

REVISION LITERATURA

Reducción de emisiones de metano en bovinos mediante selección metagenómica

Alejandro Saborío-Montero¹, Roger Molina-Coto², Carlos Campos-Granados³, Rodolfo WingChing-Jones⁴

RESUMEN

La generación de dispositivos capaces de secuenciar ADN a partir de muestras de matrices compuestas de distintos microorganismos ha marcado un hito en la clasificación taxonómica de estos. En el ámbito de la producción animal de rumiantes, el estudio genómico del microbioma del rumen (metagenómica) y su relación con el genotipo de los hospedadores ha despertado el interés de los investigadores. Esto se debe a las potenciales oportunidades de seleccionar rumiantes que puedan transmitir a su descendencia características que generen microbiomas más sostenibles para los propósitos de los sistemas productivos, tales como mejorar la eficiencia alimenticia y productividad mientras se reducen las emisiones de metano (CH₄). El objetivo de esta revisión fue exponer una selección de documentación científica relacionada con el análisis del microbioma y su relevancia como potencial estrategia para la selección de rumiantes en los programas de mejora genética. Se ha concluido que la integración de tecnologías de análisis metagenómico en la investigación del microbioma del rumen ofrece nuevas perspectivas para la mejora genética en la producción de rumiantes. Estas tecnologías promueven sistemas productivos más eficientes y sostenibles, con menor impacto ambiental.

Palabras clave: Holobiabilidad, eficiencia alimenticia, microorganismos, metagenómica, sostenibilidad.

¹Escuela de Zootecnia y Centro de Investigación en Nutrición Animal, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Autor para correspondencia: alejandro.saboriomontero@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-9840-0058>)

²Escuela de Zootecnia y Centro de Investigación en Nutrición Animal, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Correo electrónico: roger.molina@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0003-3844-2587>)

³Escuela de Zootecnia y Centro de Investigación en Nutrición Animal, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Correo electrónico: carlosmario.campos@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-0079-2621>)

⁴Escuela de Zootecnia y Centro de Investigación en Nutrición Animal, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Correo electrónico: rodolfo.wingching@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-8009-2210>)

Recibido: 03 abril 2024 Aceptado: 19 julio 2024



ABSTRACT

Reduction of methane emissions in bovines through metagenomic selection. The development of devices capable of sequencing DNA from samples composed of various microorganisms has marked a milestone in their taxonomic classification. In the field of ruminant animal production, the genomic study of the rumen microbiome (metagenomics) and its relationship with the host's genotype has attracted researchers' interest. This is due to the potential opportunities to select ruminants that can pass on traits to their offspring that create more sustainable microbiomes for productive systems, such as improving feed efficiency and productivity while simultaneously reducing methane (CH₄) emissions. The objective of this review was to present a selection of scientific literature related to microbiome analysis and its relevance as a potential strategy for selecting ruminants in genetic improvement programs. It has been concluded that the integration of metagenomic analysis technologies in rumen microbiome research offers new perspectives for genetic improvement in ruminant production. These technologies promote more efficient and sustainable productive systems with lower environmental impact.

Keywords: Holobiability, feed efficiency, microorganisms, metagenomics, sustainability.

INTRODUCCIÓN

El ganado bovino es una de las especies en las que el microbioma ha sido asociado a rasgos fenotípicos de interés (Lima et al., 2015), donde individuos con microbiomas cuyos patrones de abundancias relativas son similares, presentan rendimientos fenotípicos similares para algunos rasgos (Delgado et al., 2018). Se ha propuesto, además, que el microbioma es regulado parcialmente por el componente genético del hospedador (González-Recio et al., 2017; González-Recio et al. 2023a), así como por el genotipo de sus progenitores (Roehle et al., 2016).

En la década de 1980, se identificó una nueva técnica para la clasificación taxonómica de microorganismos, que hasta ese momento era realizada por comparación fenotípica y morfológica de aislados microbianos (Clarridge, 2004).

Este nuevo método mostró que las relaciones filogenéticas de las bacterias podían ser determinadas por comparación de una región conservada del código genético bacteriano. Lo cual se puede observar en los genes que codifican para el componente de la subunidad 30S de los ribosomas procariontes, denominado ARN ribosomal 16S (16S rRNA), y que distintos grupos filogenéticos revelaron la presencia de una o más secuencias específicas cortas denominadas "oligonucleótidos firma" (Woese et al., 1985). Estos están presentes en la mayoría de los miembros de un determinado grupo filogenético y rara vez en otros grupos. Estas particularidades del análisis de 16S rRNA permitieron identificar cada bacteria dentro de un determinado grupo (Rodicio y Mendoza, 2004).

El avance tecnológico en las técnicas de secuenciación masiva y la disminución de los costos en dichos procedimientos ha permitido el análisis de todos los genes contenidos dentro de una muestra ambiental, esto mediante el análisis metagenómico de secuenciación del genoma completo (WGS). En este tipo de análisis, se extrae el ADN de la muestra de interés, se secuencia y se obtienen lecturas cortas o largas desordenadas. Estas pertenecen a secciones de los genomas de los microorganismos, que son ensambladas por traslape de secuencias y comparadas contra una base de datos de secuencias preestablecidas y vinculadas a una clasificación filogenética y funcional de los microorganismos y los genes, respectivamente (Stewart et al., 2019).

Existe variabilidad entre abundancias relativas de microorganismos de un mismo sitio muestreado en diferentes hospedadores; por ejemplo, las abundancias relativas de microorganismos del rumen en distintos bovinos de una misma raza (Saborío-Montero et al., 2021a). Estas abundancias relativas han sido asociadas a rasgos de interés, tales como la eficiencia alimenticia (Delgado et al., 2018) y emisiones de CH₄ (Saborío-Montero et al., 2022).

La mejora de la eficiencia alimenticia en producción animal consiste en reducir la relación de alimento consumido por unidad de producto generado. Esta es una meta bien

establecida en los programas de varias especies productivas y un rasgo que ha potenciado sustancialmente en las últimas décadas. Sin embargo, la tendencia en el perfeccionamiento de este rasgo ha sido lenta en rumiantes (Hurley et al., 2018).

Contrariamente, a pesar de que las emisiones de CH₄ entérico de los rumiantes son un tema relevante en relación con el cambio climático, actualmente son pocos los países que las incluyen como un carácter dentro de las metas en los programas de mejoramiento genético de bovinos lecheros. Solamente España ha realizado a la fecha evaluaciones genéticas en base a mediciones directas en ganado vacuno (López-Paredes et al., 2020). Sin embargo, es probable que debido a que este gas de efecto invernadero tiene un potencial de calentamiento global 25 veces mayor al del dióxido de carbono y es el compuesto liberado por los rumiantes que más contribuye en esta problemática (de Haas et al., 2017), en un futuro pueda ser considerado dentro de los programas de mejora de muchos países para mitigar dichas emisiones de una manera sistematizada, constante y sostenible.

Existen metodologías desarrolladas para predecir fenotipos de rasgos complejos a partir del microbioma del hospedador. Por ejemplo, Ross et al. (2013) relacionaron la producción entérica de gases de efecto invernadero con perfiles del microbioma en ganado lechero.

Otros estudios han asociado la ingesta residual (RFI) con las emisiones de CH₄ en rumiantes, ya que los animales seleccionados para baja ingesta residual (alta eficiencia alimenticia) tienden a reducir las emisiones de CH₄ en bovinos (Fitzsimons et al., 2013). Esto sugiere que algunas estrategias de selección genética orientadas a mejorar la eficiencia alimenticia podrían ser efectivas para disminuir simultáneamente las emisiones de CH₄ (Negussie et al., 2017).

Algunos autores afirman que si el microbioma es consistente entre poblaciones de ganado bovino, diferente entre animales y, a su vez, heredable, esto podría representar una oportunidad para utilizar selección genética para escoger reproductores rumiantes con microbiomas deseables (Tapio et al., 2017).

El objetivo de esta revisión es describir aspectos asociados al análisis del microbioma del rumen bovino como una metodología potencial para la selección de rumiantes que sean bajos emisores de CH₄ dentro de programas de mejora genética animal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar esta revisión bibliográfica, se hizo una búsqueda de enero a diciembre de 2023. Se contemplaron capítulos de libros, artículos científicos, memorias de seminarios, memorias de congresos y tesis de 1972 a 2023. Además, se utilizaron palabras claves como microbioma, holobiabilidad, eficiencia alimenticia, microorganismos, metagenómica y sostenibilidad.

Una vez finalizada la búsqueda, se seleccionaron 63 publicaciones para la revisión. El criterio de selección de las publicaciones fue la inclusión en las mismas de información relevante en relación con el tema de investigación.

Esta revisión de literatura forma parte de la generación de productos dentro de las actividades de investigación denominadas “Desarrollo del observatorio de cambio climático de la Escuela de Zootecnia” e “Investigación en metagenómica con un enfoque en mejora genética animal para la sostenibilidad de sistemas productivos de rumiantes” inscritas en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica bajo los números 739-C2748 (2022-2025) y 739-C2724 (2022-2024), respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Definiciones

El término “microbioma” fue mencionado por primera vez en humanos por Joshua Lederberg en 2001 (Lederberg y McCray, 2001) para describir la “comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y patogénicos que comparten nuestro espacio corporal”. Sin embargo, otros autores (Ursell et al., 2013) consideran la microbioma como el catálogo de microbios y sus genes. Una definición más amplia de este término es “todo el material genético dentro de la microbiota (colección de microorganismos en un nicho específico)” (Berg et al., 2020).

El término “metagenoma” se utilizó por primera vez en el artículo científico de Handelsman et al. (1998) para describir la manera de analizar genes secuenciados obtenidos de una muestra ambiental, como si se tratara del genoma de un único individuo. Posteriormente, ha sido definida como el análisis genético directo de genomas contenidos dentro de una muestra ambiental (Thomas et al., 2012) y de comunidades microbianas en muestras ambientales sin necesidad previa de cultivar cultivos clonales (Oulas et al., 2015) y como el estudio del material genético general de un microbioma (Malmuthuge y Guan, 2016).

Microbiota ruminal

Los tres superreinos taxonómicos (bacterias, eucariotas y arqueas) están presentes en el rumen (López-García et al., 2022). La microbiota ruminal es esencial para la sobrevivencia de los rumiantes, debido a que algunas de sus funciones primordiales incluyen la fermentación de la fibra, la producción de ácidos grasos volátiles y la homeostasis del pH ruminal (González-Recio et al., 2023b).

Los rumiantes presentan variabilidad en su microbiota, principalmente mediada por el tipo de alimentación recibida. Sin embargo, existe evidencia relativa a asociaciones entre microbiotas de rumiantes en función a su relación de parentesco, indistintamente de la alimentación recibida (Roehe et al., 2016). Estas diferencias pueden ser vinculadas a su constitución genética.

Esta variabilidad de la microbiota y su asociación con la estructura genética del animal brinda una oportunidad de selección de reproductores. Esto se debe aplicar para desarrollar animales en las próximas generaciones que posean microbiotas moduladas a criterio de los programas de mejora genética (González-Recio et al., 2023a).

Existen estudios que respaldan que el uso de parámetros genéticos que incluyan el componente genético, el componente microbial y sus interacciones (*holobiability* u holobiabilidad) pueden explicar mejor la varianza de fenotipos de interés que aquellos parámetros que incluyen únicamente el componente genético (*heritability* o *heredabilidad*). Tal es el caso de las emisiones de CH₄ (Saborío-Montero et al., 2021a) y de la eficiencia alimenticia (Boggio et al., 2023).

Muestreo del contenido ruminal

Bovinos fistulados

La primera fístula registrada en rumiantes data de finales del siglo XIX (Willes, 1972). Estas han sido utilizadas como medio para conocer la fisiología del rumen, su composición microbiana y los procesos fermentativos que ocurren para degradar la fibra.

En bovinos fistulados, el muestreo del contenido ruminal consiste en inmovilizar parcialmente al animal y extraer directamente la muestra a través de la abertura de la cánula que conduce hacia el interior del rumen del animal (Elizondo-Salazar y Monge-Rojas, 2020).

El contenido sólido puede extraerse y, al exprimirlo mediante presión sobre un recipiente, se obtiene el contenido líquido del rumen. Dicho recipiente deberá ser tapado para reducir la exposición de los microorganismos al ambiente. La fracción líquida obtenida se filtra y se congela en vapor de nitrógeno líquido mientras es trasladada al laboratorio y es almacenada a -80 °C hasta ser analizada (Saborío-Montero et al., 2021b). El microbioma del rumen está compuesto por una comunidad de microorganismos anaeróbicos, susceptibles a la presencia de oxígeno (Chaucheyras-Durand y Ossa, 2014). Por lo tanto, la extracción y filtrado del contenido ruminal debe ser tan rápido como sea posible.

Bovinos no fistulados

El muestreo a través del esófago es una técnica menos invasiva, más barata y para mayor cantidad de animales en relación al muestreo de animales fistulados (Paz et al., 2016). Consiste en inmovilizar parcialmente al animal (i.e. dentro de un cepo) y levantar la nariz del animal con un dispositivo mecánico para introducir una sonda, oralmente o por vía naso-esofágica, hasta el interior del rumen que está conectada a una unidad de bombeo mecánico con un matraz erlenmeyer (1000 ml); ubicado entre la bomba de succión y la sonda introducida en el rumen del animal. Finalmente, se activa la bomba de succión hasta obtener el volumen de contenido ruminal deseado para el análisis, un volumen de 100 ml se considera suficiente (Saborío-Montero et al., 2021b). La fracción líquida se manejó tal y como se describió en la sección de bovinos fistulados.

Extracción del ADN de muestras de contenido ruminal

Una práctica frecuente para extraer el ADN de las muestras de contenido ruminal es utilizar kits comerciales de aislamiento de ADN de suelo (Paz et al., 2016; Saborío-Montero et al., 2020). Sin embargo, existen diferentes metodologías para la extracción de ADN; por ejemplo, Henderson et al. (2013) evaluaron el efecto de 15 diferentes técnicas de extracción de ADN del contenido ruminal de ovejas y vacas sobre la composición del microbioma.

En general, las técnicas de lisis mecánica (Yu y Morrison, 2004) son preferibles a las técnicas que utilizan lisis química (Yuan et al., 2012), aunque el método a utilizar dependerá de los intereses de los investigadores. Estos deberán evaluar las técnicas de extracción en función a las ventajas y desventajas de cada una de ellas (González-Recio et al., 2019).

Principales técnicas de análisis del microbioma

Generalidades

La clasificación taxonómica de organismos mediante técnicas moleculares se fundamenta en el principio de comparación (alineamiento) entre lecturas (fragmentos de ADN) obtenidas de una muestra mediante diferentes metodologías y un patrón de referencia asignado previamente a un organismo conocido y consignado en bases de datos dedominio público, tales como GreenGenes o SILVA (López-García et al., 2018). Una representación esquemática intuitiva del concepto de alineación se muestra en la Figura 1, en la cual se observa que las lecturas traslapadas coinciden con el patrón de referencia, lo que permite asignar un número de lecturas a un organismo (o microorganismo) específico. El número de lecturas asignadas a los distintos microorganismos denota la abundancia relativa de dichos microorganismos en la muestra.



Figura 1. Representación esquemática de un alineamiento mediante metodologías de lecturas cortas y largas en relación con una secuencia de referencia de un organismo previamente definido en una base de datos.

Fuente: Elaboración propia.

Amplicones 16S rRNA

Los genes que codifican 16S rRNA son esenciales en procariotas y están en al menos una copia del genoma (Wang y Qian, 2009). Su amplia presencia es una de las razones principales por las que su secuencia ha sido la región más utilizada para propósitos taxonómicos (Janda y Abbott, 2007). Además, existen hasta nueve regiones hipervariables conocidas en el gen 16S rRNA (Chakravorty et al., 2007), las cuales permiten una comprensiva clasificación de la composición del microbioma y, por lo tanto, de la abundancia relativa de todos los taxones. La identificación de microbiota mediante el uso de metodología 16S rRNA es a menudo restringida a bacteria y arquea (Janda y Abbott, 2007) y provee una precisión relativamente alta a nivel de identificación de género, pero baja a nivel de especie (Poretsky et al., 2014).

Análisis metagenómico de secuenciación del genoma completo (lecturas cortas)

El análisis metagenómico de secuenciación del genoma completo (WGS) permite evaluar

tanto la composición taxonómica como la diversidad de comunidades microbianas sin la limitación de buscar. Además, amplifica un gen específico brindando estimados robustos (Poretsky et al., 2014) y definiendo precisamente los taxones a nivel de especie (Ranjan et al., 2017). Asimismo, WGS provee un rápido análisis del microbioma sin el sesgo asociado al cultivo o variación relacionada a anomalías durante la amplificación de PCR o selección de cebadores (Tapio et al., 2017).

Existe evidencia que respalda las ventajas de WGS comparado con 16S rRNA como mejor detección de especies bacterianas, mayor detección de diversidad y mejor predicción de genes (Ranjan et al., 2017). Adicionalmente, este método es más preciso para elucidar las capacidades funcionales de la comunidad microbiana que la técnica de 16S rRNA, pero tiene un mayor costo económico.

Análisis metagenómico con tecnología de nanoporos (lecturas largas)

A partir del año 2014, se distribuye el secuenciador portátil con tecnología de nanoporos. Este dispositivo tiene una celda de flujo que contiene una membrana inmersa en solución salina con un voltaje constante. Esta membrana, a su vez, posee nanoporos proteicos por los que pasa una corriente iónica de manera constante. Al cargar dicho dispositivo con ARN o ADN extraído previamente, los diferentes nucleótidos de hebra simple que los conforman son dirigidos a través de los nanoporos, donde la corriente iónica es interrumpida por estos.

Dado que los nucleótidos tienen tamaños distintos, las interrupciones de corriente pueden ser asociadas a nucleótidos específicos. De esta manera, es posible asignar la secuencia de estas partículas de acuerdo con los patrones observados en las interrupciones de corriente iónica (Giordano et al., 2017).

La tecnología de nanoporos genera lecturas de segmentos del genoma más largas en relación con tecnologías de secuenciación previas, lo que permite una asignación más precisa de la taxonomía (Brandt et al., 2020). Además, provee información taxonómica y funcional simultáneamente para microorganismos de todos los superreinos (Saborío-Montero et al., 2021b). A diferencia de metodologías previas que deben utilizar métodos separados (como amplicones 16S rRNA y 18S rRNA para procariotas y eucariotas,

respectivamente) para abarcar todos los superreinos, la secuenciación de lecturas largas ha sido catalogada como el método del año 2022 por la revista NatureMethods; quienes fundamentan su escogencia en el avance metodológico trascendental y amplia aplicación (Editorial, 2023).

Evidencias de control genético del microbioma

Existe evidencia que respalda la hipótesis de que la variación genética del hospedador tiene un efecto sobre el microbioma en ganado bovino (Saborío-Montero et al., 2021b).

En experimentos anteriores, Weimer et al. (2010) intercambiaron el contenido ruminal de vacas lecheras fistuladas de la raza holstein, las cuales restauraron su composición bacteriana original después de 65 días, lo que sugiere que la composición de la comunidad bacteriana es hospedero-específica y que puede ser restablecida por sí misma. Welkie et al. (2010) encontraron que la composición de la comunidad bacteriana del rumen difirió entre vacas sometidas a una misma dieta, lo que confiere variabilidad a este rasgo, presumiblemente atribuibles a las variaciones genéticas entre animales.

King et al. (2011), por su parte, compararon los microbiomas del rumen de vacas holstein y jersey localizadas en el mismo hato, manejadas bajo la misma dieta y condiciones ambientales, y encontraron veinte unidades taxonómicas operacionales (OTUs) en común entre razas; mientras que 23 y 18 OTUs fueron encontradas exclusivamente en holstein y jersey, respectivamente. Estos autores concluyen que las oposiciones observadas podrían deberse a diferencias genéticas de las razas hospedadoras.

Un estudio sobre el microbioma ruminal de vacas de las razas holstein y pardo suizo (González-Recio et al., 2017) determinó que el 50% de los géneros de bacteria y arquea se asoció al genotipo del hospedador, lo que respalda la existencia de un control genético que regula parcialmente la composición del microbioma.

Otro estudio (Roehe et al., 2016) evaluó la influencia genética del hospedador sobre la producción microbiana de CH₄ del rumen y la eficiencia de conversión alimenticia mediante grupos de progenie de machos y encontraron clasificaciones consistentes entre los grupos

de progenie (general y dentro de dieta) para las emisiones de CH₄ y la abundancia relativa de arqueas. Los grupos asociados a un mismo progenitor presentaron patrones similares para estos rasgos y diferentes a los de otros grupos con diferentes progenitores. Específicamente, se encontraron diferencias ($p < 0,0001$) entre el ratio *Archaea*: Bacteria y emisiones de metano (g/d) para rumiantes cuyo progenitor macho fue de la raza aberdeen angus (5,53 y 183,8, respectivamente) en relación con rumiantes cuyo progenitor macho fue de la raza limousin (4,41 y 164,4, respectivamente), lo que propone un control genético del hospedador para estos rasgos y sugiere que la abundancia microbiana de arqueas del rumen podría utilizarse como predictor de emisiones de CH₄ sin necesidad de medir este rasgo complejo.

Por su parte, Wallace et al. (2019) encontraron heredabilidades para grupos taxonómicos del contenido ruminal del orden de 0,2 a 0,6 en vacas holstein y nordicred; valores mayores a los encontrados por Saborío-Montero et al. (2020) en vacas holstein, los cuales estuvieron en el ámbito de 0,08 a 0,48.

Asociación entre microbioma, eficiencia alimenticia y emisiones de CH₄

Dos rasgos complejos relevantes desde el punto de vista económico y ambiental en ganado bovino que han sido previamente relacionadas a microbioma son eficiencia alimenticia (Roehe et al., 2016) y emisiones de CH₄ (Tapio et al., 2017; Saborío-Montero et al., 2022). Ambos caracteres están relacionados a la eficiencia de la digestión; la cual está fuertemente asociada a la rentabilidad del sistema productivo, mientras que las emisiones de CH₄ tienen importancia en el contexto de calentamiento global debido a sus efectos adversos sobre el ambiente (de Haas et al., 2016).

Una consideración relevante es que la energía utilizada en la producción de CH₄ entérico equivale del 2% al 12% de la energía bruta consumida por el rumiante (Johnson y Johnson, 1995). Por lo tanto, una reducción de las emisiones de CH₄ podría optimizar el uso de la energía bruta consumida por el rumiante y, por ende, incidir positivamente sobre la eficiencia alimenticia.

El CH₄ entérico en rumiantes proviene exclusivamente de la metanogénesis que realizan las arqueas metanogénicas (Pitta et al., 2022). Es razonable hipotetizar que existe una asociación directa entre la composición del microbioma ruminal y las emisiones de CH₄ generadas. Análogamente, el microbioma modula la eficiencia alimenticia (Monteiro et al., 2022) y así la producción de CH₄ está asociada a la eficiencia alimenticia, con correlaciones genéticas entre consumo de alimento residual y producción de metano del orden de 0,76 (Manzanilla-Pech et al., 2022). Todo esto orquestado por la asociación del componente genético del animal con su microbioma ruminal, las emisiones de CH₄ y la eficiencia alimenticia (López-Paredes et al., 2021); asociaciones que se sintetizan en la Figura 2.

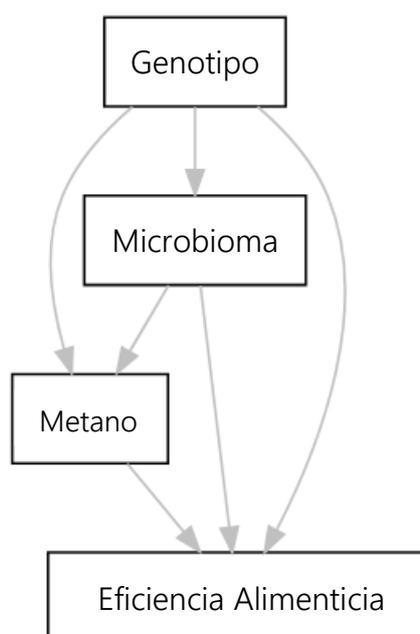


Figura 2. Hipótesis de asociación causal entre genotipo del animal, microbioma ruminal, emisiones de CH₄ y eficiencia alimenticia. La dirección de las flechas y la ubicación de las variables de arriba hacia abajo simbolizan la posible relación causal y el orden jerárquico de asociación, respectivamente.

Fuente: Elaboración propia.

El consumo de alimento residual (RFI) es un rasgo correlacionado con las emisiones de CH₄ y se estima como la diferencia entre el consumo de energía neta y los requerimientos de energía neta para mantenimiento, tomando en cuenta el peso corporal y la producción de leche corregida por grasa y proteína. Ambos rasgos son heredables con valores estimados de 0,40 y 0,35, respectivamente (de Haas et al., 2011).

Valores de correlaciones positivas (0,44) entre estos dos caracteres han sido reportados en bovinos de carne (Nkrumah et al., 2006). En esta misma línea, Martínez-Álvaro et al. (2022) reportan que un perfil de ácidos grasos más saludable puede ser alcanzado indirectamente a la cría selectiva de rumiantes cuyas abundancias relativas de ciertos microorganismos del rumen mejoran dicho perfil de ácidos grasos y se relacionan con la reducción de las emisiones de CH₄.

Algunos microorganismos específicos han sido asociados al incremento de las emisiones de CH₄. Existe evidencia que respalda una asociación positiva entre la abundancia relativa de microorganismos eucariotas y las emisiones de CH₄ (Saborío-Montero et al., 2022); presumiblemente por la relación endosimbiótica que presentan las arqueas metanogénicas con algunos eucariotas que sirven como hospedadores. De igual manera, microorganismos agrupados en otras clasificaciones taxonómicas han sido relacionados al incremento en las emisiones de metano. Martínez-Álvaro et al. (2020) reportaron que el 49,8% de la variabilidad de las emisiones de CH₄ se explicaron por un clúster de microorganismos que contenía a *Fibrobacter sp.*

Oportunidades

Una alternativa para seleccionar animales de manera indirecta es determinar reproductores según mérito genético para un carácter que no es de interés directo, pero que posee una mayor heredabilidad y una alta correlación genética con un rasgo de interés con menor heredabilidad (Saborío-Montero et al., 2021b). La heredabilidad de la composición microbiana del rumen bovino en relación con una menor heredabilidad de otros rasgos complejos de interés podría ofrecer una ventaja en el proceso de selección indirecta de animales reproductores.

Los rasgos complejos correlacionados con el microbioma del rumen, tales como eficiencia

alimentaria (Delgado et al., 2018) y emisiones de CH₄ (Saborío-Montero et al., 2020), podrían ser incluidos en evaluaciones genéticas de rumiantes para obtener animales más rentables para el sistema productivo, a la vez que se disminuye su impacto ambiental (López-Paredes et al., 2021).

Algunos rasgos, como las emisiones de CH₄, poseen heredabilidad moderada (0,15-0,20), mientras que las estimaciones de heredabilidad del microbioma son cercanas a 0,30 y las correlaciones genéticas entre las emisiones de CH₄ y el microbioma son altas (>0,70). Por lo tanto, el carácter del microbioma podría ser utilizado en las evaluaciones genéticas para obtener mayor respuesta a las selección (Saborío-Montero et al., 2021b). Sin embargo, el muestreo de contenido ruminal es complejo y algunos autores indican que, para implementar este tipo de selección indirecta, el proceso de muestreo debería realizarse en una matriz de análisis que prediga la microbiota ruminal, pero de fácil recolección a gran escala; por ejemplo en saliva (Tapio et al., 2016).

Otros autores (Pickering et al., 2015) comentan que la selección genética, mediante la estimación de valores genéticos aditivos, es potencialmente la manera más apropiada para reducir las emisiones de CH₄ provenientes de los procesos digestivos de los rumiantes.

CONSIDERACIONES FINALES

Las nuevas herramientas de análisis metagenómico permiten determinar la abundancia relativa de microorganismos nunca descritos, lo cual es algo sin precedentes, y, por ende, el uso de estas tecnologías podría generar nueva información que permita abordar problemáticas hasta ahora no resueltas. Específicamente en el tema de la asociación del microbioma del rumen con las emisiones de CH₄ y la eficiencia alimenticia en bovinos, la utilización de información obtenida mediante análisis metagenómico podría ser una herramienta que impacte positivamente la mejora genética del bovino. Es así cómo se direccionaría la selección de rumiantes hacia individuos eficientes con menor huella de carbono dentro de los sistemas productivos, lo cual redundaría en una ganadería más sostenible en aspectos económicos, ambientales y sociales.

LITERATURA CITADA

- Berg, G., D. Rybakova, D. Fischer, T. Cernava, M.C. Champomier-Vergès, T. Charles, X. Chen, L. Cocolin, K. Eversole, G. Herrero-Corral, M. Kazou, L. Kinkel, L. Lange, N. Lima, A. Loy, J. A. Macklin, E. Maguin, T. Mauchline, R. McClure, B. Mitter, M. Ryan, I. Sarand, H. Smidt, B. Schelkle, H. Roume, G. S. Kiran, J. Selvin, R. Soares-Correa-de Souza, L. van Overbeek, B. K. Singh, M. Wagner, A. Walsh, A. Sessitsch y M. Schloter. 2020. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8:103. doi: 10.1186/s40168-020-00875-0
- Boggio, G. M., H. F. Monteiro, F. S. Lima, C. C. Figueiredo, R. S. Bisinotto, J. E. P. Santos, B. Mion, F. S. Schenkel, E. S. Ribeiro, K. A. Weigel y F. Peñagaricano. 2023. Host and rumen microbiome contributions to feed efficiency traits in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. doi:10.3168/JDS.2023-23869.
- Brandt, C., E. Bongcam-Rudloff y B. Müller. 2020. Abundance Tracking by Long-Read Nanopore Sequencing of Complex Microbial Communities in Samples from 20 Different Biogas/Wastewater Plants. *Applied Science*, 10:7518. doi:10.3390/app10217518.
- Chakravorty, S., D. Helb, M. Burday y N. Connell. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69 (2):330–339. doi:10.1016/j.mimet.2007.02.005.A.
- Chaucheyras-Durand, F. y F. Ossa. 2014. The rumen microbiome: Composition, abundance, diversity, and new investigative tools. *The Professional Animal Scientist*, 30 (1):1–12. doi:10.15232/S1080-7446(15)30076-0.
- Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17 (4):840–862. doi:10.1128/CMR.17.4.840.
- de Haas, Y., P. C. Garnsworthy, B. Kuhla, E. Negussie, M. Pszczola, E. Wall y J. Lassen. 2016. Genetic control of greenhouse gas emissions. *Advances in Animal Bioscience*, 7 (2):196–199. doi:10.1017/s2040470016000121.

- de Haas, Y., M. Pszczola, H. Soyeurt, E. Wall y J. Lassen. 2017. Invited review: Phenotypes to genetically reduce greenhouse gas emissions in dairying. *Journal of Dairy Science*, 100 (2): 855-870. doi:10.3168/jds.2016-11246.
- de Haas, Y., J. Windig, M. Calus, J. Dijkstra, M. de Haan, A. Bannink y R. Veerkamp. 2011. Genetic parameters for predicted methane production and potential for reducing enteric emissions through genomic selection. *Journal of Dairy Science*, 94 (12):6122–6134. doi:10.3168/jds.2011-4439.
- Delgado, B., A. Bach, I. Guasch, C. González, G. Elcoso, J.E. Pryce y O. González-Recio. 2018. Whole rumen metagenome sequencing allows classifying and predicting feed efficiency and intake levels in cattle. *Scientific Reports*, 9 (1):1–13. doi:10.1038/s41598-018-36673-w.
- Editorial. 2023. Method of the Year 2022: long-read sequencing. *Nature Methods*, 20 (1):1–1. doi:10.1038/s41592-022-01759-x.
- Elizondo-Salazar, J. A. y C. R. Monge-Rojas. 2020. Fistulación en bovinos y uso de la técnica de degradabilidad ruminal para análisis de alimentos. *Nutrición Animal Tropical*, 14 (1):209–229.
- Fitzsimons, C., D. A. Kenny, M. H. Deighton, A. G. Fahey y M. McGee. 2013. Methane emissions, body composition, and rumen fermentation traits of beef heifers differing in residual feed intake¹. *Journal of Animal Science*, 91 (12):5789–5800. doi:10.2527/jas.2013-6956.
- Giordano, F., L. Aigrain, M. A. Quail, P. Coupland, J. K. Bonfield, R. M. Davies, G. Tischler, D. K. Jackson, T. M. Keane, J. Li, J. X. Yue, G. Liti, R. Durbin y Z. Ning. 2017. De novo yeast genome assemblies from MinION, PacBio y MiSeq platforms. *ScientificReports*, 7 (1):1–10. doi:10.1038/s41598-017-03996-z.
- González-Recio, O., M. Martínez-Alvaro, F. Tiezzi, A. Saborio-Montero, C. Maltecca y R. Roehe. 2023a. Invited review: Novel methods and perspectives for modulating the rumen microbiome through selective breeding as a means to improve complex traits: Implications for methane emissions in cattle. *Livestock Science*, 269:105171. doi:10.1016/J.LIVSCI.2023.105171.

- González-Recio, O., A. Saborío-Montero, A. López-García, B. Delgado y C. Ovilo. 2019. Improving phenotypic prediction in dairy cattle breeding using the metagenome. Burleigh Dodds Science Publishing.
- González-Recio, O., N. Scrobota, J. López-Paredes, A. Saborío-Montero, A. Fernández, E. López de Maturana, B. Villanueva, I. Goiri, R. Atxaerandio y A. García-Rodríguez. 2023b. Review: Diving into the cow hologenome to reduce methane emissions and increase sustainability. *Animal*, 17:100780. doi:10.1016/J.ANIMAL.2023.100780.
- González-Recio, O., I. Zubiria, A. García-Rodríguez, A. Hurtado y R. Atxaerandio. 2017. Short communication: Signs of host genetic regulation in the microbiome composition in 2 dairy breeds: Holstein and Brown Swiss.. *Journal of Dairy Science*, 101 (3):1–8. doi:10.3168/jds.2017-13179.
- Handelsman, J., M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy y R. M. Goodman. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry and Biology*, 5 (10):R245–R249. doi:10.1016/S1074-5521(98)90108-9.
- Henderson, G., F. Cox, S. Kittelmann, V. H. Miri, M. Zethof, S. J. Noel, G. C. Waghorn y P. H. Janssen. 2013. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. *PLoS One*, 8. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0074787.
- Hurley, A., N. Lopez-Villalobos, S. McParland, E. Lewis, E. Kennedy, J. Burke y D. Berry. 2018. Characteristics of feed efficiency within and across lactation in dairy cows and the effect of genetic selection. *Journal of Dairy Science*, 101 (2). doi:10.3168/jds.2017-12841.
- Janda, J. M. y S. L. Abbott. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (9):2761–2764. doi:10.1128/JCM.01228-07.
- Johnson, K. A. y D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73:2483–2492.

- King, E. E., R. P. Smith, B. St-Pierre y A. D. G. Wright. 2011. Differences in the rumen methanogen populations of lactating Jersey and Holstein dairy cows under the same diet regimen.. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:5682–7. doi:10.1128/AEM.05130-11.
- Lederberg, B. J. y A. T. McCray. 2001. ' Ome Sweet ' Omics-- A Genealogical Treasury of Words. *Scientist*, 15 (7):8.
- Lima, F. S., G. Oikonomou, S. F. Lima, M. L. S. Bicalho, E. K. Ganda, J. C. de O. Filho, G. Lorenzo, P. Trojancanec y R. C. Bicalhoa. 2015. Prepartum and postpartum rumen fluid microbiomes: characterization and correlation with production traits in dairy cows.. *Applied and Environmental Microbiology*, 81 (4):1327–37. doi:10.1128/AEM.03138-14.
- López-García, A., C. Pineda-Quiroga, R. Atxaerandio, A. Pérez, I. Hernández, A. García-Rodríguez y O. González-Recio. 2018. Comparison of Mothur and QIIME for the Analysis of Rumen Microbiota Composition Based on 16S rRNA Amplicon Sequences. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/FMICB.2018.03010.
- López-García, A., A. Saborío-Montero, M. Gutiérrez-Rivas, R. Atxaerandio, I. Goiri, A. García-Rodríguez, J. A. Jiménez-Montero, C. González, J. Tamames, F. Puente-Sánchez, M. Serrano, R. Carrasco, C. Óvilo y O. González-Recio. 2022. Fungal and ciliate protozoa are the main rumen microbes associated with methane emissions in dairy cattle. *GigaScience*, 11:1–14. doi:10.1093/gigascience/giab088.
- López-Paredes, J., I. Goiri, R. Atxaerandio, A. García-Rodríguez, E. Ugarte, J. A. Jiménez-Montero, R. Alenda y O. González-Recio. 2020. Mitigation of greenhouse gases in dairy cattle via genetic selection: 1. Genetic parameters of direct methane using noninvasive methods and proxies of methane. *Journal of Dairy Science*, 103 (8):7199–7209. doi:10.3168/JDS.2019-17597.
- López-Paredes, J., A. Saborío-Montero, N. Charfeddine, J. Jiménez-Montero y O. González-Recio. 2021. Dry matter intake, methane emissions and microbiome profiles as new traits for feed efficiency. *Interbull Bulletin*, 56:111–120.
- Malmuthuge, N. y L. L. Guan. 2016. Gut microbiome and omics: a new definition to ruminant production and health. *Animals Frontiers*, 6 (2): 8. doi:10.2527/af.2016-0017.
- Manzanilla-Pech, C. I. V., R. B. Stephansen, G. F. Difford, P. Løvendahl y J. Lassen. 2022. Selecting for Feed Efficient Cows Will Help to Reduce Methane Gas Emissions. *Frontiers Genetics*, 13:1. doi:10.3389/FGENE.2022.885932.

- Martínez-Álvaro, M., M. D. Auffret, R. D. Stewart, R. J. Dewhurst, C. A. Duthie, J. A. Rooke, R. J. Wallace, B. Shih, T. C. Freeman, M. Watson y R. Roehe. 2020. Identification of Complex Rumen Microbiome Interaction Within Diverse Functional Niches as Mechanisms Affecting the Variation of Methane Emissions in Bovine. *Frontiers in Microbiology*, 11:659. doi:10.3389/fmicb.2020.00659.
- Martínez-Álvaro, M., J. Mattock, M. Auffret, Z. Weng, C. A. Duthie, R. J. Dewhurst, M. A. Cleveland, M. Watson y R. Roehe. 2022. Microbiome-driven breeding strategy potentially improves beef fatty acid profile benefiting human health and reduces methane emissions. *Microbiome*, 10 (1): 166. doi:10.1186/S40168-022-01352-6.
- Monteiro, H. F., Z. Zhou, M. S. Gomes, P. M. G. Peixoto, E. C. R. Bonsaglia, I. F. Canisso, B. C. Weimer y F. S. Lima. 2022. Rumen and lower gut microbiomes relationship with feed efficiency and production traits throughout the lactation of Holstein dairy cows. *Scientific Reports*, 12:4904. doi:10.1038/s41598-022-08761-5.
- Negussie, E., Y. de Haas, F. Dehareng, R. J. Dewhurst, J. Dijkstra, N. Gengler, D. P. Morgavi, H. Soyeurt, S. van Gastelen, T. Yan y F. Biscarini. 2017. Invited review: Large-scale indirect measurements for enteric methane emissions in dairy cattle: A review of proxies and their potential for use in management and breeding decisions.. *Journal of Dairy Science*, 100 (4):2433–2453. doi:10.3168/jds.2016-12030.
- Nkrumah, J. D., E. K. Okine, G. W. Mathison, K. Schmid, C. Li, J. A. Basarab, M. A. Price, Z. Wang y S. S. Moore. 2006. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 84 (1):145–53.
- Oulas, A., C. Pavludi, P. Polymenakou, G. A. Pavlopoulos, N. Papanikolaou, G. Kotoulas, C. Arvanitidis y I. Iliopoulos. 2015. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies.. *Bioinformatics Biological Insights*, 9:75–88. doi:10.4137/BBI.S12462.
- Paz, H. A., C. L. Anderson, M. J. Muller, P. J. Kononoff y S. C. Fernando. 2016. Rumen bacterial community composition in holstein and jersey cows is different under same dietary condition and is not affected by sampling method. *Frontiers in Microbiology*, 7:1206. doi:10.3389/FMICB.2016.01206/BIBTEX.

- Pickering, N. K., V. H. Oddy, J. Basarab, K. Cammack, B. Hayes, R. S. Hegarty, J. Lassen, J. C. Mcewan, S. Miller, C. S. Pinares-Patiño y Y. De Haas. 2015. Animal board invited review: genetic possibilities to reduce enteric methane emissions from ruminants. *Animal*, 9 (9):1431–1440. doi:10.1017/S1751731115000968.
- Pitta, D., N. Indugu, K. Narayan y M. Hennessy. 2022. Symposium review: Understanding the role of the rumen microbiome in enteric methane mitigation and productivity in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 105 (10):8569–8585. doi:10.3168/JDS.2021-21466.
- Poretzky, R., L. M. Rodriguez-R, C. Luo, D. Tsementzi y K. T. Konstantinidis. 2014. Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS One*, 9 (4): e93827. doi:10.1371/journal.pone.0093827.
- Ranjan, R., A. Rani, A. Metwally, H. S. Mcgee y D. L. Perkins. 2017. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469 (4): 667-977. doi:10.1016/j.bbrc.2015.12.083.
- Rodicio, M. D. R. y M. D. C. Mendoza. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22 (4):238–245. doi:10.1157/13059055.
- Roehe, R., R. J. Dewhurst, C. A. Duthie, J. A. Rooke, N. McKain, D. W. Ross, J. J. Hyslop, A. Waterhouse, T. C. Freeman, M. Watson y R. J. Wallace. 2016. Bovine Host Genetic Variation Influences Rumen Microbial Methane Production with Best Selection Criterion for Low Methane Emitting and Efficiently Feed Converting Hosts Based on Metagenomic Gene Abundance. *PLoS Genetics*, 12 (2): 1–20. doi:10.1371/journal.pgen.1005846.
- Ross, E. M., P. J. Moate, L. C. Maret, B. G. Cocks y B. J. Hayes. 2013. Metagenomic Predictions: From Microbiome to Complex Health and Environmental Phenotypes in Humans and Cattle. *PLoS One*, 8 (9):1–8. doi:10.1371/journal.pone.0073056.
- Saborío-Montero, A., M. Gutiérrez-Rivas, A. García-Rodríguez, R. Atxaerandio, I. Goiri, E. López de Maturana, J.A. Jiménez-Montero, R. Alenda y O. González-Recio. 2020. Structural equation models to disentangle the biological relationship between

- microbiota and complex traits: Methane production in dairy cattle as a case of study. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 137 (1): 36-48. doi:10.1111/jbg.12444.
- Saborío-Montero, A., M. Gutiérrez-Rivas, I. Goiri, R. Atxaerandio, A. García-Rodríguez, J. López-Paredes, J. A. Jiménez-Montero y O. González-Recio. 2022. Rumen eukaryotes are the main phenotypic risk factors for larger methane emissions in dairy cattle.. *Livestock Science*, 263:105023. doi:10.1016/J.LIVSCI.2022.105023.
- Saborío-Montero, A., M. Gutiérrez-Rivas, A. López-García, A. García-Rodríguez, R. Atxaerandio, I. Goiri, J. A. Jiménez-Montero y O. González-Recio. 2021a. Holobiont effect accounts for more methane emission variance than the additive and microbiome effects on dairy cattle. *Livestock Science*, 250:104538. doi:10.1016/j.livsci.2021.104538.
- Saborío-Montero, A., A. López-García, M. Gutiérrez-Rivas, R. Atxaerandio, I. Goiri, A. García-Rodríguez, J. A. Jiménez-Montero, C. González, J. Tamames, F. Puente-Sánchez, L. Varona, M. Serrano, C. Ovilo y O. González-Recio. 2021b. A dimensional reduction approach to modulate the core ruminal microbiome associated with methane emissions via selective breeding. *Journal of Dairy Science*, 104 (7):8135–8151. doi:10.3168/jds.2020-20005.
- Stewart, R. D., M. D. Auffret, A. Warr, A. W. Walker, R. Roehe y M. Watson. 2019. Compendium of 4,941 rumen metagenome-assembled genomes for rumen microbiome biology and enzyme discovery. *Nature Biotechnology*, 37 (8):953–961. doi:10.1038/s41587-019-0202-3.
- Tapio, I., K. J. Shingfield, A. Bonin, D. Fischer, A. R. Bayat, J. Vilkki, P. Taberlet, T. J. Snelling y R. J. Wallace. 2016. Oral Samples as Non-Invasive Proxies for Assessing the Composition of the Rumen Microbial Community. *PLoS One*, 11 (3): 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0151220.
- Tapio, I., T. J. Snelling, F. Strozzi y R. J. Wallace. 2017. The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8:1–11. doi:10.1186/s40104-017-0141-0.
- Thomas, T., J. Gilbert y F. Meyer. 2012. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2:1–12. doi:10.1186/2042-5783-2-3.

- Ursell, L. K., J. L. Metcalf, L. Wegener Parfrey, y R. Knight. 2013. Defining the Human Microbiome. *Nutrition Reviews*, 70 (1):1–12. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x.Defining.
- Wallace, R. J., G. Sasson, P. C. Garnsworthy, I. Tapio, E. Gregson, P. Bani, P. Huhtanen, A. R. Bayat, F. Strozzi, F. Biscarini, T. J. Snelling, N. Saunders, S. L. Potterton, J. Craigon, A. Minuti, E. Trevisi, M. L. Callegari, F. P. Cappelli, E. H. Cabezas-Garcia, J. Vilkki, C. Pinares-Patino, K. O. Fliegerová, J. Mrázek, H. Sechovcová, J. Kopečný, A. Bonin, F. Boyer, P. Taberlet, F. Kokou, E. Halperin, J. L. Williams, K. J. Shingfield y I. Mizrahi. 2019. A heritable subset of the core rumen microbiome dictates dairy cow productivity and emissions. *Science Advances*, 5 (7):1–12. doi:10.1126/sciadv.aav8391.
- Wang, Y. y P. Y. Qian. 2009. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*, 4 (10): e7401. doi:10.1371/journal.pone.0007401.
- Weimer, P. J., D. M. Stevenson y D. R. Mertens. 2010. Shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat - depressing conditions. *Journal of Dairy Science*, 93 (1):265–278. doi:10.3168/jds.2009-2206.
- Welkie, D. G., D. M. Stevenson y P. J. Weimer. 2010. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe*, 16 (2):94–100. doi:10.1016/J.ANAEROBE.2009.07.002.
- Willes, R. F. 1972. Permanently Installed Digestive Cannulae. *Journal of Dairy Science*, 55 (8):1188–1190. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(72)85646-7.
- Woese, C. R., E. Stackebrandt, T. J. Macke y G. E. Fox. 1985. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Systematic and Applied Microbiology*, 6 (2):143–51. doi:10.1016/S0723-2020(85)80047-3
- Yu, Z. y M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques*, 36 (5):808–812. doi:10.2144/04365ST04/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE2.JPEG.
- Yuan, S., D. B. Cohen, J. Ravel, Z. Abdo y L. J. Forney. 2012. Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PLoS One*, 7 (3): e33865. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0033865.