

Identificación de genes xilanasas a partir de bacterias ruminales aisladas de cabras criollas en pastoreo

D. Grilli^{1,2}; J. Kopečný³; J. Mrázek³; M. Cerón⁴; S. Cravero⁴; L. Schnittger⁴; N. Arenas²

¹Universidad Juan A. Maza, Mendoza. ²Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza. ³Academy of the Sciences of the Czech Republic.

⁴Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Castelar, Buenos Aires. diegogrilli@yahoo.com.ar

En la región de Lavalle (Mendoza), las cabras componen su dieta con una alta proporción de especies arbustivas, las que constituyen una importante oferta de fibra vegetal (celulosa y hemicelulosa, principalmente). La gran eficiencia en la utilización de dicha fibra por estas cabras puede deberse, entre otros factores, a las características de las bacterias ruminales fibrolíticas (celulolíticas y hemicelulolíticas). Por lo tanto el estudio de estas bacterias y sus enzimas fibrolíticas adquieren gran importancia en los sistemas de producción caprina en nuestro país. La diversidad y organización de estas enzimas son esenciales para la comprensión de importantes aspectos de la nutrición de los rumiantes. El rumen posee una comunidad bacteriana que degrada específicamente al xilano (principal componente de la hemicelulosa vegetal) y es un ambiente ideal para estudiar la diversidad genética de las enzimas xilanasas funcionales.

Objetivos

Identificar y caracterizar bacterias fibrolíticas aisladas del contenido ruminal de cabras Criollas e identificar genes codificantes para xilanasas en las cepas aisladas.

Metodología

Para este trabajo se aislaron 2 cepas de bacterias anaerobias estrictas del contenido ruminal de cabras biotipo Criollo que pastoreaban en el campo natural del NE de Mendoza. La identificación bioquímica de las cepas aisladas se fundamentó en los estudios de fermentación de diversas fuentes de carbono y en la degradación y utilización del xilano. Las cepas aisladas fueron acondicionadas para la extracción de ADN por el procedimiento de fenol-éter. A partir del ADN extraído y mediante el uso de *primers* específicos se amplificaron regiones del gen ADN_r 16S (utilizado para la clasificación taxonómica de las cepas aisladas) y de genes codificantes para enzimas xilanasas. Para la amplificación de estas regiones se desarrolló la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando el kit QIA amp DNA Stool (Byodynamics). Los fragmentos amplificados por PCR fueron purificados con el kit Illustra GFX™ (GE Healthcare). Dichos fragmentos fueron clonados en un vector plasmídico para secuenciación (pCR[®]4- TOPO[®]) y con este

vector se transfectaron *Escherichia coli* competentes (One Shot TOP10) utilizando el kit TOPO TA Cloning (Invitrogen). Posteriormente se procedió con el cultivo de las *E. coli* competentes en un medio Luria-Bertoni con ampicilina y se realizó la selección de las bacterias recombinantes resistentes a éste antibiótico. Para la purificación de los plásmidos se utilizó el kit Illustra™ Plasmid Prep Mini Spin (GE Healthcare). La secuenciación del ADN plasmídico purificado se realizó por el método de Sanger con secuenciadores capilares. Para la identificación de los genes amplificados de las cepas aisladas se utilizaron las secuencias editadas y se construyó un árbol filogenético.

Resultados obtenidos

Nuestros resultados apoyaron la designación de las cepas aisladas como pertenecientes al género *Pseudobutyribivibrio ruminis* y *Pseudobutyribivibrio xylanivorans*, dos nuevos biotipos recientemente clasificados de la bacteria hemicelulolítica *Butyribivibrio fibrisolvens*. Estos biotipos bacterianos son predominantes en el rumen de animales adaptados a rigurosas condiciones de alimentación y a dietas de baja calidad nutricional. Además, se determinó en la cepa *P. xylanivorans* 2 una importante actividad xilanolítica y la presencia del gen *xynAPx* que codifica para una enzima xilanasas perteneciente a la familia 10 de las enzimas glicosilhidrolasas.

Publicaciones

Grilli D, Cerón M, Paez S, Egea V, Schnittger L, Cravero S, Sosa Escudero M, Allegretti L, Arenas GN. 2012. Isolation of *Pseudobutyribivibrio ruminis* and *Pseudobutyribivibrio xylanivorans* from rumen of Creole goats fed native forage diet. *Folia Microbiologica*. En prensa.

Conclusiones

Este trabajo proporciona un marco teórico para la manipulación de la fermentación ruminal en las cabras Criollas. La actividad xilanolítica en el ambiente ruminal podría ser modificada mediante la incorporación de la cepa *P. xylanivorans* o mediante la adición de las enzimas xilanasas producidas por esta cepa al ecosistema ruminal de los caprinos Criollos.