

UNIVERSIDAD DE BURGOS

ESCUELA DE DOCTORADO

TESIS DOCTORALES

TÍTULO:	BIOINFORMATIC INVESTIGATION OF MICROBIOTA AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OCCURRENCE FROM FARM TO HUMANS BY USING HIGH-THROUGHPUT DNA SEQUENCING APPROACHES.
AUTOR:	MARTÍN QUIJADA, NARCISO
PROGRAMA DE DOCTORADO:	AVANCES EN CIENCIA Y BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIAS..
FECHA LECTURA:	06/06/2019
HORA:	12:00
CENTRO LECTURA:	SALÓN DE ACTOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE BURGOS.
DIRECTORES:	MARTA HERNÁNDEZ PÉREZ DAVID RODRÍGUEZ LÁZARO
TRIBUNAL:	LUCAS DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ AZUCENA MORA GUTIÉRREZ MARTÍN WAGNER JOSÉ MARÍA EIROS BOUZA JORDI ROVIRA CARBALLIDO
RESUMEN:	

Las nuevas tecnologías de secuenciación masiva de ADN (“*high-throughput sequencing*”, HTS) han revolucionado por completo el campo de la genética bacteriana, ya que generan una gran cantidad de información genómica a un coste y tiempo inferior comparado con técnicas de secuenciación convencionales. El uso de esta tecnología permite caracterizar con gran resolución las comunidades microbianas (microbiota) y sus genes presentes a lo largo de la cadena alimentaria, lo que tiene grandes repercusiones, dada su importancia en la producción y seguridad alimentaria, así como en la salud humana y animal. La principal limitación en el uso de HTS radica en el análisis de la gran cantidad de datos que se generan, siendo necesarios conocimientos avanzados de programación y el uso de complejas herramientas bioinformáticas, principalmente en línea de comandos en sistema operativo Linux y MacOs.

En esta Tesis Doctoral se han utilizado dos aproximaciones de HTS para el estudio de la microbiota o de los genes que albergan determinadas bacterias diana en distintos puntos de la granja al humano: amplificación y secuenciación de genes taxonómicos (“*gene-targeted sequencing*”) y aislamiento de bacterias de interés y posterior secuenciación del genoma completo (“*whole genome sequencing*”, WGS). El principal objetivo fue la evaluación de distintos software, bases de datos y aproximaciones bioinformáticas y su integración en *pipelines*, protocolos informáticos que permiten la paralelización y automatización de los procesos, específicos para cada estudio, con el fin de establecer los mecanismos de análisis básicos para extraer la información biológica contenida en los archivos de HTS.

Mediante *gene-targeted sequencing* (usando como diana el gen 16S ARNr) se caracterizó la microbiota a lo largo del proceso de fabricación del *Chorizo de León*, encontrando diversos oligotipos de *Lactobacillus* predominantes en los productos finales y estrechamente relacionados con el fabricante, pudiendo ser responsables de las características organolépticas únicas de cada fabricante. También se estudió la relación existente entre la microbiota presente en las superficies de producción y el alimento, en este caso en la maduración del queso austriaco “Vorarlberger Bergkäse”. Ambos son productos sometidos a fermentación, el cual es uno de los procesos más estudiados en la microbiología alimentaria. Otro campo muy relevante en los últimos años es el estudio de la microbiota del tracto gastrointestinal (GIT), que está influenciada por la dieta y que tiene un papel vital en diversas funciones fisiológicas, inmunológicas y metabólicas, contribuyendo de

manera significativa a la salud humana y animal. Se analizó el efecto de la suplementación de la dieta con un prebiótico sobre la fisonomía y la microbiota del GIT de ovejas y corderos lactantes, observando que la suplementación alimentaria aumentaba el peso de los corderos que lo consumían y que éste estaba relacionado con una mayor abundancia relativa de bacterias del GIT como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Veillonella*, previamente identificadas como beneficiosas para el hospedador.

Por otro lado, se empleó la aproximación de WGS para el estudio de los genomas de bacterias diana aisladas en distintos puntos de la cadena alimentaria, guardando especial interés en el análisis de los genes que codifican resistencia a antibióticos (“resistoma”). La resistencia a antibióticos es uno de los problemas más urgentes de salud pública, dado que las bacterias se están volviendo refractarias al tratamiento con antibióticos, y la cadena alimentaria se comporta como un factor crítico de transmisión de bacterias y genes de resistencia a antibióticos. Investigamos los mecanismos de resistencia a colistina, uno de los antibióticos considerados como “última alternativa” contra bacterias multiresistentes, en *Escherichia coli* aislados de heces de ternero, cerdo y pavo de granjas en España. Los resultados permitieron descubrir nuevas variantes de mecanismos de resistencia a colistina, así como una alarmante coocurrencia de estos mecanismos con genes de resistencia a otros antibióticos. También se realizó el estudio genético de un *Staphylococcus aureus* aislado en queso que mostró sensibilidad a oxacilina a pesar de portar el gen de resistencia *mecA*. Una mutación en el gen *blaRI* (regulador de la expresión de *mecA*) fue identificado como el responsable de la sensibilidad del *S. aureus* a la oxacilina y que lo habría hecho pasar erróneamente como inocuo en controles de seguridad, si bien debiera haber sido identificado como aislado resistente.

Por último, y como resultado de la evaluación exhaustiva de software para WGS, desarrollamos un *pipeline* bioinformático, TORMES, que permite realizar un análisis de WGS completo (filtrado de las secuencias, ensamblado, anotación del genoma, búsqueda de genes de resistencia a antibióticos y de virulencia, plásmidos, sub-tipado y mutaciones puntuales causantes de resistencia a antibióticos y comparación pangenómica) de un conjunto de aislados bacterianos (sin importar el número, la especie o el origen) partiendo directamente desde los datos sin tratar procedentes de la plataforma de secuenciación. TORMES es código libre y requiere seguir unas instrucciones sencillas para su instalación y su uso, lo que lo convierte en una herramienta idónea para los usuarios sin conocimientos avanzados en bioinformática. Una vez terminado el análisis, TORMES resume los resultados de manera automática en un archivo interactivo tipo web, que puede abrirse en cualquier navegador, facilitando el análisis, la comparación y la transferencia de los resultados.