

Resultados de los análisis metagenómicos

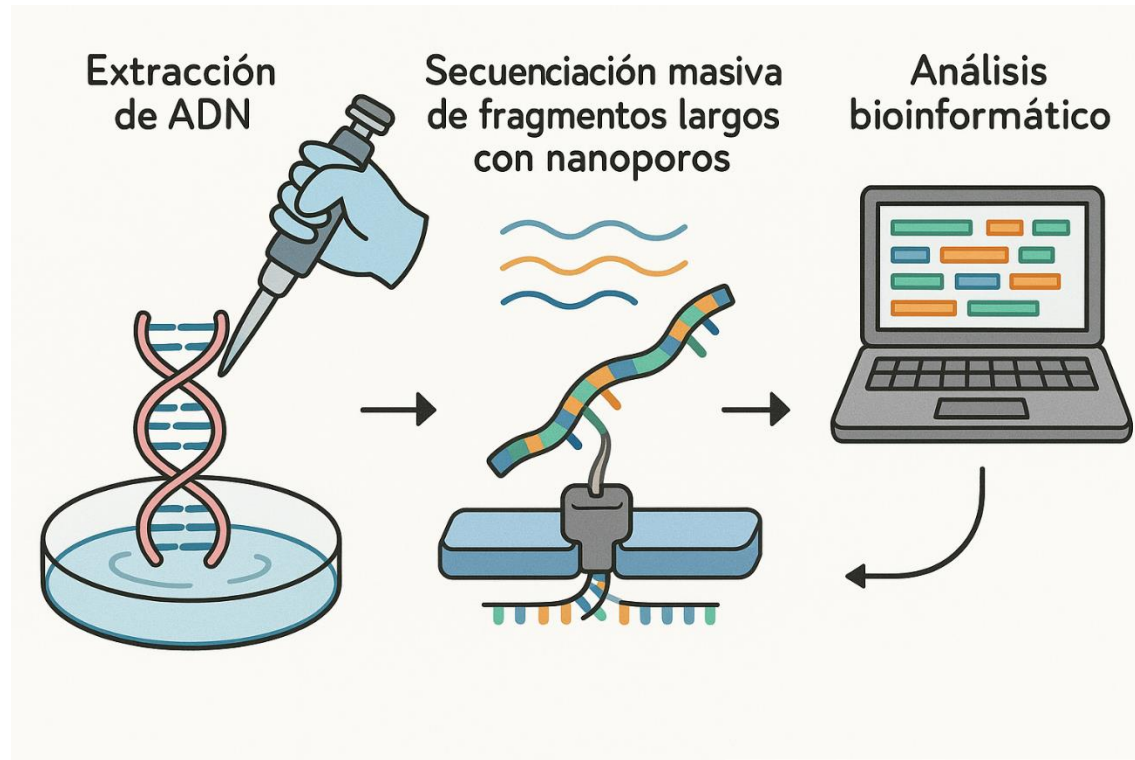
Jorge Hugo Calvo Lacosta

Investigador del CITA de Aragón. Departamento de Ciencia Animal
IUI Mixto Agroalimentario de Aragón - IA2 | Universidad de Zaragoza
ARAID

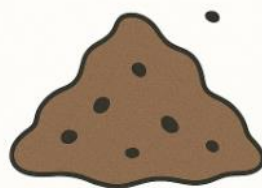
*Jornada de presentación de resultados finales del proyecto GANARAM AGROALNEXT
16 de septiembre de 2025, Facultad de Veterinaria de Zaragoza*

OBJETIVOS

Puesta a punto y optimización de un protocolo general de análisis del metagenoma



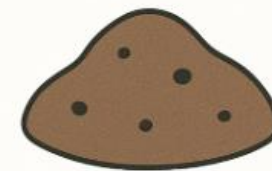
Heces



Estiércol



Purines



Suelos



Avena

OBJETIVOS

Caracterizar la composición y diversidad microbiana, así como detectar genes de resistencia a antibióticos, genes de virulencia y elementos genéticos móviles, complementando con análisis funcionales mediante COG y KEGG.



- Estudio de composición y diversidad microbiana



- Detección de genes de resistencia a antibióticos



- Identificación de genes de virulencia



- Análisis de elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones, integrones...)








- Anotación funcional mediante COG



- Análisis de rutas metabólicas con KEGG

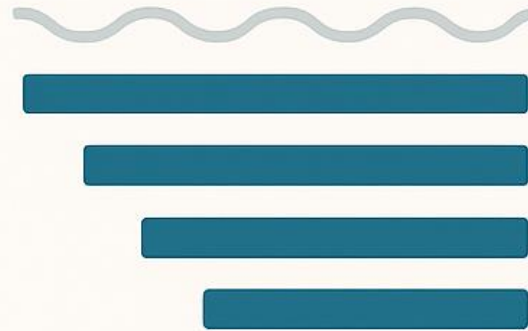
¿POR QUÉ ANÁLISIS METAGENÓMICOS?

-  No requiere cultivo → detecta bacterias no cultivables.
-  Aislamiento de diferentes matrices.
-  Visión global → diversidad, abundancia, resistoma y funciones metabólicas.
-  Elementos genéticos móviles → plásmidos, integrones, resistomas.
-  Contexto ecológico → posición del aislado en el microbioma (dominancia, asociaciones).

ANÁLISIS DEL METAGENOMA

Secuenciación de nueva generación

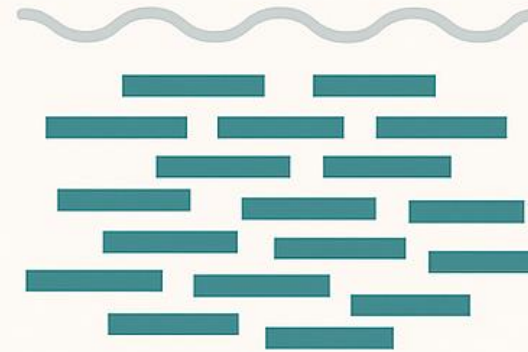
LECTURAS LARGAS



VENTAJAS

- Secuenciación de moléculas sin PCR
- Resolución de regiones del genoma complejas

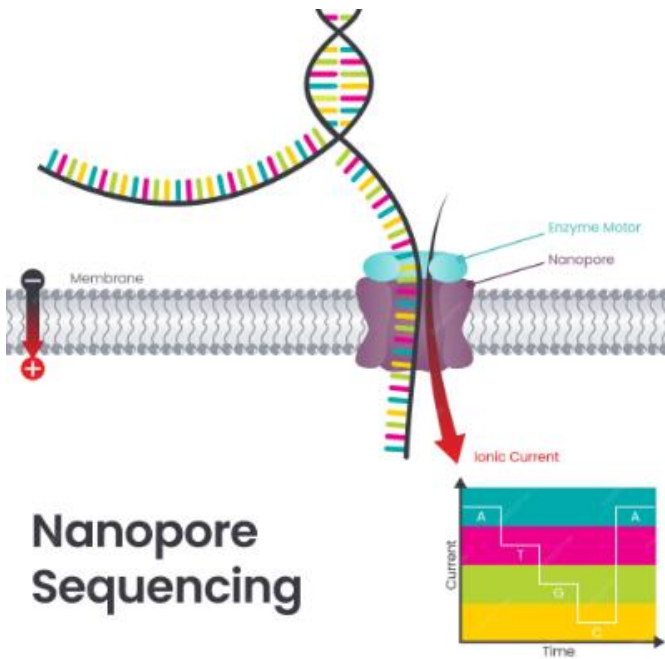
LECTURAS CORTAS



VENTAJAS

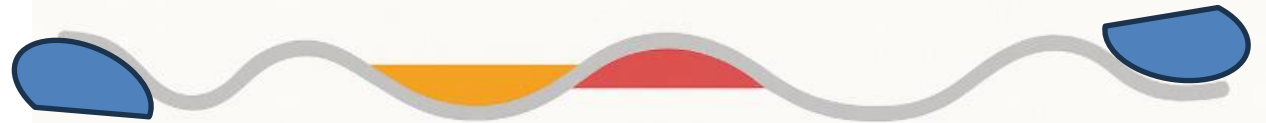
- Mayor calidad y precisión
- Mayor rendimiento

Secuenciación nanoporos



Nanopore Sequencing

Secuenciación de lecturas largas



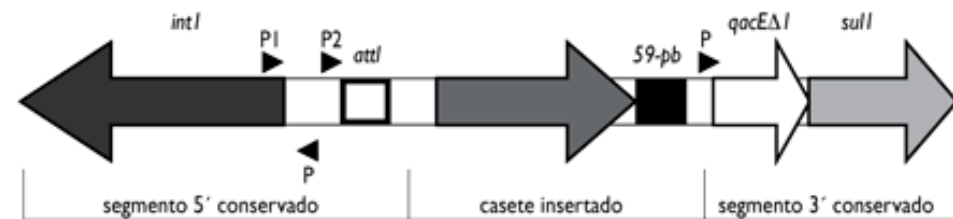
Gen de resistencia a antibióticos



Gen de virulencia



Elemento genético móvil



ANÁLISIS DEL METAGENOMA

Secuenciación nanoporos

EXTRACCIÓN DE ADN METAGENÓMICO



QUÍMICA

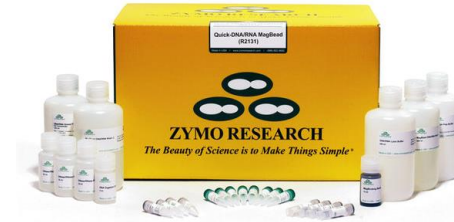


DE MAYOR PESO MOLECULAR

MECÁNICA



VS



**Extracción química → complejo
multienzimático (MetaPolyzome)**

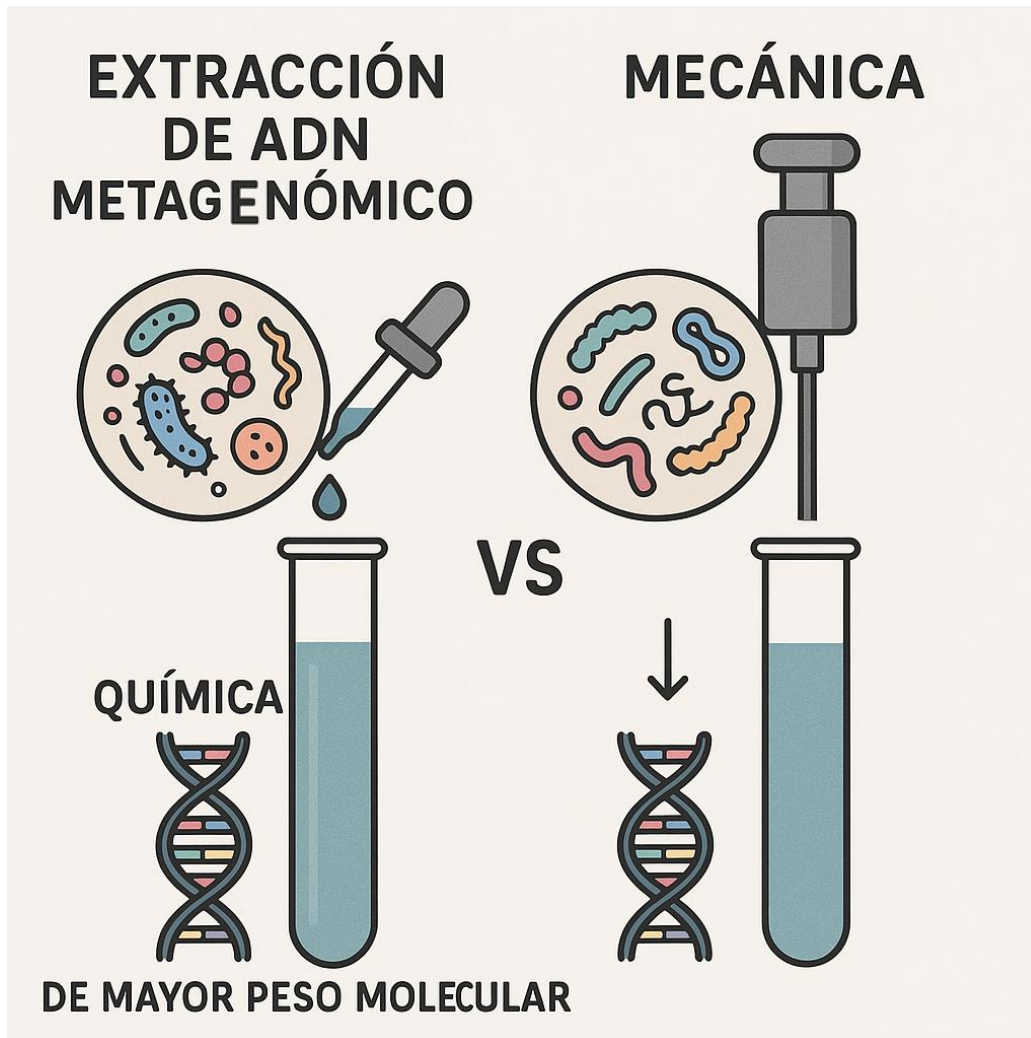
Mutanolysin • Achromopeptidase • Lyticase
• Chitinase • Lysostaphin • Lysozyme

**Heces • Estiércol • Estiércol compostado
• Purines • Suelos • Microbiota endófitas
y epífitas de plantas de avena**

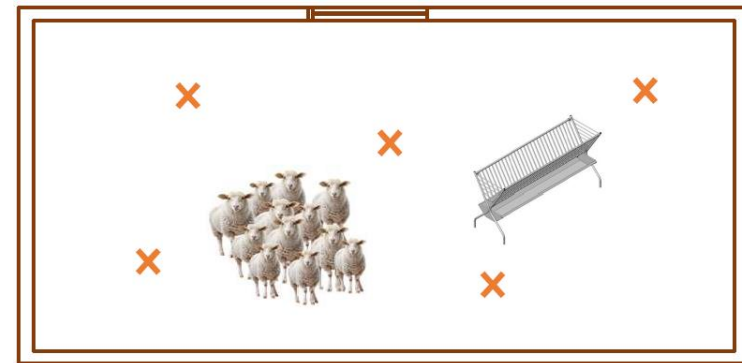
**Extracción mecánica → Power soil
de QIAGEN**

ANÁLISIS DEL METAGENOMA

Secuenciación nanoporos



Extracción individual

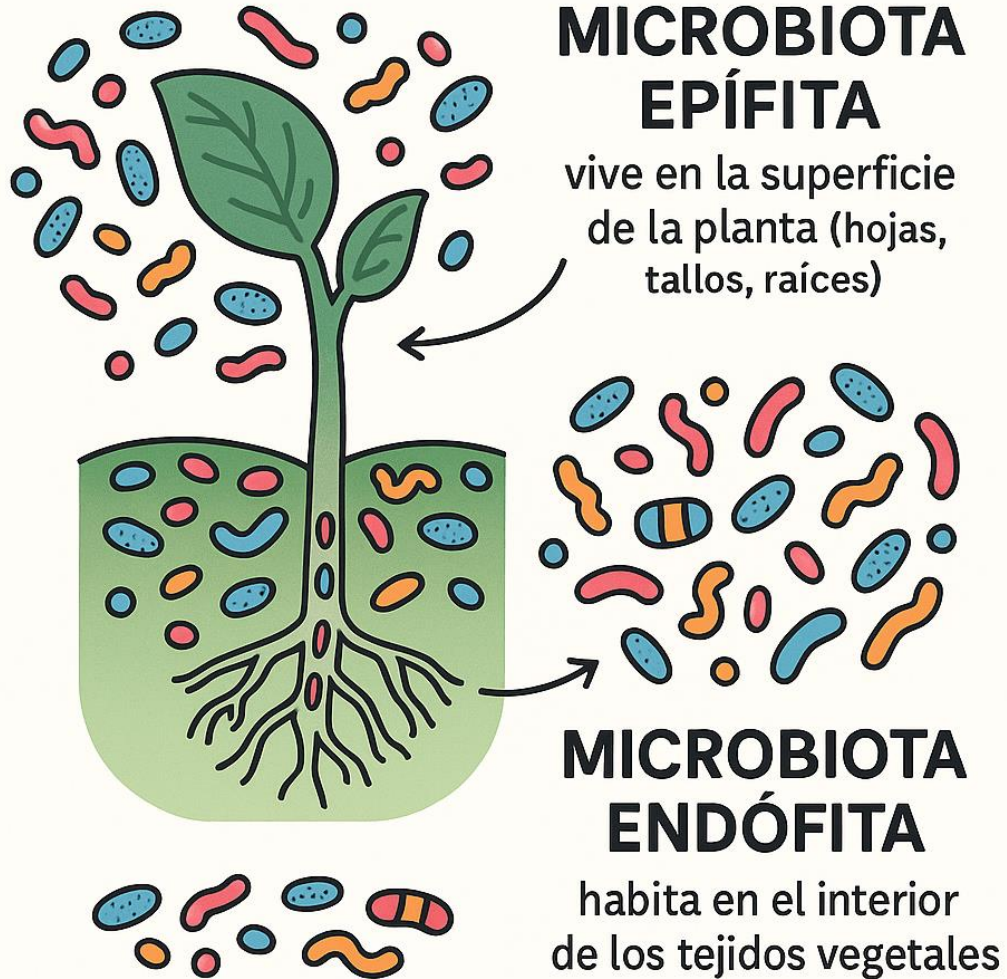


Mezcla muestras del mismo tipo en concentraciones equimolares

Secuenciación



Secuenciación nanoporos



162 metagenomas

Granjas madres porcino



- 25 metagenomas de heces.
- 14 metagenomas de purines
- 5 metagenomas de suelos

Cebaderos ovino

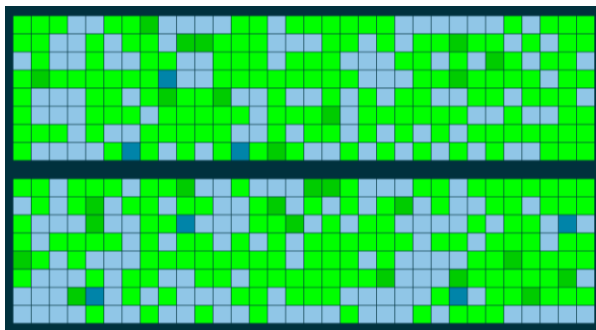


- 8 metagenomas de heces
- 6 metagenomas estiércol
- 6 metagenomas estiércol C
- 10 metagenomas suelos
- 24 metagenomas plantas

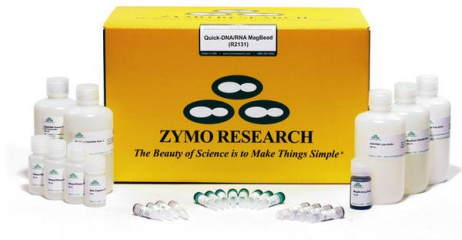
Cebaderos porcino



- 32 metagenomas de heces.
- 32 metagenomas de purines



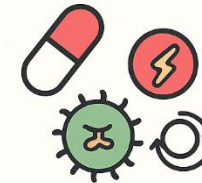
ANÁLISIS DEL METAGENOMA



Quick-DNA™ HMW
MagBead Kit
Extracción DNA individual

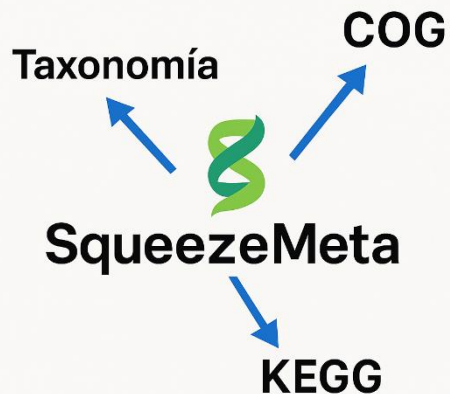


MinION device
(ONT), v14 y
R10.4.1 flow cells.
**Rendimiento
medio:
4.52 Gb/muestra**



- **TAXONOMÍA**
clasificación de los microorganismos en la muestra
- **RESISTOMA**
genes que confieren resistencia a antibióticos
- **VIRULOMA**
genes de factores de virulencia, como toxinas o adhesinas
- **MOBILOMA**
elementos genéticos móviles que se transfieren entre bacterias

Flujo estable de análisis



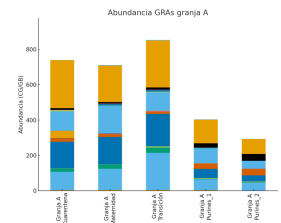
EPI2ME
Pipeline ARMA
Base de datos CARD

Galaxy

- Plasmid Finder
- Virulence Finder

Center for Genomic Epidemiology

- Mobile Element Finder



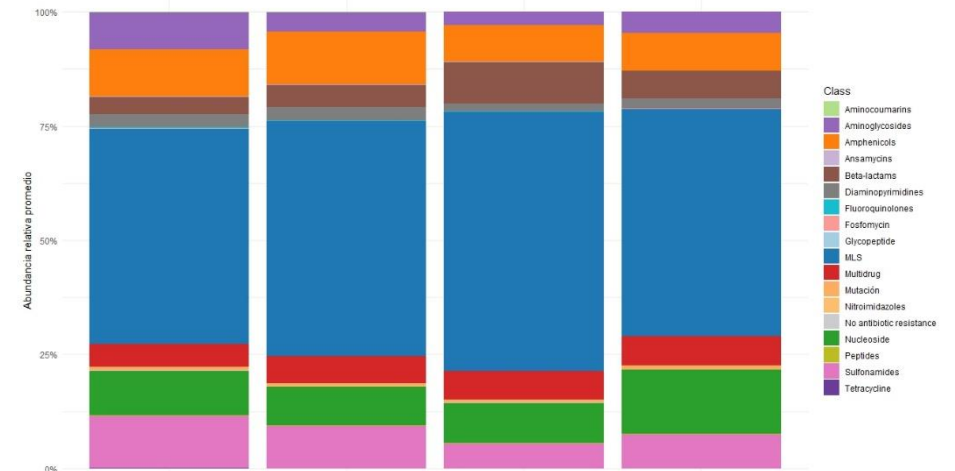
Abundancia (CG/GB secuenciado)

$$ARG_i \text{ abundance} = \frac{\sum_1^m \frac{Alignment_{end} - Alignment_{start}}{Length_{reference}(bp)}}{\frac{\sum_1^n Length_{read}(bp)}{10^9 bp/Gb}}$$

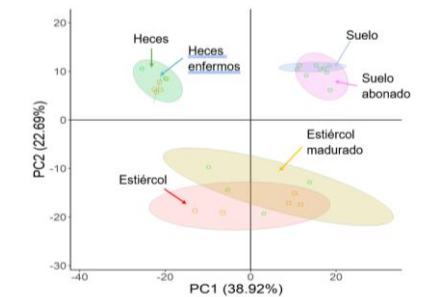
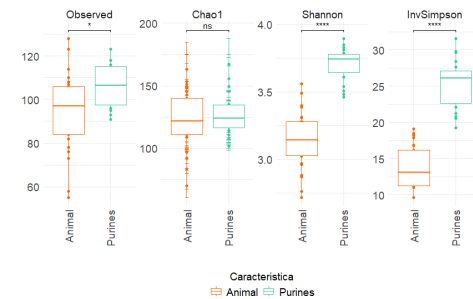
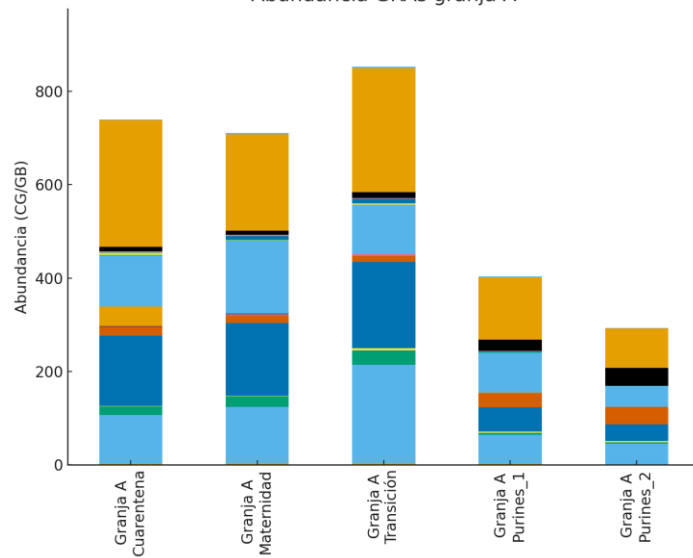
Dai, D., Brown, C., Bürgmann, H. et al.
<https://doi.org/10.1186/s40168-021-01216-5>

Abundancia relativa

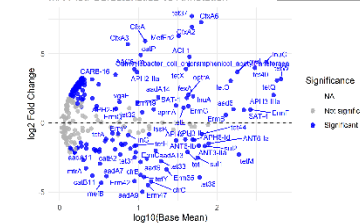
Abundancia relativa promedio por Clase y Lugar



Abundancia GRAs granja A



MA Plot: Característica vs Annotation

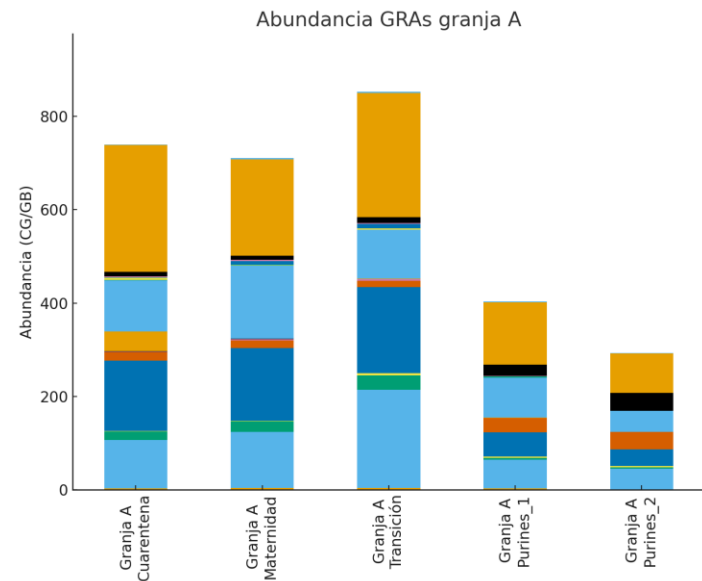


ANÁLISIS DEL METAGENOMA

Abundancia (CG/GB secuenciado)

$$ARG_i \text{ abundance} = \frac{\sum_1^m \frac{Alignment_{end} - Alignment_{start}}{Length_{reference}(bp)}}{\frac{\sum_1^n Length_{read}(bp)}{10^9 \text{ bp/Gb}}}$$

Dai, D., Brown, C., Bürgmann, H. et al.
<https://doi.org/10.1186/s40168-021-01216-5>



ANÁLISIS DEL METAGENOMA



Granjas porcino

Abundancia GRAs

- **25 metagenomas de heces.**
- **14 metagenomas de purines**



Granja A



Cuarentena



Maternidad



Transición



Balsa de purines



Granja B



Cuarentena



Maternidad



Transición



Balsa de purines

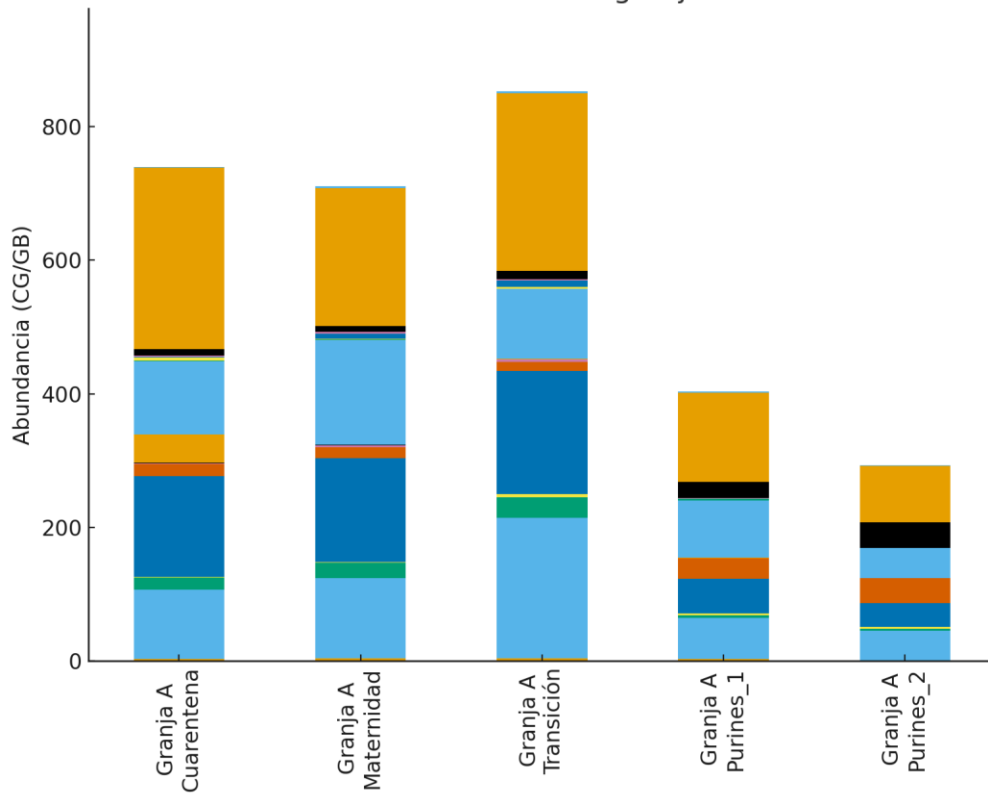




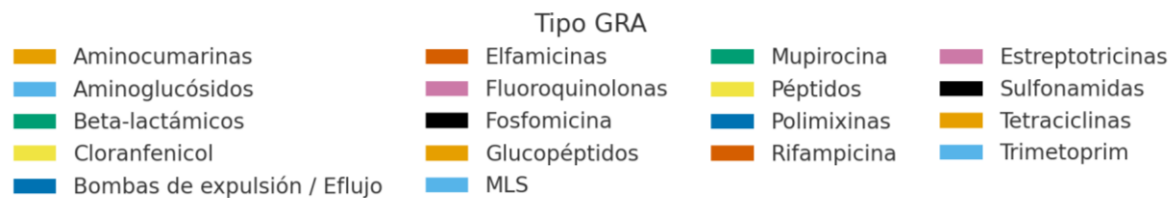
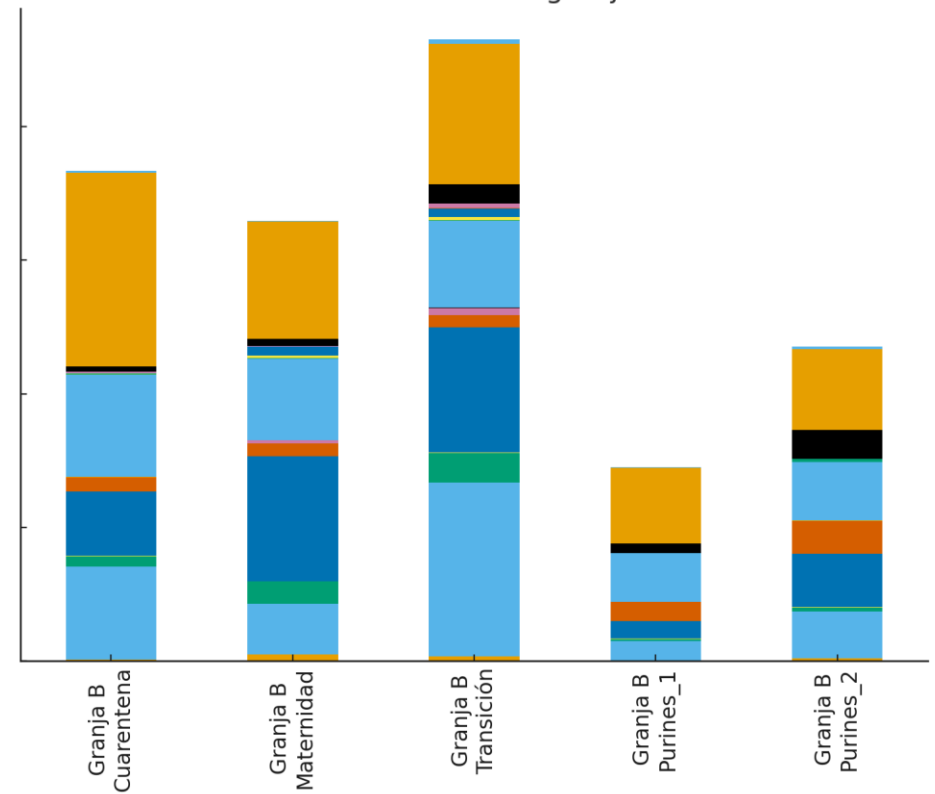
Granjas porcino

Abundancia GRAs

Abundancia GRAs granja A



Abundancia GRAs granja B



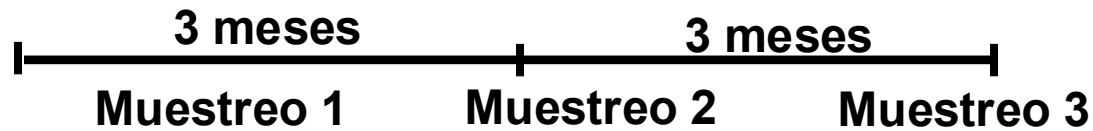
Muestra	Cg_GRA/Gb
Heces	770,68 ± 100,67
Purines	364,05 ± 88,35

ANÁLISIS DEL METAGENOMA



Cebaderos ovino

Abundancia GRAs



Tipo muestra	Metagenomas		
	Granja A	Granja B	Total
Heces	3	2	5
Heces animales enfermos	2	-	2
Estiércol	3	2	5
Estiércol madurado	2	2	4
Suelo abonado	-	5	5
Suelo sin abonar	-	4	4
Microbiota epifita parte aérea avena	-	6	6
Microbiota endófito parte aérea avena	-	6	6
Microbiota epifita raíz avena	-	6	6
Microbiota endófito raíz avena	-	6	6
Total	10	39	49



Cebadero A:

- Heces (n=3),
- Heces animales enfermos (n=2),
- Estiércol (n=3),
- Estiércol madurado (n=2).



Cebadero B:

- Heces (n=2),
- Estiércol (n=2),
- Estiércol madurado (n=2),
- Suelo abonado (n=5),
- Suelo sin abonar (n=4).



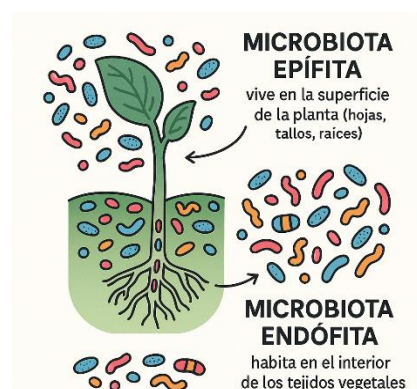
ANÁLISIS DEL METAGENOMA

Cebaderos ovino

Abundancia GRAs



VS



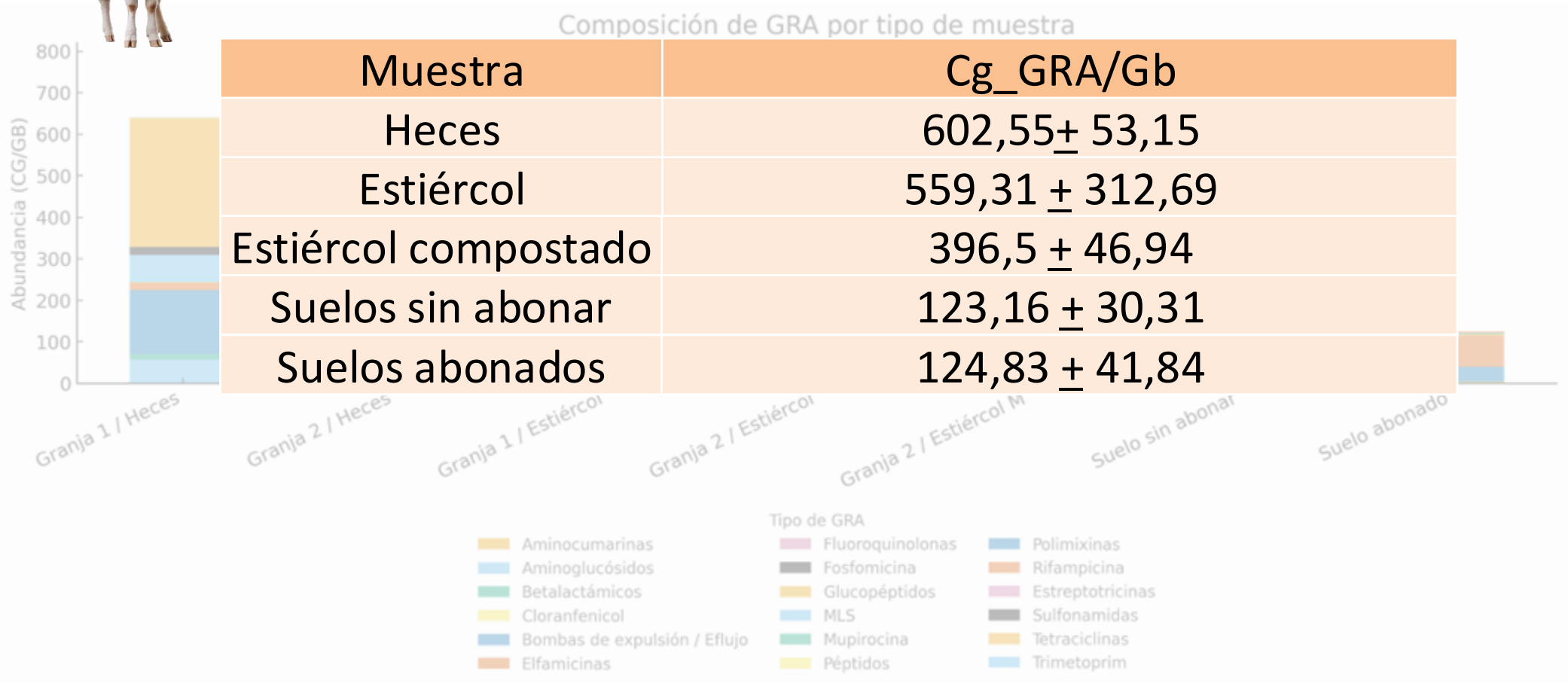
Shoot system

Root system

ANÁLISIS DEL METAGENOMA

Cebaderos ovino

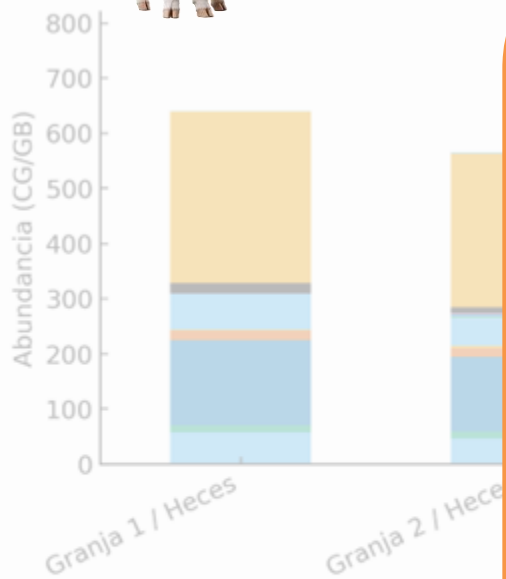
Abundancia GRAs



ANÁLISIS DEL METAGENOMA

Cebaderos ovino

Abundancia GRAs



□ Heces:

48,93% Tetraciclinas

23,95% Bombas de eflujo

□ Estiércol:

24,97% Bombas de eflujo

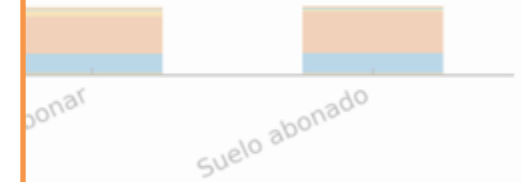
20,25% Elfamicina

20,17% Sulfonamida

□ Suelos:

54,69% Elfamicina

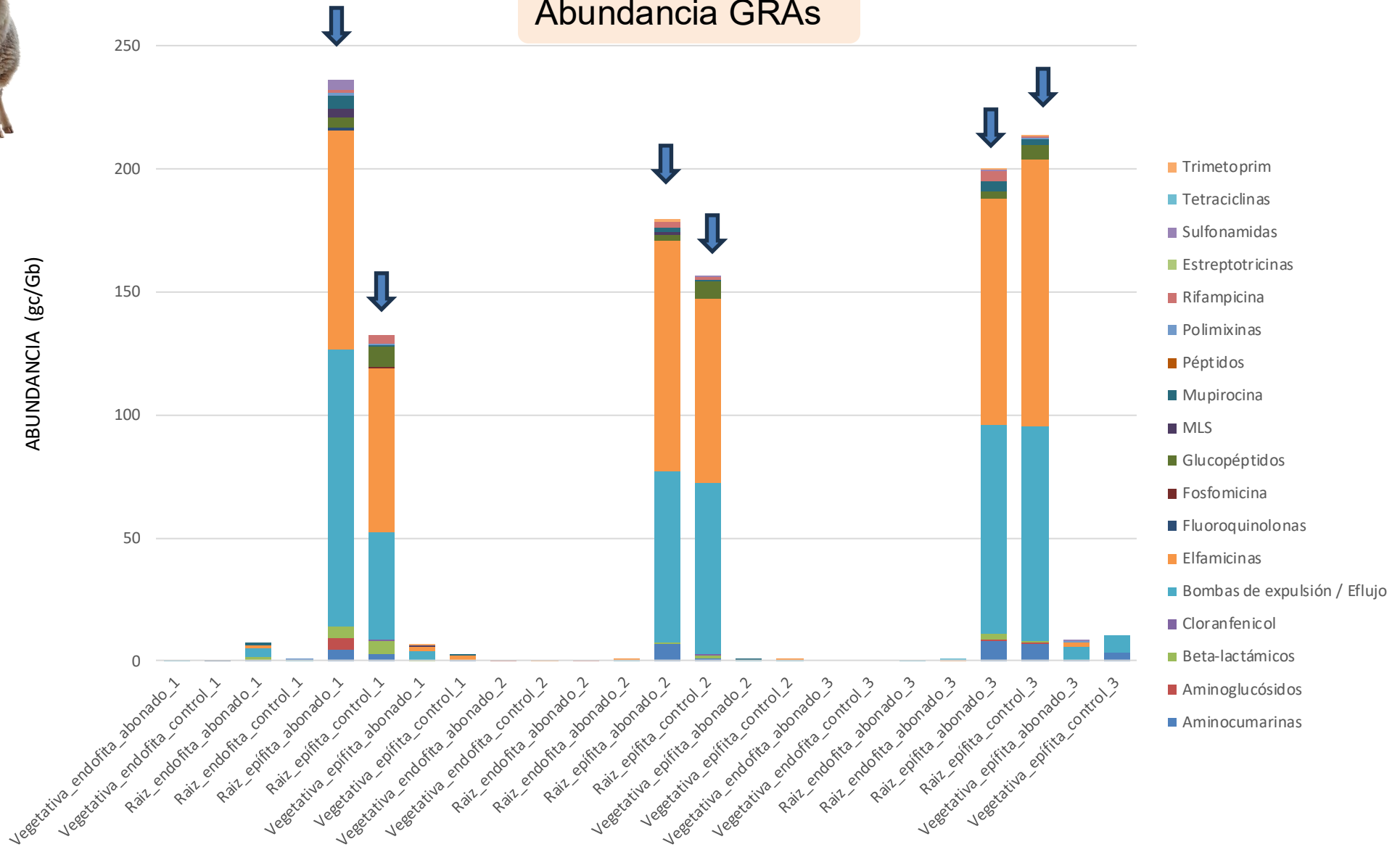
30,47% Bombas de eflujo



■ Bombas de Expulsión / Eflujo
 ■ Fluoroquinolonas
 ■ Tetraciclinas
■ Elfamicinas
 ■ Péptidos
 ■ Trimetoprim

Cebaderos ovino

Abundancia GRAs



Cebaderos ovino

Abundancia GRAs



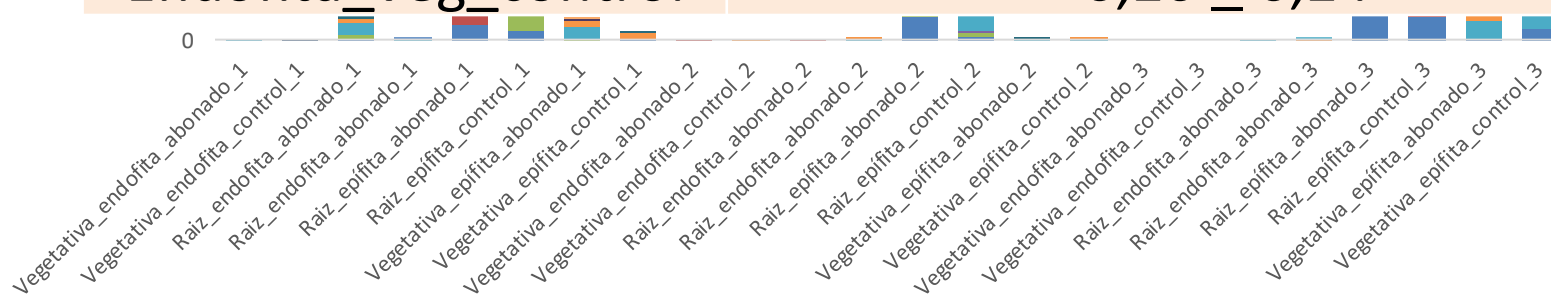
250

Muestra	Cg_GRA/Gb
Epífita_raíz_abonado	205,29 + 28,67
Epífita_raíz_control	167,76 + 41,74
Epífita_veg_abonado	5,4 ± 4,19
Epífita_veg_control	4,4 + 5,17
Endófitas_raíz_abonado	2,79 ± 4,38
Endófitas_raíz_control	0,60 ± 0,02
Endófitas_veg_abonado	0,05 + 0,05
Endófitas_veg_control	0,26 ± 0,24

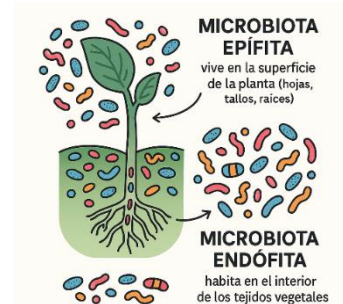
ABUNDANCIA (gc/Gb)



Avena



Beta-lactámicos

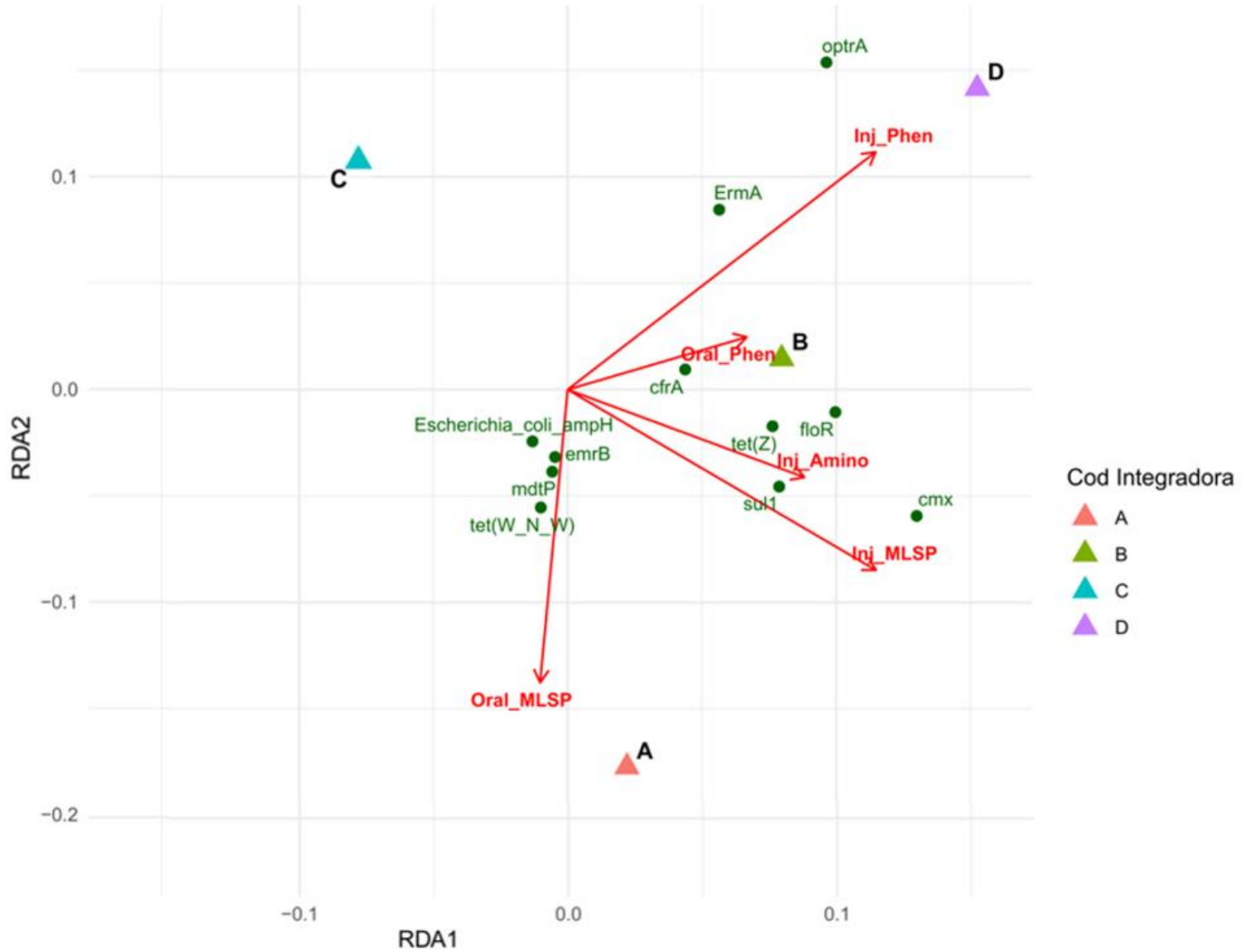


ANÁLISIS DEL METAGENOMA



Cebaderos porcino

Análisis de redundancia



ANÁLISIS DEL METAGENOMA

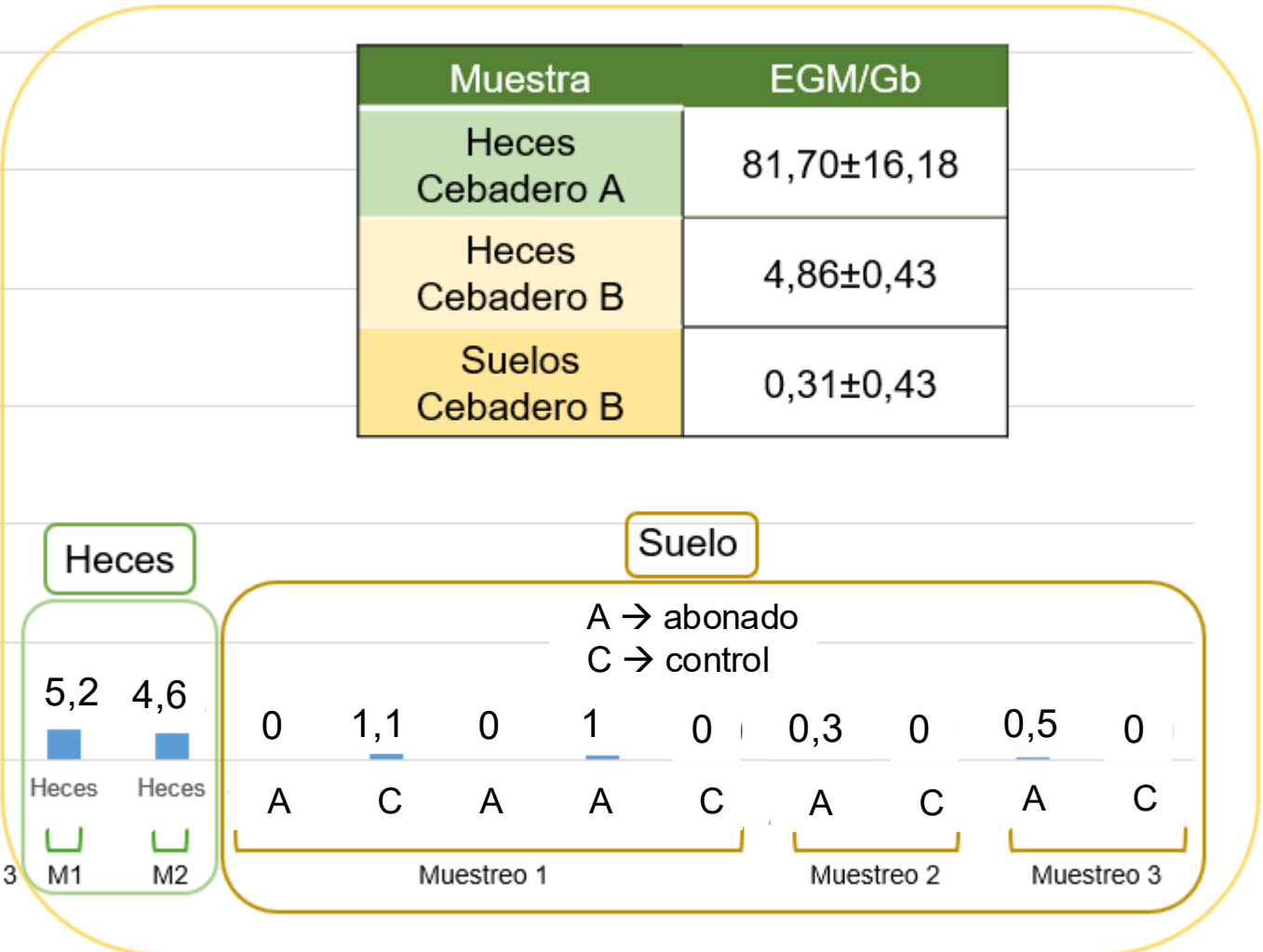
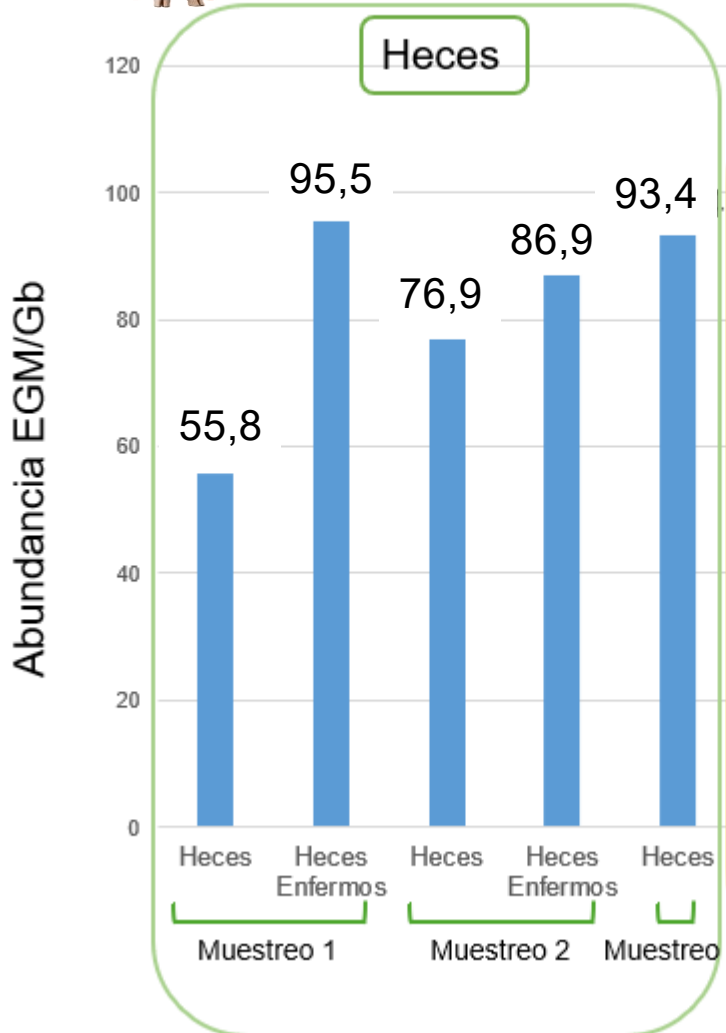
Cebaderos ovino

Análisis de abundancia EGM



Cebadero A

Cebadero B



Cebaderos ovino

Análisis de abundancia EGM



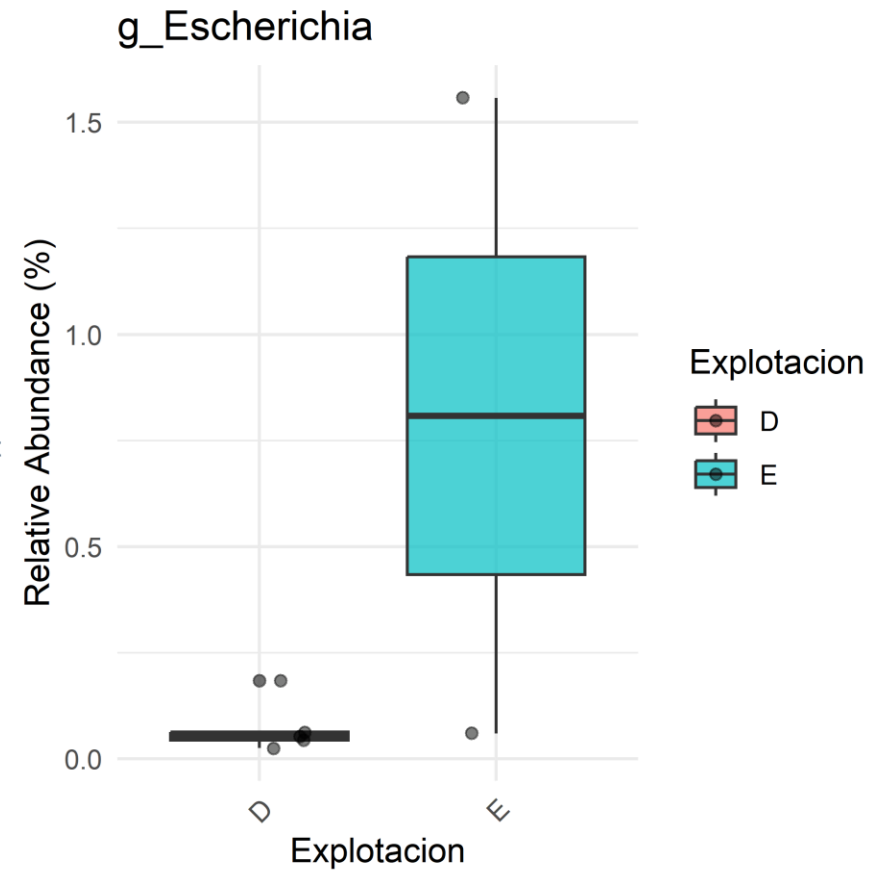
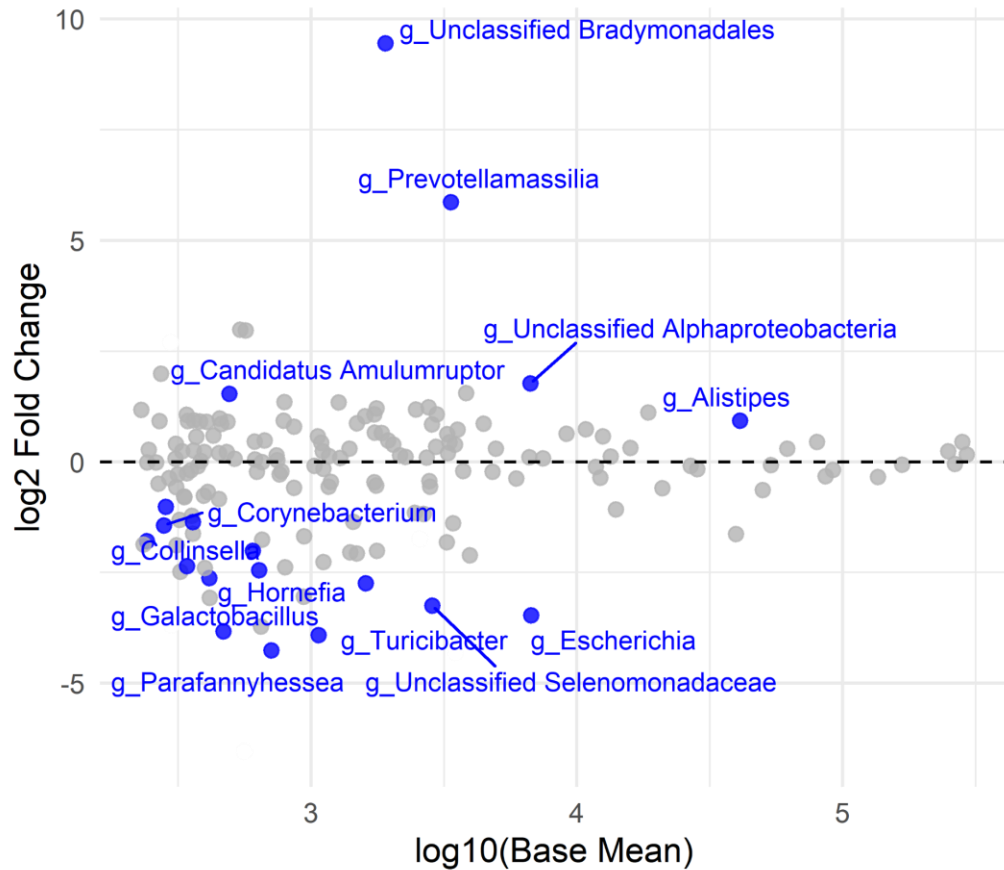
EGM	Cebadero A		Cebadero B	
	Heces	%	Heces	%
Transposón compuesto	1207	26.54%	26	23.01%
Secuencias de inserción (IS)	2932	64.47%	75	66.37%
Elemento conjugativo integrativo (ICE)	0	0.00%	0	0.00%
Elemento movilizable integrativo (IME)	406	8.93%	12	10.62%
Elementos transponibles de repetición invertida en miniatura	1	0.02%	0	0.00%
Transposones unitarios	2	0.04%	0	0.00%
Total	4548	100.00%	113	100.00%

Cebadero A y B similares en composición de EGM.

1,5% de los de los GRA se detectaron en plásmidos.

Cebaderos ovino

Análisis de abundancia EGM

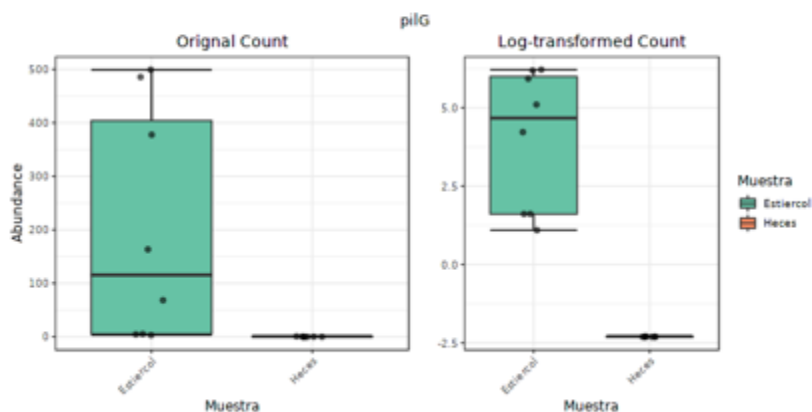


Cebaderos ovino

Análisis de abundancia genes de virulencia

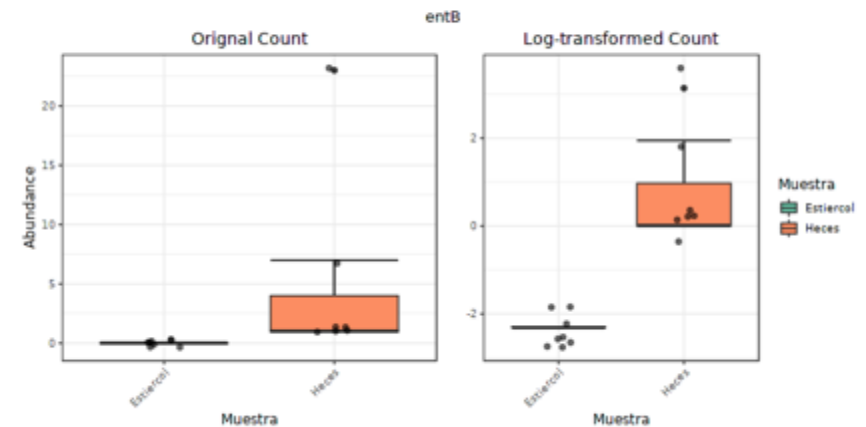


- Sin diferencias significativas a nivel composicional entre cebaderos ni entre tipo de muestra.
- Abundancia diferencial de 23 genes codificantes para factores de virulencia entre heces y estiércol.



- ***pilG, pilT***: involucrados en formación, ensamblaje o regulación de *pili* tipo IV.
- ***fliN, fliM, fliI***: componentes del flagelo y su regulación.
- ***ideR***: regulador de homeostasis del hierro.

- ***fepC, fepG***: componentes del sistema de captación de enterobactina.
- ***entS, entB***: biosíntesis y transporte de enterobactina.



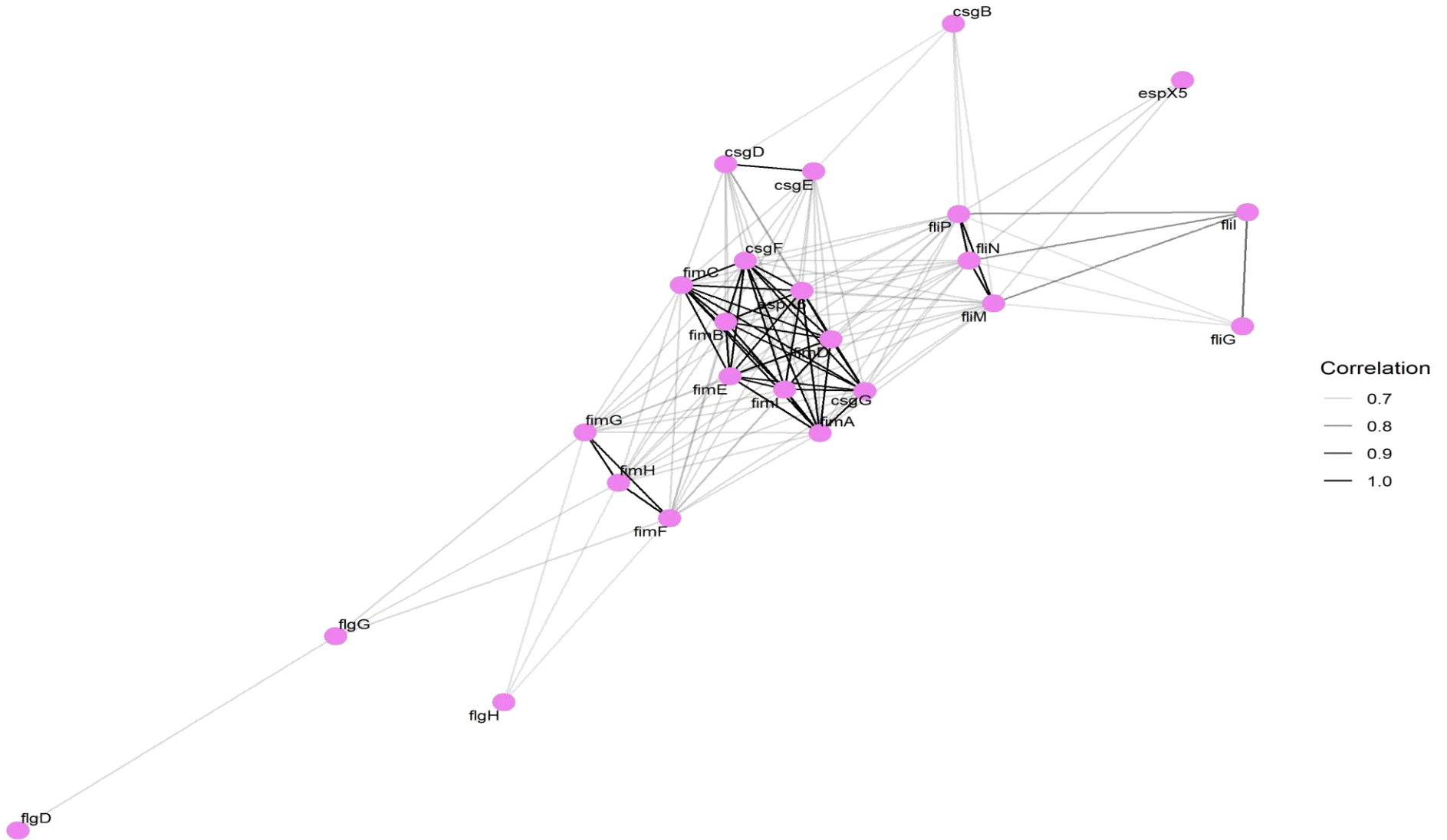
ANÁLISIS DEL METAGENOMA



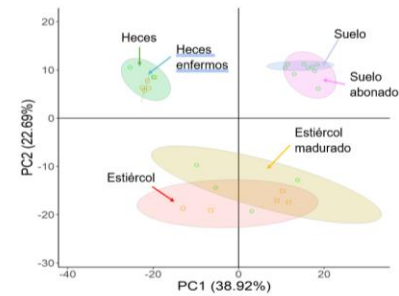
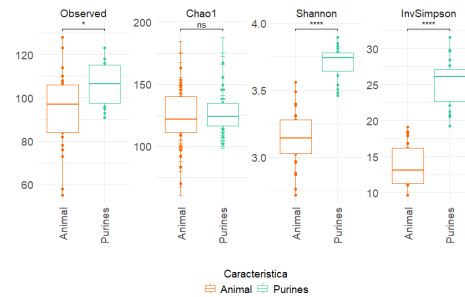
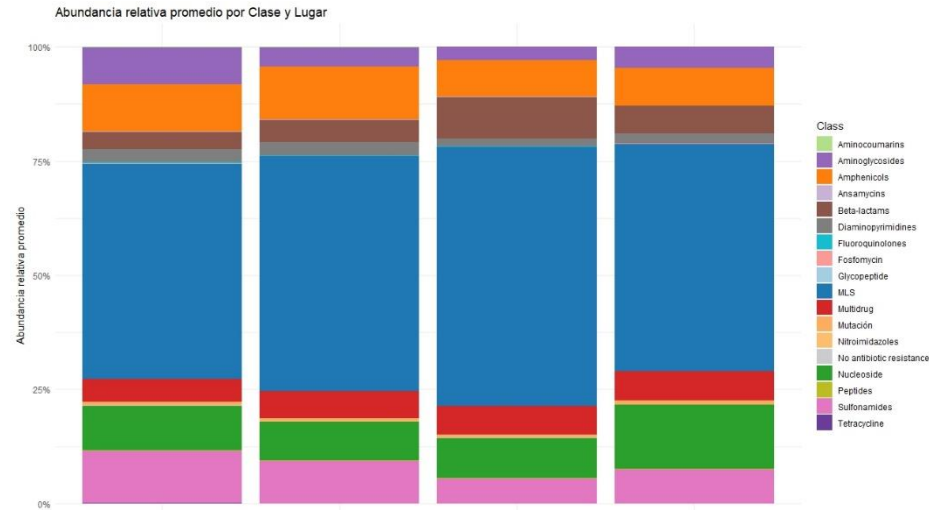
Cebaderos porcino

Análisis de co-ocurrencia heces genes de virulencia

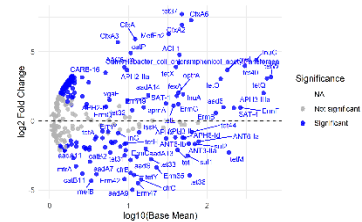
Red de co-ocurrencia de genes (cor > 0.6)



Abundancia relativa



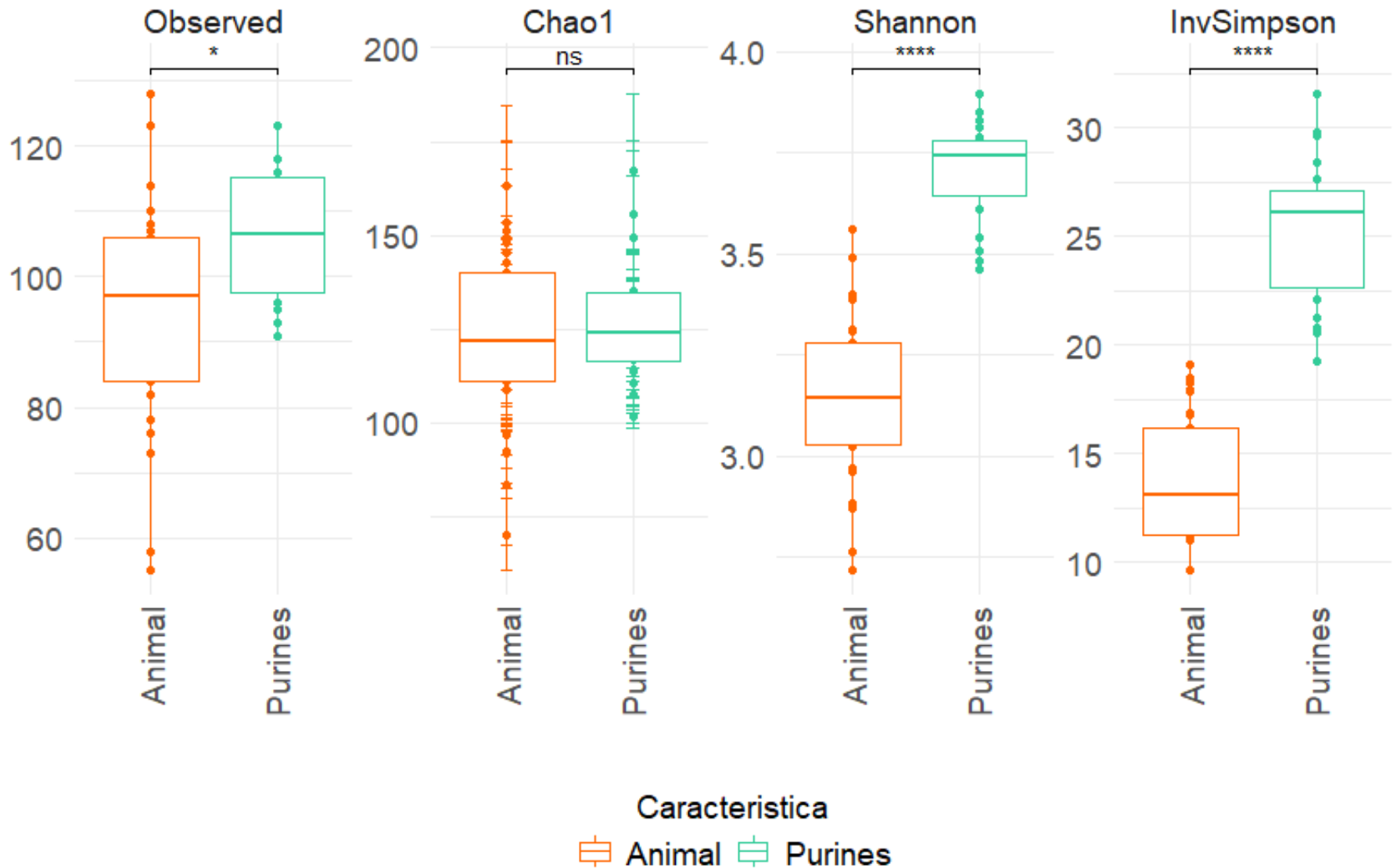
MA Plot Característica vs Annotation





Cebaderos porcino

α -diversidad GRAs

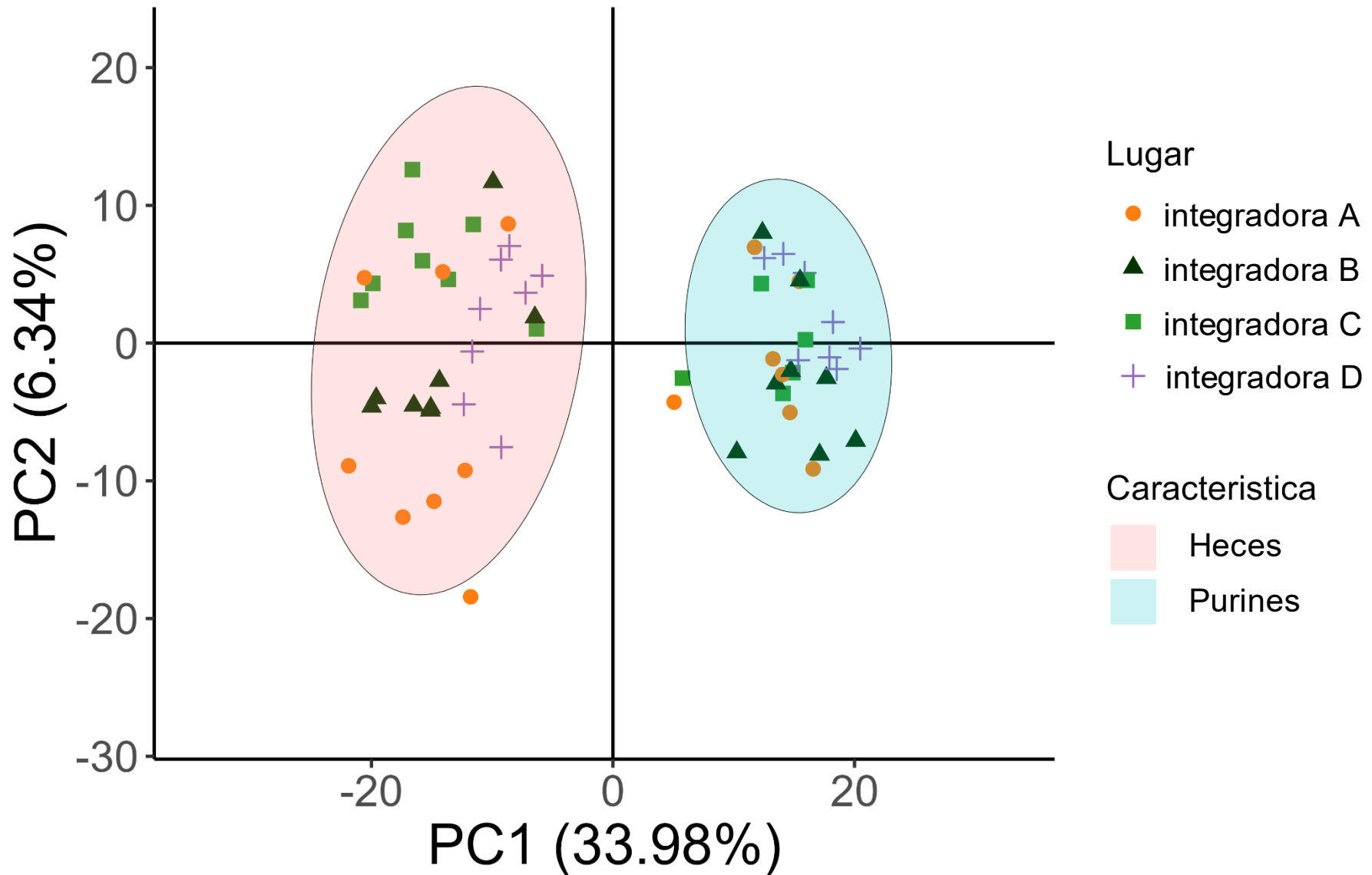


ANÁLISIS DEL METAGENOMA



Cebaderos porcino

β -diversidad GRAs

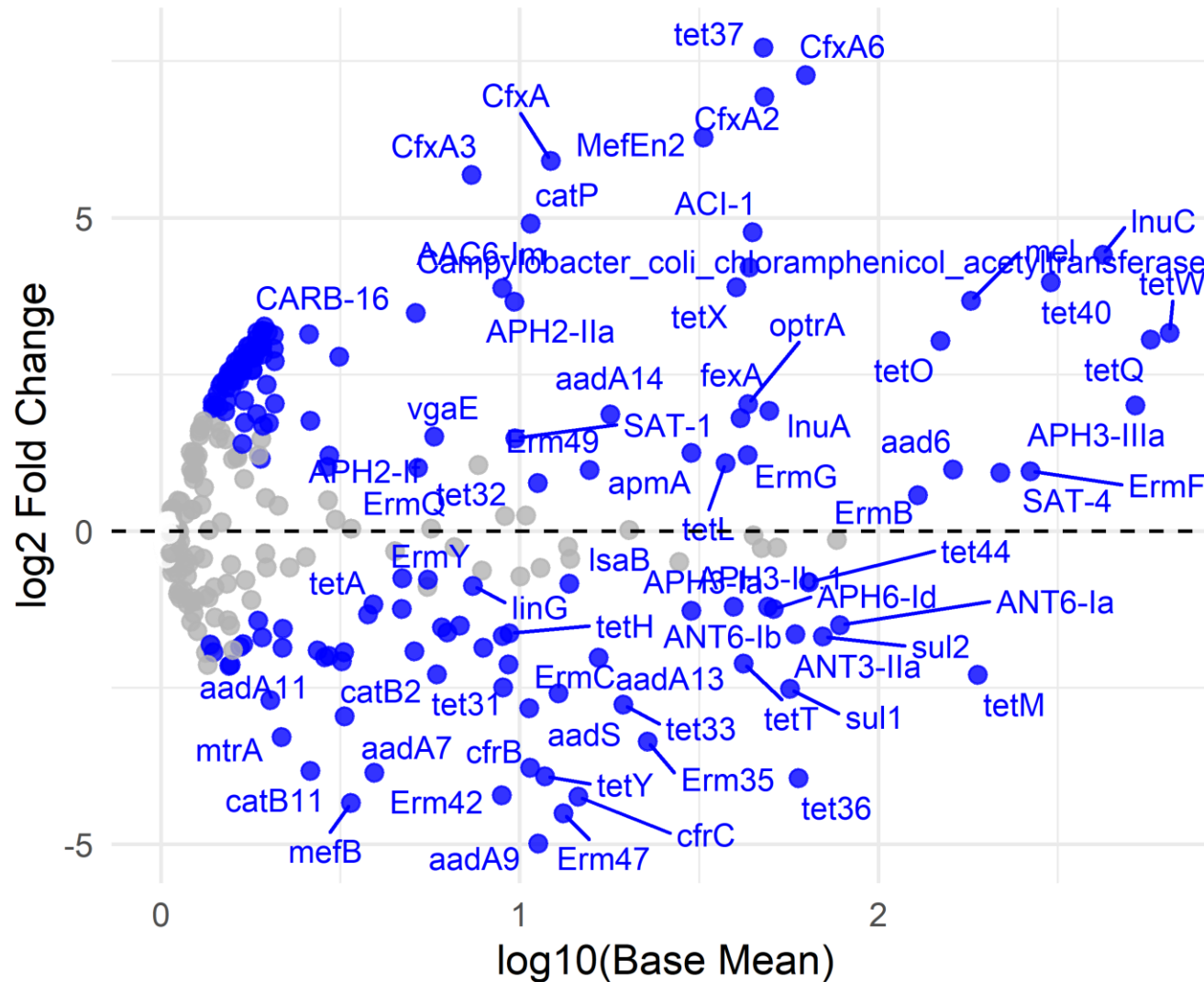




Cebaderos porcino

MA GRAs

MA Plot: Característica vs Annotation



Significance

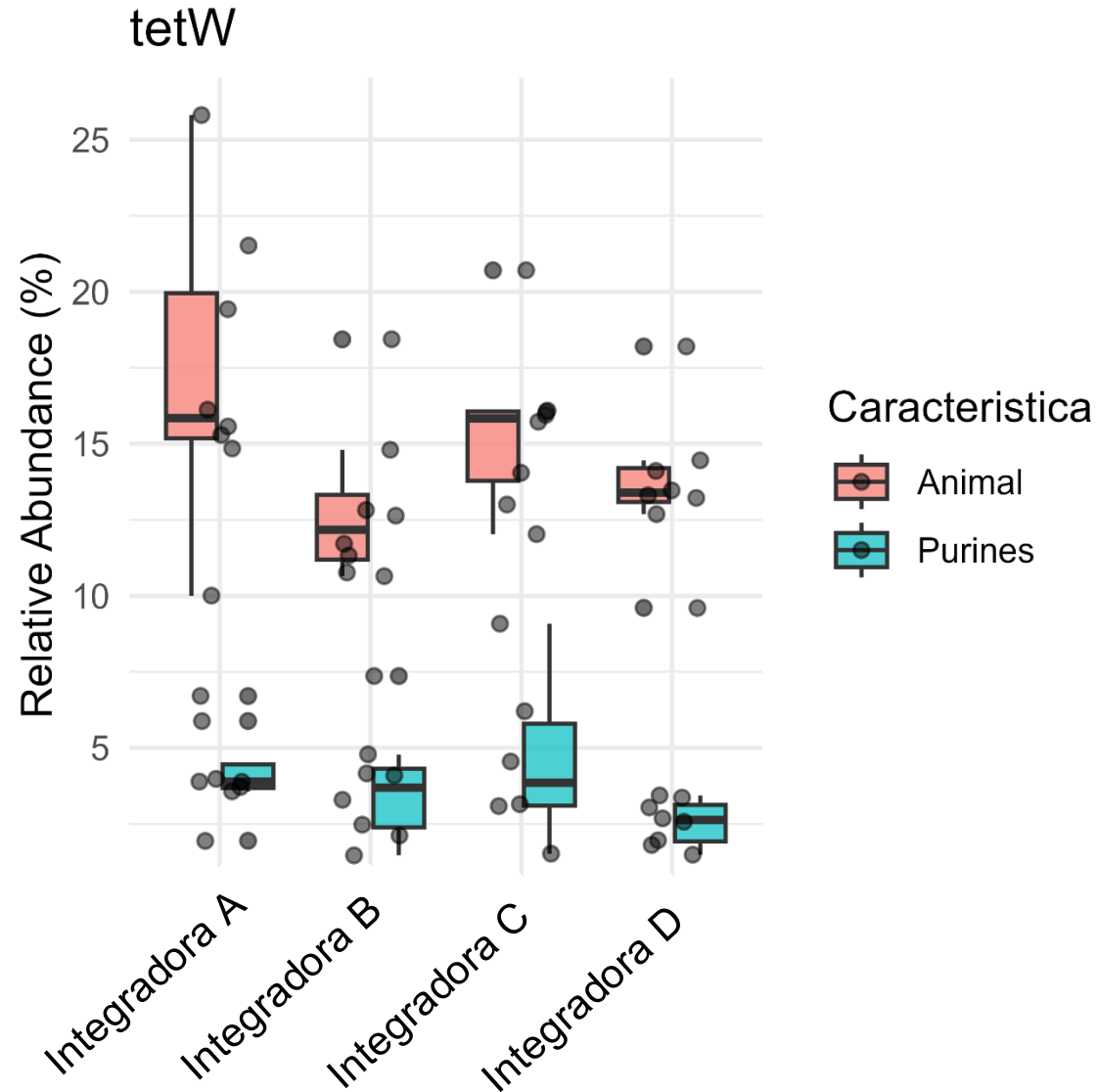
- NA
- Not significant
- Significant

ANÁLISIS DEL METAGENOMA



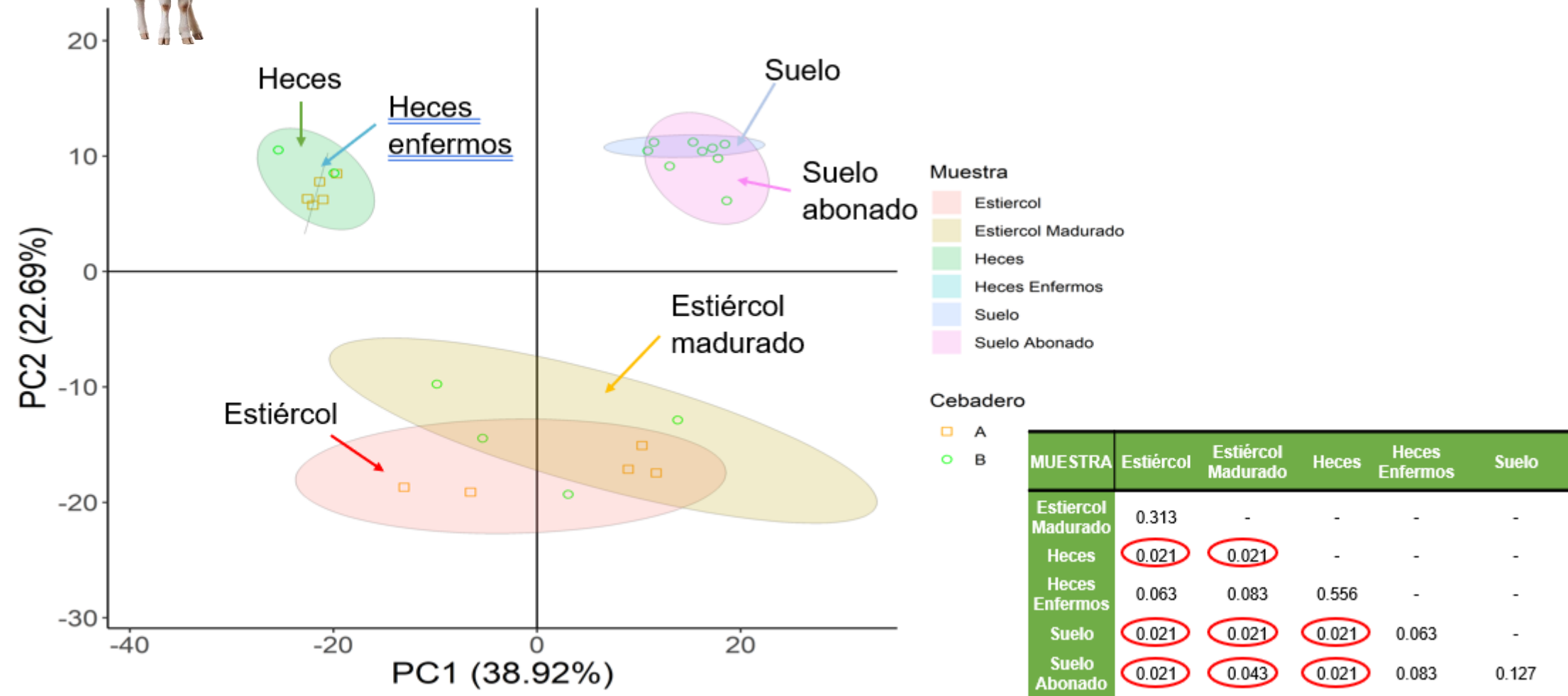
Cebaderos porcino

Boxplot GRAs



Cebaderos ovino

β -diversidad GRAs

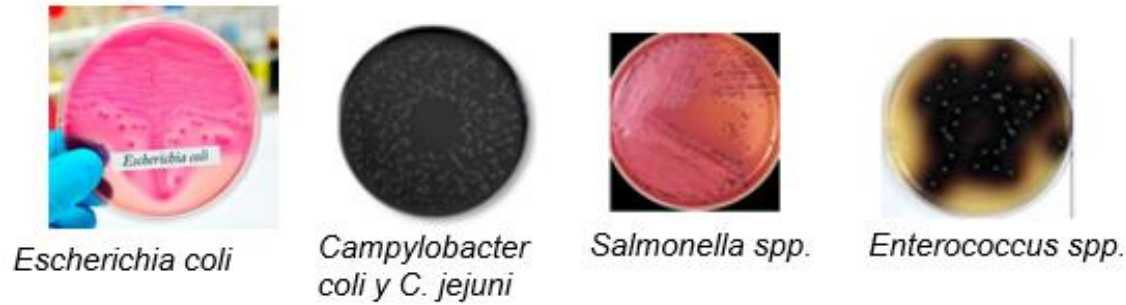


Cebaderos porcino

Aislados con MIC



32 cebaderos



150 grupo / heces



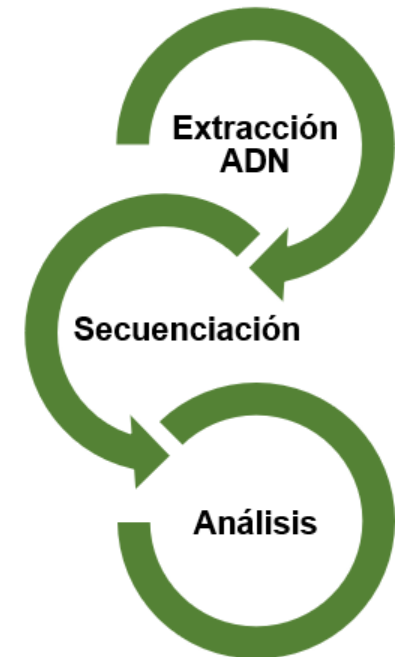
GeneElute Bacterial Genomic DNA



Librerías de 150 nucleótidos paired-end



MinION device (ONT), v14 y R10.4.1 flow cells



SECUENCIACIÓN GENOMA COMPLETO AISLADOS

Cebaderos porcino

Aislados con MIC



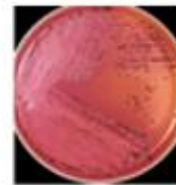
32 cebaderos



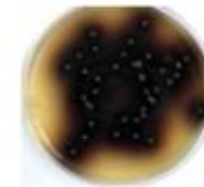
Escherichia coli



Campylobacter coli y *C. jejuni*

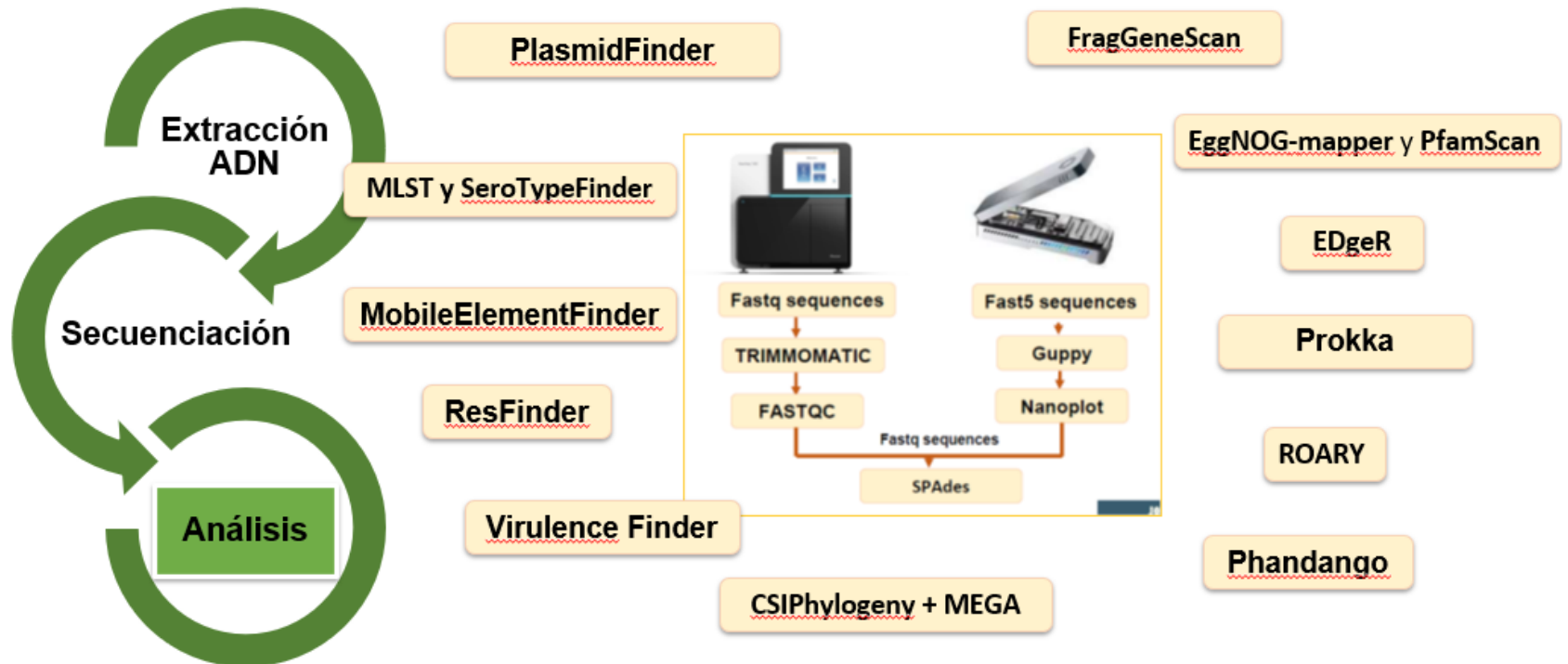


Salmonella spp.



Enterococcus spp.

150 grupo / heces



Cebaderos porcino

Aislados con MIC



32 cebaderos



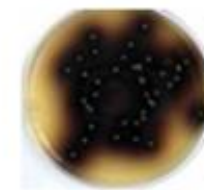
Escherichia coli



Campylobacter coli y *C. jejuni*

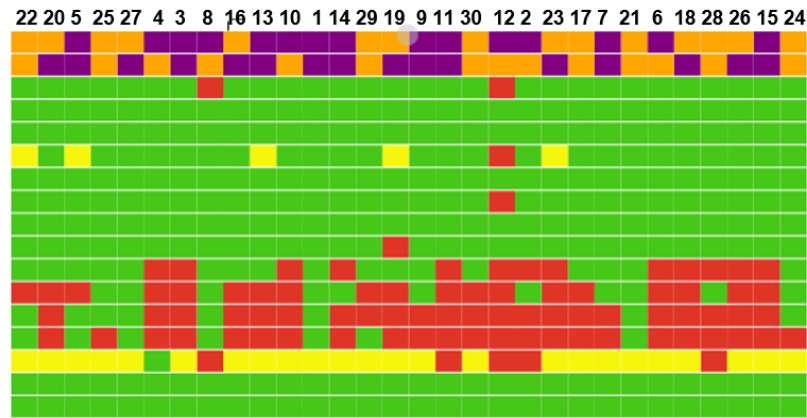
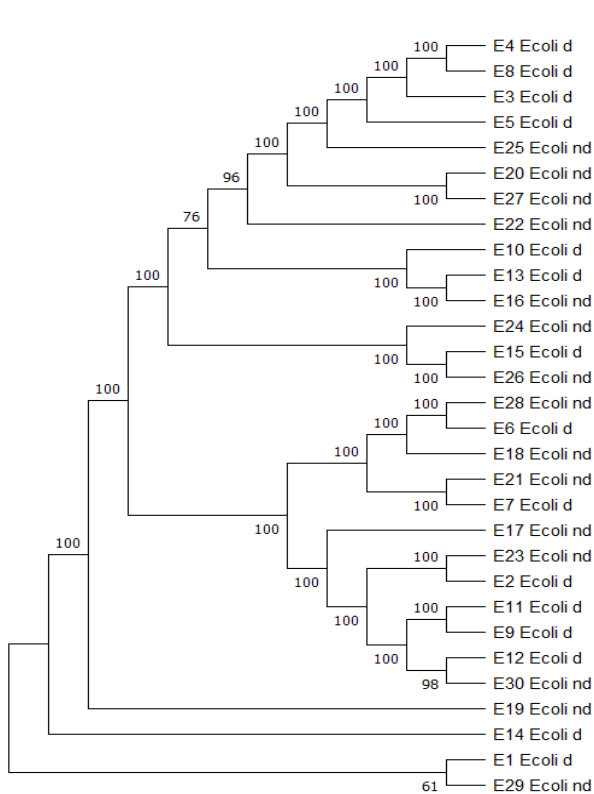


Salmonella spp.



Enterococcus spp.

150 grupo / heces



Diarrea ■ SI ■ NO
 Lesión pulmonar
 AZI ■ Resistente
 AMI ■ No resistente
 GEN ■ Límite de detección
 TGC
 TAZ
 FOT
 COL
 NAL
 AMP
 TET
 TMP
 SMX
 CHL
 MERO
 CIP

Colaboración con el Plan de Secuenciación Epidemiológica Integrada de Patógenos de Aragón (SEIPA).



Puesta a punto de un sistema portátil de secuenciación y flujo bioinformático de análisis de última generación

Descenso importante de la cantidad de GRA de heces a purines

A pesar de que tanto heces como estiércol contienen una gran cantidad de bacterias portadoras de GRA y EGM, su transmisión a la microbiota del suelo y al cultivo de avena parece ser muy limitada.

No obstante, en este trabajo detectamos diferencias en cuanto a la composición y número de EGM entre microbiota de heces, lo cual podría afectar a la diferente diseminación de los GRA.

Muchas gracias

AGROALNEXT



Financiado por
la Unión Europea
NextGenerationEU



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



Plan de Recuperación,
Transformación
y Resiliencia



Principado de
Asturias



La Rioja



GENERALITAT
VALENCIANA



Gobierno de Navarra
Nafarroako Gobernua



Región
de Murcia



GOBIERNO
DE ARAGON



JUNTA DE
EXTREMADURA