

## Revisión [Review]



## TECNOLOGÍAS DE SECUENCIACIÓN DEL METAGENOMA DEL RUMEN†

### [RUMEN METAGENOME SEQUENCING TECHNOLOGY]

J.R. Pacheco Arjona<sup>a</sup> and C.A. Sandoval-Castro<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>*Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Km 15.5 Carretera Mérida-Xmatkuil, 97315 Mérida, Yucatán, México. Email: jrpachecoar@conacyt.mx*

<sup>b</sup>*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5 Carretera Mérida-Xmatkuil, 97315 Mérida, Yucatán, México.*

*Email: Carlos.sandoval@correo.uady.mx*

*\*Corresponding author*

#### SUMMARY

Ruminant livestock and their products have a high economic importance in the world. Their rumen is part of a complex digestive system, contains a microbial community of great importance to the host and with functions related to health, productivity, greenhouse gas emissions, and others. Within the microbial community of the rumen, the bacterial population constitutes the highest population biomass; they are the most active and fermentative and contributes with an important nutrient supply to the host. The DNA sequencing technologies in the molecular age, has allowed to identify an unprecedented number of microorganisms through metagenomics, identifying microbial communities from the sequence of molecular markers, integrated in all microorganisms. Metagenomic studies effectively increased knowledge related to ruminal microbial diversity. However, several factors that can influence the inference of population profiles, makes comparison between studies difficult. This review analyzes several factors that can generate variability in the profiles of the microbial population and presents the state of the art of the sequencing technologies applied in metagenomic studies. On the other hand, makes a comparison between several studies and meta-analysis of the rumen microbiome, with a focus on the dominant populations and their functions. Finally, makes a proposal that could be useful in the difficult challenge of effectively manipulating the composition and function of the ruminal microbiome and opening the possibility for sustainable production.

**Key words:** microbiome; rumen; metagenome; sequencing; 16S rRNA.

#### RESUMEN

La cría de los rumiantes y los productos derivados de ellos tienen una alta importancia económica en el mundo. El rumen forma parte del complejo sistema digestivo de los rumiantes y contiene una comunidad microbiana de suma importancia para el hospedero ya que sus funciones están relacionadas con la salud, productividad y emisión de gases con efecto invernadero, entre otros. Dentro de la comunidad microbiana del rumen, la población bacteriana constituye la biomasa poblacional más alta, son los más activos en la fermentación de los alimentos y son considerados una fuente importante de nutrientes para el rumiante. Las tecnologías de secuenciación del ADN en la era molecular, ha permitido identificar un número sin precedentes de microorganismos a través de la metagenómica, identificando comunidades microbianas a partir de la secuencia de marcadores moleculares, integrados en todos los microorganismos. Los estudios metagenómicos incrementaron de forma efectiva el conocimiento relacionado con la diversidad microbiana ruminal. Sin embargo, son numerosos los factores que pueden influir sobre la inferencia de los perfiles poblacionales, lo que vuelve complicado la comparativa entre estudios. Esta revisión analiza diversos factores que pueden generar variabilidad en los perfiles de la población microbiana y presenta el estado del arte de las tecnologías de secuenciación aplicadas en estudios metagenómicos. Por otro lado, realiza una comparativa entre diversos estudios y meta-análisis del microbioma del rumen, con un enfoque en las poblaciones dominantes y sus funciones. Finalmente, realiza una propuesta que podría ser útil en el difícil reto de manipular de forma efectiva la composición y función del microbioma ruminal y abrir la posibilidad para una producción sustentable.

**Palabras clave:** microbioma; rumen; metagenoma; secuenciación; ARNr 16S.

† Submitted August 16, 2018 – Accepted November 23, 2018. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License

## INTRODUCCIÓN

Según la FAO (2016), el conteo mundial de cabezas de rumiantes integrados por búfalos, camélidos, caprinos, ganado vacuno y ovinos en el mundo es de  $5.73 \times 10^8$ , de los cuales en el mismo año se obtuvo una producción primaria de  $2.11 \times 10^7$  y  $9.14 \times 10^7$  toneladas de carne y leche entera fresca, respectivamente. Su producción representa el sustento directo o indirecto de millones de personas en el mundo, lo que le otorga una alta importancia económica.

El rumen es una parte importante del sistema digestivo de los rumiantes, integra una comunidad microbiana que es determinante para la digestión del material vegetal y subsecuente conversión a energía requerida por el hospedero, se encuentra constituido por un ecosistema complejo de cientos de filotipos de bacterias, protozoos, hongos, arqueas y virus (Mackie et al., 1997; Kamra, 2005).

La composición y proporción de los microorganismos del rumen están influenciados por factores como la dieta, frecuencia de alimentación, edad, locación geográfica e interacción (Hungate, 1966). Su concentración aproximada es de  $10^{11}$ ,  $10^6$  y  $10^6$  células o partículas/ml para bacterias, protozoos y hongos, respectivamente. Su actividad hidrolítica es excepcionalmente superior comparada con ecosistemas terrestres y acuáticos (Hungate et al., 1997; Mackie et al., 2002; Weimer et al., 2009; Williams y Coleman, 1997).

En “The rumen and its microbes”, Hungate (1966), el padre de la microbiología del rumen, descubre en esencia el concepto microbioma del rumen. El libro describe cómo los alimentos de rumiantes son tomados por la población microbiana en el sistema de fermentación continua que es el rumen y cómo estos son convertidos dentro de cuerpos microbianos en la proteína utilizada por el hospedero, al mismo tiempo en el que se digiere la fibra y se fermentan los carbohidratos solubilizados para producir gases y los ácidos acético y butírico y otros productos absorbidos y oxidados por el rumiante para satisfacer sus necesidades energéticas.

Actualmente, las tecnologías de secuenciación masiva de nucleótidos han crecido a pasos agigantados. Este tipo de tecnologías han impulsado los estudios de poblaciones del rumen, ofreciendo entre otras cosas, eliminar el tedioso paso de cultivo de microorganismos. Los marcadores moleculares (p. ej. ARNr 16S o 18S) pueden ser secuenciados en su totalidad a partir de una única muestra biológica y con la información masiva realizar estudios de la población microbiológica que lo integra. El termino metagenómica, se define como el análisis genético directo de genomas contenidos en una muestra

ambiental a través de marcadores moleculares (Thomas et al., 2012). La correcta selección de marcadores moleculares son críticas para la clasificación taxonómica, ya que éstos deben de contar con una fuerte huella filogenética. Cada nucleótido de los marcadores moleculares puede ser identificado a través de secuenciación, empleando múltiples métodos y plataformas de secuenciación. Las secuencias son contrastadas con diversas bases de datos a través de programas bioinformáticos con el fin de realizar una clasificación taxonómica y una reconstrucción filogenética, pudiendo discernir hasta nivel de género y en algunos casos de especie (Krishnan et al., 2017; Rodicio y Mendoza, 2004). Lo anterior puede ser complementado con análisis metatranscriptómicos o metaproteómicos para describir actividades de expresión y función (Gilbert et al., 2011; Wilmes y Bond, 2006). Se han reportado cientos de estudios metagenómicos para abordar diferentes aspectos del microbioma del rumen, como el efecto del aditivo alimenticio o las dietas en el microbioma ruminal, los patrones tempranos de colonización del rumen y la diversidad de enzimas, la producción de metano, entre otros (Kothari et al., 2017).

### ADN microbiano del rumen

Los diversos métodos de extracción del ADN genómico microbiano, pueden generar una alta variabilidad experimental en el análisis de secuencias (Henderson et al., 2013; Kennedy et al., 2014; Villegas-Rivera et al., 2013; Wu et al., 2010; Yu y Morrison, 2004; Yuan et al., 2012). La selección del método adecuado de extracción depende de la naturaleza y tipo de muestra. Con el fin de reducir éste problema, se han comparado métodos de extracción de ADN microbiano basados en perlas magnéticas, en muestras de tipo fecal, oral, piel, suelo y agua, reportando a la plataforma KingFisher como productora de lecturas de alta calidad en términos de secuenciación (Marotz et al., 2017). En el trabajo de Yu y Morrison (2004), desarrollaron el método de purificación de perlas más columna (RBB+C), extrayendo eficientemente el ADN metagenómico de muestras ruminales en bovinos, este método aumentó el rendimiento de ADN hasta seis veces en comparación con otros tres métodos, también produjo resultados superiores en estudios de diversidad basados en PCR, evaluados por DGGE de la región V3 del gen ARNr 16S.

### Marcador molecular ARNr 16S

Uno de los marcadores genéticos universales para el análisis de comunidades microbianas es el gen ARNr ribosomal 16S (*ARNr 16S*), la información de su secuencia se obtiene del ADN por ser mucho más fácil de procesar y secuenciar que el ARN. Es el gen marcador más utilizado para perfilar comunidades

microbianas (Tringe y Hugenholtz, 2008), mide aproximadamente 1500 pb y se compone de nueve regiones hipervariables V1-V9, separadas por nueve regiones altamente conservadas (Baker et al., 2003; Wang and Qian, 2009). Las regiones hipervariables aportan la mayor información útil para estudios de filogenética y taxonomía, gracias a que se encuentran presentes en todas las bacterias y arqueas. La selección de una región o la combinación de diferentes regiones y la tecnología de secuenciación empleada para obtener la o las regiones, tiene un efecto determinante en la descripción de la diversidad bacteriana en las muestras (Yang et al., 2016).

### Secuenciación de alto rendimiento

Secuenciar, consiste en conocer la cadena concreta de nucleótidos que componen un gen o fragmento de ADN o ARN (p. ej. *ARNr 16S*). A través del tiempo y gracias a los avances tecnológicos han surgido diversas tecnologías de secuenciación, las cuales han sido ampliamente acudidas para estudios de poblaciones microbianas. Las nuevas tecnologías de secuenciación ofrecen entre otras cosas, eliminar el tedioso paso de cultivo de microorganismos y obtener de forma masiva las secuencias de marcadores moleculares de todos los microorganismos integrados en una muestra biológica. A continuación, se proporciona una breve descripción de las principales plataformas de secuenciación. Para ampliar la información sobre estas tecnologías, se pueden consultar excelentes revisiones recientes (Besser et al., 2018; Buermans y Den Dunnen, 2014; van Dijk et al., 2014; Vincent et al., 2017).

**Secuenciación de primera generación.** La secuenciación tipo Sanger, también conocida como secuenciación de primera generación, ha evolucionado favorablemente a través del tiempo. Este tipo de secuenciación ofrece secuencias de ADN de alta calidad de un largo aproximado de 500-1000 pb. Considerado durante mucho tiempo como el estándar de referencia para secuenciar el ADN, ha sido de gran utilidad en estudios de composición bacteriana a pequeña escala. Sin embargo, la pequeña proporción de marcadores moleculares que pueden ser secuenciados en una corrida, comparado con el total de microorganismos en una muestra, es su principal limitante.

**Secuenciación de segunda generación.** La secuenciación de segunda generación (SSG), también conocida como secuenciación de lecturas cortas (50-400 pb), implica una secuenciación masiva de un número de templados de la misma muestra en una simple corrida, las diversas plataformas difieren sustancialmente en términos de ingeniería, química de secuenciación, largo de lecturas, cantidad de secuencias, precisión y costo (Buermans y Den Dunnen, 2014). La plataforma Illumina, se basa en la

secuenciación por síntesis, sus lecturas tienen un largo de 50-300 pb y pueden secuenciarse en ambos sentidos (PE). Los instrumentos MiniSeq, MiSeq, NextSeq tienen una escala adecuada para secuenciación metagenómica 16S, en tanto que la escala de los instrumentos HiSeq y NovaSeq se ajustan mejor para secuenciación del metatranscriptoma. La plataforma IonTorrent de Thermo Fisher también emplea secuenciación por síntesis, pero la detección se basa en medidores de pH de estado sólido, incluye los instrumentos Ion PGM, de escala adecuada para secuenciación metagenómica 16S y el Ion Proton, adecuado para metatranscriptómica, ofrecen largos de lecturas de 200-400 pb en un solo sentido (SE).

**Secuenciación de tercera generación.** Las lecturas cortas de la SSG tienden a generar ensamblajes fragmentados, lecturas más largas, como la secuencia completa del gen ARNr 16S, ayudan a identificar con mayor precisión la diversidad taxonómica (Yarza et al., 2014). Las plataformas de secuenciación de tercera generación (STG) ofrecen longitudes de lecturas que van de 1-100 Kb (Laver et al., 2015; Lu et al., 2016; Reuter et al., 2015; Rhoads y Au, 2015), ésta característica reduce el sesgo que existe entre las lecturas cortas como las de SSG. La plataforma PacBio RSII con su versión más reciente Sequel y su tecnología denominada "Single Molecule Real-Time" (SMRT), ofrece fragmentos de ADN de un largo de 20-40 Kb, secuenciando la longitud completa del gen ARNr 16S (~1500 pb). Con esta característica, las comunidades microbianas pueden detectarse a nivel de especie en algunos casos, sin embargo, el nivel de error de su secuenciación es mayor que el de las plataformas de SSG y su costo es más elevado. La plataforma Oxford Nanopore presenta los dispositivos MinIon, GridIon y PromethIon, emplean tecnología de nano poros e identifica las bases midiendo los cambios en la conductividad eléctrica generada a medida que las cadenas de ADN pasan a través de un poro. La longitud de lecturas es similar a PacBio y su tasa de error es mayor. Lo que hace interesante a futuro esta tecnología, es su portabilidad y secuenciación en tiempo real.

### Secuenciación de las regiones V1-V9 del ARNr 16S

Como se mencionó anteriormente los métodos de secuenciación de alto rendimiento se aplican ampliamente en estudios metagenómicos, empleando al gen ARNr 16S como marcador molecular. Sin embargo, existen inconvenientes críticos para considerar cuando se interpretan los resultados, incluidas las diferencias en los resultados en función de la/las regiones hipervariables utilizadas. Existen diversos diseños de cebadores que amplifican las múltiples combinaciones de los sitios hipervariables V1-V9 (Tabla 1), por su parte, Kim et al. (2017) presenta los pares de cebadores usados para métodos

NGS para diversas combinaciones de sitios variables. La selección del o los sitios variables tendrá un efecto determinante en la descripción de la diversidad bacteriana de las muestras (Valenzuela-Gonzalez et al., 2015; Walters et al., 2015).

#### Secuenciación ARNr 16S tipo Sanger.

Tradicionalmente, para estudios metagenómicos por secuenciación tipo Sanger, se han empleado el par de cebadores 515F/806R que amplifican la región V4, sin embargo se demostró que este marcador identifica parcialmente las arqueas Crenarchaeota/Thaumarchaeota (Hugerth et al., 2014) y el clado SAR11 abundante en bacterias acuáticas (Morris et al., 2002). La longitud completa V1-V9 se amplifica habitualmente por el par de cebadores 27F y 1492R, sin embargo, para obtener una secuencia precisa, ambas cadenas de ADN deben secuenciarse usando múltiples cebadores (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores empleados para amplificar regiones hipervariables V1-V9

Cebador (Primer)	
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
336R	ACTGCTGCSYCCCGTAGGAGTCT
337F	GACTCCTACGGGAGGCWGCAG
337R	GACTCCTACGGGAGGCWGCAG
341F	CCTACGGGNGGCWGCAG
515F	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA
518R	GTATTACCGCGGCTGCTGG
533F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
785F	GGATTAGATACCTGGTA
805R	GACTACHVGGGTATCTAATCC
806R	GGACTACNVGGGTWTCTAAT
907R	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT
928F	TAAACTYAAAKGAATTGACGGG
1100F	YAACGAGCGCAACCC
1100R	GGGTTGCGCTCGTTG
1492R	CGGTTACCTTGTTACGACTT

F= forward, R= Reverse

#### Secuenciación de segunda generación del ARNr 16S.

El protocolo de secuenciación para el gen ARNr 16S de la compañía Illumina ([https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)) se enfoca en las regiones V3-V4 (~460 pb), los cebadores para amplificar estos sitios fueron seleccionados de Klindworth et al. (2013), como los de mejor cobertura general y espectro de Phylum. Sin embargo, este método no se limita a los sitios V3-V4, puesto que también se puede utilizar para secuenciar otras regiones en el genoma, ya sea del

mismo gen ARNr 16S empleando otros conjuntos de pares de cebadores o de regiones no 16S en todo el genoma, es decir, cualquier amplicón.

La compañía Thermo Fisher presenta el kit “Ion 16S™ Metagenomics” para la secuenciación de sitios variables del gen ARNr 16S empleando la plataforma Ion PGM ([https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0010799\\_Ion\\_16S\\_Metagenomics\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0010799_Ion_16S_Metagenomics_UG.pdf)). El kit presenta dos grupos de cebadores para amplificar siete regiones hipervariables en total, el grupo V2, 4, 8 y el V3, 6, 7, 9, los cuales pueden ser usados juntos o por separado. Si se desea emplear los dos grupos de cebadores la demanda de tiempo y trabajo es extensa, pero se recompensa con buenos resultados.

#### Secuenciación de tercera generación del ARNr 16S.

La compañía Pacific Biosciences, con su tecnología de secuenciación SMRT y su librería SMRTbell (<https://www.pacb.com/wp-content/uploads/Procedure-Checklist-Full-Length-16S-Amplification-SMRTbell-Library-Preparation-and-Sequencing.pdf>), llega a amplificar el largo total del gen ARNr 16S (~1500 pb) a partir de muestras de ADN metagenómico usando PCR y cebadores específicos, los productos de PCR se convierten a una forma circular que posteriormente es secuenciada. Desafortunadamente, con la tecnología actual, las ganancias en longitud pueden venir a expensas de la precisión. Como se mencionó anteriormente, el nivel de error de su secuenciación puede llegar a ser alto si se compara con los de SSG. Puesto que el objetivo es distinguir entre especies por similitud de secuencias la tasa de error es un problema.

El protocolo “Rapid Sequencing Kit” ([https://store.nanoporetech.com/media/wysiwyg/Rapid\\_Lambda\\_Control\\_Experiment\\_SQK-RAD004\\_.pdf](https://store.nanoporetech.com/media/wysiwyg/Rapid_Lambda_Control_Experiment_SQK-RAD004_.pdf)) de la compañía Oxford Nanopore, junto con las librerías de secuenciación 1D o 2D, con diferencia en tiempo de elaboración y calidad de secuenciación, obtiene la secuencia completa del gen ARNr 16S (~1500 pb). El protocolo 1D solo lee la cadena molde de ADN bicatenario, considerado inicialmente de calidad relativamente baja, sin embargo, actualmente con la química R9 ha mejorado su precisión. El protocolo 2D produce datos de ambas cadenas, pero requiere más tiempo para la preparación de la biblioteca (~90 min) (Mitsuhashi et al., 2017).

#### Microbioma del rumen

Numerosos estudios han abordado diversos aspectos del microbioma del rumen en diferentes especies, principalmente ganado vacuno y ovino. Debido a las limitaciones que presenta el cultivo de bacterias del rumen, el uso de técnicas para evaluar poblaciones bacterianas basada en cultivos, subestima sustancialmente la diversidad de microorganismos dentro del rumen (Fernando et al., 2010). La

introducción de técnicas de secuenciación de alto rendimiento, utilizando el gen ARNr 16S como marcador molecular, ha hecho grandes aportes en la caracterización de comunidades microbianas del rumen (Cremonesi et al., 2018). Con estas tecnologías ha sido posible generar estudios que puedan también caracterizar bacterias no cultivables integradas en el metagenoma del rumen, aplicándolo en trabajos que buscan conocer la variación de la población microbiana durante el efecto de aditivos alimenticios, la dieta, patrones de colonización del rumen, diversidad de enzimas, metanógenos, entre otros. A continuación, se presentan trabajos de investigación representativos, que emplearon tecnología de secuenciación masiva de segunda y tercera generación, para efectuar estudios metagenómicos.

Mediante la tecnología Roche/454 GS FLX Titanium System y empleando las regiones V3-V5 del ARNr 16S, se caracterizó el microbioma ruminal de terneros pre-rumiantes de 12 y 42 días, alimentados con sustitutos de leche. En terneros de 42 días, el Phylum predominante en el rumen fue Bacteroidetes (74.8%), seguido por Firmicutes (12.0%), Proteobacteria (10.4%), Verrucomicrobia (1.2%) y Sinergistetes (1.1%). La composición a nivel Phylum de terneros de 14 días fue claramente diferente. Durante el desarrollo temprano de los dos grupos, el microbioma ruminal presentó una profunda diferencia en composición. Sin embargo, todas las clases funcionales entre los dos grupos tuvieron una asignación similar, lo que sugiere que las comunidades microbianas mantienen una función estable y un potencial metabólico, mientras su composición filogenética fluctúa (Li et al., 2012).

Empleando la misma tecnología de secuenciación, en muestras de rumen de ganado Kankrej, se investigó el efecto de tratamientos dietéticos con forrajes secos o verdes sobre la diversidad bacteriana. También, se determinó las diferencias que existen en la clasificación de poblaciones, al usar las combinaciones de sitios hipervariables V1-V3, V4-V5 y V6-V8 del gen ARNr 16S. En todas las comunidades los Phyla más abundantes fueron Bacteroidetes y Firmicutes, comprendiendo hasta el 90%. A medida que los animales fueron pasando de las dietas de forraje fresco a seco, los linajes de Bacteroidetes se reducían y el de Firmicutes aumentaba. Los linajes del Phylum Bacteroidetes se asignaron principalmente a la familia Prevotellaceae. Se identificaron aproximadamente 11 géneros, sin embargo, Prevotella fue el género más dominante en todas las comunidades. Los linajes de Firmicutes estaban dominados por Ruminococcaceae, Lachnospiraceae y Veillonellaceae. Sin embargo, la abundancia de estos Phyla varió según la región empleada. La región V1-V3 proporcionó una mayor riqueza de especies y diversidad de poblaciones bacterianas en el rumen del ganado Kankrej (Pitta et al., 2014).

La región V4 de muestras del microbioma ruminal de novillos con cánulas, fue secuenciada empleando la plataforma IonTorrent PGM (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Con lo anterior, se determinó que los métodos de conservación pellet y liofilizado y los tiempos de 3, 6 y 12 meses de almacenamiento, influyen sobre la calidad y rendimiento del ADN metagenómico, a mayor tiempo de almacenamiento la muestra ruminal reduce significativamente el rendimiento de ADN metagenómico extraído. También, se observó que el método de almacenamiento puede influir en la abundancia de los Phyla (14 de 17 identificados en el estudio), clases y familias de bacterias en muestras de rumen y afectar el índice de riqueza y diversidad (Granja-Salcedo et al., 2017).

Empleando muestras de rumen de novillos, se compararon las plataformas de secuenciación Illumina MiSeq y Pacific Bioscience RSII, usando dos segmentos diferentes del gen ARNr 16S, V1-V3 y V1-V8, respectivamente. La plataforma MiSeq con el segmento V1-V3 clasificó 20 Phyla, 28 clases, 39 órdenes, 64 familias y 73 géneros, siendo los Phyla más predominantes los Bacteroidetes (68.64%) y Firmicutes (21.58%). La plataforma Pacific Bioscience RSII con el segmento V1-V8, clasificó 18 Phyla, 27 clases, 44 órdenes, 65 familias y 81 géneros, similar a la clasificación anterior los Phyla predominantes fueron los Bacteroidetes (62.18%) y Firmicutes (23.38%). Las dos plataformas con sus respectivos segmentos revelaron clasificaciones microbianas similares. Sin embargo, el segmento más largo V1-V8 produjo aumentos significativos en varios órdenes de taxa, como los Phyla Proteobacteria y Verrucomicrobia. La precisión en la clasificación taxonómica también fue superior cuando se empleó el segmento V1-V8, proponiendo así que lecturas largas, como V1-V8, dan una resolución filogenética que puede no alcanzarse con fragmentos más cortos como el V1-V3 (Myer et al., 2016).

Para determinar el papel que juega la microbiota del rumen de cabras en la composición de ácidos grasos de la leche, durante diversas dietas, se secuenciaron las regiones V3-V4 del gen ARNr 16S, empleando la plataforma MiSeq (Illumina). En el fluido ruminal se observó que el Phylum predominante fue Bacteroidetes (61.2%), seguido por Firmicutes (24.2%), con mayor abundancia de las familias Prevotellaceae (41%) y Veillonellaceae (9.4%), respectivamente. También, que la suplementación de linaza reduce la abundancia relativa del género Prevotella (-12%), mientras que los géneros Succinivibrio y Fibrobacter se incrementan (+50% y +75%, respectivamente). La asociación entre el perfil de ácidos grasos del rumen y el microbioma bacteriano, reveló que la familia Fibrobacteriaceae presenta la correlación significativa más alta con

ácidos grasos involucrada en la vía de biohidrogenación de C18:3n-3 (Cremonesi et al., 2018).

**Meta-análisis del microbioma ruminal.** La base de datos Ribosomal Database Project (RDP), archiva todas las secuencias del gen 16S rRNA que han pasado los controles de calidad. La versión 11.5 (Sep/30/2016) consta de 3, 356,809 secuencias de ARNr 16S alineadas y anotadas y 125, 525 secuencias de ARNr 28S fúngicas. En el presente trabajo de revisión, se realizó un meta-análisis empleando secuencias de buena calidad del gen 16S rRNA y con un tamaño  $\geq$  1200 pb, disponibles en la base de datos RDP, para investigar el microbioma del rumen de forma general. Empleando las palabras clave “rumen” y “ruminal, dentro del motor de búsqueda Hierarchy Browser (Cole et al., 2014), se localizaron 129,725 secuencias ruminales putativas, de las cuales 114,239 pertenecen al dominio Bacteria, 15,318 a Archaeas y 168 a Fungi. Las secuencias de cada dominio fueron cargadas y procesadas para su clasificación taxonómica dentro del programa Classifier v2.11 (Wang et al., 2007), con un umbral de confianza de 80%. El dominio Bacteria se clasificó en 26 Phyla, siendo los más representativos los Bacteroidetes (43,112) con los géneros Prevotella (25.6%), Bacteroides (13.6%) y Macellibacteroides (12.1%), el Phylum Firmicutes (40,887) con el género Trichococcus (25%) y la familia Lachnospiraceae (29.3%) y el Phylum Spirochaetes (14,544) con el género Sphaerochaeta (78.2%). Dentro del dominio Archaea el Phylum Euryarchaeota es el de mayor predominancia con 15,282 secuencias con los géneros Methanobrevibacter (49.5%), Methanosarcina (28%) y Methanomassiliicoccus (7.3%). Por su parte el dominio Fungi cuenta con 168 secuencias ruminales putativas, distribuidas en los Phyla Ascomycota (66%), Neocallimastigomycota (29.1%) y Basidiomycota (4.7%).

El trabajo de Henderson et al. (2015) fue integrador, desarrollado en 32 especies animales de 35 países. En el demostraron que la composición de la comunidad microbiana del rumen varía con la dieta y el huésped, pero que, a pesar de ello, existe un microbioma central fijado en un amplio rango geográfico. Observaron que los 30 grupos bacterianos más abundantes se encontraban en más del 90% de las muestras, y que estos coincidían con un meta-análisis previo de las comunidades microbianas del rumen, desarrollado por Kim et al. (2011). A su vez, los resultados coinciden con los estudios de investigación presentados anteriormente en esta revisión (Cremonesi et al., 2018; Granja-Salcedo et al., 2017; Li et al., 2014; Myer et al., 2016; Pitta et al., 2014) y con el meta-análisis del microbioma ruminal localizados en RDP, de esta revisión. Las características y resultados de cada trabajo se resumen en la Tabla 2. Según Henderson et al. (2015) de los 30 grupos bacterianos, siete comprenden el ~67% detectados en todas las muestras. Estos grupos son representados por los géneros Prevotella, Butyrivibrio y Ruminococcus, así como las familias Lachnospiraceae sin clasificar y Ruminococcaceae y los orden Bacteroidales y Clostridiales. A pesar del patrón evidente, es importante resaltar que la abundancia de estas bacterias fue diferente en todas las especies animales. Henderson et al. (2015) proponen que múltiples especies microbianas pueden cumplir la misma función, y se seleccionan diferentes combinaciones de microbios dependiendo de la dieta. Esta flexibilidad de la estructura de la comunidad microbiana del rumen conferiría al huésped del rumiante la capacidad de explotar una variedad de diferentes piensos para plantas.

Tabla 2. Comparación representativa de la población dominante en diversos estudios de perfiles microbianos del rumen

Plataforma de secuenciación	Fragmento ARNr 16S	Modelo animal	Tratamiento u objetivo del estudio	Población dominante (~%)	Dominancia (%)	Referencia
Roche/454 GS FLX	V3-V5	Terneros pre-rumiantes	Alimentados con sustitutos de leche	Bacteroidetes (74.8) Firmicutes (12) Proteobacteria (10.4)	~86.8	Li et al. (2012)
Roche/454 GS FLX	V1-V3, V4-V5 V6-V8	Bovino Kankrej	Alimentados con forraje fresco y seco	Bacteroidetes (39.97) Prevotellaceae Prevotella Firmicutes (0.12-66) Ruminococcaceae Lachnospiraceae Veillonellaceae	~80-97	Pitta et al. (2014)
IonTorrent PGM	V4	Novillos	Estudiar conservación de muestra ruminal	Bacteroidetes (32-53) Firmicutes (30-48)	~69-88	Granja-Salcedo et al. (2017)
Illumina MiSeq	V1-V3	Novillos	Comparación entre plataformas de secuenciación y fragmentos ARNr 16S	Bacteroidetes (68.64) Firmicutes (21.58)	~90.22	Myer et al. (2016)
Pacific Bioscience RSII	V1-V8	Novillos	Comparación plataformas de secuenciación y marcadores moleculares	Bacteroidetes (62.18) Firmicutes (23.38)	~85.56	Myer et al. (2016)
Illumina MiSeq	V3-V4	Cabras	Dietas diversas	Bacteroidetes (61.2) Prevotellaceae (41) Firmicutes (24.2) Veillonellaceae (9.4)	~85.4	Cremonesi et al. (2018)
Ribosomal Database Project	ARNr 16S ≥ 1200 pb	Rumiantes en general	Clasificación general del Microbioma del rumen	Bacteroidetes (37.74) Prevotella (25.6) Bacteroides (13.6) Macellibacteroides (12.1) Firmicutes (35.79) Lachnospiraceae (29.3) Trichococcus (25)	~73.53	Esta revisión
Roche/454 GS FLX	V1-V3	Rumiantes en general	Estudiar efecto de Dieta, especie hospedera y origen geográfico	Bacteroidetes Bacteroidales (8.4) Prevotella (22) Firmicutes Ruminococcaceae (7.9) Ruminococcus (3.6) Lachnospiraceae (6.3) Butyrivibrio (3.4) Clostridiales (15.3)	~67%	Henderson et al. (2015)

## Observaciones finales

Existen múltiples factores que pueden afectar la correcta identificación de comunidades microbianas en el rumen, dentro de los más relevantes podemos encontrar a los métodos y técnicas de extracción de ADN microbiano, la selección del marcador molecular o segmentos de este, tal como lo son los sitios hipervariables V1-V9 del gen ARNr 16S y la tecnología de secuenciación empleada. La alta variabilidad en la selección de los sitios hipervariables del gen ARNr 16S, en los estudios de perfiles microbianos del rumen, genera un grado de imprecisión en la clasificación a nivel de género y especie, incluso en algunos casos a nivel de Phylum. A pesar de que los trabajos de Pitta et al. (2014) y Myer et al. (2016), emplearon el mismo fragmento V1-V3, pero diferente tecnología de secuenciación (Roche/454 GS FLX Titanium System e Illumina MiSeq, respectivamente), se pueden observar diferencias evidentes entre las clasificaciones taxonómicas. El primero clasificó 20 Phyla y el segundo 24, demostrando así que la tecnología empleada también puede influenciar sobre la descripción de los perfiles poblacionales. Sin embargo, las diferencias entre el número de Phyla, también podrían estar influenciada por los diferentes tipos y condiciones de las muestras. Resulta evidente que existe una mayor precisión en la clasificación taxonómica cuando se emplea el gen completo o segmentos largos (p. ej. V1-V8) sobre otras combinaciones más pequeñas. Pitta et al. (2014) indican en su estudio, que la región V1-V3 empleada como marcador molecular fue la que proporcionó una mayor riqueza de especies y diversidad. Sin embargo, sería erróneo suponer que esa característica este acompañada de precisión, puesto que, existe la posibilidad de que el fragmento empleado solo este sobre estimando la población. El trabajo de Yang et al. (2016), llevo a cabo un estudio comparativo entre la clasificación taxonómica obtenida empleando cada uno de los sitios hipervariables y diversas combinaciones entre ellos, en contra de la clasificación obtenida al emplear el segmento completo V1-V9 del gen ARNr 16S. Pudieron comprobar, en el comparativo de las regiones individuales, que la región V4 y el largo total del ARNr 16S presentan una distancia geodésica pequeña, indicativo de que la topología de los árboles inferidos con la región V4 fue la que más se ajusta a los inferidos con el largo total del ARNr 16S. Lo anterior define a la región V4 como la mejor para estudios filogenéticos, sin embargo, el ajuste de su precisión se encuentra a nivel Phylum. La combinación de las regiones V4, V5 y V6 resultaron ser las de mayor sensibilidad al ser comparadas con el largo total del ARNr 16S, proponiéndose como la región óptima para estudios filogenéticos.

Actualmente, las tecnologías de SSG son las que ofrecen una mayor precisión en la secuenciación, pero

los largos de lectura máxima rondan los 300-400 pb, lo que significa que, si se desea amplificar varias regiones hipervariables para obtener el largo que ofrece precisión en la clasificación, el tiempo de trabajo aumenta al igual que los costos. En contraparte, las tecnologías de STG pueden secuenciar fácilmente el gen completo del ARNr 16S, sin embargo, la precisión de secuenciación es inferior a las que ofrecen las tecnologías de SSG, lo que resulta de suma importancia si se desea una alta precisión en la clasificación, aumentar la precisión de secuenciación significa un aumento en el tiempo de trabajo y costos de secuenciación. Aún falta encontrar el equilibrio entre los dos puntos deseados, obtener lecturas largas con alta precisión de secuenciación masiva a un costo accesible, para poder explotar de manera precisa los estudios de tipo metagenómico. En tanto esto ocurre, los perfiles de poblaciones microbianas con mayor precisión, al emplear fragmentos del gen ARNr 16S, estarán dados por la combinación de los sitios variables V4-V6, como se indica en Yang et al. (2016), a su vez, si se desea evitar la sobre estimación en la clasificación, dada por la precisión de la secuenciación, es altamente recomendable que la secuenciación sea efectuada por plataformas de segunda generación que empleen tipos de lecturas en pares.

A pesar de los múltiples factores que pueden afectar la correcta identificación de comunidades microbianas en el rumen, es posible observar patrones de predominancia en las poblaciones microbianas en diversos estudios. Los Phyla con mayor presencia son los Bacteroidetes y Firmicutes, con dominancia del género *Prevotella* y las familias Ruminococcaceae, Lachnospiraceae y Veillonellaceae, respectivamente (Tabla 2). Lo anterior apunta a que las comunidades microbianas del rumen mantienen en la mayoría de los casos la misma predominancia, con fluctuaciones que pueden mantener la misma tendencia. Existe una alta probabilidad que estas bacterias dominantes sean las responsables de la mayor parte de la transformación de los alimentos ingeridos en el rumen.

Resulta interesante las coincidencias entre Henderson et al. (2015) y Li et al. (2012), al definir que a pesar de que existen diferencias en composición y abundancia en la población microbiana durante el desarrollo y en diferentes especies animales, respectivamente, las comunidades microbianas fluctuantes presentes en el rumen, cumplen la misma función. Con lo anterior nacen nuevas propuestas para explicar este fenómeno, como la planteada por el propio Henderson, donde propone que existe una selección de diferentes combinaciones de microbios según la dieta, la cual otorga al huésped del rumiante la capacidad de explotar una variedad de diferentes piensos de plantas.



La manipulación de la composición y función del microbioma ruminal, representa probablemente el desafío más grande e importante. La microbiota ruminal ha demostrado tener superposición de funciones (Henderson et al., 2015; Li et al., 2012) y resistencia y capacidad de recuperar la estructura poblacional inicial después de ser perturbada (Weimer, 2015). Son pocos los precedentes de éxito en la modificación de la comunidad microbiana, las excepciones conocidas incluyen cepas introducidas que llenan nichos desocupados, como en el caso de las bacterias especializadas que degradan las fitotoxinas, mimosina o el fluoroacetato (Weimer, 2015).

### CONCLUSIÓN

El empleo de la metagenómica para determinar la diversidad microbiana en el rumen ha generado datos de forma masiva, a pesar de que la generación de toda esta información resulta gratificante para un conocimiento generalizado, este ha superado la capacidad de efectuar un análisis individual de los nuevos organismos que están siendo identificados constantemente, sobre todo los de aquellos que pueden estar influenciando el rendimiento del animal. Para avanzar sobre el objetivo de manipular de forma efectiva la composición y función del microbioma ruminal y ligarlo con una alta productividad, disminución en la ingesta de fármacos antiparasitarios, disminución en la emisión de metano y abrir la posibilidad para una producción sustentable, es importante prestar atención en esclarecer los roles fisiológicos y ecológicos de estos puntos aun desconocidos, ya que constituyen piezas clave para decodificar las interacciones entre los microorganismos y entre la combinación de ellos y el huésped en diferentes condiciones.

### REFERENCIAS

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A., 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology*. 56: 1919-1925. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01066.x>

Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A., 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal Microbiological Methods*. 55: 541-555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>

Besser, J., Carleton, H.A., Gerner-Smidt, P., Lindsey, R.L., Trees, E., 2018. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clinical Microbiology Infectology*. 24: 335-341.

<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.013>

Buermans, H.P.J., Den Dunnen, J.T., 2014. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica Biophysica Acta*. 1842: 1932-1941. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.015>

Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Tiedje, J.M., 2014. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*. 42: 633-642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>

Cremonesi, P., Conte, G., Severgnini, M., Turri, F., Monni, A., Capra, E., Rapetti, L., Colombini, S., Chessa, S., Battelli, G., Alves, S.P., Mele, M., Castiglioni, B., 2018. Evaluation of the effects of different diets on microbiome diversity and fatty acid composition of rumen liquor in dairy goat. *Animal* 12: 1856-1866. <https://doi.org/10.1017/S1751731117003433>

Fernando, S.C., Purvis, H.T., Najjar, F.Z., Sukharnikov, L.O., Krehbiel, C.R., Nagaraja, T.G., Roe, B.A., De Silva, U., 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Applied Environmental Microbiology*. 76: 7482-7490. <https://doi.org/10.1128/AEM.00388-10>

Ferrer, M.D., Mira, A., 2016. Oral Biofilm Architecture at the Microbial Scale. *Trends Microbiology*. 24:246-248. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.013>

Gilbert, J.A., Field, D., Huang, Y., Edwards, R.A., Li, W., Gilna, P., Joint, I., 2011. Detection of Large Numbers of Novel Sequences in the Metatranscriptomes of Complex Marine Microbial Communities, in: *Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118010549.ch27>

Granja-Salcedo, Y.T., Ramirez-Uscategui, R.A., Machado, E.G., Messana, J.D., Kishi, L.T., Dias, A.V.L., Berchielli, T.T., 2017. Studies on bacterial community composition are affected by the time and storage method of the rumen content. *PLoS One* 12(4): e0176701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176701>

Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., Janssen, P.H., Abecia, L., Angarita, E., Aravena, P., Arenas, G.N., Ariza, C., Attwood, G.T., Avila, J.M., Avila-Stagno, J., Bannink, A., Barahona, R., Batistotti, M., Bertelsen, M.F., Brown-Kav, A., Carvajal, A.M., Cersosimo, L., Chaves, A.V., Church, J., Clipson, N., Cobos-

- Peralta, M.A., Cookson, A.L., Cravero, S., Carballo, O.C., Crosley, K., Cruz, G., Cucchi, M.C., De La Barra, R., De Menezes, A.B., Detmann, E., Dieho, K., Dijkstra, J., Dos Reis, W.L.S., Dugan, M.E.R., Ebrahimi, S.H., Eythórsdóttir, E., Fon, F.N., Fraga, M., Franco, F., Friedeman, C., Fukuma, N., Gagić, D., Gangnat, I., Grilli, D.J., Guan, L.L., Miri, V.H., Hernandez-Sanabria, E., Gomez, A.X.I., Isah, O.A., Ishaq, S., Jami, E., Jelincic, J., Kantanen, J., Kelly, W.J., Kim, S.H., Klieve, A., Kobayashi, Y., Koike, S., Kopečný, J., Kristensen, T.N., Krizsan, S.J., LaChance, H., Lachman, M., Lamberson, W.R., Lambie, S., Lassen, J., Leahy, S.C., Lee, S.S., Leiber, F., Lewis, E., Lin, B., Lira, R., Lund, P., Macipe, E., Mamuad, L.L., Mantovani, H.C., Marcoppido, G.A., Márquez, C., Martin, C., Martinez, G., Martinez, M.E., Mayorga, O.L., McAllister, T.A., McSweeney, C., Mestre, L., Minnee, E., Mitsumori, M., Mizrahi, I., Molina, I., Muenger, A., Munoz, C., Murovec, B., Newbold, J., Nsereko, V., O'Donovan, M., Okunade, S., O'Neill, B., Ospina, S., Ouwerkerk, D., Parra, D., Pereira, L.G.R., Pinares-Patino, C., Pope, P.B., Poulsen, M., Rodehutsord, M., Rodriguez, T., Saito, K., Sales, F., Sauer, C., Shingfield, K., Shoji, N., Simunek, J., Stojanović-Radić, Z., Stres, B., Sun, X., Swartz, J., Tan, Z.L., Tapio, I., Taxis, T.M., Tomkins, N., Ungerfeld, E., Valizadeh, R., Van Adrichem, P., Van Hamme, J., Van Hoven, W., Waghorn, G., Wallace, R.J., Wang, M., Waters, S.M., Keogh, K., Witzig, M., Wright, A.D.G., Yamano, H., Yan, T., Yanez-Ruiz, D.R., Yeoman, C.J., Zambrano, R., Zeitz, J., Zhou, M., Zhou, H.W., Zou, C.X., Zunino, P., 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports*. 5:14567 <https://doi.org/10.1038/srep14567>
- Henderson, G., Cox, F., Kittelmann, S., Miri, V.H., Zethof, M., Noel, S.J., Waghorn, G.C., Janssen, P.H., 2013. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. *PLoS One* 8(9):e0074787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074787>
- Mackie RI, White BA, Isaacson R, E., 1997. *Gastrointestinal microbiology. Volume 2: Gastrointestinal microbes and host interactions.* Chapman and Hall Microbiology Series. Springer, USA.
- Hugerth, L.W., Wefer, H.A., Lundin, S., Jakobsson, H.E., Lindberg, M., Rodin, S., Engstrand, L., Andersson, A.F., 2014. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies. *Applied Environmental Microbiology*. 80:5116-5123. <https://doi.org/10.1128/AEM.01403-14>
- Hungate, R.E., 1966. *The rumen and its microbes.* Academic Press, New York. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-12555-X>
- Hungate, R.E., Hobson, P., Stewart, C., 1997. The rumen microbial ecosystem, *Annual Review of Ecology and Systematics*. 6:39-66. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.06.110175.000351>
- Kamra, D.N., 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*. 89: 124-135. <https://doi.org/10.2307/24110438>
- Kennedy, N.A., Walker, A.W., Berry, S.H., Duncan, S.H., Farquarson, F.M., Louis, P., Thomson, J.M., Satsangi, J., Flint, H.J., Parkhill, J., Lees, C.W., Hold, G.L., 2014. The impact of different DNA extraction kits and laboratories upon the assessment of human gut microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing. *PLoS One*. 9(2):e0088982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088982>
- Kim, M., Morrison, M., Yu, Z., 2011. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiology Ecology*. 76:49-63. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01029.x>
- Kim, M., Park, T., Yu, Z., 2017. Metagenomic investigation of gastrointestinal microbiome in cattle. *Asian-Australasian Journal Animal Science*. 30: 1515-1528. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0544>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 41: 1-11. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Kothari, R.K., Nathani, N.M., Mootapally, C., Rank, J.K., Gosai, H.B., Dave, B.P., Joshi, C.G., 2017. *Comprehensive Exploration of the Rumen Microbial Ecosystem With Advancements in Metagenomics, Metagenomics: Perspectives, Methods, and Applications.* Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102268-9.00011-2>
- Krishnan, K., Chen, T., Paster, B.J., 2017. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Diseases*. 23: 276-286. <https://doi.org/10.1111/odi.12509>

- Laver, T., Harrison, J., O'Neill, P.A., Moore, K., Farbos, A., Paszkiewicz, K., Studholme, D.J., 2015. Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION. *Biomolecular Detection Quantification*. 3:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.02.001>
- Li, R.W., Connor, E.E., Li, C., Baldwin Vi, R.L., Sparks, M.E., 2012. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environmental Microbiology*. 14: 129–139. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02543.x>
- Li, R.W., Giarrizzo, J.G., Wu, S., Li, W., Düringer, J.M., Craig, A.M., 2014. Metagenomic insights into the RDX-degrading potential of the ovine rumen microbiome. *PLoS One* 9(11). e0110505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110505>
- Lu, H., Giordano, F., Ning, Z., 2016. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics, Proteomics Bioinformatics*. 14: 265-279. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.004>
- Mackie, R.I., McSweeney, C.S., Klieve, A. V., 2002. Microbial ecology of the ovine rumen., in: *Sheep Nutrition*. CABI, Wallingford, pp. 71–94. <https://doi.org/10.1079/9780851995953.0071>
- Marotz, C., Amir, A., Humphrey, G., Gaffney, J., Gogul, G., Knight, R., 2017. DNA extraction for streamlined metagenomics of diverse environmental samples. *Biotechniques* 62: 290–293. <https://doi.org/10.2144/000114559>
- Mitsuhashi, S., Kryukov, K., Nakagawa, S., Takeuchi, J.S., Shiraishi, Y., Asano, K., Imanishi, T., 2017. A portable system for rapid bacterial composition analysis using a nanopore-based sequencer and laptop computer. *Scientific Reports*. 7:5657. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05772-5>
- Morris, R.M., Rappé, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., Siebold, W.A., Carlson, C.A., Giovannoni, S.J., 2002. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature*. 420(6917):806-810. <https://doi.org/10.1038/nature01240>
- Myer, P.R., Kim, M.S., Freetly, H.C., Smith, T.P.L., 2016. Evaluation of 16S rRNA amplicon sequencing using two next-generation sequencing technologies for phylogenetic analysis of the rumen bacterial community in steers. *Journal Microbiological Methods* 127: 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.004>
- Omoniyi, L.A., Jewell, K.A., Isah, O.A., Neumann, A.P., Onwuka, C.F.I., Onagbesan, O.M., Suen, G., 2014. An analysis of the ruminal bacterial microbiota in West African Dwarf sheep fed grass- and tree-based diets. *Journal Applied Microbiology*. 116: 1094–1105. <https://doi.org/10.1111/jam.12450>
- Palomba, A., Tanca, A., Fraumene, C., Abbondio, M., Fancello, F., Atzori, A., Uzzau, S., 2017. Multi-Omic Biogeography of the Gastrointestinal Microbiota of a Pre-Weaned Lamb. *Proteomes* 5: 36. <https://doi.org/10.3390/proteomes5040036>
- Pitta, D.W., Parmar, N., Patel, A.K., Indugu, N., Kumar, S., Prajapathi, K.B., Patel, A.B., Reddy, B., Joshi, C., 2014. Bacterial diversity dynamics associated with different diets and different primer pairs in the rumen of Kankrej cattle. *PLoS One* 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111710>
- Reuter, J.A., Spacek, D. V., Snyder, M.P., 2015. High-Throughput Sequencing Technologies. *Molecular Cell*. 58:586-597. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004>
- Rhoads, A., Au, K.F., 2015. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics, Proteomics Bioinformatics*. 13: 278-289. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.002>
- Rodicio, M.D.R., Mendoza, M.D.C., 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 22: 201-257. <https://doi.org/10.1157/13059055>
- Streit, W.R., Schmitz, R.A., 2004. Metagenomics - The key to the uncultured microbes. *Current Opinion Microbiology*. 7:492-498. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.08.002>
- Thomas, T., Gilbert, J., Meyer, F., 2012. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics Experimentation*. 2: 3. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>
- Tringe, S.G., Hugenholtz, P., 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion Microbiology*. 11:442-446. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.011>
- Valenzuela-Gonzalez, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., Vargas-Albores, F., Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., Vargas-Albores, F., 2015. The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Mar.* 41: 297–313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>

- van Dijk, E.L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., Thermes, C., 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genetics*. 30: 418-426.  
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>
- Villegas-Rivera, G., Vargas-Cabrera, Y., González-Silva, N., Aguilera-García, F., Gutiérrez-Vázquez, E., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juárez, M., Baizabal-Aguirre, V.M., Valdez-Alarcón, J.J., 2013. Evaluation of DNA extraction methods of rumen microbial populations. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 29: 301-307. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1183-2>
- Vincent, A.T., Derome, N., Boyle, B., Culley, A.I., Charette, S.J., 2017. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *Journal Microbiological Methods*. 138:60-71. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.02.016>
- Walters, W., Hyde, E.R., Berg-lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., Parada, A., Gilbert, J. a, Jansson, J.K., 2015. Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *mSystems* 1, e0009-15. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00009-15>.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied Environmental Microbiology*. 73: 5261-5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wang, Y., Qian, P.Y., 2009. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*. 4(10): e0007401  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>
- Weimer, P.J., 2015. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations. *Frontiers Microbiology*. 6: 296. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00296>
- Weimer, P.J., Russell, J.B., Muck, R.E., 2009. Lessons from the cow: What the ruminant animal can teach us about consolidated bioprocessing of cellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 100: 5323-5331.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.075>
- Williams, A.G., Coleman, G.S., 1997. The rumen protozoa. In. *The rumen Microbial Ecosystem*. Hobson, P.N., Stewart, C.S (editors). Springer Nature Switzerland. pp. 73-739. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7>.
- Wilmes, P., Bond, P.L., 2006. Metaproteomics: Studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends Microbiology*. 14:92-97.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.12.006>
- Wu, G.D., Lewis, J.D., Hoffmann, C., Chen, Y.Y., Knight, R., Bittinger, K., Hwang, J., Chen, J., Berkowsky, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F.D., 2010. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. *BMC Microbiology*. 10:206. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-206>
- Xu, P., Gunsolley, J., 2014. Application of metagenomics in understanding oral health and disease. *Virulence*. 5:424-432. <https://doi.org/10.4161/viru.28532>
- Yang, B., Wang, Y., Qian, P.Y., 2016. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*. 17:135. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R., Rosselló-Móra, R., 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews. Microbiology*. 12: 635-645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Yu, Z., Morrison, M., 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques*.36: 808-812. <https://doi.org/10.2144/3605A0808>
- Yuan, S., Cohen, D.B., Ravel, J., Abdo, Z., Forney, L.J., 2012. Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PLoS One*. 7(3):e0033865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033865>