (bacteriano). La extracción del DNA total sigue un protocolo de tipo *bead-beating* consiguiendo de este modo la destrucción mecánica de las células y la resuspensión y estabilización de los ácidos nucleicos en un

buffer ya existente. A continuación, se añade un detergente y una proteasa para eliminar los lípidos y las proteínas. Por último se añade alcohol y, mediante centrifugación, se consigue que el DNA se agregue y precipite. Una vez extraído el DNA se procede a amplificar todos los genes 16S rRNA presentes en la muestra mediante PCR utilizando como cebadores (primers) oligonucleótidos diseñados de cadena monocatenaria y complementarios a regiones estables del gen (**Figura 4**). A las moléculas de DNA dúplex resultantes del proceso de amplificación en la región que delimitan los dos cebadores se les denomina amplicones.

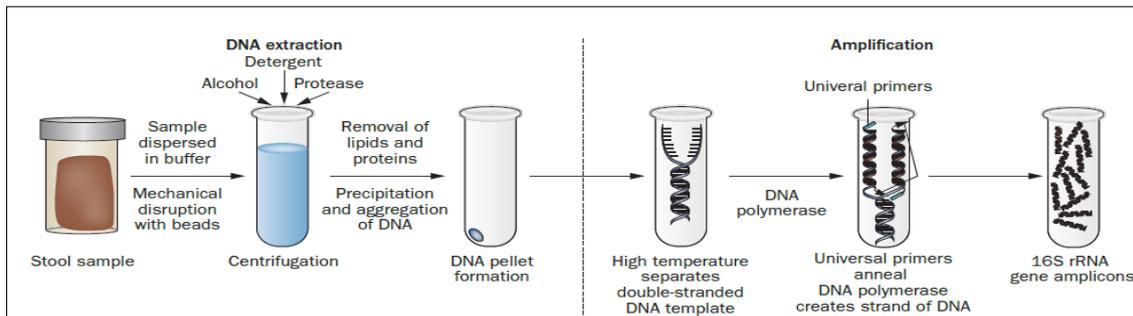


Figura 4. Extracción de DNA y amplificación de los genes 16S rRNA. (Extraído de Fraher y col., 2012)

Las técnicas de análisis basadas en el estudio del gen 16S rRNA que requieren un paso previo de PCR pueden ser sesgadas. Una causa de sesgo podría asociarse al método empleado para la lisis celular, porque ésta fuese más efectiva en unas bacterias que en otras; el diseño de los cebadores podría ser otra causa de sesgo ya que podría influir en el número de filos diferentes que éstos serán capaces de reconocer específicamente.

Los métodos que se describen a continuación se agrupan en PCR cuantitativa (qPCR), *fingerprinting*, hibridación de sondas y secuenciación. Cada uno de estos procedimientos aporta una cantidad de información creciente respecto a la abundancia de bacterias y la composición microbiana de una determinada muestra.

2.1.1. PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa (qPCR), además de amplificar un DNA diana, en una región concreta del DNA, como una PCR convencional, permite la cuantificación de copias existentes de una región concreta de DNA determinado presente en la muestra gracias al calibrado de la emisión de fluorescencia de un fluoróforo cuando se une al DNA dúplex durante la polimerización en el proceso de PCR. La qPCR permite, por tanto, la cuantificación del número total de genes 16S rRNA contenido en una muestra, así como de otros genes de interés. Si además se combina con otras técnicas moleculares -como gel de separación de amplicones 16S rRNA mediante geles desnaturalizantes (DGGE) o microarrays de DNA-puede proporcionar una información más detallada de la diversidad y abundancia de la microbiota presente en una muestra (Zwiehner y col., 2009).

2.1.2. Técnicas de *fingerprinting* de secuencias diferentes en genes de 16S rRNA

Este grupo de técnicas hace posible la comparación de fragmentos de DNA de los mismos tamaños presentes en una muestra. Permiten la separación de varios genes 16S rRNA mezclados ya que, aunque tienen el mismo tamaño, presentan diferencias en sus secuencias de DNA, las cuales dan lugar a distintos pesos moleculares que generarán diferentes patrones de bandas al cargar los fragmentos en un gel y posteriormente someterlo a electroforesis.

Gel de separación de amplicones 16S rRNA mediante desnaturalización (DGGE).

La mezcla de amplicones 16S rRNA se introduce en un gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante (que se consigue con un incremento lineal de la concentración de un agente desnaturalizante como la formamida o la urea capaces de provocar un cambio estructural en el DNA). Cuando se aplica un voltaje al gel, al principio los amplicones van migrando a una determinada velocidad por el gel en función de su peso molecular y, como las secuencias de DNA varían entre amplicones se desnaturalizarán por completo –y en consecuencia dejan de migrar- en momentos diferentes. El resultado es que los amplicones pertenecientes a diferentes especies quedan separados gracias a la variación existente en sus secuencias de DNA. La técnica DGGE es rápida y semicuantitativa pero no resuelve el problema del sesgo asociado a la PCR ni permite una identificación filogenética directa (Muyzer and Smalla 1998) .

Polimorfismos de longitud de fragmentos terminales de restricción (T-RFLP).

Esta técnica consiste en fragmentar mediante el empleo de enzimas de restricción una población de amplicones de genes 16S rRNA, que están marcados en la región terminal mediante un fluoróforo, correspondientes a las diferentes especies de microorganismos que contenía la muestra. El proceso de restricción al tener lugar en diferentes posiciones del gen 16S rRNA según el tipo de secuencia, genera un patrón de fragmentos terminales de restricción de diferentes tamaños que puede ser visualizado en un secuenciador o mediante electroforesis.. El método T-RFLP es útil para medir la diversidad de una comunidad microbiana de manera semicuantitativa, rápida y barata. La desventaja es que no permite llevar a cabo una identificación filogenética de los fragmentos terminales.

2.1.3. Hibridación de sondas

Estos métodos emplean sondas específicas de oligonucleótidos (secuencias monocatenarias cortas, de unos 50 bases, de DNA o RNA) complementarias a determinadas secuencias de DNA microbiano, como pueden ser regiones variables del gen 16S rRNA, permitiendo la identificación filogenética y la cuantificación de especies o poblaciones microbianas concretas presentes en una muestra.

Microscopia FISH (Hibridación fluorescente in situ). Esta técnica emplea sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorescencia y que son complementarias a

determinadas secuencias de genes 16S rRNA pertenecientes a especies que se quieren identificar. La localización de la fluorescencia (positivos para una sonda FISH concreta) puede ser estudiada en un microscopio de fluorescencia. El método FISH puede aplicarse directamente sobre la muestra; evitando así el sesgo asociado a la PCR, pero no permite la identificación de especies microbianas desconocidas, y tampoco tiene mucha resolución para identificar diferentes grupos filogenéticos en una muestra.

Microarrays de DNA. Se utilizan sondas de oligonucleótidos inmovilizadas en un portaobjetos de vidrio. Sobre este “chip” se coloca directamente el DNA extraído el cual se ha marcado con un fluorocromo que produce fluorescencia en caso de que haya complementariedad con la sonda e hibriden produciendo una fluorescencia que es detectada mediante un láser (**Figura 5**). Esta técnica se emplea principalmente en estudios comparativos de la microbiota en diferentes poblaciones. En el mercado hay disponibles varios chips comerciales que han sido desarrollados para caracterizar la microbiota intestinal en humanos (Rajilic-Stojanovic y col. 2009).

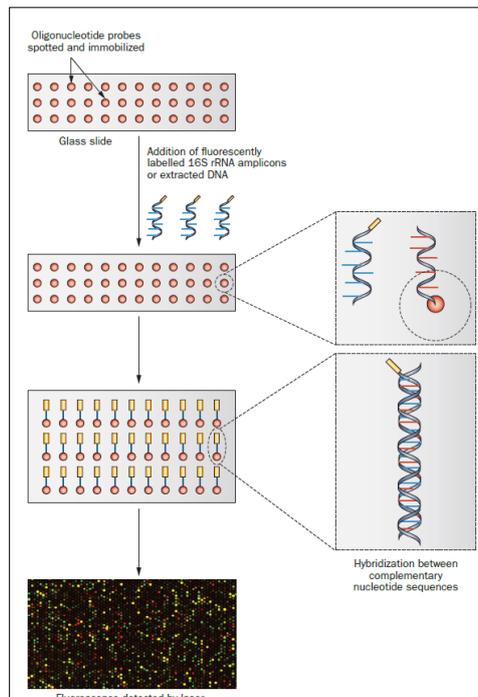


Figura 5. Microarray de DNA. (Extraído de Fraher y col., 2012)

2.1.4. Secuenciación

Las técnicas basadas en la secuenciación han evolucionado mucho y son capaces de aportar información muy detallada de la composición de una comunidad microbiana compleja. El primer procedimiento de secuenciación que tuvo éxito fue el método Sanger, o secuenciación por dideoxinucleótidos, que actúa sobre una cadena del DNA desnaturalizado que se desea secuenciar. Es necesario un cebador con un extremo 3' OH libre sobre el que la polimerasa pueda añadir nucleótidos e iniciar así la secuenciación. Para el proceso son necesarios cuatro tubos que contengan un molde

de DNA de cadena sencilla, la polimerasa, el cebador y los cuatro nucleótidos trifosfato; además cada tubo contiene una pequeña cantidad de un dideoxinucleótido marcado (inicialmente con ^{14}C y actualmente con fluorocromos), que cada vez que se incorpore a la nueva cadena de DNA en crecimiento interrumpirá la elongación al carecer de grupo hidroxilo en el carbono 3'. De este modo, en cada uno de los tubos se generan cadenas de longitudes diferentes que, al ser cargadas en un gel de agarosa y someterse a electroforesis, generan un patrón de bandas ordenadas marcadas en el extremo terminal del cual se deduce la secuencia del DNA de interés en un secuenciador.

Este método de secuenciación fue muy usado hasta la década de los noventa cuando comenzaron a desarrollarse las técnicas de secuenciación masiva conocidas también como *Next Generation Sequencing (NGS)* (Rogers y Wenter, 2005) que suplían las carencias del método Sanger gracias a su capacidad de producir una gran cantidad de secuencias en paralelo –al mismo tiempo y en la misma reacción-, a bajo coste y rápida velocidad. Las principales tecnologías de secuenciación masiva disponibles a nivel comercial son 454-Pyrosequencing® (Roche Diagnostics GMHB Ltd, Mannheim, Germany), Illumina® (Illumina, San Diego, C.A, U.S.A) y SOLiD® (Life Technologies, Carlsbad, C.A, U.S.A). Todas ellas potencialmente permiten la identificación taxonómica, la detección de especies microbianas desconocidas y su cuantificación. Estas compañías comerciales implementan distintos procedimientos químicos para la secuenciación (**Tabla 1**) que, a su vez, son diferentes del método Sanger.

Tabla 1. Comparativa de los tres principales métodos de secuenciación masiva (NGS). (Adaptado de Shendure y Ji, 2008).

	Secuenciación 454	Illumina/Solexa	ABI SOLiD
Química de secuenciación	Pirosecuenciación (emisión de luz durante la secuenciación)	Secuenciación por síntesis basada en la polimerasa y fluoróforos	Secuenciación basada en la ligación
Procedimiento para la amplificación	PCR en emulsión	Amplificación en "puente"	PCR en emulsión
Separación paired end (PED)	3 kb	200-500 pb	3 kb
Mb por run (chip)	100 Mb	1.300 Mb	3.000 Mb
Tiempo por PED run	<0,5 días	4 días	5 días
Tamaño de la lectura	250-400 bases	35, 75 y 100, 250 bases	35 y 50 bases
Coste por run	\$ 8.438 USD	\$ 8.950 USD	\$ 17.447 USD
Coste por Mb	\$ 84,39 USD	\$ 5,97 USD	\$ 5,81 USD

Las secuencias obtenidas con esta aproximación se comparan con una base de datos como *The Ribosomal Database Project (RDP)*, *Silva* o *Greengenes* que contienen secuencias nucleotídicas específicas de genes ribosomales pertenecientes a un número cada vez mayor de microorganismos (Cole y col., 2009; <http://arb-silva.de>;

<http://greengenes.lbl.gov>). La primera base de datos, RDP, es más conservadora que *Silva* o *Greengenes* que emplean sus propias taxonomías desarrolladas por los colaboradores.

La aproximación más avanzada hasta la fecha para la descripción de la variabilidad microbiológica y su potencialidad fisiológica existente en una muestra determinada es la metagenómica. Esta técnica consiste en el estudio de la totalidad de genomas que componen la muestra mediante la estrategia *shotgun* en la que la secuenciación se realiza a partir de pequeños fragmentos de DNA obtenidos al azar con enzimas de restricción para después ensamblar la secuencia completa original. Con las técnicas de metagenómica, una vez hecho el ensamblado contra un mapa de referencia, además de la variabilidad se pueden estudiar distintas funciones fisiológicas potenciales del microbioma, o de actividad midiendo el nivel de expresión de ciertos genes cuya función es conocida, hablando en este caso de metatranscriptómica a partir del estudio de los transcritos (mRNA).

A modo de resumen la **Tabla 2** presenta una lista de todas las técnicas disponibles para la caracterización de la microbiota gastrointestinal en animales. A la hora de diseñar un estudio con este objetivo, los costes y la profundidad de análisis requeridos deben tenerse en cuenta para decidir qué técnica utilizar.

Queda claro en base a la revisión de esta serie de procedimientos que el paso de la microbiología clásica a los estudios metagenómicos más modernos ha hecho necesario el desarrollo de nuevas ramas de conocimiento y métodos computacionales además de la integración de otras disciplinas como la biología molecular, la genética, la bioinformática o la estadística. Todos estos avances son útiles para caracterizar una comunidad microbiana en términos de composición, diversidad y abundancia relativa de las diferentes especies de microorganismos que la conforman.

Tabla 2. Técnicas empleadas para caracterizar la microbiota gastrointestinal en animales. (Modificado de Fraher y col., 2012).

Técnica	Descripción	Ventajas	Desventajas
Cultivo	Aislamiento de bacterias en un medio selectivo.	Barata, semi-cuantitativa.	Mano de obra intensiva, <30% de la microbiota ha podido ser cultivada.
qPCR	Amplificación y cuantificación del 16S rRNA. La mezcla de la reacción contiene un componente que emite luz fluorescente cuando se une a DNA de doble cadena.	Rápida y cuantitativa.	No identificación filogenética, sesgo en la PCR.
DGGE	Gel de separación de amplicones 16S rRNA utilizando desnaturalización.	Rápida, semi-cuantitativa, las bandas pueden ser escindidas para análisis posteriores.	No identificación filogenética, sesgo en la PCR.
T-RFLP	Se utilizan enzimas de restricción para digerir los amplicones 16S rRNA. Los fragmentos digeridos son separados por un gel de electroforesis.	Rápida, semi-cuantitativa, barata.	No identificación filogenética, sesgo en la PCR, baja resolución.
FISH	Sondas de oligonucleótidos marcadas fluorescentemente que hibridan con secuencias diana del 16S rRNA.	Identificación filogenética, semi-cuantitativa, no sesgo en la PCR.	Dependiente de las secuencias de las sondas, incapaz de detectar especies desconocidas.
Microarrays de DNA	Sondas de oligonucleótidos marcadas fluorescentemente que hibridan con secuencias nucleotídicas complementarias. La fluorescencia es detectada con un láser.	Identificación filogenética, semi-cuantitativa, rápida.	Hibridación cruzada, sesgo en la PCR, la detección de especies a bajos niveles puede ser difícil.
Secuenciación de clones del gen 16S rRNA	Clonación de la totalidad del amplicón 16S rRNA, secuenciación Sanger y electroforesis capilar.	Identificación filogenética, cuantitativa.	Sesgo en la PCR y clonación, laboriosa, cara.
Secuenciación directa de amplicones del gen 16S rRNA	Secuenciación paralela masiva parcial del amplicón 16S rRNA.	Identificación filogenética (también de especies desconocidas), cuantitativa, rápida.	Sesgo en la PCR, cara y laboriosa.
Secuenciación "shotgun" del microbioma	Secuenciación paralela masiva de los genomas completos.	Identificación filogenética, cuantitativa.	Cara, el análisis de los datos es muy costoso computacionalmente.

DGGE: Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización; FISH: Hibridación fluorescente *in situ*; qPCR: PCR cuantitativa; TGGE: Electroforesis en gel con gradiente de temperatura; T-RFLP: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

2.2. Diversidad de la microbiota intestinal del conejo

El ciego es el principal órgano fermentador de los conejos aunque en los segmentos proximal (estómago e intestino delgado) y distal (colon) del tracto gastrointestinal también existe población microbiana activa (Gouet y Fonty, 1979).

Es importante mencionar las características del tracto digestivo del conejo que hacen de éste un lugar idóneo para el desarrollo de determinadas especies de microorganismos. El tracto gastrointestinal del conejo presenta un pH casi neutro (6-6,5) asociado a una alta humedad (75-95%) y temperatura estable de 35-40°C. La velocidad de tránsito es bastante lenta en comparación con la de otras especies (Kararli, 1995) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Tiempo medio de retención de fluidos y partículas de alimento en el tracto gastrointestinal de diferentes animales. (Modificado de Stevens y Hume, 1995).

Especie	Peso corporal, kg	Dieta	Tiempo medio de retención, h		
			Fluido	Partículas	Partículas/Fluido
Perdiz	0.46	Comida de aves	9.9	1.9	0.2
Rata	0.2	Pellet	20	22	1.1
Cobaya	0.6	Pellet	13	13	1.0
Cobaya	0.6	Alfalfa	20	21	1.1
Conejo	2.1	Pellet	39	27	0.7
Caballo	210	Heno	20	25	1.3
Cabra	34.1	Pellet	35	39	1.1
Oveja	49.5	Pellet	35	50	1.4

En estas condiciones, la comunidad microbiana intestinal está compuesta por 100-1.000 billones de microorganismos por gramo (Savage, 1987) entre los cuales se encuentran 1.000 especies diferentes de microorganismos (Combes y col., 2011).

De todas las especies diferentes de microorganismos que forman parte de la microbiota cecal del conejo predomina el reino *Bacteria* (10^{10} - 10^{12} copias de moléculas 16S rRNA por gramo de contenido cecal; Gouet y Fonty, 1973), mientras que la población de *Archaea* supone 10^7 copias de 16S rRNA por gramo de contenido cecal (Combes y col., 2011). Los hongos anaeróbicos y levaduras están ausentes en la microbiota cecal del conejo y ésta también carece de protozoos; excepto en animales enfermos de coccidiosis (Bennegadi y col., 2003; Kimsé y col., 2012; Lelkes y Chang, 1987).

Según estudios previos acerca del microbioma del tracto gastrointestinal del conejo, la mayor parte de especies bacterianas presentes corresponden al filo *Firmicutes* (90%) y sólo el 4% de las especies a *Bacteroidetes* seguido de *Actinobacteria*

y *Proteobacteria* (Abecia y col., 2005; Monteils y col., 2008). Dentro del filo *Firmicutes*, predominan las familias *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae* (Massip y col., 2012).

Las archaeas presentes en el ciego son metanogénicas de tipo hidrogenótrofo y anaerobias estrictas. Se encuentran integradas al final de la cadena alimentaria - proceso de transferencia de nutrientes entre las diferentes especies que componen una comunidad biológica- y permiten la eliminación de hidrógeno (H₂) procedente de la fermentación (Jones y col., 1987), pero su población es 3-5 órdenes de magnitud inferior a la encontrada respecto a las poblaciones de eubacterias.

2.3. Factores que influyen en la composición de la microbiota intestinal del conejo

A pesar de que la microbiota digestiva de conejos adultos es muy homogénea entre individuos (Combes y col., 2011), existen factores que pueden perturbar este equilibrio y provocar cambios en la composición de la microbiota en términos de diversidad y/o abundancia relativa. Como se expone a continuación, esto no es así en animales jóvenes en los que existe una variabilidad muy importante entre individuos (Combes y col., 2011).

2.3.1. Edad

Se considera que la colonización microbiana de un animal tiene lugar en el momento del nacimiento cuando se produce el contacto con la madre y el medio ambiente externo inmediato (Berg, 1996). A partir de este momento se produce una colonización organizada por una sucesión de diferentes especies de microorganismos, cada vez más diversa, que parece alcanzar su máximo a los 70 días de vida en el caso del conejo (Combes y col., 2011).

A los 2 días de vida se observa una densidad bacteriana en el ciego del gazapo de 10^9 copias de 16S rRNA/g de contenido cecal. Esta densidad va incrementándose hasta alcanzar su máximo a los 21 días de vida (10^{11} - 10^{12} copias de 16S rRNA/g), momento que coincide con el destete biológico del animal (Combes y col., 2011) y el comienzo de la ingestión de alimento sólido.

En las primeras semanas de vida, la microbiota cecal está compuesta a partes iguales por microorganismos anaerobios estrictos y por anaerobios facultativos. Más adelante, la abundancia de los microorganismos anaerobios facultativos disminuye rápidamente e incluso pueden desaparecer en algunos animales tras el destete (Gouet y Fonty, 1979).

Las archaeas están presentes en el ciego a un nivel de 10^5 copias de 16S rRNA/g a los 7 días de vida. La implantación de las archaeas tiene lugar más tarde que la implantación bacteriana y alcanza su nivel máximo (10^7 copias de 16S rRNA/g) a los 35 días de vida del animal (Combes y col., 2011).

La composición cecal de la microbiota de conejos jóvenes es altamente variable entre individuos hasta la edad de 49 días pero a los 70 días de vida, momento en el que la microbiota del animal alcanza el equilibrio, la composición microbiana es bastante homogénea entre individuos (**Figura 6**). Este hecho permite definir una ventana de acción (0-49 días) en la que sería posible modificar la microbiota; un periodo de permisividad que permitiría la instalación de nuevas especies en el hospedador.

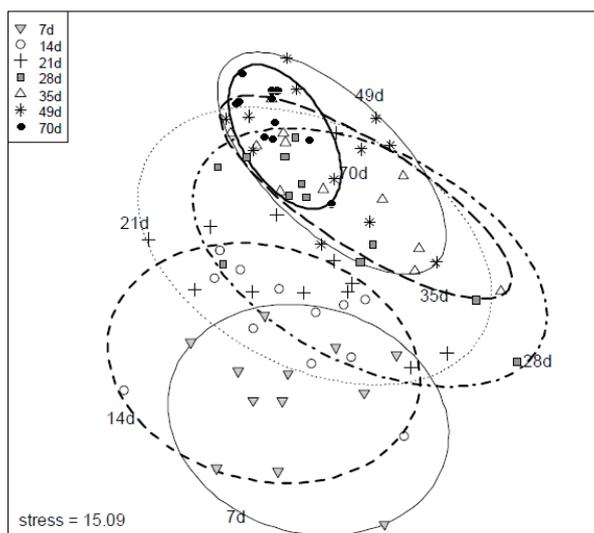


Figura 6. Edad asociada a la variabilidad de la composición de las comunidades bacterianas en el ciego de conejo. Cada punto representa, en un espacio de análisis de componentes principales de comunidades bacterianas, la microbiota de un individuo: cuanto más juntos están los puntos, más similares son las microbiotas. (Extraído de Combes y col., 2011)

2.3.2. Dieta y régimen alimentario

La dieta es un factor clave en el balance de la composición de la microbiota cecal pues condiciona el aporte de nutrientes y energía al ecosistema microbiano (Fonty y Chaucheyras-Durand, 2007).

El destete parece tener un efecto favorable sobre la maduración del ciego y del colon del animal. El destete temprano incrementa el peso de estos órganos sin efecto en la morfología de la mucosa, estimula la actividad fermentativa y acelera la maduración del sistema inmune (Carabaño y col., 2010). Estudios en humanos recién nacidos han demostrado que antes del destete, la diversidad del microbioma gastrointestinal es baja y los filos predominantes son *Actinobacteria* y *Firmicutes* (Turróni y col., 2012). Cuando los bebés son destetados (9-18 meses de edad), la diversidad de la microbiota aumenta y los filos predominantes son *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. A partir del destete, se va estableciendo un equilibrio de la microbiota en el que el ratio específico de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* está fuertemente influenciado por la dieta (De Filippo y col., 2010).

En relación al régimen alimentario, la restricción de la cantidad de pienso suministrado a los animales se practica en muchas granjas de conejos como una medida de manejo para reducir la incidencia de enfermedades digestivas, como es la enteropatía epizoótica que produce una elevada mortalidad (Larour y col., 2002). Diversos estudios han demostrado su eficacia para este fin (Gidenne y col., 2012; Le Floch y col., 2014). Por otra parte, la eficiencia alimentaria de los gazapos es mayor cuando, tras un periodo de racionamiento de unas 3 semanas, los animales son alimentados de nuevo a voluntad incrementando gradualmente la cantidad de pienso

suministrada. En esta etapa, los animales previamente racionados crecen más rápido que los que fueron alimentados a voluntad durante todo el engorde, alcanzando un peso de sacrificio similar. Este mayor crecimiento no se produce a expensas de un sobreconsumo de pienso, lo que conduce a una mejora de la eficiencia alimentaria de los animales previamente restringidos. A pesar de que durante este último periodo los efectos beneficiosos de la restricción sobre la salud de los animales desaparecen, esta práctica comporta mayores beneficios en global que la alimentación a voluntad durante todo el engorde (Maertens y Peeters, 1988; Szendro y col., 1988; Perrier, 1998; Gidenne y Feugier, 2009; Gidenne y col., 2009).

Los mecanismos fisiológicos responsables de estos efectos tanto sobre la mortalidad como sobre la mejora de la eficiencia no se conocen aún claramente. Por una parte se ha estudiado la velocidad de tránsito de los alimentos (**tabla 4**) pensando que podría tener un efecto en la salud digestiva de los gazapos ya que en experimentos con dietas ricas en fibra se había observado una mayor velocidad de tránsito de líquidos y partículas asociado a una menor tasa de mortalidad (Gidenne, 1994; Gidenne, 2003). Sin embargo, no parece ser este el mecanismo responsable ya que el tiempo medio de retención aumenta en los animales alimentados bajo restricción que son los que presentan menor mortalidad.

Tabla 4. Velocidad de tránsito en conejos de 45 días de edad en función de la cantidad de alimento ingerido. (Modificado de Gidenne y Feugier, 2009).

Grupos	AL (n=6)	Grupos con ingesta restringida (% de AL)	
		80 (n=8)	60 (n=7)
Alimento ingerido (gramos/día)	124	93	70
Peso corporal (gramos)*	1529	1362	1214
Tiempo medio de retención de partículas (h)	16,8	24,3	28,1
Tiempo medio de retención de líquidos (h)	43,8	47,1	52,7

AL: *Ad libitum*; n: número de animales; *Peso corporal medio de los animales cuando se tomaron las medidas.

La mayor retención de partículas en el tracto digestivo de los animales racionados sí podría, sin embargo, estar asociada a la mayor digestibilidad de los nutrientes observada durante el periodo de restricción (Ledin, 1984; Xicatto y col., 1992; Tumova y col., 2003, Tumova y col., 2007). Ésta explicaría la mejora en la eficiencia alimentaria que se ha encontrado en algunos experimentos también durante el período de restricción, aunque los resultados son muy variables en función de la dieta empleada (Gidenne y col., 2012).

Dado el importante papel que tiene la microbiota tanto sobre la inmunidad frente a patógenos como sobre la eficacia en la absorción de nutrientes (Mazmanian y col., 2008; Rakoff-Nahoum y col., 2004; Hooper y col., 2001), se ha hipotetizado que estos efectos del racionamiento podrían ser en parte debidos a cambios que pudiera provocar la restricción en la propia microbiota y/o en su actividad fermentativa.

Por un lado, en relación a la tolerancia a enfermedades, se ha comprobado que la restricción alimentaria modifica la pauta de ingestión y fermentación de los alimentos (Gidenne y Feugier, 2009). Esto produce un pico en la pauta de fermentación de los alimentos y un nivel de acidez en el ciego que podría ser desfavorable para los microorganismos patógenos mejorando así la resistencia del hospedador frente a enfermedades digestivas, como se ha visto en el caso de la enteropatía (Boisot y col., 2003). Así, Gidenne y Feugier (2009) observaron que el pH cecal era menor en los conejos alimentados bajo restricción y podría estar relacionado con un aumento en la concentración de ácidos grasos volátiles en estos animales como se observa en la **tabla 5**. La concentración de amoniaco y la actividad fibrolítica bacteriana no parecen variar entre regímenes alimentarios pero la proporción de butirato –ácido graso volátil con efecto bacteriostático- es mayor en animales con dieta restringida (Rolfe, 1984).

Tabla 5. Actividad microbiana cecal de conejos de 45 días de edad, 5 horas después de la distribución del alimento, según el nivel de alimento ingerido. (Modificado de Gidenne y Feugier, 2009).

Grupos	AL (n=10)	Grupos con ingesta restringida (% de AL)		
		80 (n=10)	70 (n=10)	60 (n=10)
Actividad fermentativa				
Concentración VFA (mmol/l)	65.9	79.5	81.6	84.8
Acetato(%)	84.0	81.2	82.3	83.1
Propionato (%)	4.8	4.7	3.8	3.6
Butirato (%)	9.9	13.0	12.7	11.9
Ratio prop.:but.	0.53	0.32	0.33	0.32
Amoniaco (mmol/l)	9.7	13.9	12.3	14.4
Actividad fibrolítica bacteriana (µmol azúcar reducido/ g DM por h)				
Carboximetilcelulasa	5.0	10.6	5.6	9.8
Xilanasa	47.7	79.6	52.6	52.4
Pectinasa	64.8	62.5	45.7	53.8

AL: *Ad libitum*; n: número de animales; VFA: ácidos grasos volátiles; DM: materia seca.

Cuando los animales son alimentados de nuevo a voluntad este pico de actividad fermentativa y de acidez desaparece, siendo la pauta de fermentación más estable, y perdiéndose el efecto protector (Gidenne y col., 2009).

Por otra parte, una modificación en la composición microbiana derivada de la disminución de la cantidad de alimento ingerido por el animal podría explicar la mejora en la eficiencia alimentaria que tiene lugar durante la restricción y tras la misma. Esto es lo que han tratado de demostrar Martignon y col. (2010) utilizando la técnica de *fingerprinting* CE-SSCP de perfiles de fragmentos del gen 16S rRNA. A pesar de que no encuentran asociación entre el nivel de ingestión y el número de copias del gen 16S rRNA por gramo de contenido cecal y la composición bacteriana, estos autores señalan que la utilización de otras técnicas de secuenciación que permitan un análisis más completo de los microorganismos existentes podría conducir a resultados más fiables

que permitan explicar los efectos del racionamiento. Otros cambios en la microbiota intestinal, como una reducción de sus requisitos de mantenimiento (Hespell y Bryant, 1979), podrían ser también los responsables de la mayor eficiencia alimentaria de los animales racionados.

La composición de la dieta sí parece tener un efecto claro sobre la composición de la comunidad microbiana. Así, la alimentación de conejos con dietas deficientes en fibras tiene como consecuencia una elevada frecuencia de enteropatías (Gidenne y col., 2004) debido a alteraciones en los productos derivados de la fermentación, cambios en la actividad enzimática, en la composición y en la abundancia relativa de especies de la comunidad microbiana cecal (Michelland y col., 2011). Ante una carencia de fibras la microbiota cecal del conejo es capaz de modificarse y adaptarse rápidamente en busca de un nuevo equilibrio.

Estudios de perfiles T-RFLP han demostrado que una reducción del contenido proteico en la dieta reduce la mortalidad y modifica la diversidad de la comunidad microbiana gastrointestinal del conejo viéndose reducida la abundancia relativa de algunas de especies bacterianas pertenecientes al género *Clostridium* (Chamorro y col., 2007).

El empleo de dietas suplementadas con antibióticos ha tenido gran controversia debido al riesgo que suponen en cuanto a que podrían promover la selección de bacterias patógenas resistentes en el tracto gastrointestinal del animal que podrían ser transmitidas a otros animales, o incluso a humanos. Por otro lado, se ha visto que el uso de antibióticos antes de las ocho semanas de vida de un conejo podría alterar su microbiota digestiva por lo que su limitación podría ser importante para no alterar el desarrollo normal de la microbiota del animal. El efecto de los antibióticos en la microbiota depende de la molécula empleada. Por ejemplo, el uso de bacitracina reduce la actividad fermentativa de la hembra lactante (Abecia y col., 2007) y la administración de apramicina tras el destete disminuye la mortalidad y reduce la diversidad microbiana (Chamorro y col., 2007).

2.3.3. Determinismo genético

Algunos estudios en conejos muestran que la influencia del genotipo parece jugar un papel no muy relevante en la composición de la microbiota cecal del gazapo, ya que la estructura de la comunidad microbiana intestinal de gazapos adoptados que conviven juntos es más similar entre sí que la de hermanos biológicos que no conviven juntos (Abecia y col., 2007). Sin embargo, el papel de este factor no debe ser descartado ya que en otras especies se ha observado una alta variabilidad en la composición de comunidades bacterianas entre individuos y además se ha observado que las microbiotas de dos individuos humanos que pertenecen a la misma familia presentan más similitudes que las microbiotas de dos individuos no emparentados

(Zoetendal y col., 2002). Por otro lado, las microbiotas de dos gemelos monocigóticos humanos son más parecidas que las microbiotas de dos gemelos dicigóticos (Steward y col., 2005).

En un estudio con pollos de engorde se estudió el papel que ejerce el hospedador en el establecimiento de la microbiota intestinal durante el crecimiento. Para ello se aplicó, en muestras intestinales, la técnica del DGGE de amplicones de 16S rRNA (región V6-V8) donde se concluyó que existen factores desconocidos específicos de cada hospedador que influyen en el desarrollo de la microbiota en cada pollo (Van der Wielen y col., 2002).

En bovino, se ha demostrado que la existencia de diferencias en la ratio de arqueas: bacterias del rumen influye en los niveles de metano emitidos por el animal (Roehe y col., 2016), lo que a su vez tiene un claro determinismo genético. Por lo tanto, sería de esperar que la composición de la microbiota intestinal tuviese un cierto determinismo genético como han demostrado específicamente algunos estudios realizados en gemelos humanos en los que se ha observado una alta heredabilidad de determinadas bacterias como la familia *Christensenellaceae* (*Firmicutes*) y arqueas metanogénicas (Goodrich y col., 2014).

Las evidencias encontradas en otras especies acerca de la influencia del genotipo del animal en la composición de su microbiota gastrointestinal hacen pensar que esto podría ocurrir también en conejos por lo que estudios con técnicas moleculares de secuenciación masiva y un número suficientemente grande de animales son necesarios para aceptar o rechazar esta hipótesis.

2.4. Influencia de la microbiota gastrointestinal en el hospedador

El desarrollo de las nuevas técnicas moleculares ha permitido profundizar en el conocimiento del papel que la microbiota intestinal de un animal desempeña en diversos procesos metabólicos, nutricionales, fisiológicos e inmunológicos.

2.4.1. Sistema inmune

La presencia del género *Bacteroidetes* en el tracto gastrointestinal de mamíferos tiene una función vital en el desarrollo de tolerancia inmunitaria (ausencia de respuesta del sistema inmune ante un antígeno propio o extraño como consecuencia del contacto previo con dicho antígeno) a la microbiota comensal (Mazmanian y col., 2008). Por otro lado, la presencia del género *Bifidobacterium* se ha relacionado con una menor incidencia de alergias infantiles en humanos (Sjogren y col., 2009).

Las interacciones entre la microbiota y el hospedador pueden influir en el estado del sistema inmune del último. Un suplemento con prebióticos –hidratos de carbono, indigeribles por el intestino animal, que estimulan el crecimiento o actividad de determinadas bacterias beneficiosas para la salud digestiva del animal- en terneros recién nacidos aumenta la abundancia de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en su colon; relacionado con un incremento en la concentración total de inmunoglobulina G en el suero sanguíneo (Al-Saiady, 2010). No se observa un efecto tan pronunciado en terneros de 4 semanas de edad (Marquez, 2014) ya que la manipulación del microbioma es más sencilla durante el periodo inicial de colonización y, por tanto, un suplemento con prebióticos tendrá un efecto mayor si es administrado a edades más tempranas cuando la variación, en términos de composición microbiana, es mayor entre individuos.

La microbiota intestinal es fundamental para el desarrollo de la mucosa epitelial del intestino y el sistema inmune de la mucosa como se demuestra en un estudio comparativo en el que se observó que los ratones gnotobióticos tienen menos desarrollados el epitelio intestinal y el sistema inmune de la mucosa que los ratones normales pertenecientes al grupo control (Petersson y col., 2011). Además, la microbiota es imprescindible para la producción de secreciones intestinales que constituyen una barrera física contra patógenos. Se vio que la velocidad de secreción era menor en los ratones con un tracto gastrointestinal libre de microorganismos. En definitiva, los animales gnotobióticos son más susceptibles a sufrir una infección ya que presentan severos descensos en la producción de citoquinas, en los niveles de inmunoglobulinas y en el recuento de linfocitos intraepiteliales (O'Hara y Shanahan, 2006).

El establecimiento de una serie de interacciones específicas entre el hospedador y su microbiota es fundamental para un correcto funcionamiento del

sistema inmunológico. El animal cuenta con unos receptores, denominados receptores de tipo Toll (TLR) -englobados en el sistema inmune innato- que le permiten detectar señales emitidas por la microbiota intestinal de manera diferencial según se trate de patógenos o microbios comensales. La activación de receptores TLR intestinales provocada por patógenos estimula la respuesta inflamatoria, pero la activación de estos receptores por parte de la microbiota comensal promueve la producción de la interleucina-6 y el factor de necrosis tumoral que protegen al epitelio intestinal de posibles daños (Rakoff-Nahoum y col., 2004).

2.4.2. Fisiología y patologías intestinales

La composición de la microbiota del tracto gastrointestinal de un mamífero condiciona la capacidad de éste para obtener energía de fuentes como polisacáridos o celulosa. La microbiota del animal está involucrada activamente en la absorción de nutrientes; ratones libres de microorganismos tienen una expresión intestinal muy reducida del transportador de sodio-glucosa (SLGT-1) en comparación con ratones gnotobióticos colonizados únicamente por la especie *Bacteroides thetaiotaomicron* (Hooper y col., 2001). Sin embargo, estudios realizados en aves han demostrado que esta barrera de microorganismos podría tener un efecto contrario al de los mamíferos inhibiendo la absorción de nutrientes. Como consecuencia del proceso evolutivo que supuso el desarrollo del vuelo, las aves fueron disminuyendo su superficie intestinal y desarrollaron la absorción paracelular (proceso mediante el que los nutrientes hidrosolubles son transferidos entre células epiteliales). De hecho, la colonización microbiana en aves está asociada a una disminución de la absorción de glucosa y vitaminas puesto que pollos gnotobióticos presentan una mejor absorción de estos componentes (Ford y Coates, 1971).

La diarrea neonatal es la causa principal de muerte en algunos mamíferos, como terneros o gazapos, antes del destete. El establecimiento de la microbiota gastrointestinal en las primeras semanas de vida de los terneros está asociado con la susceptibilidad al desarrollo de determinadas enfermedades (diarrea o neumonía) y con la velocidad de crecimiento diario (Oikonomou y col., 2013). En el mismo estudio se observó que la diversidad microbiana era mayor en terneros sanos y con mayor crecimiento medio diario que en aquellos animales afectados por neumonía o diarrea neonatal. Se desconoce si estas diferencias en la microbiota son una consecuencia de la enfermedad y/o de la medicación que se administra a los animales para su tratamiento o, por el contrario, si la presencia de determinados microorganismos y su abundancia confieren resistencia al hospedador frente a algunas enfermedades.

En terneros parece ser que la prevalencia de la especie *Faecalibacterium prausnitzii*, una de las principales bacterias productoras de butirato, puede disminuir la susceptibilidad a desarrollar enteropatías dado que en el estudio de Oikonomou y col.,

(2013) se encontró una asociación negativa entre esta especie bacteriana y la incidencia de diarreas en terneros jóvenes. Esta especie también parece jugar un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis promoviendo respuestas anti-inflamatorias. En pacientes humanos afectados por la enfermedad inflamatoria intestinal de Bowel, la prevalencia de esta bacteria se ha visto reducida. La enfermedad de Bowel también está asociada con una reducción en la abundancia del género *Bifidobacterium* (Sokol y col., 2009). Por lo tanto, los géneros *Faecalibacterium* y *Bifidobacterium* podrían tener un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y la resistencia frente a enteropatías.

Además, es importante mencionar que existe la posibilidad de modificar el microbioma gastrointestinal de un animal mediante la administración de probióticos - microorganismos vivos que favorecen el desarrollo de la flora microbiana intestinal- o prebióticos con el objetivo de mejorar su estado fisiológico y su productividad. En un estudio se observó que la alimentación directa de vacas con microorganismos tales como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* o *Enterococcus* (que son comúnmente usados como probióticos en humanos y animales monogástricos) disminuía la acidosis ruminal, incrementaba la producción lechera y disminuía la abundancia de *Escherichia coli* en las heces de los terneros (Krehbiel y col., 2003) y, por lo tanto, los autores vieron que esta estrategia podía proteger a los animales frente a enteropatías. Como ya se ha indicado en el apartado 2.3.2 al estudiar el efecto de la dieta sobre la composición microbiana en los conejos; aunque la restricción alimentaria no parece claramente que modifique la composición microbiana, sí genera unas condiciones fermentativas que favorecen la presencia de ácidos grasos volátiles que parecen tener un papel bacteriostático evidente (Rolfe, 1984).

2.4.3. Caracteres productivos

En rumiantes, la microbiota del rumen es capaz de producir el 70% de la energía diariamente requerida a través de la fermentación de sustratos indigeribles para el hospedador (Yeoman y White, 2014). Por ese motivo, la mayoría de estudios de la microbiota gastrointestinal en rumiantes se han enfocado en la caracterización de los diferentes microorganismos presentes en el rumen con el objetivo de entender su influencia en la producción cárnica y lechera. Estos estudios determinaron que la microbiota del rumen está compuesta por diversas especies de bacterias, archaeas, protozoos y hongos, cuya abundancia y variabilidad dependen de factores ya explicados detalladamente en apartados anteriores. La comunidad microbiana del rumen tiene gran importancia en el manejo de rumiantes; especialmente durante el destete cuyo éxito depende en gran medida del desarrollo del rumen y de la capacidad de fermentación de carbohidratos (Heinrichs, 2005).

En un estudio sobre eficiencia alimentaria se crearon dos líneas de conejos: una seleccionada por consumo residual de alimento (CRA) alimentada a voluntad y otra seleccionada por ganancia media diaria (GMD) con alimentación restringida (Drouilhet y col., 2016). Las poblaciones microbianas del ciego de conejos pertenecientes a las dos líneas seleccionadas mostraron perfiles de fermentación diferentes a la población microbiana de conejos no seleccionados: las líneas eficientes tenían una producción de hidrógeno menor pero una producción mayor de propionato. Por otra parte, utilizando la tecnología MiSeq de Illumina para la secuenciación e identificación de microorganismos, se compararon las microbiotas gastrointestinales de animales seleccionados y no seleccionados para evaluar su relación con la eficiencia alimentaria y la salud de los animales. Hicieron un análisis discriminante con componentes principales a partir de la tabla de abundancia de OTUs y encontraron que la mayor parte de la varianza podía ser explicada por los 14 primeros componentes principales. Y que con sólo los 10 primeros (**Figura 7**), eran capaces de distinguir las comunidades microbianas del ciego procedentes de las tres líneas consideradas en el estudio.

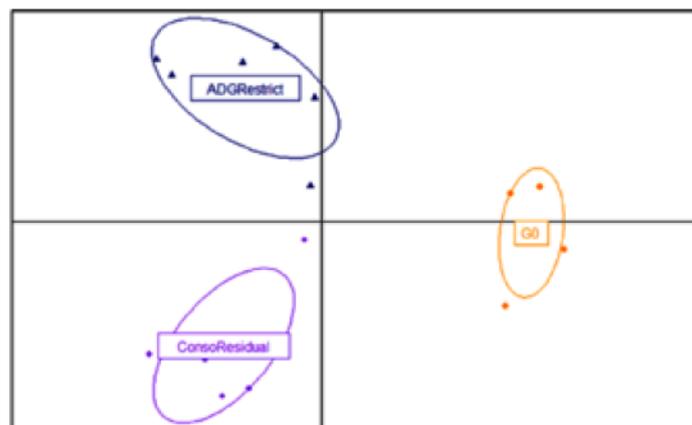


Figura 7. Separación basada en las secuencias de 16S rRNA de las comunidades microbianas de la línea no seleccionada (G0), la línea seleccionada por ganancia media diaria (ADGRestrict) y la línea seleccionada por consumo de alimento residual (ConsoResidual). El gráfico muestra la separación con los 10 OTUs más discriminantes entre las muestras de las tres líneas. (Extraído de Drouilhet y col., 2016).

El OTU de mayor importancia en la clasificación está relacionado con *Paludibacter propionicigenes* que se trata de una bacteria productora de propionato. Este resultado es consistente con el hecho de que los conejos de las líneas eficientes produzcan más butirato que aquellos no seleccionados. Además, el cuarto y el sexto OTU con mayor poder discriminante también están relacionados con una bacteria importante en el metabolismo del propionato: *Pelotomaculum thermopropionicum*. La actividad enzimática relacionada con la hidrolización de fibras vegetales también podría ser diferente entre las líneas ya que el quinto OTU con mayor poder discriminante está relacionado con la bacteria *Alistipes timonensis* que es capaz de degradar carbohidratos complejos y también fue encontrada en ratones obesos capaces de aprovechar la energía del alimento de forma más eficiente (Turnbaught y col., 2006). A pesar de estos resultados positivos, no pudo determinarse el papel

funcional de varios OTUs relevantes para discriminar las tres líneas ya que, aunque se encuentran a menudo en el conejo, se desconoce su función. Estos resultados son una evidencia clara de que el genotipo del hospedador condiciona la microbiota y ésta a su vez determina una mayor o menor eficiencia alimentaria. Sin embargo, en relación a la restricción alimentaria, el efecto positivo que ésta tiene en el conejo para favorecer la eficiencia en el uso de los recursos alimentarios, no está claramente asociado con cambios en la microbiota intestinal, aunque sí pudieran asociarse a cambios en su función de modo que ésta fuese más eficiente en el uso de recursos.

3. Objetivos

Esta tesis se ha elaborado dentro del proyecto europeo Feed-a-Gene (Horizon 2020) que tiene como objetivo general la mejora de la eficiencia de producción de los animales monogástricos y la reducción de su impacto medioambiental.

Uno de los objetivos del proyecto es determinar si los efectos beneficiosos ya conocidos (mejora en la digestibilidad y reducción del índice de riesgo sanitario) de la restricción cuantitativa de pienso durante el cebo son debidos, en parte, a cambios en la composición y actividad de la microbiota intestinal. Otro de los objetivos es determinar el grado de asociación existente entre la microbiota de animales racionados o alimentados a voluntad con su crecimiento post-destete.

Para alcanzar estos objetivos del proyecto Feed-a-Gene, en el presente trabajo se proponen cuatro objetivos específicos:

1. Evaluar el procedimiento de secuenciación desarrollado con el fin de determinar si la implementación que se hace del kit Nextera® XT para la generación de librerías es correcta.
2. Desarrollar y poner a punto un protocolo de análisis bioinformático con el software QIIME para el filtrado por calidad de las secuencias y su asignación a unidades taxonómicas operacionales (OTUs) que serán la base de los análisis posteriores.
3. Comparar los perfiles microbiológicos de ciego y heces de dos grupos de conejos de la misma línea sometidos a las mismas condiciones de alimentación, manejo y ambientales con excepción del régimen alimentario durante la etapa de engorde.
4. Analizar la relación entre la ganancia media diaria y el peso al destete de cada uno de los microorganismos encontrados en el ciego y las heces de ambos grupos de conejos.

El conocimiento de estos aspectos del microbioma del conejo permitirá establecer pautas de manejo o alimentación que promuevan la presencia de microorganismos favorables para el crecimiento, la eficiencia alimentaria y la tolerancia a enfermedades que provocan importantes trastornos digestivos en el conejo como las enteropatías epizoótica (ERE) y mucoide.

4. Materiales y métodos

Este estudio se desarrolló dentro del programa de Mejora Genética Animal del IRTA (Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias) en Caldes de Montbui, Barcelona.

4.1. Animales y diseño experimental

Para este estudio se emplearon muestras de ciego y heces pertenecientes a 24 animales de la línea Caldes (Gómez y col., 2002), especializada en crecimiento post-destete. Los animales empleados en este trabajo procedían de un experimento mucho más amplio realizado en el periodo comprendido entre julio de 2012 y junio de 2015 y cuyo objetivo fue estimar la magnitud de la interacción entre el genotipo y el régimen alimentario sobre los caracteres de crecimiento, consumo, eficiencia alimentaria, peso de la canal y salud de los animales. En dicho experimento se engordaron un total de 6.264 animales procedentes de 1.303 camadas producidas a lo largo de 14 lotes y alojados en 783 jaulas con 8 animales en cada una. Los regímenes alimentarios (tratamientos) estudiados fueron la alimentación a voluntad y la alimentación restringida al 75% del consumo a voluntad.

En el momento del destete (a los 31 días de edad) los gazapos de una misma camada se repartieron en ambos tratamientos, incluyendo un máximo de 2 animales por camada dentro de una misma jaula con el fin de minimizar el efecto materno y el efecto ambiental previo al destete sobre los caracteres de interés. Para tener grupos uniformes de individuos, dentro de tratamiento se establecieron dos grupos de animales en función de que su peso al destete fuese menor o igual, o mayor que la media del lote.

A excepción del régimen alimentario, todos los animales fueron criados en las mismas condiciones ambientales y de manejo. En ambos regímenes alimentarios, los animales recibieron la misma dieta estándar de pellet, cuya composición se muestra en la **tabla 6**, desde el destete hasta los 59 días de edad. Desde los 60 días de edad hasta el sacrificio (a los 66 días de edad) se les suministró pienso de retirada.

Tabla 6. Composición del pellet con que se alimentó a los animales del experimento durante el periodo de engorde.

	Cebo medicado	Retirada
FB %	18,70	15,98
PB%	15,02	15,90
Cenizas %	8,97	8,80
EE %	3,28	3,30
Oxitetraciclina (ppm)	400	-
Cl. de valnemulina (ppm)	30	-
Colistina sulfato (ppm)	100	-
Bacitracina de zinc (ppm)	-	100

FB: Fibra Bruta; PB: Proteína bruta; EE: Extracto etéreo; ppm: partes por millón.

Para este trabajo se emplearon 24 animales de los cuales 11 fueron alimentados a voluntad y 13 de manera restringida. Las muestras fueron recogidas tras el sacrificio de los animales (10 en febrero de 2014 y 14 en mayo de 2014) y almacenadas a -80°C hasta el momento de extracción del DNA.

Este grupo de muestras forma parte de un conjunto mayor (aproximadamente 500) que en el contexto del proyecto de investigación en el que se integra el presente trabajo (Feed-a-Gene: <http://www.feed-a-gene.eu/>) se van a utilizar con el objetivo de determinar el determinismo genético/genómico de la composición del microbioma intestinal del conejo, cómo éste se ve influenciado por el contacto con la madre, qué papel puede jugar la restricción alimentaria en su definición y qué relaciones fenotípicas y genéticas existen entre la composición del microbioma y los caracteres de crecimiento y eficiencia alimentaria. La consecución de todos estos objetivos en el marco de Feed-a-Gene es una actividad de cooperación con otras instituciones como por ejemplo el INRA de Francia.

4.2. Extracción de DNA microbiano presente en ciego y heces

Un paso previo a la extracción del DNA microbiano fue someter las 48 muestras de 250 mg aproximadamente cada una -24 de contenido fecal y 24 de contenido cecal a una lisis mecánica a -24°C con un aparato de tipo FastPrep® a una velocidad de 1x6 m/s durante 60 segundos. La extracción de DNA se realizó con el kit comercial ZR Soil Microbe DNA MiniPrep™ (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en la tecnología *bead-beating* y permite un aislamiento rápido y eficaz del DNA de bacterias y otros microorganismos; como hongos, archaeas o protozoos, presentes en las muestras de ciego y heces.

Después de la aplicación del protocolo de extracción, el DNA purificado de cada muestra fue cuantificado y se comprobó su pureza con un NanoDrop, utilizando el protocolo descrito por (Desjardins y Conklin, 2010). El procedimiento de cuantificación de la pureza se basa en que los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorbancia a 260 nm mientras que las proteínas lo tienen a 280 nm; por lo tanto, viendo la relación entre ambas absorbancias ($A_{260/280}$) medidas mediante espectrofotometría (NanoDrop) se puede comprobar la pureza de una muestra y saber si el DNA extraído es puro o está contaminado con fragmentos proteicos. La medida ideal es $1,8 < A_{260/280} < 2,0$; como se puede ver en la **tabla 7** nuestros extractos tenían una pureza ligeramente menor de la deseable, pero nunca inferiores a 1,6 y de suficiente calidad para no inhibir procesos posteriores de PCR.

Una vez cuantificado el DNA y tomadas las correspondientes medidas de absorbancia, el DNA extraído de cada muestra se dividió en alícuotas de 20 µl y fue almacenado a -20 °C para posteriores análisis.

Tabla 7. Concentración (ng/uL) y pureza (A260/280) del DNA extraído con el kit ZR Soil.

Muestra	Tatuaje	Régimen	Origen	[ng/uL]	A260/280
1C	113061	Voluntad	Ciego	159,6	1,79
2C	113101	Voluntad	Ciego	141,9	1,70
3C	115040	Voluntad	Ciego	167,6	1,74
4C	113063	Restricción	Ciego	120,7	1,72
5C	113064	Restricción	Ciego	150,0	1,73
6C	113087	Restricción	Ciego	126,7	1,71
7C	115804	Voluntad	Ciego	196,0	1,77
8C	115231	Restricción	Ciego	140,4	1,77
9C	115263	Restricción	Ciego	170,4	1,76
10C	113210	Restricción	Ciego	185,7	1,78
11C	115334	Restricción	Ciego	114,2	1,61
12C	115776	Voluntad	Ciego	162,4	1,77
13C	113133	Voluntad	Ciego	143,7	1,69
14C	113150	Voluntad	Ciego	178,1	1,72
15C	115240	Restricción	Ciego	202,4	1,73
16C	115259	Restricción	Ciego	195,0	1,76
17C	115162	Restricción	Ciego	169,4	1,82
18C	115124	Voluntad	Ciego	143,4	1,75
19C	115279	Voluntad	Ciego	125,6	1,63
20C	115280	Voluntad	Ciego	113,2	1,55
21C	115379	Voluntad	Ciego	141,0	1,69
22C	113238	Voluntad	Ciego	232,3	1,73
23C	113115	Restricción	Ciego	191,9	1,68
24C	113198	Restricción	Ciego	234,0	1,76
1H	113061	Voluntad	Heces	190,6	1,80
2H	113101	Voluntad	Heces	274,8	1,85
3H	115040	Restricción	Heces	135,7	1,84
4H	113063	Restricción	Heces	119,1	1,78
5H	113064	Restricción	Heces	217,6	1,85
6H	113087	Restricción	Heces	149,1	1,78
7H	115804	Voluntad	Heces	184,3	1,83
8H	115231	Restricción	Heces	228,6	1,76
9H	115263	Restricción	Heces	167,6	1,81
10H	113210	Restricción	Heces	211,9	1,82
11H	115334	Restricción	Heces	209,5	1,80
12H	115776	Voluntad	Heces	204,0	1,81
13H	113133	Voluntad	Heces	218,6	1,73
14H	113150	Voluntad	Heces	258,5	1,76
15H	115240	Restricción	Heces	259,0	1,78
16H	115259	Restricción	Heces	201,8	1,76
17H	115162	Restricción	Heces	196,0	1,73
18H	115124	Voluntad	Heces	219,1	1,72
19H	115279	Voluntad	Heces	193,3	1,71
20H	115280	Voluntad	Heces	215,2	1,71
21H	115379	Voluntad	Heces	227,4	1,72
22H	113238	Voluntad	Heces	228,0	1,76
23H	113115	Restricción	Heces	213,0	1,83
24H	113198	Restricción	Heces	260,2	1,77

4.3. Generación de librerías masivas de gen 16S rRNA de las muestras y secuenciación con la plataforma MiSeq

El trabajo que aquí se presenta debe entenderse como un estudio preliminar del papel de la microbiota digestiva en el proceso de engorde de los gazapos y cómo la restricción influye sobre ella. Este estudio se está ampliando considerando un total de 500 muestras y las 48 consideradas en este trabajo son las que se han utilizado para poner a punto el protocolo de secuenciación que se está implementado con el resto de muestras.

Se amplificó un fragmento del gen 16S rRNA que contiene las regiones hipervariables V4 y V5 con los cebadores *forward* 515Y: 5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3' y *reverse* 926: 5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3' (Parada y col., 2015). Esta combinación de cebadores produce un amplicón de 411 pb, de un tamaño mayor que el que produce el par de cebadores 515Y/806 (Caporaso y col., 2011), que hubiese sido otro buen candidato, lo que va a permitir identificar un mayor número de especies bacterianas y archaeas.

Según el protocolo de preparación de librerías, en la primera etapa de amplificación por PCR se incluyeron las secuencias, que unidas al par de cebadores elegido, actúan como adaptadores - *forward*: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' y *reverse*: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'- para los índices (*barcodes*) que define Illumina y que permiten la mezcla de hasta 96 muestras (librerías) en cada reacción de secuenciación. Los índices propiamente dichos junto con los adaptadores de secuenciación se añaden en una segunda reacción de PCR (**figura 8**).

El kit Nextera® XT de Illumina cuenta con 12 índices para unir a un cebador y 8 índices para el otro cebador que combinados permiten mezclar un total de 96 librerías para secuenciar en una placa este número máximo de muestras al mismo tiempo.

Una vez preparada la placa con las muestras correspondientes se llevó a cabo la secuenciación utilizando un equipo MiSeq de Illumina (Guía del usuario del sistema MiSeq de Illumina, San Diego, C.A, U.S.A).

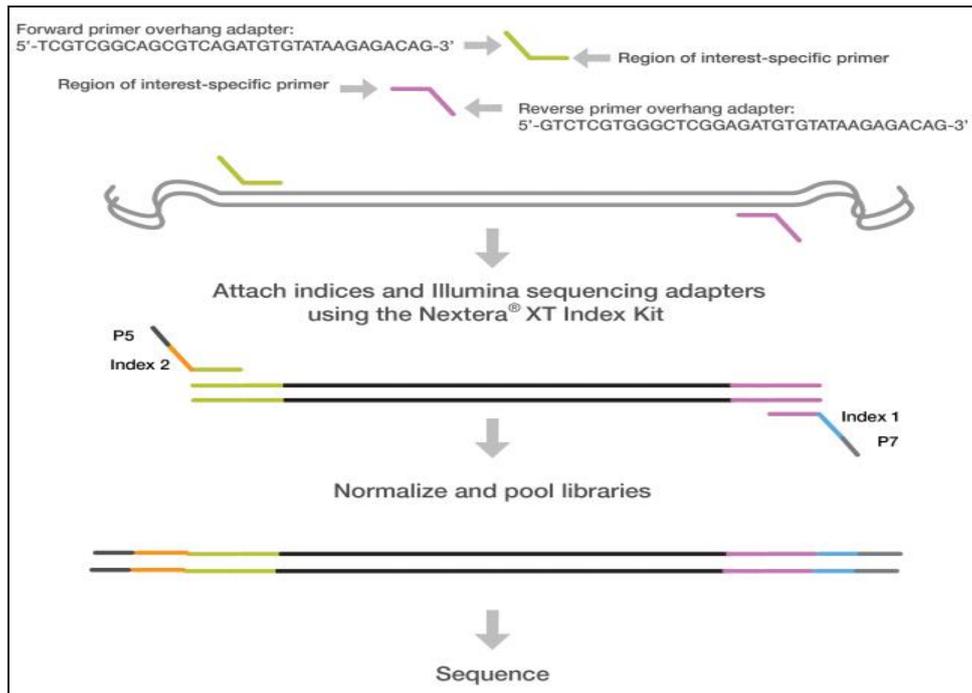


Figura 8. Esquema que describe la preparación de librerías en el contexto del kit de secuenciación en paralelo Nextera[®] XT. En rosa y verde se representan los cebadores escogidos por el usuario, que son complementarios a la región de interés del gen, y que incluyen unos adaptadores (secuencia de DNA) para posteriormente etiquetar las distintas muestras. A continuación, se realiza un nuevo paso de amplificación para añadir los índices (amarillo y azul) y los adaptadores de secuenciación de Illumina (P5 y P7). Finalmente, se normalizan y mezclan las librerías generadas que estarán listas para ser secuenciadas en un equipo MiSeq. (Extraído de la guía de preparación de librerías de Illumina, San Diego, C.A, U.S.A).

4.4. Elección del software para el filtrado y análisis bioinformático de las lecturas obtenidas en el equipo MiSeq

El creciente número de estudios del microbioma ha hecho necesario el desarrollo de paquetes de análisis de secuencias del gen 16S rRNA resultantes de plataformas comerciales de secuenciación como 454 o Illumina. Entre la gran variedad de paquetes disponibles podemos elegir, en función de nuestro propósito, algunos como Mothur (Schloss y col., 2009), QIIME (Caporaso y col., 2010), WATERS (Hartman y col., 2010) o RDPipeline (Cole y col., 2009).

Los paquetes de uso más popular en estudios de análisis de secuencias microbianas son Mothur y QIIME. Estos paquetes cuentan con guías de uso online y manuales en forma de *wiki pages* que, además, se encargan de mantener informado al usuario de la creación de nuevas aplicaciones o versiones mejoradas de los *pipelines* (elementos conectados que se encargan del procesamiento de datos).

El propósito de todos los paquetes para el análisis molecular de secuencias 16S rRNA es agilizar el proceso de filtrado, análisis y salida final de las secuencias (Nilakanta y col., 2014).

El primer paso del análisis es la eliminación de secuencias de baja calidad y, por tanto, poco fiables. En este sentido, para medir la calidad de una lectura se emplea el parámetro *quality score*. Este parámetro es una puntuación que indica la probabilidad de incorporación de una base correcta en la secuencia -dada por la tasa de error de la polimerasa empleada en la amplificación del DNA-; cuanto mayor sea el *quality score* de una base, menor será su probabilidad de ser incorrecta. Al finalizar el proceso de secuenciación con la plataforma Illumina, se crea un fichero FASTQ que contiene, siguiendo el código ASCII, los *quality scores* de cada base de la secuencia (Cock y col., 2010). Posteriormente, la calidad se puede estudiar y editar las secuencias que contienen bases con bajo índice de calidad en posiciones concretas.

El segundo objetivo es la eliminación de secuencias quiméricas que pueden formarse durante los diferentes ciclos del proceso de amplificación del DNA si dos o más moléculas diferentes de DNA se unen dando lugar a una secuencia híbrida que, en caso de no ser eliminada, generaría falsa diversidad en el análisis. Existen varios programas que emplean diferentes metodologías para detectar y después eliminar estas quimeras: UCHIME (Edgar y col., 2011), CHIMERA_CHECK (Maidak y col., 1999) o Bellerophon (Huber y col., 2004).

Otro paso importante durante el filtrado de secuencias que estos software deben ser capaces de realizar es la detección y eliminación de fuentes contaminantes como microorganismos no pertenecientes a la muestra original que se quiere estudiar.

Siguiendo estos pasos se reduce el número de secuencias que serán utilizadas para llevar a cabo el análisis final que siempre dependerá de los parámetros

empleados para el filtrado de calidad de las lecturas. Tanto Mothur como QUIIME ofrecen herramientas que permiten llevar a cabo el análisis de comparación filogenética o estudios de diversidad mediante el cálculo de índices alfa (referente a la riqueza de especies de una muestra) o beta (referente a la diversidad entre distintas muestras).

A continuación se detalla todo el proceso de edición realizado que se implementó en el presente trabajo. Los ficheros de secuenciación FASTQ generados por la plataforma MiSeq de Illumina fueron depurados (*trimming*) en varias etapas y analizados con QUIIME (**Figura 9**).

En primer lugar, se generó y validó un fichero de mapa que contiene toda la información propia de las muestras analizadas. Con este fichero se asigna un nombre a cada una de las muestras y, además, se indican las categorías de diseño a las que cada una de ellas pertenece, por ejemplo el régimen alimentario del que procede, si se extrajo del ciego o de las heces, etc.

En segundo lugar, se utilizó el script **multiple_join_paired_ends.py** para la creación de los contigs (unión de dos lecturas que se realiza en sentido *forward* y *reverse* que contienen un fragmento común de secuencia que se superpone) a partir de la unión de los ficheros FASTQ correspondientes a las lecturas-R1 (sentido forward) y lecturas-R2 (sentido reverse) de cada muestra que genera el sistema MiSeq. El siguiente paso consistió en asignar cada contig a su muestra correspondiente con el script **split_libraries.py** y llevar a cabo un filtrado de calidad de cada secuencia y así eliminar lecturas ambiguas o de baja calidad; en este caso se eliminaron todas aquellas con un *quality score* (QS) inferior a 19 lo que implica una probabilidad de error de la base inferior a 0.012, ya que en los secuenciadores Illumina el $QS = -10 \cdot \log_{10} P$ donde P es la probabilidad de que la base sea incorrecta. Este mismo script se podría haber utilizado para hacer el *demultiplexing* -asociación de una lectura a su muestra de origen- en el caso de que el secuenciador hubiese generado un fichero único con todas las lecturas procedentes de las diferentes muestras.

A continuación, se empleó el script **identify_chimeric_seqs.py** que implementa el algoritmo ChimeraSlayer (Haas y col., 2011) para detectar las quimeras generadas durante el proceso de amplificación del DNA. Las secuencias quiméricas identificadas se eliminaron con el script **filter_fasta.py** con el objetivo de evitar la falsa diversidad que generarían en análisis posteriores.

Además, se decidió descartar aquellas muestras que tuviesen asociado un número de contigs finales inferior a 10.000. En nuestro estudio se eliminó la muestra 16C.

Para el último paso, en el que se lleva a cabo la agrupación de secuencias en OTUs (*Operational Taxonomic Unit*), debido a que disponíamos de acceso a la base de datos de referencia *Greengenes* (<http://greengenes.lbl.gov>), se empleó la estrategia

pick_open_reference_otus.py (Rideout y col., 2014) en la que las lecturas son agrupadas contra una base de datos de referencia y aquellas secuencias que no mapean son agrupadas *de novo* con la ventaja de que todas las lecturas pueden ser potencialmente agrupadas, por lo tanto esta estrategia, a diferencia del script **pick_closed_reference_otus.py**, no descarta todas aquellas secuencias que no alinean contra la base de referencia empleada. También se descartó el uso del script **pick_de_novo_otus.py** con el que todas las lecturas son agrupadas *de novo* sin una referencia externa, lo que es computacionalmente muy costoso.

El script **pick_open_reference_otus.py** realiza las siguientes funciones en varias etapas (**Figura 9**).

La primera etapa consistió en alinear los contigs no quiméricos totales ya filtrados contra la base de datos de referencia *Greengenes*. De éstos, los que no alinearon con las secuencias de referencia de la base de datos fueron filtrados del archivo original en uno nuevo fichero llamado “failures.fasta”. Las secuencias que sí alinearon fueron agrupadas con UCLUST (Edgar, 2010) y se obtuvo un primer conjunto de OTUs (1.914). El algoritmo UCLUST está diseñado para agrupar secuencias nucleotídicas en base a un umbral de similitud de secuencia siguiendo dos criterios de agrupación:

- a) La secuencia centroide (representativa) de un grupo/clúster debe tener una similitud menor que el umbral establecido respecto a la secuencia centroide de otros grupos.
- b) Cada secuencia perteneciente a un determinado clúster deberá tener una similitud, con la secuencia centroide de dicho clúster, igual o superior al umbral establecido.

En la segunda etapa, se tomó una muestra aleatoria de un 0,1% de los contigs que no alinearon con la base de datos de referencia. Con esta muestra se llevó a cabo una clusterización *de novo* con el algoritmo UCLUST (en esta ocasión sin utilizarla base de datos de referencia) que resultó en un segundo grupo de OTUs nuevos (406).

En la tercera etapa, el total de las secuencias recogidas en el fichero “failures.fasta”, que no habían alineado en la primera etapa con la base de datos de Greengenes, se alinearon con las secuencias representativas de los 406 OTUs creados en la segunda etapa. Después de esta agrupación resultó un grupo de 622.364 secuencias que no alinearon y se descartaron.

En análisis preliminares se llevó a cabo un cuarto paso en el que las secuencias que no alinearon se clusterizaron *de novo* dando lugar a un archivo de OTUs muy grande en el que la mayor parte de ellos estaban definidos por una única secuencia en una muestra (*singletons*) y por tanto este paso en los análisis finales se descartó.

En la siguiente etapa se concatenan las tablas de OTUs generadas en la primera y tercera etapa para producir una única tabla final. A continuación, se tomó la decisión de crear un nuevo archivo en el que se eliminaron los OTUs *singletons* y se generó el archivo definitivo que contiene una tabla con 1.823 OTUs no *singletons*. Finalmente se creó un archivo que contiene la tabla definitiva con la taxonomía asignada a cada OTU.

Un paso muy importante fue la normalización de la tabla de OTUs. La variabilidad en número de contigs por muestra es bastante grande (**Tablas 9 y 10**), por lo tanto para hacer comparable el número de secuencias que pertenecen a cada OTU entre las distintas muestras es preciso llevar a cabo una normalización de la tabla de OTUs, de manera que el número total de secuencias dentro de muestra sea constante. La normalización se realizó con el script **normalize_table.py** que implementa el procedimiento de normalización “cumulative sum scaling” (CSS) el cual se adapta mejor a datos basados en marcadores moleculares ya que corrige el sesgo introducido por el método de normalización más comúnmente utilizado; el “total sum normalization” (Paulson y col., 2013).

La tabla de OTUs normalizada se empleó en pasos posteriores para determinar la composición relativa de cada muestra a nivel taxonómico de filo y familia. Las tablas de composición relativa de las muestras a estos niveles taxonómicos se emplearon para estudiar la significación estadística del origen de la muestra, el régimen alimentario y la interacción de ambos sobre estas composiciones relativas.



Figura 9. Diagrama de flujo de los pasos seguidos para el procesado de secuencias, generación de OTUs y análisis posteriores con QIIME.

4.5. Análisis de la diversidad microbiana

En ecología de poblaciones, la diversidad alfa se refiere a la cantidad (riqueza) de especies presentes en un determinado ecosistema que se considera homogéneo (Moreno, 2001). Los índices de diversidad alfa que se ofrecen para distintas agrupaciones asumen que, por ejemplo, un tipo de dieta define un ecosistema específico y, por tanto, es diferente de otro tipo de dieta.

Por el contrario la diversidad beta es la variabilidad que existe entre diferentes ecosistemas. En este estudio igualmente se asume que cada muestra o grupo de muestras (por ejemplo aquel conformado por las muestras que proceden de animales alimentados con la misma dieta) procedería de un ambiente específico y la variabilidad vendría dada por la magnitud de la distancia entre las muestras o grupos de muestras.

El software QIIME ofrece el script **alpha_rarefaction.py** que permite obtener curvas de rarefacción (técnica de evaluación de la riqueza de especies de una muestra) para distintos índices de diversidad. Los análisis de rarefacción permiten la comparación de la diversidad entre diferentes muestras que difieren en número de secuencias y la extrapolación de la diversidad calculando el número hipotético de especies en una muestra a través de diferentes índices estimadores de riqueza. Las curvas de rarefacción presentan, para distintos números de secuencias, la cantidad y composición de especies diferentes que se pueden encontrar en las distintas muestras o en agrupaciones de las mismas.

El cálculo de las curvas de rarefacción se realiza mediante un muestreo sin reemplazo de un determinado número de contigs de cada muestra para las que se establecen los índices deseados. Repitiendo dicho muestreo varias veces es posible determinar el error del índice calculado. Los muestreos se van repitiendo para distintos números de contigs y así se obtienen, finalmente, las curvas de rarefacción que permiten determinar la variabilidad existente entre muestras o grupos de muestras dado un número constante de contigs por muestra. El valor máximo que alcanzan las curvas de rarefacción, dado el modo de cálculo, corresponde al número de contigs de la muestra que menos contigs tenga.

En nuestro caso se utilizaron los siguientes índices de diversidad:

- a) **Chao 1**: estimador del número de especies (o OTUs) en una comunidad basado en el número de especies raras en la muestra (Chao, 1984).

$$Chao\ 1 = S + \frac{a^2}{2b}$$

S representa el número de especies en una muestra, a es el número de especies que están representadas solamente por un único individuo en esa muestra y b es el número de especies representadas por dos individuos en la muestra.

b) Número de OTUs observados: índice que hace referencia a la riqueza o cantidad de OTUs presentes en una muestra.

c) PD Whole Tree: es una medida cuantitativa de la diversidad filogenética (PD) que se define como la longitud mínima total de todas las ramas necesarias para abarcar un determinado conjunto de OTUs en el árbol filogenético (Faith, 1992). Valores grandes se asocian a mayor diversidad.

Diferencias en los valores de estos índices en función del origen de las muestras o del tipo de dieta se interpretan como una medida de diversidad beta.

4.6. Análisis de la beta diversidad

El estudio de los efectos del régimen alimentario (voluntad y restricción), el origen de la muestra (heces y ciego) y la interacción entre ambos sobre la composición relativa de OTUs, filos y familias en las distintas muestras se llevó a cabo mediante un modelo lineal que se implementó con la función `lm()` de R (Chambers, 1992). La significación de los factores de variación señalados se estudió mediante tests F teniendo en cuenta los múltiples test realizados; para ello se ajustaron los pvalores obtenidos considerando la tasa de falsos positivos (FDR) (Benjamini y Hochberg, 1995). El ajuste de corrección por test-múltiples se hizo para todos los tests dentro de contraste (dieta, origen e interacción) y nivel taxonómico (OTU, filo y familia).

En un intento de reconocer que cada pareja de muestras de heces y de ciego procede del mismo animal se intentó ajustar un modelo de repetibilidad con el que estimar la varianza del animal. Se utilizó la función `lmer()` del paquete `lme4` de R (Bates y col., 2015) que implementa un algoritmo REML para estimar los componentes de varianza. Dado el escaso número de datos de los que se disponía, en muchos de los análisis ejecutados no se estimó de manera adecuada la repetibilidad y por tanto los resultados de los tests F que comparaban el contenido de un determinado filo, familia u OTU no eran fiables. Por este motivo, los resultados obtenidos tras la aplicación de este modelo fueron descartados.

Otros procedimientos para el estudio de las diferencias existentes en la composición taxonómica de las muestras, a nivel del conjunto de OTUs, se basan en el análisis multivariante de las tablas de OTUs o de matrices de distancias entre las muestras derivadas de las mismas y de los árboles filogenéticos. En este estudio se utilizó el análisis de coordenadas principales (PCoA) de matrices de distancias filogenéticas UniFrac.

La distancia filogenética UniFrac ponderada (Lozupone y Knight, 2005) se calculó utilizando el script **`beta_diversity.py`** de QIIME. Esta distancia se calcula a partir de un árbol filogenético que incluye todos los taxones encontrados en las muestras y se define, para cada par de muestras, como el cociente entre la suma de la longitud de las ramas que conducen a taxones no compartidos entre las muestras sobre la suma de la longitud de todas las ramas del árbol. El árbol filogenético que se ha usado para estos cálculos se construyó utilizando el script **`make_phylogeny.py`** de QIIME.

En el análisis PCoA, a partir de la matriz de distancia UniFrac ponderada, se proyectan las muestras en los ejes ortogonales definidos por las coordenadas principales, las cuales quedan definidas por el producto de los vectores propios de la matriz de distancias centrada y una matriz diagonal que contiene la raíz cuadrada de los valores propios no negativos.

El método más común en estudios multivariados suele ser el análisis de componentes principales (PCA), en él la proyección de los datos se hace sobre los ejes

ortogonales definidos por los componentes principales que en nuestro caso se obtendrían al proyectar la matriz de OTUs, normalizada y estandarizada dentro de OTU, en el espacio que definen los vectores propios de la matriz de correlaciones entre los OTUs los vectores propios de la matriz de OTUs calculados por un procedimiento que no requiera matrices cuadradas; como el caso de la “spectral value decomposition”.

En estudios de microbiología ambiental se prefiere el uso de PCoA sobre el de PCA porque con PCA dos muestras en las que falte el mismo OTU se tratan como similares, de la misma manera que si ambas muestras compartiesen el OTU. Por el contrario, este problema no ocurre cuando se lleva a cabo un PCoA basado en matrices de distancias filogenéticas ya que la similitud solamente se define por los OTUs que comparten y están presentes en las muestras.

4.7. Análisis del efecto de la microbiota sobre el crecimiento y el peso al destete

Como primer paso para estudiar la asociación entre el crecimiento y la composición microbiológica de las muestras se calcularon las ganancias medias diarias (GMD) de todos los animales considerados en el estudio, así como su peso ajustado a 31 días de edad (P31) que se corresponde con el mínimo peso de inicio del cebo y coincide aproximadamente con el momento de destete de los animales.

El crecimiento se obtuvo como la regresión lineal, anidada a animal, del peso vivo sobre su edad. Se dispuso de 6 medidas de peso para cada animal que fueron registradas entre el destete y el sacrificio (30-66 días de edad aproximadamente). En la **figura 10** se presentan los registros de peso sobre la edad.

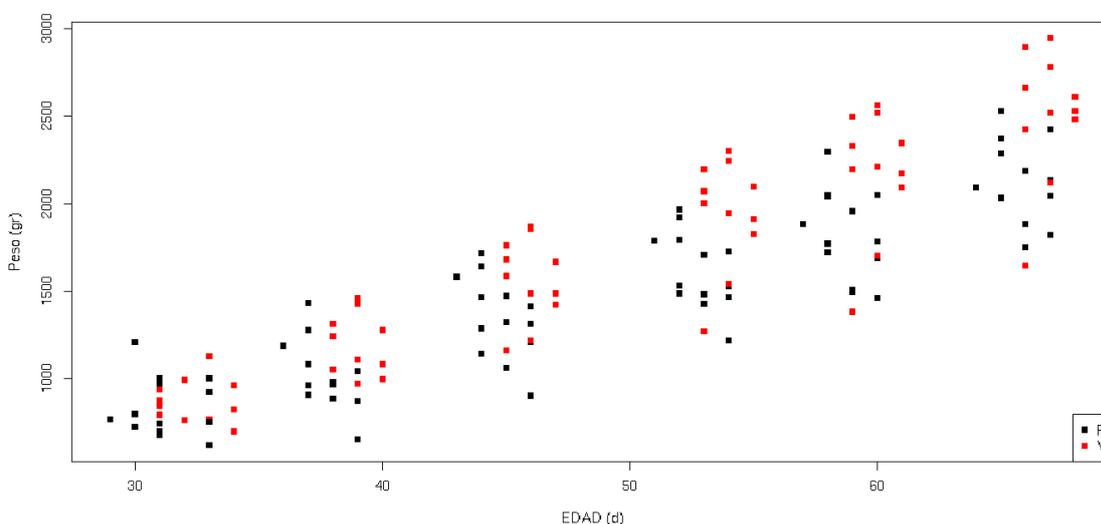


Figura 10. Registros de peso de los 24 animales del estudio en 6 edades diferentes comprendidas entre el destete y el sacrificio. En negro se representan los animales que fueron alimentados bajo restricción y en rojo los animales alimentados a voluntad

Las medias, desviaciones típicas, mínimos y máximos de los caracteres P31 y GMD en función del régimen de alimentación se resumen en la **tabla 8**.

Tabla 8. Promedios, desviaciones típicas, mínimos y máximos de los caracteres peso ajustado a los 31 días (P31) y ganancia media diaria (GMD).

Peso ajustado a los 31 días (P31)					
Régimen	Promedio	Desviación típica	Mínimo	Máximo	N
Restricción	806,1	211,2	423,0	1265,1	13
Voluntad	822,9	158,4	545,7	1057,5	11
Ganancia media diaria (GMD)					
Régimen	Promedio	Desviación típica	Mínimo	Máximo	N
Restricción	37,4	5,9	27,9	45,5	13
Voluntad	47,4	10,8	18,8	57,3	11

N: número de animales.

Los análisis del efecto de la composición del microbioma sobre el P31 y la GMD post-destete se abordaron con modelos lineales en los que se incluyeron como covariables -de manera separada para las heces y el ciego- los porcentajes de las distintas familias y filos, y también las unidades taxonómicas normalizadas para los distintos OTUs. Cada uno de los filos, familias y OTUs se estudiaron en un análisis separado.

El modelo para el estudio del P31 únicamente incluyó la regresión sobre el filo, familia u OTU estudiado. El modelo para el estudio de GMD incluyó el régimen alimentario como un factor categórico y la regresión sobre el filo, familia u OTU se anidó al tratamiento. En todos los casos, la significación estadística de los coeficientes de regresión se determinó mediante un test t y los pvalores obtenidos se corrigieron por la tasa de falsos positivos (FDR) (Benjamini y Hochberg, 1995). El ajuste se hizo dentro de coeficiente (regresión para P31, regresión para ADG en los animales alimentados a voluntad y regresión para ADG en los animales alimentados bajo restricción) y nivel taxonómico (OTU, filo y familia) considerado. Los análisis sobre las unidades taxonómicas normalizadas para los distintos OTUs y los porcentajes de las familias sólo se hicieron sobre aquellos OTUs y familias que estaban presentes en, al menos, el 50% de las muestras.

Además de estos modelos que pretendían explorar el efecto de la composición sobre el crecimiento y el peso al destete, también se exploró el efecto de la diversidad del microbioma sobre el crecimiento. Esto se hizo mediante un modelo lineal, implementado con la función `lm()` de R, en el que la variable dependiente era la GMD y los factores explicativos eran el tratamiento alimentario y la regresión sobre el número de OTUs observados a 11.719 lecturas, anidada a tratamiento.

5. Resultados y discusión

5.1. Análisis de los resultados de secuenciación

Dado el carácter preliminar del trabajo, pues el centro encargado de realizar la secuenciación es la primera vez que ha utilizado el kit Nextera® XT de Illumina para la generación de librerías, es preciso llevar a cabo un análisis profundo de los resultados del proceso de secuenciación; es decir del número total de secuencias que de cada muestra se obtiene inicialmente y después de aplicar distintos filtros de calidad que van reduciendo progresivamente el número de secuencias válidas por muestra.

Como se observa a modo de resumen en las **tablas 9 y 10**, el proceso de secuenciación generó un total de 5.820.828 secuencias en las 48 muestras pero con una importante variabilidad entre ellas; variando desde un mínimo de 40.025 (muestra 11C) hasta un máximo de 240.333 (muestra 21C) secuencias generadas por muestra.

De los casi 6 millones de secuencias totales generadas inicialmente para las 48 muestras, el propio sistema de secuenciación declaró como válidas un 83,28%. Entre las 5.022.259 secuencias válidas, la variabilidad entre muestras fue similar a la observada para las secuencias brutas. Los 5 millones de lecturas válidas se agruparon en 2.466.197 contigs con un promedio de 51.379 y una desviación típica de 21.317,3 contigs por muestra. Tras el filtrado de calidad de los contigs y la eliminación de contigs quiméricos, un total de 2.195.158 (2.191.182 una vez eliminados los 3.976 contigs asignados a la muestra 16C que fue descartada) contigs finales fueron agrupados en 1.823 OTUs no *singletons*. Cada muestra tuvo en promedio $45.732 \pm 19.184,95$ contigs -que dieron lugar a $658 \pm 123,93$ OTUs- variando desde un mínimo de 15.749 (muestra 11C) hasta un máximo de 81.198 (muestra 6H) contigs por muestra. La muestra 4C fue la que tuvo el menor número de OTUs (312) y la muestra 6H el máximo (1.012) número de OTUs (**Tablas 9 y 10**).

Los resultados de secuenciación de otros estudios sobre poblaciones microbianas gastrointestinales y de otros ambientes (rumen, pulmón, etc.) en conejo y diferentes especies animales de producción muestran resultados variables en el número promedio de contigs filtrados por muestra. Por lo tanto se podría decir que la secuenciación del gen 16S rRNA debe estar fuertemente influida por factores como la especie, el ambiente microbiano estudiado, el kit empleado para la extracción del DNA, la región hipervariable seleccionada del gen 16S rRNA secuenciada o el par de cebadores utilizado y el kit o sistema de generación de librerías masivas. Además, las diferencias encontradas en el número promedio de contigs y su variación, y también en la media y variación del número final de OTUs por muestra, se pueden ver acentuadas por el software empleado, los parámetros escogidos para el depurado de secuencias y la estrategia elegida para la creación de los OTUs, así como por el número final de contigs/lecturas utilizado. En el estudio de Correa-Fiz y col. (2016), al igual que en el presente estudio, se encuentra una gran variación en el número de contigs filtrados por muestra desde un mínimo de 7.338 a un máximo de 844.521 contigs. Por

otro lado, el hecho de que algunos estudios (Zeng y col., 2015; Wang y col., 2016) presenten un número total de OTUs no *singletons* mucho mayor (entre 1.600 a 6.900 OTUs por muestra) al descrito en el presente estudio es debido a que no suprimieron la cuarta etapa del script de QIIME **pick_open_reference_otus.py** en la que es posible llevar a cabo una clusterización *de novo* con las secuencias que no alinearon con la referencia en las etapas previas (**Tabla 11**) y en nuestro estudio si se ha suprimido la cuarta etapa de este script.

Tabla 9. Datos de las lecturas resultantes del proceso de secuenciación, filtrado y procesado con el software QIIME en muestras de origen cecal.

ID Animal	ID Muestra	Tratamiento	Nº lecturas totales MiSeq	Nº lecturas filtradas MiSeq	Nº contigs	Nº contigs filtrados (Q>19)	Nº contigs no quiméricos	Nº OTU no singletons
113061	1C	Voluntad	189.825	171.956	86.604	79.056	76.868	692
113101	2C	Voluntad	173.618	153.972	77.871	71.394	69.387	760
115040	3C	Restricción	125.282	109.388	56.227	51.637	50.342	693
113063	4C	Restricción	84.462	73.465	40.762	37.488	36.200	312
113064	5C	Restricción	65.274	51.837	28.674	26.280	25.591	601
113087	6C	Restricción	119.866	103.381	50.887	46.366	45.464	721
115804	7C	Voluntad	89.808	81.298	40.575	37.290	36.436	606
115231	8C	Restricción	80.883	72.071	34.590	31.541	30.608	559
115263	9C	Restricción	62.914	56.825	27.292	25.071	24.521	558
113210	10C	Restricción	54.571	46.955	21.419	19.438	18.940	580
115334	11C	Restricción	40.025	34.763	17.923	16.244	15.749	361
115776	12C	Voluntad	62.347	54.426	28.805	26.439	25.809	581
113133	13C	Voluntad	79.711	64.409	33.800	30.771	29.976	559
113150	14C	Voluntad	91.105	77.555	37.474	34.059	33.353	664
115240	15C	Restricción	91.364	78.489	30.994	27.418	26.785	591
115259	16C	Restricción	63.613	48.643	5.338	4.067	3.976	DESCARTADA
115162	17C	Restricción	192.857	174.255	80.476	73.734	71.857	779
115124	18C	Voluntad	159.913	137.241	64.225	58.692	57.397	685
115279	19C	Voluntad	195.975	170.341	81.388	74.368	72.164	760
115280	20C	Voluntad	174.784	145.767	74.785	68.476	66.596	753
115379	21C	Voluntad	240.333	193.718	90.456	82.158	80.042	834
113238	22C	Voluntad	217.076	183.220	89.940	81.874	78.660	777
113115	23C	Restricción	156.466	137.895	59.256	52.906	51.731	700
113198	24C	Restricción	102.019	90.456	40.373	36.682	35.653	698
TOTAL	-	-	2.914.091	2.512.326	1.200.134	1.093.449	1.064.105	1,823
Promedio	-	-	1.214.20,5	104.680,3	50.005,58	45.560,38	44.337,71	644,52
Desv. Típica	-	-	58.747,18	50.595,78	25.323,54	23.191	22.491,12	127,19

Tabla 10. Datos de las lecturas resultantes del proceso de secuenciación, filtrado y procesado con el software QIIME en muestras de origen fecal.

ID Animal	ID Muestra	Tratamiento	Nº lecturas totales MiSeq	Nº lecturas filtradas MiSeq	Nº contigs	Nº contigs filtrados (Q>19)	Nº contigs no quiméricos	Nº OTU no singletones
113061	1H	Voluntad	159.674	144.596	75.481	69.154	67.445	693
113101	2H	Voluntad	120.847	105.960	54.631	49.818	48.501	726
115040	3H	Restricción	143.182	125.333	66.655	61.034	59.420	717
113063	4H	Restricción	96.475	84.068	47.390	43.487	41.828	355
113064	5H	Restricción	110.027	88.560	50.985	46.699	45.089	688
113087	6H	Restricción	189.836	160.685	84.567	84.097	81.998	1.012
115804	7H	Voluntad	110.928	100.291	50.601	46.605	45.536	651
115231	8H	Restricción	157.615	136.207	57.237	51.214	49.949	632
115263	9H	Restricción	79.270	72.031	37.085	34.112	33.285	587
113210	10H	Restricción	73.208	65.169	33.928	31.165	30.321	642
115334	11H	Restricción	142.067	124.194	64.538	58.811	57.001	482
115776	12H	Voluntad	113.805	97.032	43.278	38.797	37.810	666
113133	13H	Voluntad	106.305	84.894	43.039	38.874	37.774	594
113150	14H	Voluntad	85.920	71.608	35.414	32.059	31.297	648
115240	15H	Restricción	65.777	59.380	30.436	27.899	27.229	608
115259	16H	Restricción	57.120	50.746	25.003	22.815	22.411	601
115162	17H	Restricción	78.863	71.192	32.945	30.133	29.419	645
115124	18H	Voluntad	98.913	87.058	42.798	39.261	38.260	645
115279	19H	Voluntad	156.229	135.906	69.397	63.498	61.727	770
115280	20H	Voluntad	148.880	127.016	63.949	58.310	56.716	787
115379	21H	Voluntad	201.265	159.048	78.147	71.155	69.409	816
113238	22H	Voluntad	186.912	158.860	78.477	71.697	69.774	763
113115	23H	Restricción	117.032	105.035	53.860	48.946	47.741	686
113198	24H	Restricción	106.587	95.064	46.222	42.153	41.113	734
TOTAL	-	-	2.906.737	2.509.933	1.266.063	1.161.793	1.131.053	1.823
Promedio	-	-	121.114	104.580,5	52.752,63	48.408,04	47.127,21	672,83
Desv. Típica	-	-	40.259,88	33.138,82	16.834,29	15.992,5	15.563,32	121,79

Tabla 11. Comparativa de los resultados de diversos estudios de secuenciación del gen 16S rRNA en diferentes especies y los resultados del presente estudio.

Referencia del estudio	Zeng y col., 2015	Han y col., 2016	Glendinning y col., 2016	Correa-Fiz y col., 2016	Wang y col., 2016	Presente estudio
Especie	Conejo	Pollo	Oveja	Cerdo	Cabra	Conejo
Población microbiana	Gastrointestinal	Gastrointestinal	Pulmonar	Nasal	Ruminal	Gastrointestinal
Nº muestras/ Nº animales	40/20	60/20	18/6	10/10	55/55	48/24
Región del gen 16S rRNA secuenciada	V4	V4	V2-V3	V3-V4	V3-V4	V4-V5
Kit extracción DNA	PowerFecal™ DNA Isolation kit (MO BIO Laboratories, Carsbad, CA, USA)	NucleoSpin®Soil kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemania)	PowerSoil™ DNA Isolation kit (MO BIO Laboratories, Carsbad, CA, USA)	NucleoSpin®Blood kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemania)	TIANamp DNA Isolation kit (Tiangen Biotech, Beijing, China)	Soil Microbe DNA MiniPrep™ (Zymo Research, CA, USA)
Software empleados	Mothur / QIIME	QIIME	Mothur	QIIME	Mothur / QIIME	QIIME
Nº total de contigs filtrados	2.078.821	950.771	-	4.204.803	2.138.084	2.191.182
Promedio y desviación típica de contigs filtrados por muestra	51.970	16.115 ± 6.460	205.625 ± 27.232	232.807 (rango 7.338-844.521)	-	45.732 ± 19.184,95
Nº total de OTU no <i>singletons</i>	60.783	-	925	-	79.728	1.823
Promedio de OTU por muestra	6.904	-	-	1.603 (muestra con el máximo nº de OTU)	-	658 ± 123,93

5.2. Resultados de los diferentes análisis de diversidad microbiana

Las **figuras 11, 12 y 13** muestran las curvas de rarefacción obtenidas para los índices de diversidad Chao 1, número de OTUs observados y PD Whole Tree. Estas curvas se presentan para la combinación del origen de la muestra (heces/ciego) y el régimen alimentario al que estuvo sometido el animal del que procede la muestra (voluntad/restricción).

El resultado más relevante que se observa es la ausencia de diferencias en términos de diversidad entre los cuatro niveles diferentes de la combinación estudiada. Como se puede apreciar en la curva de rarefacción generada para la combinación Restricción-Ciego (RC) (**figuras 11, 12 y 13**), el valor máximo se sitúa en torno a 12.000 contigs, que es el mínimo número de contigs presente en todas las muestras. Este valor es por tanto el número máximo de contigs al que computar las curvas de rarefacción y el que se ha utilizado para comparar la diversidad entre los distintos niveles de la combinación origen-régimen alimentario.

Analizando las curvas de rarefacción, se aprecia que las barras de error son notablemente más grandes para las muestras obtenidas de animales alimentados bajo restricción que para animales alimentados a voluntad. Un análisis detallado de las **tablas 9 y 10** permite detectar dos animales (IDs: 113063 y 115334), ambos alimentados en el régimen de restricción, para los que tanto sus muestras de heces como de ciego contienen un número particularmente bajo de OTUs. Este desequilibrio provoca que la variabilidad se vea incrementada en el muestreo realizado para generar las curvas de rarefacción. De hecho, cuando los análisis se han repetido excluyendo estas muestras se observó el mismo error en todos los niveles de la combinación.

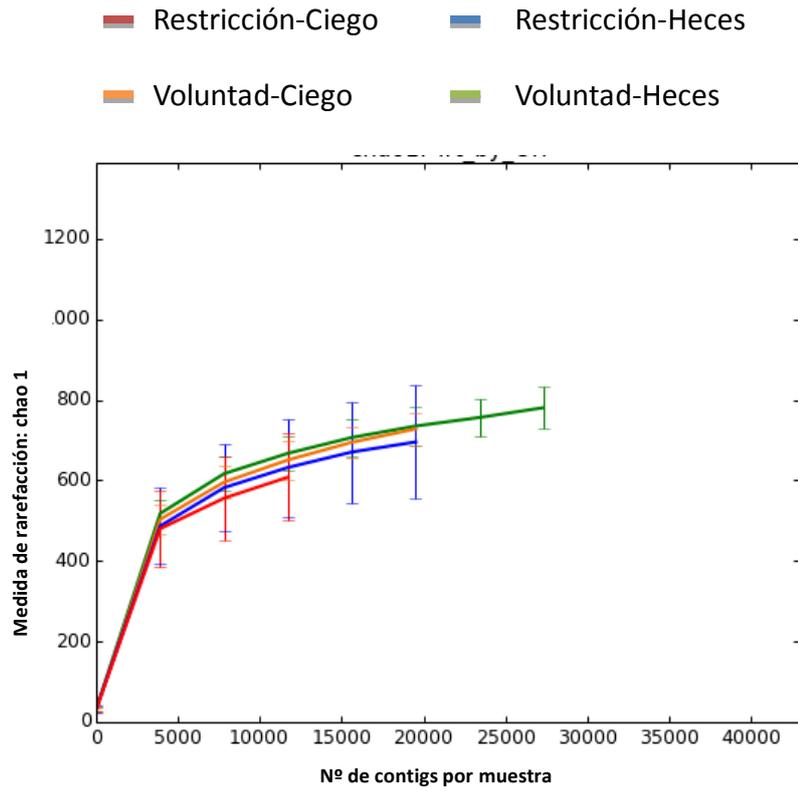


Figura 11. Curva de rarefacción generada para el índice Chao 1.

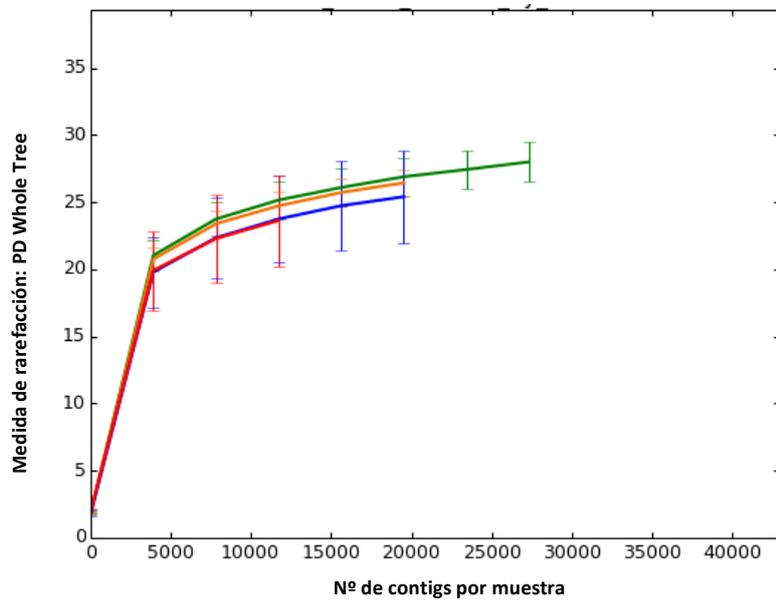


Figura 12. Curva de rarefacción generada para el índice PD Whole Tree.

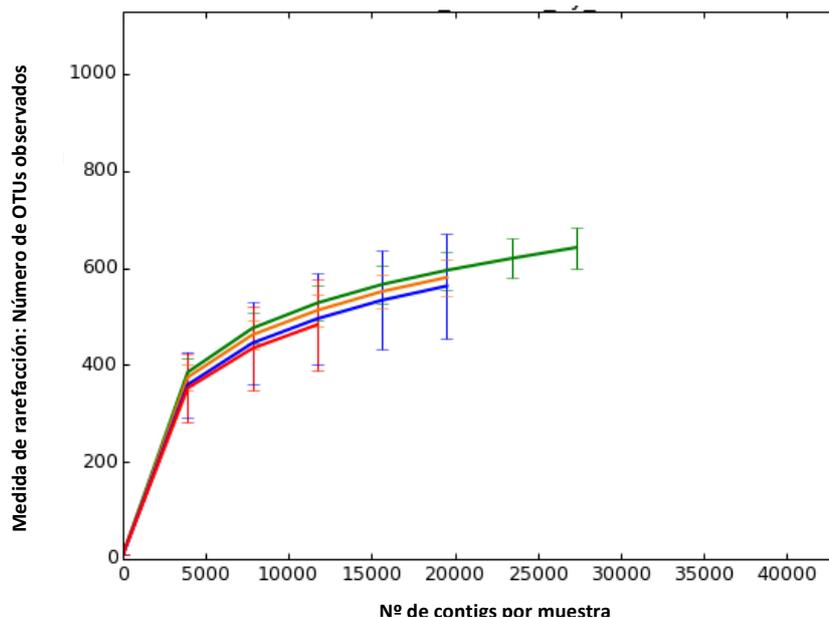


Figura 13. Curva de rarefacción generada para el índice número de OTUs observados.

Para el índice número de OTUs observados, en la **tabla 12** y las **figuras 13 y 14**, se presenta la comparación entre los cuatro niveles de la combinación a un nivel de rarefacción de 11.719 contigs, el número contigs más bajo que se ha observado entre las muestras.

Tabla 12. Comparación del índice número de OTUs observados para los cuatro niveles de la combinación origen/régimen alimentario.

Grupo 1	Grupo 2	Media grupo 1	Desv. típica grupo 1	Media grupo 2	Desv. típica grupo 2	Estadístico t	p-valor
VH	VC	527,66	37,03	512,45	34,29	0,95	1,0
VH	RC	527,66	37,03	482,93	94,15	1,41	1,0
VC	RC	512,45	34,29	482,93	94,15	0,94	1,0
RH	RC	495,25	94,62	482,93	94,15	0,31	1,0
VC	RH	512,45	34,29	495,25	94,62	0,55	1,0
VH	RH	527,66	37,03	495,25	94,62	1,02	1,0

Se puede apreciar que el número promedio de OTUs observados por muestra es ligeramente superior a 500 y que, como ya se ha indicado, no hay diferencias significativas entre los diferentes niveles de la combinación analizada.

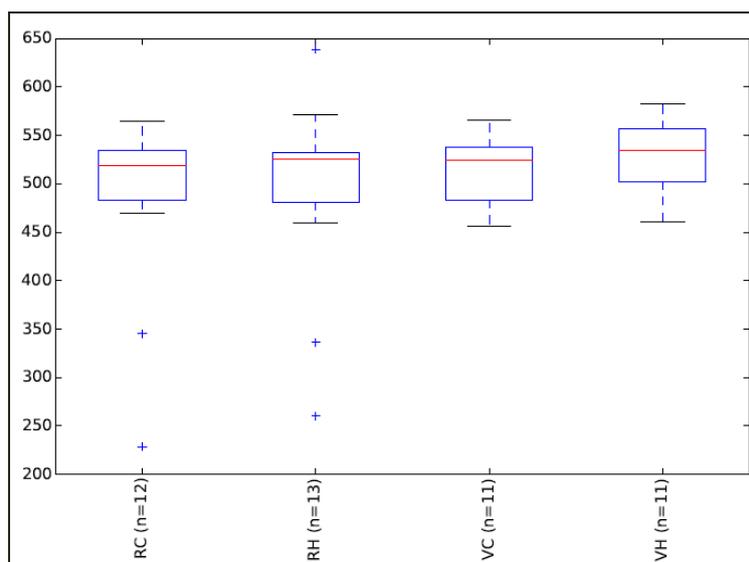


Figura 14. Diagrama de caja del número de OTUs observados para los cuatro niveles de la combinación origen/régimen alimentario.

En un estudio en el que caracterizaron la microbiota cecal y fecal de un grupo de conejos Rex con peso corporal alto y de otro grupo con peso corporal bajo (Zeng y col., 2015), encontraron que el número de OTUs observados y estimados (Chao 1) era significativamente mayor ($p < 0,001$) en las heces pertenecientes a conejos de bajo peso corporal que en las heces de conejos de elevado peso. No encontraron diferencias significativas en los índices de diversidad entre animales de alto y bajo peso cuando las muestras procedían del ciego. Cuando compararon los índices de diversidad para el origen de las muestras (ciego o heces), no encontraron diferencias significativas en diversidad ni riqueza (Chao 1 y número de OTUs observados). En nuestro estudio, el peso vivo de los animales en el momento de la recogida de muestras era menor en los animales racionados debido, como es lógico, a su menor ingestión de pienso. En el análisis anterior, el efecto del racionamiento podría estar confundido con el del peso de los animales que encuentran estos autores.

En un estudio en pollos (Han y col., 2016) en el que caracterizaron la diversidad microbiana utilizando el índice número de OTUs observados en tres compartimentos diferentes (buche, íleon y ciego), determinaron la máxima diversidad en el ciego y la mínima diversidad en el íleon. De manera similar a lo observado en nuestro estudio, también en conejos, Michelland y col. (2011), utilizando la técnica CE-SSCP de perfiles de fragmentos del gen 16S rRNA, no observaron diferencias en el índice de diversidad de las comunidades bacterianas del ciego y de las heces blandas o duras de conejos adultos.

5.3. Análisis multivariante de la composición

La **figura 15** muestra los resultados del PCoA en los que se exploran y visualizan las diferencias entre las muestras a partir de la matriz de distancias filogenéticas UniFrac ponderada, asignando a cada muestra una posición en un gráfico tridimensional. Con distintos colores se representan los niveles de la combinación entre dieta y origen de las muestras.

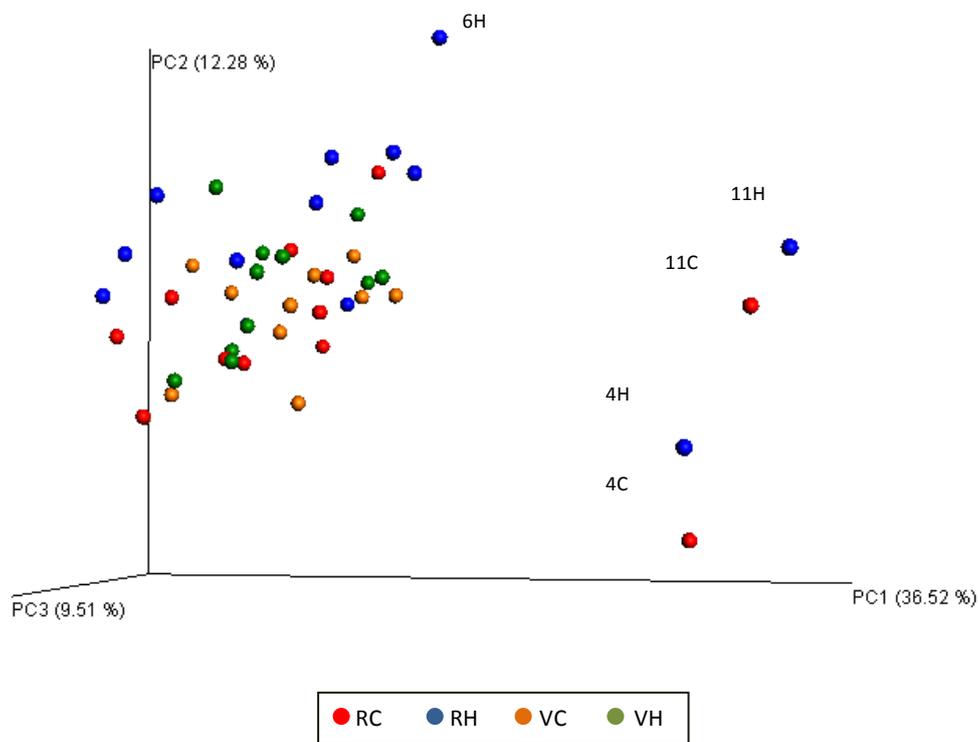


Figura 15. PCoA, construido a partir de la matriz de distancias UniFrac, que representa las muestras del estudio con diferentes colores en función de la combinación dieta/origen: Restricción-Ciego (RC), Restricción-Heces (RH), Voluntad-Ciego (VC) o Voluntad-Heces

Si en este mismo análisis se presentan los resultados separando las muestras en función del tratamiento u origen, los gráficos generados son los de la **figura 16**.

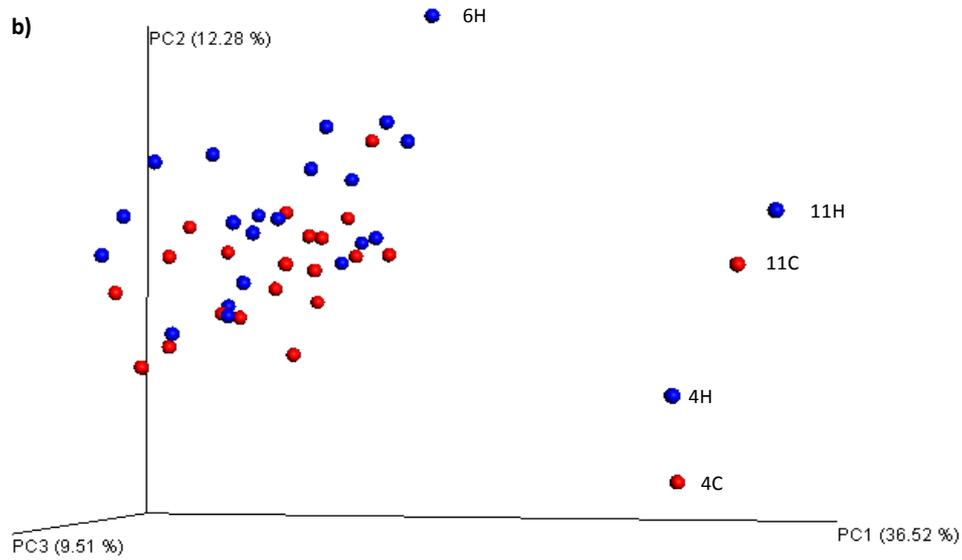
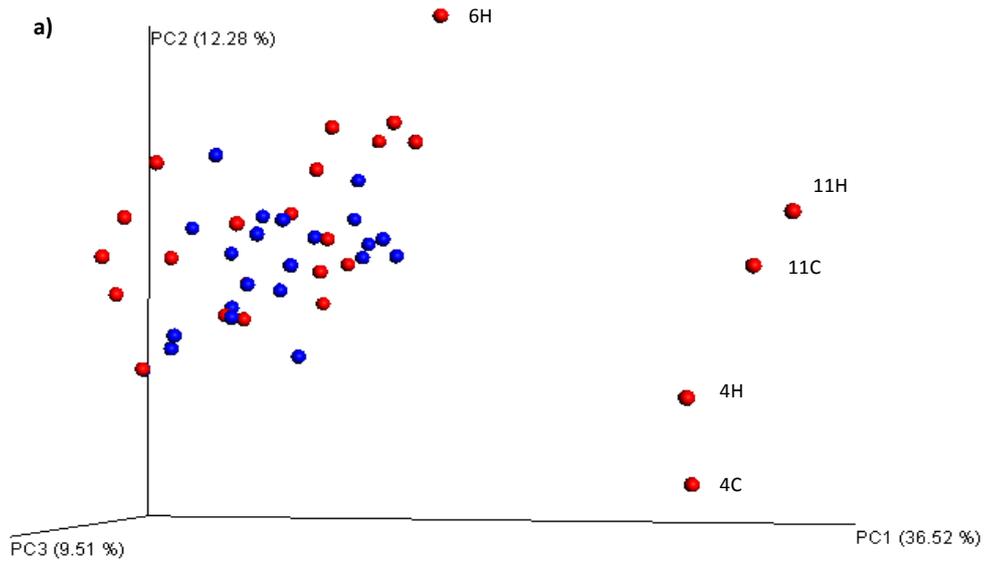


Figura 16. a) PCoA que representa las muestras del estudio con diferentes colores en función de la dieta a la que estuvo sometido el animal (restricción o voluntad). **b)** PCoA que representa las muestras del estudio con diferentes colores en función del origen de la muestra (ciego o heces).

No se aprecia ningún patrón claro de separación entre los 4 niveles de la combinación (**figura 15**), ni tampoco entre tratamiento u origen (**figura 16**). Lo más relevante de estas figuras son las 5 muestras señaladas en la **figura 15** que sí parecen separarse del resto. La muestra 6H fue la que presentó un mayor número de OTUs diferentes (1.012), cuando el promedio está en torno a 500, se trata de una muestra de origen fecal procedente de un animal alimentado bajo restricción. Su correspondiente muestra de ciego (6C), aunque no presentó un valor tan extremo, también tuvo un valor alto de número de OTUs observados (721). Las otras 4 muestras resaltadas, las respectivas de heces y ciego de dos animales, son las que tuvieron una menor cantidad de OTUs. Uno de estos animales fue el único animal del estudio diagnosticado (por los técnicos de la granja) con enteropatía mucoide durante el período de engorde aunque terminó el cebo sin morir con un peso a los 66 días de 1.750 gramos. No se apreciaron signos de enfermedad en el otro animal y terminó el cebo con un peso de 2.045 gramos; por lo tanto no se puede afirmar que la separación observada con el PCoA de estas muestras se pueda atribuir a problemas entéricos pero, del mismo modo, tampoco se puede descartar pues en estudios previos (Bäuerl y col., 2014) se ha demostrado que la microbiota de conejos afectados por enteropatía experimenta cambios radicales caracterizados por una disminución de la diversidad.

Relacionado con esta última anotación, en un estudio sobre enteropatía epizootica en conejo (Bäuerl y col., 2014) caracterizaron las comunidades microbianas del tracto gastrointestinal de tres grupos de conejos (enfermos, sanos y sanos pretratados con antibióticos). En el PCoA que realizaron se separan claramente las muestras pertenecientes a conejos enfermos de las muestras correspondientes a los dos grupos de animales sanos indicando que la microbiota de los animales afectados es completamente distinta y que la microbiota de los individuos sanos, con o sin tratamiento antibiótico, no parece ser significativamente diferente.

Cuando se repitieron los mismos análisis PCoA excluyendo las 4 muestras cuya posición se situaba más alejada del resto en el gráfico tridimensional, siguió sin apreciarse ningún patrón claro de separación entre las muestras en función del tratamiento o la combinación de tratamiento y origen, aunque sí se pudo intuir una cierta distribución organizada de las muestras en función del origen atendiendo a la segunda coordenada principal (**figura 17**). Michelland y col. (2011) tampoco detectaron diferencias claras entre la composición de las heces duras, de las heces blandas y del contenido cecal de conejos. De modo que estos autores recomiendan, por su mejor manejo, el uso de las heces en experimentos en los que se realice un seguimiento de las comunidades microbianas a lo largo del tiempo.

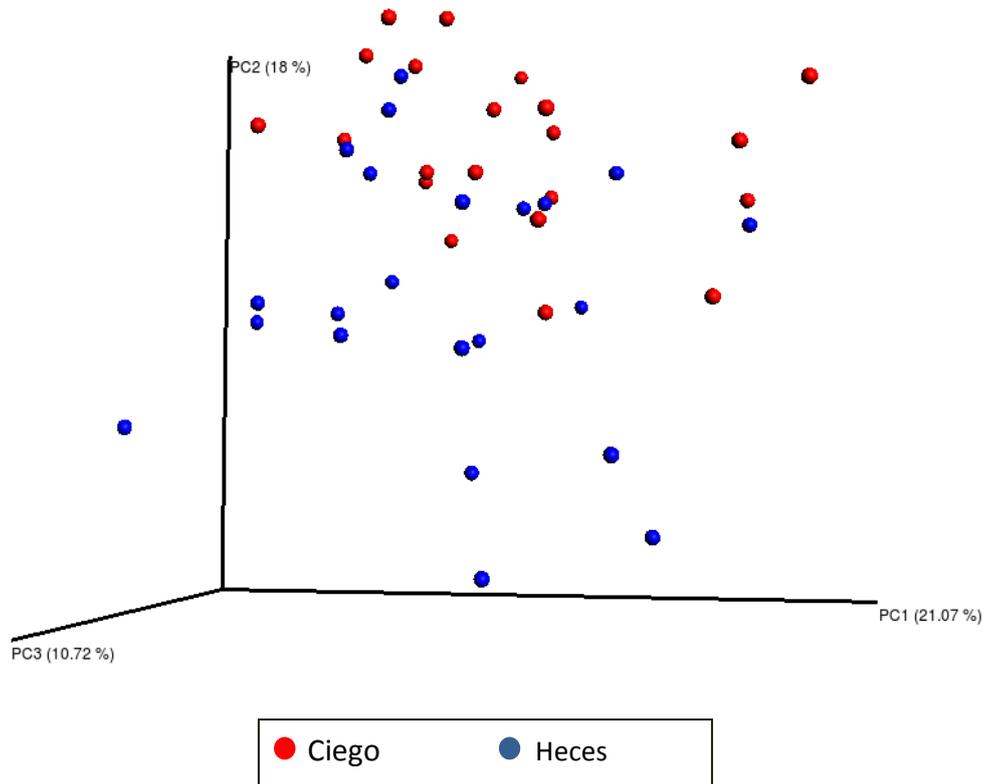


Figura 17. PCoA que representa las muestras del estudio, excluyendo las 4 muestras atípicas, con diferentes colores en función del origen de la muestra (ciego o heces).

5.4. Caracterización taxonómica en función del origen (heces/ciego) de la muestra

La agrupación en diferentes niveles taxonómicos (filo y familia) de los 1.823 OTUs no *singletons* identificados en las 47 muestras del estudio (23 muestras procedentes de contenido cecal y 24 muestras de contenido fecal) mostró los resultados que se resumen a continuación.

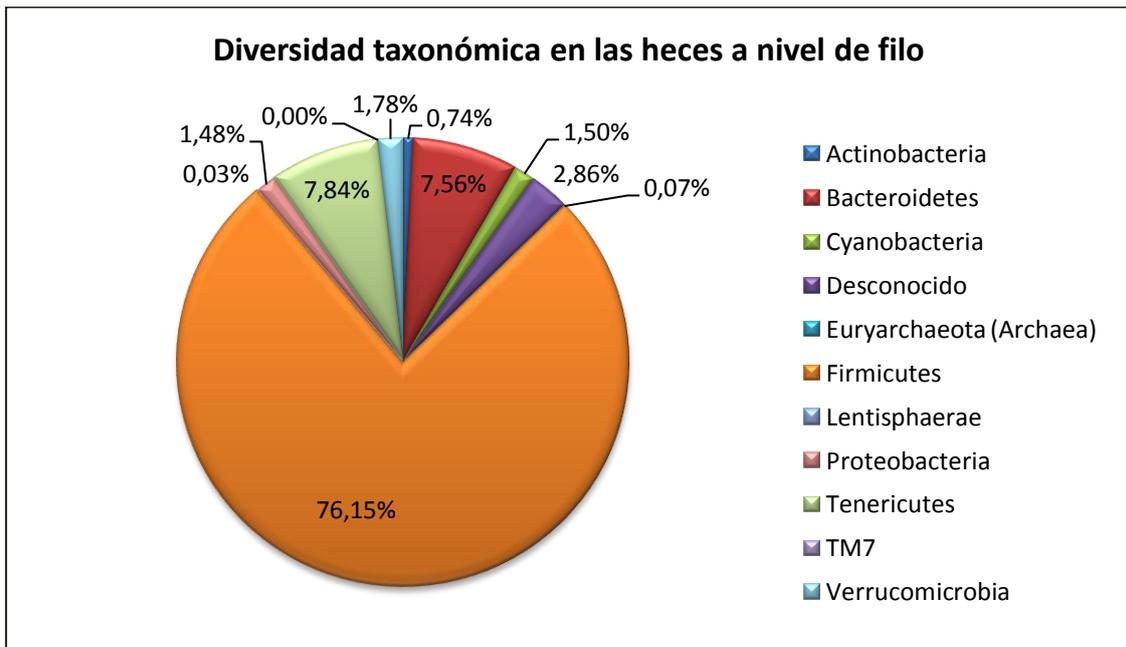


Figura 18. Diversidad taxonómica a nivel de filo en las muestras fecales.

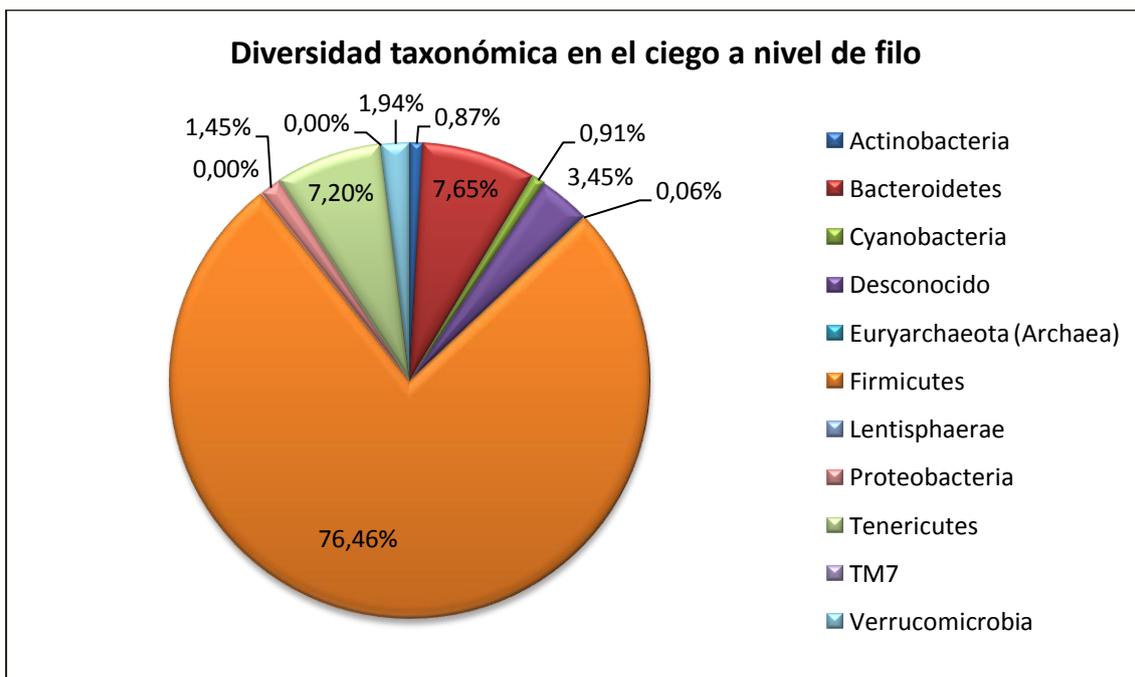


Figura 19. Diversidad taxonómica a nivel de filo en las muestras cecales.

Los dos tipos de muestras presentan, para cada filo, abundancias relativas similares y en ambas predominan tres filos bacterianos que en su conjunto suponen el 90% de la cantidad total de bacterias a este nivel taxonómico. El filo predominante es *Firmicutes* (presente en un porcentaje medio de 76,15% en las heces y en un 76,46% en el ciego), seguido de *Bacteroidetes* (7,56% en heces y 7,65% en ciego) y *Tenericutes* (7,84% en heces y 7,20% en ciego). El único filo perteneciente al reino *Archaea* identificado fue *Euryarchaeota*; presente en un 0,65 ‰ tanto en las muestras de ciego como de heces (**Figuras 18 y 19**).

Tanto en muestras de origen cecal como fecal, dentro del filo *Bacteroidetes*, la clase de bacteria más abundante es *Bacteroidia* (99,98%) y dentro de ella sólo está presente el orden *Bacteroidales* (100%). Dentro de este orden la diversidad bacteriana aumenta a nivel taxonómico de familia pues incluye como familias más abundantes a *Bacteroidaceae*, *Rikenellaceae* y *S24-7*. No se encontraron diferencias relevantes en términos de abundancia para ninguna familia del orden *Bacteroidales* entre las muestras de ciego y heces (**Figura 20**).

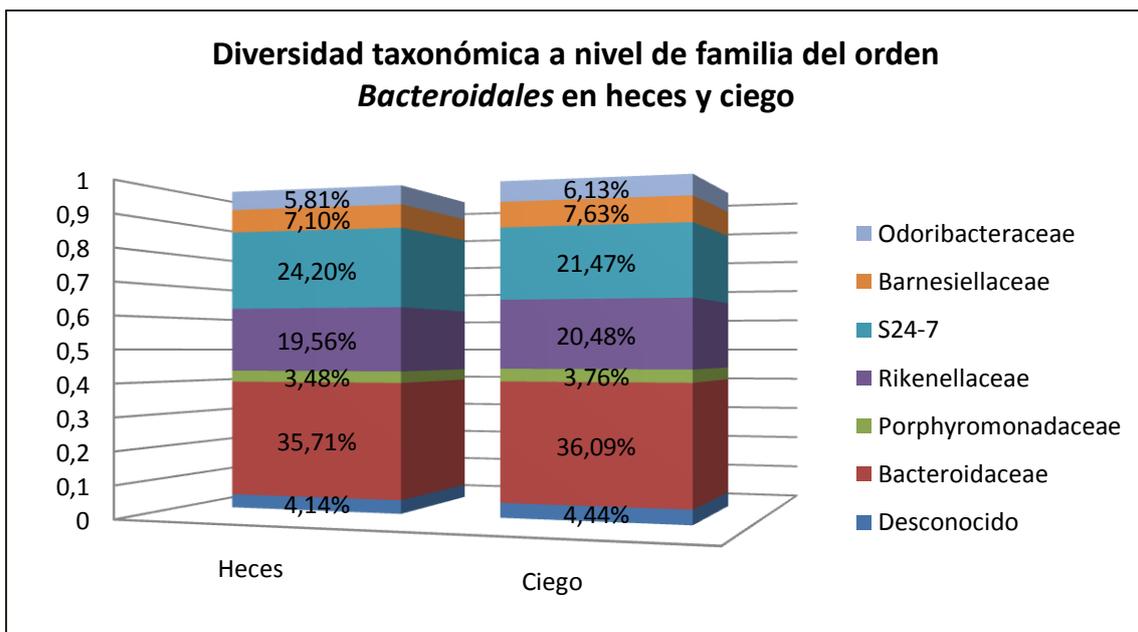


Figura 20. Diversidad taxonómica a nivel de familia del orden *Bacteroidales* en muestras de heces y ciego.

Tanto en muestras de origen cecal como fecal, dentro del filo *Firmicutes*, la clase más abundante es *Clostridia* (99,19%) y dentro de ella el orden mayoritario es *Clostridiales* (99,96%), dentro del cual, la diversidad bacteriana aumenta a nivel de familia. Aunque a este nivel un porcentaje muy elevado de OTUs (44,22% en muestras fecales y 44,47% en muestras cecales) no pudo ser clasificado taxonómicamente y se asignaron a la categoría “Desconocido”, las diferencias existentes en la abundancia relativa de las familias predominantes (*Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae*) en el ciego respecto a las heces son casi nulas (**Figura 21**).

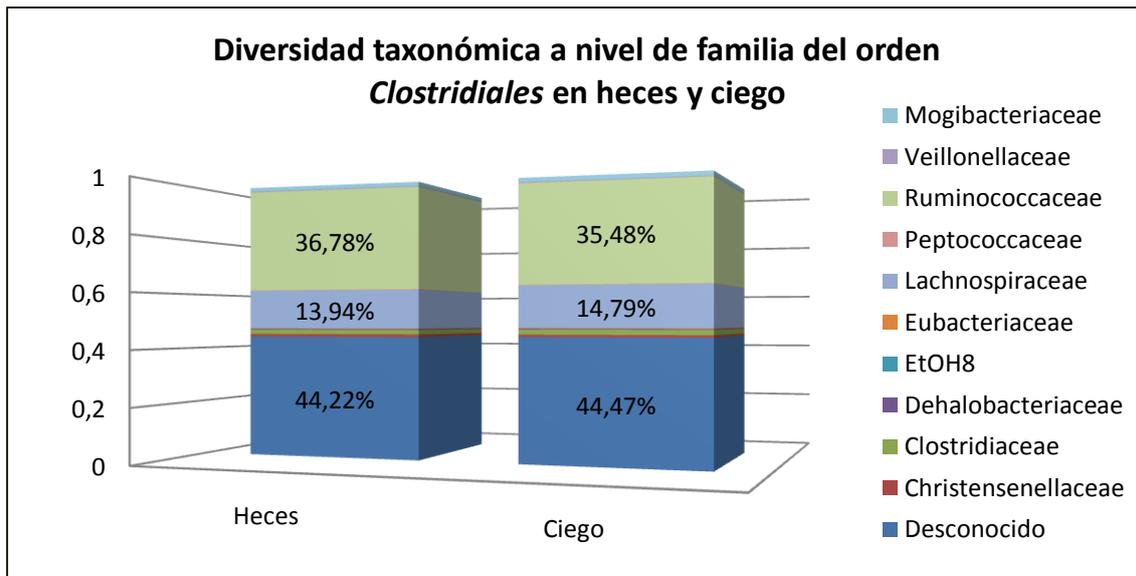


Figura 21. Diversidad taxonómica a nivel de familia del orden Clostridiales en muestras de heces y ciego.

En el filo *Tenericutes*, la clase más abundante tanto en muestras cecales como fecales es *Mollicutes* (96,76%). Dentro de esta clase se identificaron los órdenes *RF39* y *Anaeroplasmatales*; siendo *RF39* (presente en un porcentaje medio de 96,70% en las heces y en un 95,77% en el ciego) el orden mayoritario (**Figura 22**). Con los datos disponibles no fue posible la clasificación de los OTUs a nivel de familia dentro del orden *RF39*.

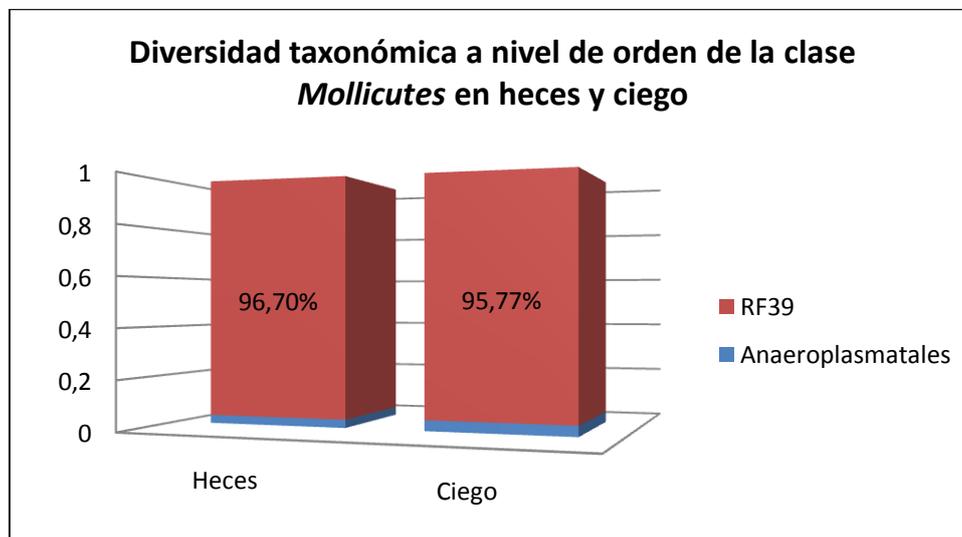


Figura 22. Diversidad taxonómica a nivel de orden de la clase Mollicutes en muestras de heces y ciego.

Los resultados obtenidos guardan cierta coherencia con los de trabajos previos que caracterizaron la microbiota gastrointestinal del conejo. La mayoría de bacterias se engloban dentro de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* aunque en nuestro estudio el porcentaje de bacterias del primero, alrededor de un 76%, es menor que el encontrado en los otros estudios que indican que un 90% de especies pertenecen al filo *Firmicutes* (Abecia y col., 2005; Monteils y col., 2008). Por otro lado, en nuestro

estudio el porcentaje estimado de bacterias pertenecientes al filo *Bacteroidetes* fue de un 7%, lo que supone casi el doble de las bacterias de esta especie que se detectaron en estudios anteriores. En concordancia con los resultados de Massip y col., (2012) también encontramos que las familias predominantes dentro del filo *Firmicutes* son *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae*. En nuestro estudio, se ha encontrado una sobrerrepresentación del filo *Tenericutes* con respecto al resto de trabajos previos de caracterización de la microbiota gastrointestinal en conejos. La abundancia del filo *Tenericutes* en nuestro estudio se sitúa en el mismo rango porcentual que el filo *Bacteroidetes* cuando lo habitual era encontrar *Actinobacteria* como el tercer filo más abundante. Una hipótesis es que el par de cebadores empleado en nuestro estudio presente una mejor hibridación para las secuencias bacterianas pertenecientes a este filo que otros cebadores. También hay que señalar que algunas bacterias ahora englobadas en el filo *Tenericutes* antes se clasificaban dentro del filo *Firmicutes*.

Las únicas *Archaea*, presentes en un porcentaje inferior al 1‰ tanto en las muestras de ciego como de heces, detectadas pertenecen al género *Methanobrevibacter* que engloba diferentes especies anaerobias estrictas metanógenas de tipo hidrogenótrofo productoras de metano mediante la reducción de dióxido de carbono con hidrógeno. Es frecuente encontrar este género de *Archaea* en el intestino de muchos organismos, entre ellos el conejo, como se reporta en el estudio de Kusar y Avgustin (2010).

En la **tabla 13** se presentan los resultados del estudio del efecto del origen de la muestra, el tipo de alimentación a la que se sometió el animal y la interacción entre ambos para los distintos filos. Como se puede ver, el único filo para el que el efecto principal del origen de la muestra fue significativo ($p_{\text{valor}}_{\text{FDR}} < 0,05$) es el de las *Cyanobacteria*.

Tabla 13. Efectos del origen de la muestra, tratamiento y combinación de ambos sobre la composición, expresada en porcentaje, de los distintos filos.

Filo	Promedio	C-H	V-R	(V-R,C)-(V-R,H)
Desconocido	3,12(0,11)	0,53(0,22)	0,45(0,22)	-0,27(0,45)
Euryarchaeota (Archaea)	0,07(0,02)	-0,01(0,03)	-0,01(0,03)	0,01(0,06)
Actinobacteria	0,80(0,03)	0,11(0,06)	0,16(0,06)	-0,03(0,13)
Bacteroidetes	7,77(0,43)	0,18(0,87)	-1,30(0,87)	0,04(1,74)
Cyanobacteria	1,20(0,07)	-0,55(0,14)*	-0,55(0,14)*	0,38(0,28)
Firmicutes	76,27(0,30)	0,22(0,60)	1,68(0,60)*	-0,92(1,21)
Lentisphaerae	0,01(0,00)	-0,02(0,01)	0,01(0,01)	-0,02(0,02)
Proteobacteria	1,50(0,08)	0,01(0,15)	-0,18(0,15)	-0,03(0,31)
TM7	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,01(0,00)
Tenericutes	7,39(0,27)	-0,63(0,54)	-0,09(0,54)	0,88(1,08)
Verrucomicrobia	1,87(0,06)	0,16(0,12)	-0,17(0,12)	-0,05(0,24)

C-H: contraste de la diferencia entre las muestras procedentes de ciego y las de heces; V-R: contraste de la diferencia entre las muestras procedentes de animales alimentados a voluntad y bajo restricción; (V-R,C)-(V-R,H): contraste de la diferencia entre las muestras de origen cecal y las muestras de origen fecal en función de la dieta que recibieron los animales. *Diferencias significativas asociadas a un $p_{\text{valor}}_{\text{FDR}} < 0,05$.

Cuando se repitió el mismo tipo de análisis a nivel de familia únicamente se detectó una diferencia significativa entre los orígenes de las muestras correspondientes a una familia desconocida perteneciente al orden YS2, dentro del filo *Cyanobacteria*. Las muestras procedentes de ciego contenían 0,55 puntos porcentuales menos bacterias de esta familia desconocida que las muestras procedentes de heces. Este valor coincide con la diferencia observada a nivel de filo, lo que indica que todas las *Cyanobacteria* detectadas como tales pertenecen a esta familia desconocida del orden YS2.

El mismo tipo de análisis realizado a nivel de OTU mostró que no hay diferencias significativas entre la procedencia de las muestras (heces o ciego) para ninguno de los 1.823 OTUs definidos.

El hecho de haber detectado bacterias pertenecientes al filo *Cyanobacteria* en nuestras muestras nos hizo inicialmente pensar que pudiera ser consecuencia de una contaminación producida en la recogida de las muestras ya que asumimos que las *Cyanobacteria* tienen un metabolismo fotosintético, que no podría llevarse a cabo en el interior del aparato digestivo. Sin embargo, en el trabajo anteriormente mencionado en el que se caracteriza la microbiota cecal y fecal en dos grupos de conejos Rex (Zeng y col., 2015) también detectaron una sobrerrepresentación del orden YS2 en las heces de animales de elevado peso. Parece ser que, según un estudio reciente (Di Rienzi y col., 2013), el orden YS2 realmente no tiene capacidad fotosintética y actualmente se clasifica en un nuevo filo llamado *Melainobacteria*. Los análisis metabólicos del orden YS2 pusieron de manifiesto que estas bacterias son fermentadoras anaerobias estrictas y tienen capacidad de producir hidrógeno, fijar nitrógeno y sintetizar vitaminas B y K (Di Rienzi y col., 2013).

Caracterización taxonómica en función del origen excluyendo las 4 muestras atípicas

Al repetir estos análisis descartando las muestras que se han comentado previamente que pudieran ser problemáticas se observaron diferencias notorias con respecto a lo hasta ahora descrito incluyendo estas 4 muestras que parecen atípicas (**tabla 14**).

En esta ocasión, el efecto del origen de la muestra resultó significativo para los filios *Cyanobacteria* y *Actinobacteria*. Se detectaron diferencias significativas en cinco familias al repetir el mismo tipo de análisis a este nivel taxonómico. Dos de estas familias, *Lachnospiraceae* y *Clostridiaceae*, pertenecen al filo *Firmicutes* y son 1,04 y 0,19 puntos porcentuales respectivamente más abundantes en las muestras de ciego que en las de heces. Las muestras de ciego contienen 0,07 puntos porcentuales más bacterias de la familia *Coriobacteriaceae*, perteneciente al filo *Actinobacteria*, que las muestras de heces. Una familia desconocida clasificada dentro del filo *Proteobacteria* resultó 0,04 puntos porcentuales más abundante en las muestras de ciego.

Finalmente, también se detectó como significativa la diferencia entre el origen de las muestras en la familia desconocida del orden YS2 que resultó 0,48 puntos porcentuales más abundante en las muestras de heces.

Tabla 14. Efectos del origen de la muestra, tratamiento y combinación de ambos sobre la composición, expresada en porcentaje, de los distintos filos (excluyendo del análisis las 4 muestras atípicas).

Filo	Promedio	C-H	V-R	(V-R,C)-(V-R,H)
Desconocido	2,65(0,07)	0,43(0,13)*	0,21(0,13)	-0,38(0,27)
Euryarchaeota (Archaea)	0,06(0,01)	0,00(0,03)	0,01(0,03)	0,01(0,05)
Actinobacteria	0,46(0,01)	0,07(0,02)*	0,04(0,02)	-0,02(0,04)
Bacteroidetes	7,33(0,20)	0,11(0,41)	0,04(0,41)	0,20(0,82)
Cyanobacteria	1,15(0,07)	-0,48(0,14)*	-0,53(0,14)*	0,34(0,27)
Firmicutes	77,26(0,27)	0,39(0,54)	1,08(0,54)	-1,10(1,07)
Lentisphaerae	0,01(0,00)	-0,02(0,01)	0,02(0,01)	-0,02(0,02)
Proteobacteria	1,57(0,05)	0,05(0,10)	0,05(0,10)	-0,06(0,20)
TM7	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,01(0,01)
Tenericutes	7,91(0,14)	-0,64(0,29)	-0,82(0,29)*	1,01(0,58)
Verrucomicrobia	1,60(0,05)	0,10(0,10)	-0,10(0,10)	0,01(0,20)

C-H: contraste de la diferencia entre las muestras procedentes de ciego y las de heces; V-R: contraste de la diferencia entre las muestras procedentes de animales alimentados a voluntad y bajo restricción; (V-R,C)-(V-R,H): contraste de la diferencia entre las muestras de origen cecal y las muestras de origen fecal en función de la dieta que recibieron los animales. *Diferencias significativas asociadas a un $p_{\text{valor}_{\text{FDR}}} < 0.05$.

El análisis del efecto del origen de la muestra sobre los distintos OTU detectó diferencias significativas entre ciego y heces para 7 OTUs; 4 de ellos pertenecientes al orden *Clostridiales* del filo *Firmicutes*, 2 al orden YS2 del filo *Cyanobacteria* y 1 correspondiente al filo *Actinobacteria* (tabla 15).

Tabla 15. Efecto del origen de la muestra sobre la composición, expresada en unidades taxonómicas normalizadas, a nivel de OTU. Se muestran los 7 OTUs en los que se encontró un efecto significativo (excluyendo del análisis las 4 muestras atípicas)

ID OTU	Asignación de OTU a nivel de familia	Promedio	C-H	$p_{\text{valor}_{\text{FDR}}}$
N.R. OTU 251	Ruminococcaceae	3,66(0,29)	-2,50(0,59)	0,0376
N.R. OTU 332	Ruminococcaceae	3,16(0,28)	-2,43(0,56)	0,0376
581388	Desconocida (orden YS2)	4,50(0,21)	-2,23(0,42)	0,0020
550894	Desconocida (orden YS2)	4,29(0,24)	-1,90(0,47)	0,0499
N.R. OTU 140	Desconocida (orden Clostridiales)	5,31(0,10)	1,65(0,21)	0,0000
298149	Desconocida (orden Clostridiales)	0,65(0,09)	0,84(0,19)	0,0242
N.R. OTU 333	Coriobacteriaceae	4,92(0,09)	0,95(0,17)	0,0014

N.R. OTU: nuevo OTU de referencia; C-H: contraste de la diferencia entre las muestras procedentes de ciego y las de heces.

Las muestras de origen cecal tienen una sobrerrepresentación del OTU asignado a la familia *Coriobacteriaceae* y de los dos OTUs de familia desconocida pertenecientes al orden *Clostridiales*. Consistentemente con los resultados de otro estudio en conejos (Zeng y col., 2015), las muestras de heces analizadas presentan una mayor cantidad de bacterias de la familia *Ruminococcaceae* y del orden YS2. En dicho

trabajo también encontraron una sobrerrepresentación del orden *Clostridiales* y de la familia *Coriobacteriaceae* en las muestras de origen cecal.

En el estudio en pollos de Han y col., (2016) en el que caracterizaron las comunidades microbianas de tres compartimentos del tracto gastrointestinal encontraron que los filos *Cyanobacteria* y *Proteobacteria* son más abundantes en el buche y que el filo *Firmicutes* se encuentra sobrerrepresentado en el íleon. A nivel de género, encontraron una sobrerrepresentación de *Faecalibacterium* (orden *Clostridiales*), *Ruminococcus* y *Bacteroides* en el ciego. Como ya se ha indicado, en el estudio en conejos adultos de Michelland y col. (2011) no se detectan diferencias en la composición microbiológica entre muestras de heces y ciego.

5.5. Caracterización taxonómica en función del régimen alimentario

Con respecto al efecto del régimen alimentario, en la **tabla 13** se pueden observar diferencias significativas en el contenido bacteriano de los filos *Cyanobacteria* y *Firmicutes*. Las muestras procedentes de animales alimentados a voluntad contienen 0,55 puntos porcentuales menos *Cyanobacteria* que los alimentados bajo restricción; y 1,68 puntos porcentuales más *Firmicutes*. En el análisis a nivel de familia, como el grupo de *Cyanobacteria* únicamente está representado por una familia desconocida del orden YS2 se vuelve a observar esta diferencia significativa, pero en este caso para ninguna de las familias pertenecientes al filo *Firmicutes* se aprecian diferencias significativas ($p_{\text{valor}_{\text{FDR}}} > 0,05$).

El análisis del efecto de la dieta sobre los distintos OTUs detectó diferencias significativas entre los regímenes alimentarios para 43 OTUs. Dos de estos OTUs no tienen asignación taxonómica, uno pertenece al filo *Cyanobacteria* (orden YS2), otro al filo *Proteobacteria* (género *Desulfovibrio*; las muestras pertenecientes a animales alimentados a voluntad tienen 3,26 unidades taxonómicas normalizadas más que las procedentes de animales alimentados bajo restricción, lo que supone un 73% de la media de este OTU). Dos de los OTUs para los que se observaron diferencias significativas pertenecen al filo *Actinobacteria* (familia *Coriobacteriaceae*) y otros dos al filo *Bacteroidetes* (familias *Rikenalleceae* y *Barnesiellaceae*). Por último, se encontraron diferencias significativas para 35 OTUs pertenecientes al filo *Firmicutes* (23 clasificados dentro del orden *Clostridiales* pero de familia desconocida, 4 de la familia *Ruminococcaceae*, 6 de la familia *Lachnospiraceae*, 1 de la familia *Christensenellaceae* y 1 de la familia *Clostridiaceae*). En la **tabla 16** se muestran los resultados para el contraste entre tratamientos de los 43 OTUs que resultaron significativos.

Tabla 16. Efecto del tratamiento alimentario sobre la composición, expresada en unidades taxonómicas normalizadas, a nivel de OTU. Se muestran los 43 OTUs en los que se encontró un efecto significativo.

ID OTU	Asignación de OTU a nivel de familia	Promedio	V-R	pvalor _{FDR}
288843	Barnesiellaceae	7,37(0,40)	2,83(0,79)	0,0424
348609	Christensenellaceae	2,51(0,23)	1,74(0,46)	0,0287
N.R. OTU 80	Clostridiaceae	2,24(0,29)	2,14(0,59)	0,0377
N.R. OTU260	Coriobacteriaceae	3,14(0,17)	1,44(0,33)	0,0143
N.R. OTU 212	Coriobacteriaceae	4,80(0,21)	1,51(0,42)	0,0424
798164	Desconocida (orden Clostridiales)	3,37(0,29)	2,89(0,58)	0,0062
N.R. OTU24	Desconocida (orden Clostridiales)	3,21(0,19)	1,93(0,38)	0,0062
299306	Desconocida (orden Clostridiales)	0,44(0,07)	0,63(0,14)	0,0095
849147	Desconocida (orden Clostridiales)	2,66(0,17)	1,54(0,33)	0,0095
279340	Desconocida (orden Clostridiales)	1,65(0,26)	2,34(0,52)	0,0114
N.R. OTU 257	Desconocida (orden Clostridiales)	3,13(0,18)	1,56(0,36)	0,0143
330792	Desconocida (orden Clostridiales)	2,74(0,22)	1,79(0,44)	0,0235
N.R. OTU 187	Desconocida (orden Clostridiales)	3,04(0,23)	1,83(0,46)	0,0235
308359	Desconocida (orden Clostridiales)	1,20(0,13)	1,01(0,26)	0,0256
576853	Desconocida (orden Clostridiales)	6,66(0,30)	2,39(0,60)	0,0256
N.R. OTU 54	Desconocida (orden Clostridiales)	3,88(0,18)	1,45(0,37)	0,0256
N.R. OTU 225	Desconocida (orden Clostridiales)	3,26(0,34)	2,68(0,68)	0,0258
584107	Desconocida (orden Clostridiales)	1,52(0,13)	1,04(0,27)	0,0263
N.R. OTU 38	Desconocida (orden Clostridiales)	3,89(0,27)	2,03(0,53)	0,0283
N.R. OTU 185	Desconocida (orden Clostridiales)	4,31(0,29)	2,16(0,57)	0,0287
N.R. OTU 332	Desconocida (orden Clostridiales)	4,12(0,36)	2,71(0,73)	0,0311
134365	Desconocida (orden Clostridiales)	0,48(0,13)	0,96(0,27)	0,0424
198331	Desconocida (orden Clostridiales)	0,79(0,10)	0,74(0,21)	0,0424
509675	Desconocida (orden Clostridiales)	0,17(0,05)	0,34(0,10)	0,0424
621649	Desconocida (orden Clostridiales)	9,08(0,37)	2,62(0,75)	0,0457
N.R. OTU 126	Desconocida (orden Clostridiales)	7,53(0,30)	2,09(0,59)	0,0457
4377150	Desconocida (orden Clostridiales)	2,03(0,23)	1,62(0,47)	0,0484
269386	Desconocida (orden YS2)	1,93(0,22)	-2,00(0,44)	0,0095
N.R. OTU 296	Desconocida	3,32(0,19)	1,85(0,38)	0,0062
N.R. OTU 310	Desconocida	3,64(0,18)	1,56(0,37)	0,0152
N.R. OTU 5	Desulfovibrionaceae	4,46(0,37)	3,26(0,75)	0,0143
N.R. OTU 201	Lachnospiraceae	3,87(0,20)	1,71(0,41)	0,0167
N.R. OTU 65	Lachnospiraceae	3,81(0,21)	1,74(0,43)	0,0235
N.R. OTU 97	Lachnospiraceae	2,42(0,19)	1,50(0,38)	0,0263
N.R. OTU 190	Lachnospiraceae	3,75(0,20)	1,53(0,41)	0,0311
N.R. OTU 245	Lachnospiraceae	4,27(0,20)	1,51(0,41)	0,0326
N.R. OTU 286	Lachnospiraceae	1,84(0,18)	1,29(0,36)	0,0425
N.R. OTU 123	Peptococcaceae	3,68(0,18)	1,37(0,36)	0,0283
N.R. OTU 269	Rikenellaceae	2,02(0,45)	3,48(0,90)	0,0282
N.R. OTU 25	Ruminococcaceae	0,81(0,13)	1,32(0,25)	0,0062
N.R. OTU 336	Ruminococcaceae	2,44(0,34)	2,90(0,67)	0,0143
327058	Ruminococcaceae	1,08(0,12)	0,92(0,24)	0,0282
321135	Ruminococcaceae	2,83(0,24)	1,85(0,48)	0,0283

N.R. OTU: nuevo OTU de referencia; V-R: contraste de la diferencia entre las muestras procedentes de animales alimentados a voluntad y animales alimentados bajo restricción.

Caracterización taxonómica en función del régimen alimentario excluyendo las 4 muestras atípicas

Al repetir todos estos análisis descartando las muestras que se han comentado previamente que pudieran ser problemáticas se obtuvieron resultados diferentes.

En esta ocasión, el efecto del régimen alimentario resultó significativo para los filos *Cyanobacteria* y *Tenericutes* (y no para *Firmicutes*). Los animales alimentados bajo restricción tienen 0,53 puntos porcentuales más *Cyanobacteria* (promedio 1,15 puntos porcentuales) y 0,82 puntos porcentuales más *Tenericutes* (promedio 7,91 puntos porcentuales) que los animales alimentados a voluntad. Cuando se repitió el mismo tipo de análisis a nivel de familia se detectaron dos diferencias significativas entre los tratamientos alimentarios correspondientes a una familia desconocida perteneciente al orden *YS2* (filo *Cyanobacteria*) -también señalada anteriormente- y a una familia desconocida del orden *RF39* (filo *Tenericutes*) que se ha encontrado de forma variable y en un rango parecido también en la microbiota intestinal humana (Lin et al., 2013) pero no se habían detectado diferencias significativas en este filo en estudios previos del microbioma intestinal de conejos. Las muestras de animales alimentados bajo restricción contienen 0,53 puntos porcentuales menos bacterias de esta familia desconocida perteneciente al orden *YS2* que las muestras procedentes de animales alimentados a voluntad. Este valor coincide con la diferencia observada a nivel de filo, lo que indica que todas las *Cyanobacteria* detectadas como tales pertenecen a esta familia desconocida del orden *YS2*. Las muestras de animales alimentados bajo restricción contienen 0,96 puntos porcentuales menos bacterias de la familia desconocida perteneciente al orden *RF39* que las muestras procedentes de animales alimentados a voluntad.

Por último, el análisis del efecto de la dieta sobre los distintos OTUs detectó diferencias significativas entre los regímenes alimentarios para 20 OTUs. Dos de estos OTU pertenecen al filo *Cyanobacteria* (orden *YS2*), otro al filo *Proteobacteria* (género *Desulfovibrio*) y dos al filo *Actinobacteria* (familia *Coriobacteriaceae*). Por último, se encontraron diferencias significativas para 15 OTUs pertenecientes al filo *Firmicutes* (9 clasificados dentro del orden *Clostridiales* pero de familia desconocida, 5 de la familia *Ruminococcaceae* y 1 de la familia *Lachnospiraceae*). En la **tabla 17** se muestran los resultados del modelo de efectos fijos para los 20 OTUs significativos.

Tabla 17. Efecto del tratamiento alimentario sobre la composición, expresada en unidades taxonómicas normalizadas, a nivel de OTU. Se muestran los 20 OTUs en los que se encontró un efecto significativo (excluyendo del análisis las 4 muestras atípicas)

ID OTU	Asignación de OTU a nivel de familia	Promedio	V-R	pvalor _{FDR}
N.R. OTU 333	Coriobacteriaceae	4,92(0,09)	0,79(0,17)	0,019877
N.R. OTU 287	Coriobacteriaceae	6,02(0,10)	0,85(0,21)	0,029280
621649	Desconocida (orden Clostridiales)	9,77(0,12)	1,30(0,24)	0,006224
299306	Desconocida (orden Clostridiales)	0,45(0,07)	0,62(0,15)	0,027019
576853	Desconocida (orden Clostridiales)	7,18(0,16)	1,41(0,32)	0,027019
798164	Desconocida (orden Clostridiales)	3,55(0,30)	2,57(0,61)	0,027019
N.R. OTU 52	Desconocida (orden Clostridiales)	4,18(0,11)	0,91(0,21)	0,027019
279340	Desconocida (orden Clostridiales)	1,64(0,28)	2,36(0,56)	0,027019
849147	Desconocida (orden Clostridiales)	2,84(0,15)	1,22(0,30)	0,027019
N.R. OTU 36	Desconocida (orden Clostridiales)	7,48(0,16)	1,25(0,31)	0,033853
584107	Desconocida (orden Clostridiales)	1,53(0,14)	1,04(0,28)	0,046057
269386	Desconocida (orden YS2)	4,50(0,21)	-2,00(0,42)	0,014953
581388	Desconocida (orden YS2)	1,81(0,23)	-1,75(0,46)	0,040449
N.R. OTU 183	Desulfovibrionaceae	4,64(0,39)	2,95(0,79)	0,046057
N.R. OTU 234	Lachnospiraceae	4,86(0,18)	1,39(0,36)	0,040449
563490	Ruminococcaceae	7,13(0,12)	1,11(0,23)	0,014953
N.R. OTU 112	Ruminococcaceae	8,97(0,07)	0,55(0,14)	0,033853
N.R. OTU 264	Ruminococcaceae	11,07(0,07)	0,52(0,13)	0,033853
538805	Ruminococcaceae	6,28(0,10)	0,79(0,20)	0,033853
N.R. OTU 50	Ruminococcaceae	3,06(0,12)	0,90(0,24)	0,046057

N.R. OTU: nuevo OTU de referencia; V-R: contraste de la diferencia entre las muestras procedentes de animales alimentados a voluntad y animales alimentados bajo restricción.

Como se puede apreciar en las **tablas 16 y 17**; donde se muestran los resultados del modelo de efectos fijos para los OTUs significativos en función del tratamiento alimentario teniendo en cuenta primero las 47 muestras y después excluyendo las 4 muestras mencionadas anteriormente como atípicas, los OTUs significativos en ambos análisis se asocian a la familia *Ruminococcaceae*, a la familia *Lachnospiraceae*, a familias desconocidas del orden *Clostridiales*, a familias desconocidas del orden *YS2*, a la familia *Coriobacteriaceae* y a la familia *Desulfovibrionaceae*. En ambos análisis, se observa que los animales alimentados a voluntad tienen una sobrerrepresentación de todos los OTUs que se muestran en las **tablas 16 y 17** con su correspondiente asignación taxonómica; a excepción de los OTUs clasificados dentro del orden *YS2* que están sobrerrepresentados en los animales alimentados bajo restricción.

En el análisis que tiene en cuenta las 47 muestras se detectan algunos OTUs significativos que no aparecen como tal cuando se repite el análisis excluyendo las 4 muestras atípicas: un OTU clasificado dentro de la familia *Barnesiellaceae*, un OTU asignado a la familia *Christensenellaceae*, un OTU de la familia *Clostridiaceae*, un OTU de la familia *Peptococcaceae*, 6 OTUs asignados a la familia *Lachnospiraceae* y un OTU clasificado como *Rikenellaceae*. Todos estos OTUs son más abundantes en las muestras procedentes de animales alimentados a voluntad.

En general son pocos los trabajos disponibles en la literatura con los que comparar nuestros resultados. Martignon y col (2010) no encuentran diferencias ni en el número de copias del gen 16S rRNA por gramo de contenido cecal ni en la estructura o en la diversidad de la comunidad bacteriana de gazapos sometidos a una restricción del 75% del consumo a voluntad y de los no racionados. Sin embargo, ellos utilizaron el método CE-SSCP para su estudio. Como señalan los mismos autores, la utilización de técnicas de secuenciación recientes, como la empleada por nosotros, podría conducir a resultados distintos que pudieran explicar el papel desempeñado por diferentes microorganismos en la tolerancia a patógenos digestivos y a la mayor eficiencia alimentaria de los animales alimentados bajo restricción.

Por otra parte, en un estudio en el que se comparan las microbiotas de dos grupos de conejos que fueron alimentados con diferentes dietas en base al contenido de fibra (Arrazuria y col., 2016) se observó que los conejos infectados por el patógeno *Mycobacterium avium* y que habían sido alimentados con una dieta de alto contenido en fibra, tenían una sobrerrepresentación de los géneros *Ruminococcus* y *Clostridium*. En el mismo trabajo encontraron una sobrerrepresentación de las familias *Coriobacteriaceae*, *Dehalobacteriaceae* y *Mogibacteriaceae* en animales alimentados con la dieta control e infectados por el patógeno. Nuestros resultados también muestran una sobrerrepresentación de la familia *Coriobacteriaceae* en los animales alimentados a voluntad, que sería equivalente a una dieta control, con mayor contenido energético que una dieta rica en fibra. Sin embargo para las familias del orden Clostridiales, que sería en el que se engloban los géneros *Ruminococcus* y *Clostridium*, apreciamos una tendencia contraria a la indicada por Arrazuria y col., (2016) ya que están sobrerrepresentadas en los animales alimentados a voluntad, y no en los alimentados en restricción que serían los equivalentes a los alimentados con una dieta enriquecida en fibra. Estas comparaciones entre resultados se han de hacer con precaución, pues ni la restricción es estrictamente equivalente al aumento de la proporción de fibra en la dieta, ni en nuestro experimento hemos sometido a los animales a una infección por *Mycobacterium avium*. De hecho, en este mismo estudio (Arrazuria y col., 2016), las comparaciones entre dietas para los animales no infectados no parecen mostrar diferencias en la composición taxonómica de las muestras de cecales.

En un estudio con ratones de 6 semanas de edad (Campbell y col., 2016) compararon las microbiotas fecales de 4 grupos de ratones establecidos en función de la combinación dieta recibida (normal o con alto contenido en grasa) y ejercicio realizado (activo o sedentario). Observaron una sobrerrepresentación del orden *Clostridiales* y de la especie comensal *Faecalibacterium prausnitzii* -que sintetiza butirato como producto final de la fermentación- en los grupos de ratones que practicaron ejercicio. Los ratones alimentados con la dieta normal presentaron una sobrerrepresentación de la familia *Lachnospiraceae*, aunque estos resultados son

difícilmente comparables a los nuestros, en nuestro estudio la familia *Lachnospiraceae* aparece sobrerrepresentada en las muestras de conejos alimentados a voluntad.

En el estudio de McCabe y col. (2015) se caracterizó la microbiota ruminal de dos grupos de vacas sometidos a dos regímenes distintos de alimentación (voluntad/restricción). En el grupo alimentado a voluntad encontraron un incremento de la abundancia relativa de la arquea *Methanobrevibacter gottschalkii* y una reducción de una especie desconocida perteneciente al género *Succinivibrionaceae* (filo *Proteobacteria*) Estudios previos al descrito sugieren que las bacterias del género *Succinivibrionaceae* reducen las emisiones de metano utilizando hidrógeno para generar succinato que posteriormente es convertido en propionato.

En el estudio de Le Floch y col. (2014) estudiaron el impacto de un régimen alimentario en restricción en la microbiota fecal de cerdos, criados en buenas o pobres condiciones sanitarias. Encontraron que las especies *Clostridium butyricum*, *Clostridium bartletti*, *Lactobacillus animalis* y *Bifidobacterium choerinum* estaban enriquecidas en las muestras pertenecientes a cerdos alimentados bajo restricción.

Otros estudios en humanos (Chen y col., 2012) han encontrado una sobrerrepresentación de la familia *Coriobacteriales* y del género *Desulfovibrio* perteneciente al filo *Proteobacteria*, en pacientes con cáncer colorrectal. Los resultados del presente estudio también muestran un incremento de bacterias pertenecientes al género *Desulfovibrio* en los animales alimentados a voluntad. Por tanto, quizás los animales alimentados de esta manera son más susceptibles a desarrollar determinadas enfermedades entéricas por el hecho de tener una sobrerrepresentación de determinadas familias bacterianas en su microbiota gastrointestinal.

Como ya se ha indicado, no existen muchos trabajos publicados que nos puedan servir de referencia para comparar los resultados del presente estudio ya que en aquellos en los que se sigue un diseño experimental equivalente (voluntad/restricción), por tratarse de trabajos en otras especies no son muy informativos, mientras que los que se han encontrado en conejo tienen un diseño experimental y objetivos diferentes al presente estudio y, por lo tanto, tampoco son directamente comparables.

Finalmente, mencionar que el efecto de la interacción entre el régimen alimentario y el origen de las muestras sobre la composición microbiana en ningún caso resultó significativo.

5.6. Diferencias en la composición microbiana entre las 4 muestras atípicas y las restantes

Después de los análisis hasta ahora presentados se hace necesaria una caracterización profunda de la composición microbiana de las 4 muestras atípicas señaladas anteriormente. Estos resultados se presentan en este apartado en el que se comparan las microbiotas del grupo atípico compuesto por estas 4 muestras y las del grupo compuesto por las 43 muestras restantes.



Figura 23. Diversidad taxonómica a nivel de filo en las 43 muestras.

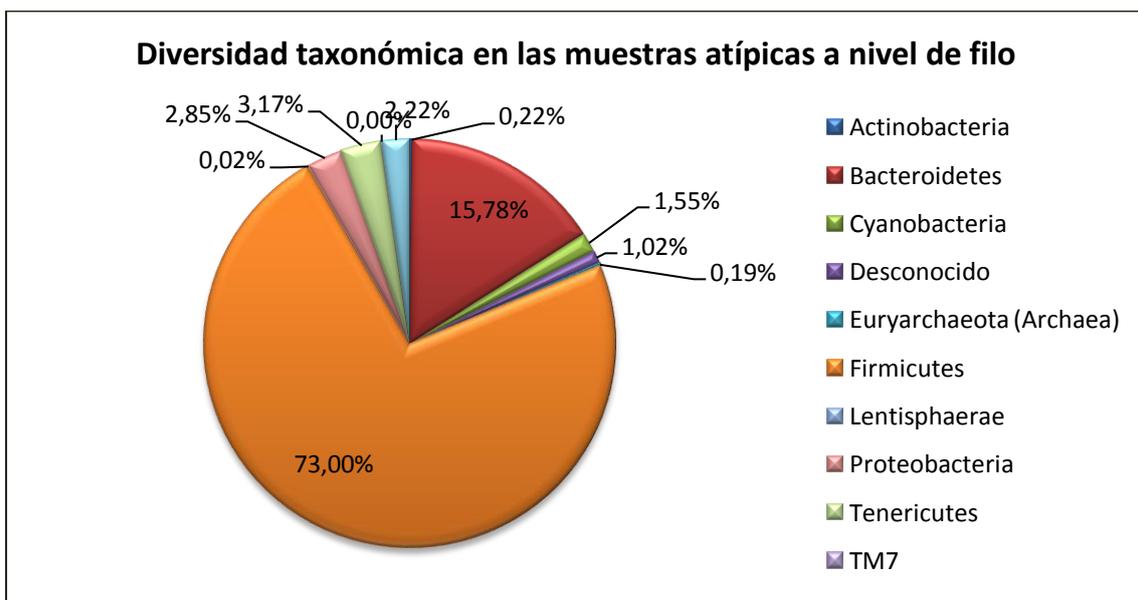


Figura 24. Diversidad taxonómica a nivel de filo en las 4 muestras atípicas.

Tabla 18. Efecto del tipo de muestra (normal/atípica) sobre composición relativa, expresada en porcentaje, a nivel de filo.

Filo	Promedio	Normal-atípica
Actinobacteria	0,53(0,04)	0,62(0,08)*
Bacteroidetes	11,49(0,41)	-8,89(0,82)*
Cyanobacteria	1,34(0,16)	-0,28(0,32)
Desconocido	2,17(0,14)	2,24(0,28)*
Euryarchaeota	0,13(0,03)	-0,14(0,05)*
Firmicutes	74,73(0,51)	3,58(1,03)*
Lentisphaerae	0,02(0,01)	0,00(0,02)
Proteobacteria	2,12(0,08)	-1,47(0,16)*
Tenericutes	5,44(0,33)	4,73(0,66)*
TM7	0,00(0,00)	0,00(0,00)
Verrucomicrobia	2,04(0,11)	-0,40(0,21)

Normal-atípica: contraste de la diferencia entre las muestras consideradas normales y las muestras atípicas. *Diferencias significativas asociadas a un $p_{\text{valor}_{\text{FDR}}}<0.05$.

En esta ocasión, el efecto de que la muestra fuese atípica o normal resultó significativo para 6 filos: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Tenericutes* (**tabla 18**).

Se detectaron diferencias significativas en 27 familias al repetir el mismo tipo de análisis a este nivel taxonómico. 6 de estas familias -*Mogibacteriaceae*, *Christensenellaceae*, *Eubacteriaceae*, *Dehalobacteriaceae*, *Lachnospiraceae* y una familia desconocida- pertenecen al filo *Firmicutes* y son 0,95, 0,54, 0,14, 6,13 y 0,13 puntos porcentuales, respectivamente, más abundantes en las muestras atípicas que en las no atípicas. 5 familias -*Odoribacteraceae*, *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Rikenellaceae* y una familia desconocida- pertenecen al filo *Bacteroidetes* y son 1,04, 6,57, 0,65, 0,68 y 0,04 puntos porcentuales respectivamente más abundantes en las muestras atípicas que en las restantes. 5 familias pertenecientes al filo *Proteobacteria* -*Oxalobacteraceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Campylobacteraceae*, *Enterobacteriaceae* y una familia desconocida- son 0,14, 0,53, 0,18, 0,20 y 0,51 puntos porcentuales, respectivamente, más abundantes en las muestras atípicas que en las restantes. Finalmente señalar que la familia *Methanobacteriaceae* (reino *Archaea*) resultó 0,14 puntos porcentuales más abundante en las muestras atípicas (**tabla 19**).

Tabla 19. Efecto del tipo de muestra (normal/atípica) sobre la composición relativa, expresada en porcentaje, a nivel de familia. Se muestran las 27 familias en las que se encontró un efecto significativo.

Familia (Filo)	Promedio	Normal-atípica	pvalor
Methanobacteriaceae (Euryarchaeota)	0,13(0,03)	-0,14(0,05)	0,0000
Corynebacteriaceae (Actinobacteria)	0,00(0,00)	0,00(0,01)	0,0192
Chitinophagaceae (Bacteroidetes)	0,00(0,00)	0,00(0,01)	0,0000
Barnesiellaceae (Bacteroidetes)	0,46(0,05)	0,24(0,10)	0,0023
Odoribacteraceae (Bacteroidetes)	0,91(0,08)	-1,04(0,15)	0,0372
Bacteroidaceae (Bacteroidetes)	5,61(0,22)	-6,57(0,44)	0,0000
Porphyromonadaceae (Bacteroidetes)	0,56(0,08)	-0,65(0,16)	0,0004
Rikenellaceae (Bacteroidetes)	1,83(0,10)	-0,68(0,20)	0,0035
Desconocida (Bacteroidetes)	0,02(0,01)	-0,04(0,01)	0,0022
Desconocida (Firmicutes)	28,31(0,65)	11,50(1,30)	0,0000
Mogibacteriaceae (Firmicutes)	1,52(0,06)	-0,95(0,13)	0,0000
Christensenellaceae (Firmicutes)	1,21(0,06)	-1,23(0,13)	0,0000
Clostridiaceae (Firmicutes)	1,15(0,05)	0,34(0,11)	0,0047
Dehalobacteriaceae (Firmicutes)	0,50(0,04)	-0,54(0,09)	0,0000
Eubacteriaceae (Firmicutes)	0,20(0,01)	-0,14(0,03)	0,0000
Lachnospiraceae (Firmicutes)	13,57(0,35)	-6,13(0,70)	0,0000
Peptococcaceae (Firmicutes)	0,08(0,01)	0,16(0,02)	0,0000
Desconocida (Firmicutes)	0,08(0,01)	-0,13(0,02)	0,0000
Erysipelotrichaceae (Firmicutes)	1,39(0,05)	-1,82(0,10)	0,0000
Desconocida (Proteobacteria)	0,46(0,03)	-0,51(0,06)	0,0000
Oxalobacteraceae (Proteobacteria)	0,22(0,03)	-0,14(0,05)	0,0192
Desulfovibrionaceae (Proteobacteria)	0,93(0,05)	-0,53(0,11)	0,0000
Campylobacteraceae (Proteobacteria)	0,16(0,02)	-0,18(0,04)	0,0000
Enterobacteriaceae (Proteobacteria)	0,10(0,02)	-0,20(0,03)	0,0000
Anaeroplasmataceae (Tenericutes)	0,42(0,04)	-0,33(0,08)	0,0003
Desconocida (Tenericutes)	4,84(0,34)	4,93(0,67)	0,0000
Desconocido	2,17(0,14)	2,24(0,28)	0,0000

Normal-atípica: contraste de la diferencia entre las muestras consideradas normales y las muestras atípicas.

Por último, a nivel de OTU se encontraron que 9 -todos ellos clasificados dentro de las familias *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae* pertenecientes al orden *Clostridiales*- eran exclusivos del grupo formado por las 4 muestras atípicas. Estos resultados no parecen guardar relación con los obtenidos en el estudio mencionado anteriormente sobre enteropatía epizootica en conejo (Bäuerl y col, 2014) en el que encontraron una sobrerrepresentación de especies como *Bacteroides*, *Akermansia* y *Rikenella* en animales enfermos y una mayor proporción de bacterias de la especie

Ruminococcus en animales sanos. Algún factor desconocido provoca la separación de las microbiotas de los dos animales atípicos del resto (**figura 15**), y no está claro que este factor sea una enteropatía, ya que la composición que observamos en las muestras atípicas no se parece a la que caracteriza las muestras de animales enfermos de enteropatía mucoide (Bäuerl y col, 2014). Aunque, como ya se ha indicado, uno de los animales de los que proceden estas 4 muestras fue el único animal del estudio diagnosticado durante su engorde con problemas entéricos y cabría pensar que las poblaciones bacterianas que han disminuido más en los animales atípicos podrían estar relacionadas con microorganismos que confieren cierta protección frente a enteropatías. Finalmente mencionar que el grupo de muestras atípicas presenta una sobrerrepresentación de la familia *Enterobacteriaceae*. A pesar de que, como ya se ha dicho, no puede afirmarse que todas las muestras atípicas procedan de animales con problemas entéricos, algunas especies de esta familia de bacterias -como *Escherichia coli*- son patógenas y se asocian a problemas gastrointestinales en mamíferos (Marlier y col., 2006).

5.7. Efecto de la composición microbiana sobre el peso al destete y el crecimiento

No se detectó ningún efecto significativo de la composición microbiana - correspondiente al final del período de engorde- sobre el peso ajustado a los 31 días de los animales. La hipótesis que nos llevó a realizar este análisis es que pudieran existir poblaciones microbianas asociadas con el peso al destete de los gazapos y, que estas comunidades, podrían mantenerse diferencialmente representadas en los conejos una vez finalizado el cebo (momento en el que se recogieron las muestras de contenido fecal y cecal). Existen estudios previos que demuestran que la composición de las poblaciones microbianas del conejo se estabiliza en torno a los 70 días de edad (Combes y col., 2011). Nuestros resultados pudieran ser compatibles con este hecho ya que aunque podrían haber existido poblaciones bacterianas con un efecto sobre el peso al destete éstas se habrían visto modificadas durante el periodo cebo -sobre todo considerando los distintos regímenes alimentarios aplicados-, como las muestras se recogieron al final del engorde, no seríamos capaces de detectar dicho efecto potencial.

Por otro lado, sí se detectaron ciertas asociaciones significativas de la composición microbiana con la ganancia media diaria. En un análisis inicial, considerando todos los animales del estudio y la composición microbiana a nivel de filo se apreció una asociación negativa entre el porcentaje de *Cyanobacteria* en ciego y la ganancia media diaria del grupo de animales alimentados a voluntad (-2.178 gramos/día; error típico=610; pvalor_{FDR}=0,022). Cuando se realizó el mismo análisis a nivel de familia, 4 de ellas mostraron un coeficiente de regresión significativamente diferente de cero para el grupo de animales alimentados a voluntad. En la **figura 25** se representa la distribución de los datos de crecimiento para cada una de estas 4 familias.

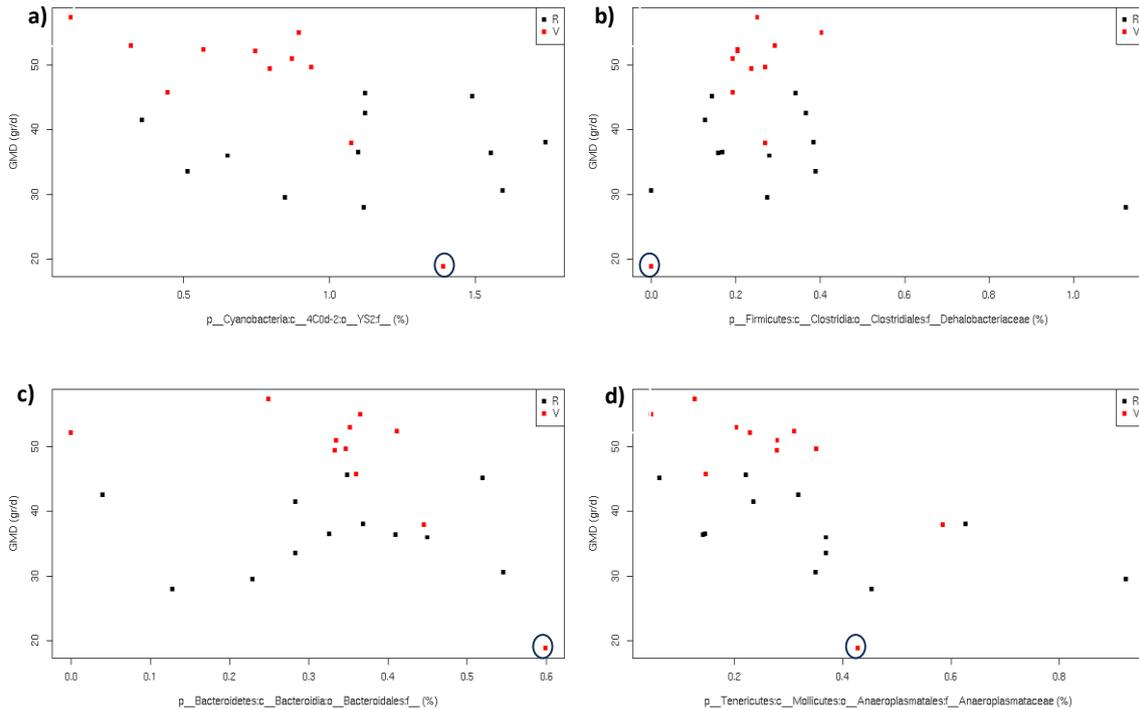


Figura 25. Efecto de la composición de las familias **a)** Desconocida perteneciente al orden YS2, **b)** *Dehalobacteriaceae*, **c)** Desconocida perteneciente al orden *Bacteroidales* y **d)** *Anaeroplasmataceae* sobre la ganancia media diaria. Los animales representados en negro fueron alimentados bajo restricción y los animales representados en rojo fueron alimentados a voluntad. El punto azul circulado en cada gráfico representa al animal 115804.

Se puede apreciar claramente que la significación estadística de las pendientes para los animales alimentados a voluntad se debe a la gran influencia de un dato - rodeado con un círculo en los gráficos de la **figura 25**- perteneciente al animal con identificación 115804 que mostró un crecimiento anormalmente bajo (18,8 gramos/día), cuando la media del grupo de los animales alimentados a voluntad fue de 47,4 gramos/día (**Tabla 8**). Sin embargo, las muestras de ciego y heces pertenecientes a dicho animal se localizaban en el centro de la nube de puntos del análisis PCoA (**figura 15**), el número de secuencias obtenidas en las dos muestras de este animal de la secuenciación no parecen anormales y no se dispone de ninguna anotación en la base de datos que indique que este animal tuviese algún problema durante el periodo de cebo. Por lo tanto, aunque no parece que haya ninguna razón experimental para descartar este individuo del estudio, el hecho de que se trate de la única realización del grupo de animales alimentados a voluntad con un crecimiento muy bajo pudiera justificar descartarlo ya que tenerlo en consideración tiene consecuencias importantes en los resultados de los tests. Estos resultados son poco fiables pues no están avalados por asociaciones en otros individuos con crecimientos similares.

Cuando el estudio de asociación se repitió descartando el animal de crecimiento anormalmente bajo, los resultados cambiaron drásticamente y sólo se detectaron dos asociaciones significativas:

1.- Para el porcentaje de la familia *Mogibacteriaceae* (orden *Clostridiales*) en el ciego del grupo de animales alimentados bajo restricción. Para esta familia el coeficiente de regresión (error típico) fue -1.575 (371) con un $p_{\text{valor}_{\text{FDR}}}=0,015$.

2.- Para un OTU de familia desconocida, y también perteneciente al orden *Clostridiales*, en las heces de los animales alimentados bajo restricción. Para este OTU el coeficiente de regresión (error típico) fue positivo 2,45 (0,44) con un $p_{\text{valor}_{\text{FDR}}}=0,012$.

En la **figura 26** se presenta la distribución de los registros de crecimiento en función del porcentaje de la citada familia en el ciego y en función del contenido en las heces del OTU arriba indicado.

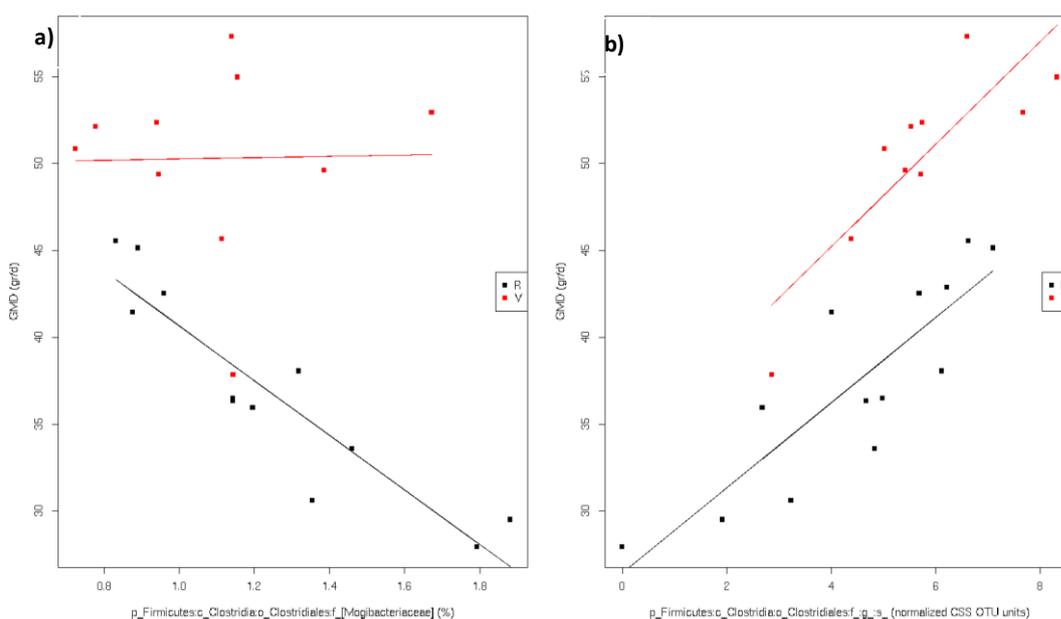


Figura 26. Efecto de la composición de **a)** la familia *Mogibacteriaceae* en ciego y **b)** el OTU de familia desconocida perteneciente al orden *Clostridiales* en heces sobre la ganancia media diaria. Los animales representados en negro fueron alimentados bajo restricción y animales representados en rojo fueron alimentados a voluntad.

Cabe señalar que para el OTU, la regresión para el crecimiento de los animales alimentados a voluntad también parece mostrar una tendencia clara con un coeficiente de regresión (error típico) de 2,95 (0,66), aunque después de corregir por los múltiples test realizados no resultó significativa ($p_{\text{valor}_{\text{FDR}}}=0,16$).

En el estudio en conejos de Zeng y col. (2015) encontraron una correlación positiva entre el peso corporal y el orden *YS2* y los géneros *Bacteroides*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Prevotella* en las heces.

En el estudio en pollos de Han y col. (2016), cuando caracterizaron la microbiota de muestras cecales, encontraron una correlación negativa entre el peso corporal y los filos *Lentisphaerae* y *Verrucomicrobia*. El género *Lactococcus* presentó una correlación positiva con el peso corporal mientras que los géneros *Anaerovibrio*, *Prevotella* y *Akkermansia* mostraron una correlación negativa.

En un estudio en cerdos en el que caracterizaron la microbiota fecal de un grupo de cerdos de 60 días de edad criados en las mismas condiciones de manejo y bajo el mismo régimen alimentario (Ramayo-Caldas y col., 2016), encontraron una correlación positiva entre la ganancia media diaria y los géneros *Prevotella* y *Mitsuokella* mientras que los géneros *Ruminococcus* y *Treponema* -relacionados con la degradación de celulosa y lignina- mostraron una correlación negativa con la ganancia media diaria.

En el estudio de la asociación entre la GMD y el número de OTUs observados a un nivel fijo de 11.719 lecturas, la regresión resultó significativa en las heces ($p_{\text{valor}_{\text{FDR}}}=0,005$) y en el ciego ($p_{\text{valor}_{\text{FDR}}}=0,016$) sólo para el grupo de animales alimentados bajo restricción y únicamente cuando se consideraron todas las muestras a excepción de las del animal con un crecimiento anormalmente bajo. Estas regresiones se presentan gráficamente en la **figura 27**. Se puede observar que hay una mayor GMD en las muestras con mayor diversidad.

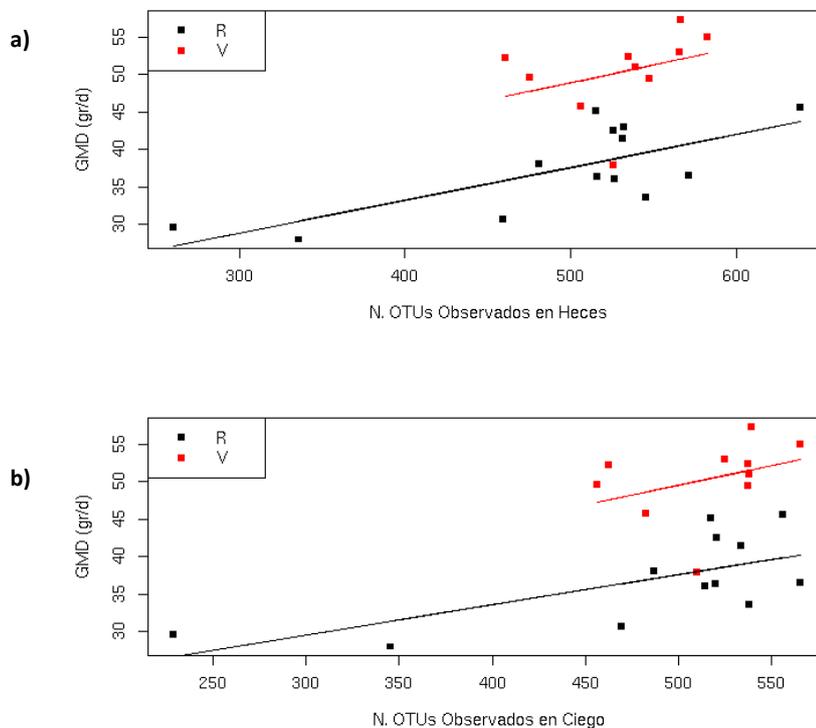


Figura 27. Asociación entre GMD y el número de OTUs observados en **a)** heces y **b)** ciego. Los animales representados en negro fueron alimentados bajo restricción y los animales representados en rojo fueron alimentados a voluntad.

A pesar de que la tendencia señalada se sigue apreciando, la regresión deja de ser significativa cuando en el análisis se incluyen las muestras correspondientes al animal con crecimiento anormalmente bajo o cuando se excluyen las muestras pertenecientes a los animales con datos atípicos para el número de OTUs observados (IDs=113063 y 115334).

En el estudio realizado en pollos mencionado en apartados anteriores (Han y col., 2016), en el que trataron de establecer la relación entre la microbiota gastrointestinal de tres compartimentos diferentes (buche, íleon y ciego) y el peso corporal, determinaron que el número de OTUs observados estaba positivamente correlacionado con el peso corporal cuando se estudiaban las muestras procedentes del buche ($r=0,75$, $p<0,001$) y del íleon ($r=0,39$, $p=0,087$). Pero por el contrario, cuando el número de OTUs observados se definía en relación a las muestras de ciego la correlación con el peso corporal era negativa ($r=-0,67$, $p=0,001$).

A modo de resumen de este apartado se puede señalar que, al igual que ocurre en otros estudios en varias especies, en nuestro trabajo la diversidad se puede asociar positivamente con el crecimiento. Además, parecen existir ciertos grupos bacterianos que se asocian con el crecimiento aunque la coincidencia de estos grupos entre especies y estudios no es clara.

6. Conclusiones

1. Con las 48 muestras de contenido cecal/fecal analizadas en este estudio se ha logrado poner a punto el método de generación de librerías masivas con el kit Nextera[®] XT y obtener un elevado número de secuencias con la plataforma de secuenciación masiva MiSeq de Illumina.
2. Se ha desarrollado un protocolo de análisis bioinformático para ser implementado con el software QIIME que genera un elevado número final de contigs de buena calidad y una tabla que recoge las abundancias relativas de cada OTU normalizadas.
3. Los filos más abundantes en todas las muestras analizadas fueron *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Tenericutes*, los dos últimos mostraron una abundancia muy similar.
4. Las comunidades microbianas del ciego y heces no son, a nivel global, diferentes aunque se encontraron diferencias significativas para el origen de la muestra en la abundancia relativa de los filos *Cyanobacteria* –más abundante en heces- y *Actinobacteria* –más abundante en ciego.
5. Los animales alimentados bajo restricción presentaron menos bacterias pertenecientes a una familia desconocida del orden *YS2/Cyanobacteria* y a una familia desconocida del orden *RF39/Tenericutes*.
6. Ni el efecto del régimen alimentario, ni el del origen de la muestra permiten claramente diferenciar los grupos de muestras en función de su origen o tratamiento en el análisis de PCoA.
7. En el análisis de PCoA se han detectado algunas muestras con una composición microbiana claramente diferente del resto, que pudieran pertenecer a animales que sufrieron o estaban sufriendo procesos patológicos entéricos.
8. Se observó una asociación positiva entre la ganancia media diaria y la diversidad aunque sólo resultó significativa para el grupo de animales alimentados bajo restricción.
9. La presencia de la familia *Mogibacteriaceae* parece influir negativamente sobre el crecimiento de los animales mientras que la presencia de un OTU perteneciente al orden *Clostridiales* parece influir de forma positiva.

7. Referencias

- Abecia, L., Fondevila, M., Balcells, J., Edwards, J.E., Newbold, C.J., McEwan, N.R. (2005). *Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum*. FEMS microbiology letters, vol. 244: 111-115.
- Abecia, L., Fondevila, M., Balcells, J., McEwan, N.R. (2007). *The effect of lactating rabbit does on the development of the caecal microbial community in the pups they nurture*. Journal of applied microbiology, vol. 103: 557-564.
- Al-Saiady, M.Y. (2010). *Effect of probiotic bacteria on immunoglobulin G concentration and other blood components of newborn calves*. Journal of animal and veterinary advances, vol. 9: 604-609.
- Arrazuria, R., Elguezabal, N., Juste, R.A., Derakhshani, H., Khafipour, E. (2016). *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection modifies gut microbiota under different dietary conditions in a rabbit model*. Frontiers in microbiology, vol. 7: 446-460.
- Bagoné Vántus, V., Kovács, M., Zsolnai, A. (2014). *The rabbit caecal microbiota: development, composition and its role in the prevention of digestive diseases – a review on recent literature in the light of molecular genetic methods*. Acta Agraria Kaposváriensis, vol. 18(1): 55-65.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S. (2015). *Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4*. Journal of statistical software vol, 67(1): 1-48.
- Bäuerl, C., Collado, M.C., Zúñiga, M., Blas, E., Pérez, G. (2014). *Changes in cecal microbiota and mucosal gene expression revealed new aspects of epizootic rabbit enteropathy*. PloS One, vol. 9(8): e105707.
- Begon, M., Harper, J.L., Townsend, C.R. (1986). *Ecology: individuals, populations and communities*. 3ª - Blackwell Scientific Oxford.
- Benjamini, Y. y Hochberg, Y. (1995). *Controlling the False Discovery Rate: A Practical y Powerful Approach to Multiple Testing*. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), vol. 57(1): 289-300.
- Bennegadi, N., Fonty, G., Millet, L., Gidenne, T., Licois, D. (2003). *Effects of age and dietary fibre level on caecal microbial communities of conventional and specific pathogen-free rabbits*. Microbial ecology in health and disease, vol. 5: 23-32.
- Berg, D. (1996). *The indigenous gastrointestinal microflora*. Trends Microbiology, vol. 4: 430-435.
- Boisot, P., Licois, D., Gidenne, T. (2003). *Feed restriction reduces the sanitary impact of an experimental reproduction of epizootic rabbit enteropathy syndrome (ERE), in the growing rabbit*. En Proceedings of 10ème Journées recherche cunicoles, 19-20 novembre de 2003, Paris, Francia, páginas: 267-270.
- Campbell, S.C., Wisniewski, P.J., Noji, M., McGuinness, L.R., Häggblom, M.M., Lightfoot, S.A., Joseph, L.B., Kerkhof, L.J. (2016). *The effect of diet and exercise on intestinal integrity and microbial diversity in mice*. PloS One, vol. 11(3): e0150502.

- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J. (2011). *Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample*. Proceedings of the National Academy of Science, vol. 108: 4516–4522.
- Carabaño, R., Piquer, J., Menoyo, D., Badiola, I. (2010). *The digestive system of the rabbit*. En Nutrition of the rabbit, páginas: 1-18.
- Chambers, J.M. (1992). *Linear models*. Capítulo 4 de *Statistical Models en ediciones J. M. Chambers y T. J. Hastie*, Wadsworth & Brooks/Cole.
- Chamorro, S., Gomez-Conde, M.S., Perez de Rozas, A.M., Carabano, R., De Blas, J.C. (2007). *Effect on digestion and performance of dietary protein content and of increased substitution of lucerne hay with soya-bean protein concentrate in starter diets of young rabbits*. Animal, vol. 1: 651-659.
- Chao, A. (1984). *Nonparametric estimation of the number of classes in a population*. Scandinavian journal of statistics, vol. 11(4): 265-270.
- Chen, W., Liu, F., Ling, Z., Tong, X., Xiang, C. (2012). *Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer*. PloS One, vol. 7(6): e39743.
- Clarridge, J.E. (2004). *Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases*. Clinical microbiology review, vol. 17: 840-862.
- Cock, P.J., Fields, C.J., Goto, N., Heuer, M.L., Rice, P.M. (2010). *The Sanger FASTQ file format for sequences with quality score, and the Solexa/Illumina FASTQ variants*. Nucleic Acids Research, vol. 38(6): 1767-1771.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Tiedje, J.M. (2009). *The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis*. Nucleic acid research, vol. 37: 141-145.
- Colwell, R.R., Herrington, D., Tall, B., Huq, A., Levine, M.M. (1996). *Viable but non-culturable Vibrio cholerae O1 revert to a cultivable state in the human intestine*. World journal of microbiology and biotechnology, vol. 12: 28-31.
- Combes, S., Michelland, R.J., Monteils, V., Cauquil, L., Soulie, V., Tran, N.U., Gidenne, T., Fortun-Lamothe, L. (2011). *Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity*. FEMS microbiology ecology, vol. 77: 680-689.
- Correa-Fiz, F., Fraile, L., Aragon, V. (2016). *Piglet nasal microbiota at weaning may influence the development of Glässer's disease during the rearing period*. BioMed central genomics, vol. 17: 404-418.

- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poulet, J. B., Massart, S. (2010). *Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa*. Proceedings of the National academy of sciences, vol. 107 (33): 14691-14696.
- Desjardins, P. y Conklin, D. (2010). *NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids*. Journal of visualized experiments, vol. 45: e2565.
- Di Rienzi, S.C., Sharon, I., Wrighton, K.C., Koren, O., Hug, L.A., Thomas, B.C., Goodrich, J.K., Bell, J.T., Spector, T.D., Banfield, J.F., Ley, R.E. (2013). *The human gut and groundwater harbor non-photosynthetic bacteria belonging to a new candidate phylum sibling to Cyanobacteria*". eLife, vol. 2: e01102.
- Drouilhet, L., Aschard, C.S., Zemb, O., Molette, C., Gidenne, T., Larzul, C., Ruesche, J., Tircazes, A., Segura, M., Bouchez, T., Theau-Clement, M., Joly, T., Balmisse, E., Garreau, H., Gilbert, H. (2016). *Direct and correlated responses to selection in two lines of rabbits selected for feed efficiency under ad libitum and restricted feeding: I. Production traits and gut microbiota characteristics*. Journal of animal sciences, vol. 94: 38-48.
- Edgar, R.C. (2010). *Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST*. Bioinformatics, vol. 26(19): 2460-2461.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R. (2011). *UCHIME improves the sensitivity and speed of chimera detection*. Bioinformatics, vol. 27(16): 2194-2200.
- Escobar-Zepeda, A., Vera-Ponce de León, A., Sánchez-Flores, A. (2015). *The road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics*. Frontiers in genetics, vol. 6, artículo 348.
- Faith, D.P. (1992). *Conservation evaluation and phylogenetic diversity*. Biological conservation, vol. 61: 1-10.
- Fonty, G. y Chaucheyras-Durand, F. (2007). *Les écosystèmes digestifs*. Lavoisier Ediciones Tec&Doc, Paris, Francia, página 311.
- Ford, D.J. y Coates, M.E. (1971). *Absorption of glucose and vitamins of the B complex by germ-free and conventional chicks*. Nutr. Soc. Proc., vol. 30: 10-11.
- Fraher, M.H., O'Toole, P.W., Quigley, E.M.M. (2012). *Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician*. Nature reviews gastroenterology and hepatology, vol. 9: 312-322.
- Gaskins, H.R. (1997). *Immunological aspects of host/microbiota interactions at the intestinal epithelium*. Gastrointestinal Microbiology, vol. 2: 537-587.
- Gidenne, T. (1994). *Estimation of volatile fatty acids and of their energetic supply in the rabbit caecum: effect of the dietary fibre level*. En VI Journées de la Recherche Cunicole, 6-7 diciembre de 1994, Paris, INRA-ITAVI, vol. 2: 293-299.

- Gidenne, T. (2003). *Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre*. *Livestock production science*, vol. 81: 105-117.
- Gidenne, T. y Feugier, A. (2009). *Feed restriction strategy in the growing rabbit. 1. Impact on digestion, rate of passage and microbial activity*. *Animal*, vol. 3(4): 501-508.
- Gidenne, T., Combes S., Feugier, A., Jehl, N., Arveux, P., Boisot, P., Briens, C., Corrent, E., Fortune, H., Montessuy, S., Verdelhan, S. (2009). *Feed restriction strategy in the growing rabbit. 2. Impact on digestive health, growth and carcass characteristics*. *Animal*, vol. 3(4): 509-515.
- Gidenne, T., Mirabito, L., Jehl, N., Perez, J. M., Arveux, P., Bourdillon, A., Briens, C., Duperray, J., Corrent, E. (2004). *Impact of replacing starch by digestible fibre, at two levels of lignocellulose, on digestion, growth and digestive health of the rabbit*. *Animal science*, vol. 78: 389-398.
- Gidenne, T., Combes, S., Fortun-Lamothe, L. (2012). *Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health: a review*. *Animal*, vol. 6: 1407-1419.
- Glendinning, L., Wright, S., Pollock, J., Tennant, P., Collie, D., McLachlan, G. (2016). *Variability of the sheep lung microbiota*. *Applied environmental microbiology*, vol. 82(11): 3225-3238.
- Goodrich, J.K., Waters, J.L., Poole, A.C., Sutter, J.L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Van Treure, W., Knight, R., Bell, J.T., Spector, T.D., Clark, A.G., Ley, R.E. (2014). *Human genetics shape the gut microbiome*. *Cell*, vol. 159(4): 789-799.
- Gómez, E.A., Rafel, O., Ramon, J. (2002). *The Caldes Strain (Spain)*. *En Options Méditerranéenes Serie B. Rabbit Genetic Resources in Mediterranean Countries*, vol. 38: 189-198.
- Gouet, P. y Fonty G. (1979). *Changes in the digestive microflora of holoxenic rabbits from birth until adulthood*. *Annales de biologie animale biochimie biophysique*, vol. 19: 553-566.
- Gouet, P. y Fonty G. (1973). *Evolution de la microflore digestive du lapin holoxénique de la naissance au sevrage*. *Annales de biologie animale biochimie biophysique*, vol. 13: 733-735.
- Haas, B.J., Gevers, D., Earl, A., Feldgarden, M., Ward, D.V., Giannokous, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S.K., Sodergren, E., Methe, B., Desantis, T.Z., Petrosino, J.F., Knight, R., Birren, B.W. (2011). *Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons*. *Genome research*, vol. 21(3) : 494-504.
- Han, G.G., Kim, E.B., Lee, J., Lee, J-Y., Jin, G., Park, J., Huh, C-S., Kwon, I-K., Kil, D.Y., Choi, Y-J., Kong, C. (2016). *Relationship between the microbiota in different sections of the gastrointestinal tract and the body weight of broiler chickens*. *SpringerPlus*, vol. 5: 911-920.

- Hartman, A. L., Riddle, S., McPhillips, T., Ludäscher, B., Eisen, J. A. (2010). *Introducing WATERS: a workflow for the alignment, taxonomy, and ecology of ribosomal sequences*. BMC bioinformatics, vol. 11: 1.
- Heinrichs, J. (2005). *Rumen development in the dairy calf*. Advances in dairy technology, vol. 17: 179-187.
- Hespell, R.B. y Bryant, M.P. (1979). *Efficiency of rumen microbial growth influence of some theoretical and experimental factors on YATP*. Journal of animal Science, vol. 49(6): 1640-1659.
- Hooper, L.V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P.G., Gordon, J.I. (2001). *Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine*. Science, vol. 291: 881-884.
- Huber, T., Faulkner, G., Hugenholtz, P. (2004). *Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments*. Bioinformatics, vol. 20: 2314-2319.
- Jones, W.J., Nagle, D.P., Whitman, W.B. (1987). *Methanogens and the diversity of archaeobacteria*. Microbiology reviews, vol. 51: 135-177.
- Kararli, T.T. (1995). *Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals*. Biopharmaceutics & drug disposition, vol. 16: 351-380.
- Kimsé, M., Bayourthe, C., Monteils, V., Fortun-Lamothe, L., Cauquil, L., Combes, S., Gidenne T. (2012). *Live yeast stability in rabbit digestive tract: Consequences on the caecal ecosystem, digestion, growth and digestive health*. Animal feed science technology, vol. 173: 235-243.
- Koch R. (1882). *On the anthrax inoculation*. En *Essays of Robert Koch*. (1987). Nueva York: Greenwood Press.
- Krehbiel, C.R., Rust, S.R., Zhang, G., Gilliland, S.E. (2003). *Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: performance response and mode of action*. Journal of animal science, vol. 81: 120-132.
- Kusar, D. y Avgustin, G. (2010). *Molecular profiling and identification of methanogenic archaeal species from rabbit caecum*. FEMS microbiological ecology, vol. 74: 623-630.
- Larour, G., Jobert, J.L., Balaine, L., Eono, F., Klein, M.F., Ledein, T., Le Bouquin, S., Guittet, M. (2002). *Enquête épidémiologique analytique sur l'entérocólite epizootique du lapin en engraissement*. En Journée nationale ITAVI élevage du lapin de chair, 21 novembre, Nantes.
- Le Floch, N., Knudsen, C., Gidenne, T., Montagne, L., Merlot, E., Zemb, O. (2014). *Impact of feed restriction on health, digestion and faecal microbiota of growing pigs housed in good or poor hygiene conditions*. Animal, vol. 8(10): 1632-1642.
- Ledin, I. (1984). *Effect of restricted feeding and realimentation compensatory growth, carcass composition y organ growth in rabbit*. Ann. Zootech, vol. 33: 33-50.

- Lelkes L. y Chang C. (1987). *Microbial dysbiosis in rabbit mucoid enteropathy*. *Laboratory animal science*, vol. 37: 757-764.
- Lin, A., Bik, E. M., Costello, E. K., Dethlefsen, L., Haque, R., Relman, D. A., Singh, U. (2013). *Distinct distal gut microbiome diversity and composition in healthy children from Bangladesh and the United States*. *PloS one*, vol. 8(1): e53838.
- Lozupone, C., y Knight, R. (2005). *UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities*. *Applied and environmental microbiology*, vol. 71(12): 8228-8235.
- Mackie, R.I. (2002). *Mutualistic Fermentative Digestion in the Gastrointestinal Tract: Diversity and Evolution*. *Integrative and Comparative Biology*, vol. 42: 319-326.
- Maertens, L. y Peeters J.E. (1988). *Effect of a feed restriction after weaning on fattening performances and caecal traits of early weaned rabbits*. *Arbeitstagung über Peltztier, Kaninchen und Heimtier Production und Krankheit*. Celle, vol. 6: 158-169.
- Maidak, BL., Cole, JR., Parker, CT., Garrity, GM., Larsen, N., Li, B., Liburn, TG., McCaughey, MJ., Olsen, GJ., Overbeek, R., Pramanik, S., Schmidt, TM., Tiedje, JM., Woese, CR. (1999). *A new version of the RDP (Ribosomal Database Project)*. *Nucleic acid research*, vol. 27:171-173.
- Marlier, D., Dewree, R., Lassence, C., Licois, D., Mainil, J., Coudert, P., Meulemans, L., Ducatelle, R., Vindevogel, H. (2006). *Infectious agents associated with epizootic rabbit enteropathy: Isolation and attempts to reproduce the syndrome*. *Elsevier-The veterinary journal*, vol. 172: 493-500.
- Marquez, C.J. (2014). *Calf intestinal health: assessment and dietary interventions for its improvement*. PhD thesis, University of Illinois at Urbana-Champaign, Champaign, IL.
- Martignon, M.H., Combes, S., Gidenne, T. (2010). *Digestive physiology and hindgut bacterial community of the young rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): effects of age and short-term intake limitation*. *Comparative biochemistry and physiology parte A: Molecular & Integrative Physiology*, vol. 156(1): 156-162.
- Massip, K., Combes, S., Cauquil, L., Zemb, O., Gidenne, T. (2012). *High throughput 16S-DNA sequencing for phylogenetic affiliation of the caecal bacterial community in the rabbit - Impact of the hygiene of housing and of the intake level*. *En Proceeding symposium on gut microbiology. Gut microbiota: friend or foe?*, Clermont-Ferrand – Francia, 17-20 junio, 2012.
- Mazmanian, S.K., Round, J.L., Kaspèr, D.L. (2008). *A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease*. *Nature*, vol. 453: 620-625.
- McCabe, M.S., Cormican, P., Keogh, K., O'Connor, A., O'Hara, E., Palladino, R.A., Kenny, D.A., Waters, S.M. (2015). *Illumine MiSeq phylogenetic amplicon sequencing shows a large reduction of an uncharacterized *Succinivibrionaceae* and an*

- increase of the Methanobrevibacter gottschalkii clade in feed restricted cattle.* PloS One, vol. 10(7): e0133234.
- Michelland, R. J., Combes, S., Monteils, V., Cauquil, L., Gidenne, T., Fortun-Lamothe, L. (2011). *Rapid adaptation of the bacterial community in the growing rabbit caecum after a change in dietary fibre supply.* Animal, vol. 5(11): 1761-1768.
- Monteils, V., Cauquil, L., Combes, S., Godon, J.J., Gidenne, T. (2008). *Potential core species and satellite species in the bacterial community within the rabbit caecum.* FEMS microbiology ecology, vol. 66: 620-629.
- Moreno, C.E. (2001). *Manual de métodos para medir la biodiversidad.* Universidad Veracruzana (i9789688345436).
- Morón, J.L. (1999). *Comparación del índice de conversión entre dos líneas de conejo de carne seleccionadas por caracteres diferentes.* Trabajo Final de Carrera, ESAB, Universidad Politécnica de Catalunya, España.
- Muyzer, G. y Smalla, K. (1998). *Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology.* Antonie van Leeuwenhoek, vol. 73(1): 127-141.
- Nilakanta, H., Drews, K., Firrell, S., Foulkes, M., Jablonski, K. (2014). *A review of software for analyzing molecular sequences.* BMC Research Notes, vol. 7: 1.
- O'Hara, A.M. y Shanahan, F. (2006). *The gut flora as a forgotten organ.* EMBO reports, vol. 7: 688-693.
- Oikonomou, G., Teixeira, A.G., Foditsch, C., Bichalho, M.L., Machado, V.S., Bicalho, R.C. (2013). *Fecal microbial diversity in pre-weaned dairy calves as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. Associations of Faecalibacterium species with health and growth.* PloS One, vol. 8: e63157.
- Parada, A.E., Needham, D.M., Fuhrman, J.A. (2015). *Every base matters: assessing small subunit rRNA cebadors for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples.* Environmental microbiology, vol. 18: 1403-1414.
- Paulson, J.N., Stine, O.C., Corrada, H., Pop, M. (2013). *Robust methods for differential analysis in marker gene surveys.* Nature methods, vol. 10(12): 1200-1212.
- Pedroso, A. y Lee, M. (2013). *Modulación de la microbiota intestinal para mejorar la productividad de los animales monogástricos.* Albéitar: publicación veterinaria independiente, vol. 170: 34-35.
- Perrier, G. (1998). *Influence de deux niveaux et de deux durées de restriction alimentaire sur l'efficacité productive du lapin et les caractéristiques bouchères de la carcasse.* En 7èmes Journées de la Recherche Cunicole, Lyon, Francia: 179-182.
- Petersson, J., Schreiber, O., Hansson, G.C., Gendler, S.J., Velcich, A., Lundber, J.O. (2011). *Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse*

- model of colitis*. American journal physiology gastrointestinal liver physiology, vol. 300: 327-333.
- Rajendhran, J., y Gunasekaran, P. (2011). *Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond*. Microbiological research, vol. 166: 99-110.
- Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H.G., Molenaar, D., Kajander, K., Surakka, A., Smidt, H., De Vos, W.M. (2009). *Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults*. Environmental microbiology, vol. 11 (7): 1736-1751.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., Medzhitov, R. (2004). *Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis*. Cell, vol. 118: 229-241.
- Ramayo-Caldas, Y., Mach, N., Lepage, P., Levenez, F., Denis, C., Lemonnier, G., Leplat, J.J., Billon, Y., Berri, M., Doré, J., Rogel-Gaillard, C., Estellé, J. (2016). *Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits*. The ISME journal, vol. 77: 1-5.
- Rideout, J.R., He, Y., Navas-Molina, J.A., Walters, W.A., Ursell, L.K., Gibbons, S.M., Chase, J., McDonald, D., Gonzalez, A., Robbins-Pianka, A., Clemente, J.C., Gilbert, J.A., Huse, S.M., Zhou, H., Knight, R., Caporaso, J.G. (2014). *Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences*. PeerJ, vol. 2: e545.
- Roehe, R., Dewhurst, R.J., Duthie, A., Rooke, J.A., McKain, N., Ross, DW. (2016). *Bovine host genetic variation influences rumen microbial methane production with best selection criterion for low methane emitting and efficiently feed converting host based on metagenomic gene abundance*. PloS Genetics, vol. 12(2): e1005846.
- Rogers, Y.H., y Wenter, J.C. (2005). *Genomics: massively parallel sequencing*. Nature, vol. 437: 326-327.
- Rolfe, R.D. (1984). *Role of volatile fatty acids in colonization resistance to Clostridium difficile*. Infection and immunity, vol. 45: 185-191.
- Roszak, D.B., Grimes, D.J., Colwell, R.R. (1984). *Viable but nonrecoverable stage of Salmonella enteritidis in aquatic systems*. Canadian journal of microbiology, vol. 30: 334-338.
- Savage, D.C. (1987). *The indigenous gastrointestinal microbiota*. New perspectives in clinical microbiology, vol. 13: 69-78.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the national academy of sciences, vol. 74: 5463-5467.

- Schierbeek, A. (1959). *Measuring the Invisible World: the life and works of Antoni van Leeuwenhoek*. Abelard-Schuman (Nº 37).
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Sahl, J.W. (2009). *Introducing mothur: open-source, platform-independent, community supported software for describing and comparing microbial communities*. Applied and environmental microbiology, vol. 75(23): 7537-7541.
- Shendure, J., y Ji, H. (2008). *Next-generation DNA sequencing*. Nature biotechnology, vol. 26: 1135-1145.
- Sjogren, Y.M., Jenmalm, M.C., Bottcher, M.F., Bjorksten, B., Sverremark-Ekstrom, E. (2009). *Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age*. Clinical & experimental allergy, vol. 39:518-526.
- Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Fermisse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L. (2009). *Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota*. Inflammatory Bowel disease, vol. 16: 1183-1189.
- Stevens, C. S. y Hume, I.D. (1995). *Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System*. New York: Cambridge University Press.
- Steward, J.A., Chadwick, V.S., Murray, A. (2005). *Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal microflora of children*. Journal of medical microbiology, vol. 54: 1239-1242.
- Szendro, Z., Szabo, S., Hullar, I. (1988). *Effect of reduction of eating time on production growing rabbits*. En Proceedings of the 4th World Rabbit Congress, 10-14 de octubre, 1988, Budapest. Hungría.
- Tůmová, E., Skřivanová, V., Skřivan, M. (2003). *Effect of restricted feeding time and quantitative restriction in growing rabbits*. Archiv für Geflügelkunde, vol. 67: 182 -190.
- Tůmová, E., Zita, L., Skřivanová, V., Fučíková, A., Burešová, M. (2007). *Digestibility of nutrients, organ development and blood picture in restricted and ad libitum fed broiler rabbits*. Archiv für Geflügelkunde, vol. 71: 6-12.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I. (2006). *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature, vol. 444: 1027-1031.
- Turroni, F., Peano, C., Pass, D.A., Foroni, E., Severgnini, M., Claesson, M.J. (2012). *Diversity of Bifidobacteria within the infant gut microbiota*. PloS ONE, vol. 7: e36957.
- Van der Wielen, P.W.J.J., Keuzenkamp, D.A., Lipman, L.J.A., Van Knapen, F., Biesterveld, S. (2002). *Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial*

- community in commercially raised broiler chickens during growth. Microbial ecology*, vol. 44: 286-293.
- Wang, L., Xu, Q., Kong, F., Yang, Y., Wu, D., Mishra, S., Li, Y. (2016). *Exploring the goat rumen microbiome from seven days to two years. PloS ONE*, vol. 11(5): e0154354.
- Woese, C.R. y Fox, G.E. (1977). *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proceedings of the national academy of sciences*, vol. 74: 5088-5090.
- Xicatto, G., Cinetto, M., Dalle Zotte, A. (1992). *Effect of feeding level and rabbit class on digestibility y nitrogen balance. Zootecnica e nutrizione animale*, vol. 18.
- Yeoman, C.J. y White, B.A. (2014). *Gastrointestinal tract microbiota and probiotics in production animals. Annual reviews of animal biosciences*, vol. 2: 469-486.
- Zeng, V., Han, S., Wang, P., Wen, B., Jian, W., Guo, W., Yu, J., Du, D., Fu, X., Kong, F., Yang, M., Si, X., Zhao, J., Li, Y. (2015). *The bacterial communities associated with fecal types and body weight of rex rabbits. Scientific reports*, vol. 5: 9342-9350.
- Zoetendal, E.G., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M. (2002). *Mucosa associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. Applied environmental microbiology*, vol. 68: 3401-3407.
- Zwiehler, J., Liszt, K., Handschur, M., Lassel, C., Lapin, A., Haslberger, A.G. (2009). *Combined PCR-DGGE fingerprinting and quantitative-PCR indicates shifts in fecal population sizes and diversity of Bacteroides, Bifidobacteria and Clostridium cluster IV in institutionalized elderly. Experimental gerontology*, vol. 44 (6): 440-446.