

© 2022 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 25: 1-18, 2022.

<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.430>

Metagenómica y metatranscriptómica para mitigar las emisiones de metano por animales rumiantes

Daniela Sofía Martínez-Muñoz¹, Fernanda Rivera-Cerón¹, Iléana Palacios-Solórzano¹, Belén A. Ramírez-Martínez¹, Christian Molina-Aguilar^{1, 2b} y Bárbara B. Moguel^{1, 2a}

¹Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Campus Querétaro, Epigmenio González # 500,

Fracc. San Pablo 76130, Querétaro, Qro., México. ²Laboratorio Internacional de Investigación sobre el Genoma

Humano, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Blvd. Juriquilla # 3001, Santiago de

Querétaro 76230, Qro., México. E-mails: ^abbmoguel@tec.mx, ^bchristian_molina@tec.mx

RESUMEN

La ganadería de rumiantes es considerada una de las mayores fuentes antropogénicas del gas metano (CH_4). La metanogénesis es parte del proceso digestivo de estos animales y es mediada por los microorganismos presentes en el rumen, responsables no sólo de la pérdida de energía en el animal, que impacta directamente en la productividad del ganado, sino también de la producción del metano que contribuye al incremento del efecto invernadero. Las características funcionales del microbioma del rumen no han sido bien descritas debido a que la mayoría de los microorganismos presentes no son cultivables en condiciones de laboratorio, pero pueden ser estudiados mediante técnicas moleculares, como la metagenómica y la metatranscriptómica. Este artículo de revisión tiene como objetivos además de compilar y difundir la información del impacto ambiental por la industria ganadera, describir algunas de las estrategias experimentales y bioinformáticas que se utilizan en el análisis del microbioma ruminal desde la metagenómica y la metatranscriptómica, para reducir las emisiones de metano por el ganado.

Palabras clave: rumiantes, microbioma, metanogénesis, metagenómica, metatranscriptómica.

Metagenomics and metatranscriptomics to mitigate methane emissions by ruminant animals

ABSTRACT

Ruminant livestock is considered one of the largest anthropogenic sources of methane gas. Methanogenesis is part of the digestive process of these animals and is mediated by the microorganisms present in their rumen, responsible not only for the loss of energy in the animal, which directly impacts the productivity of cattle, but also for the production of methane that contributes to the increase of the greenhouse effect. The functional characteristics of the rumen microbiome have not been well described because most of the microorganisms present are not cultivable under laboratory conditions, but can be studied using molecular techniques, such as metagenomics and metatranscriptomics. The objectives of this review article, in addition to compiling and disseminating information on the environmental impact of the livestock industry, are to describe some of the experimental and bioinformatic strategies used in the analysis of the ruminal microbiome from metagenomics and metatranscriptomics, to reduce emissions of methane by cattle.

Key words: ruminant, microbiome, methanogenesis, metagenomics, metatranscriptomics.

INTRODUCCIÓN

Los rumiantes son mamíferos herbívoros y tienen el estómago compuesto de cuatro cavidades, por lo que también se les llama poligástricos, algunos ejemplos son la vaca, la cabra y la oveja (*Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*, 2017). La ganadería de rumiantes tiene un doble papel, por un lado, el consumo de estos animales provee a los humanos de proteínas de alta calidad, vitaminas y minerales que no son fáciles de encontrar en otros alimentos (Wyness, 2016), pero también son la principal fuente antropogénica de metano (CH_4), un gas de efecto invernadero (GEI) que tiene un poder de calentamiento 34 veces mayor que el dióxido de carbono (CO_2) (Söllinger *et al.*, 2018).

Se ha calculado que cada año estos animales liberan alrededor de 125 millones de toneladas de CH_4 a la atmósfera (Seshadri *et al.*, 2018). A pesar de esto, se estima que la producción de carne se ha cuadruplicado en los últimos 50 años y a nivel mundial se espera que las demandas de leche y carne de vaca se dupliquen para el año 2050 (Söllinger *et al.*, 2018).

Entre los esfuerzos para generar una ganadería más sostenible, durante la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático-COP26 en noviembre 2021, se abordó este tema con el fin de crear conciencia sobre la importancia de una transición hacia sistemas de producción de alimentos más sustentables, que limiten las emisiones de gases provocadas por las liberaciones gastrointestinales y por el estiércol del ganado (Organización de las Naciones Unidas, 2021).

Los rumiantes fermentan el material vegetal que consumen produciendo acetato, butirato, propionato, CH_4 y CO_2 . El CH_4 es expulsado a la atmósfera mediante la exhalación o por el extremo terminal del tracto digestivo (Duin *et al.*, 2016), este proceso es conocido como fermentación entérica y se lleva a cabo en el rumen, uno de los compartimentos esofágicos de los animales rumiantes. Los microorganismos presentes en el rumen además de degradar a los polisacáridos complejos que otorgan energía al animal, son responsables de la producción del CH_4 . Un hecho relevante es que la producción del CH_4 representa una pérdida de energía para el animal de entre el 2 y 12%, e influye en la disminución del crecimiento animal o en la producción de leche, ambas importantes en la economía de la industria ganadera (Johnson & Johnson, 1995).

Las características funcionales del microbioma del rumen no han sido bien descritas debido a que la mayoría de los microorganismos no son cultivables en condiciones *in vitro*, pero el avance tecnológico permite que en la actualidad puedan ser estudiados mediante la metagenómica y la metatranscriptómica (Kaul, Sharma & Dhar, 2016). Es relevante hacer la distinción entre microbiota y microbioma, ya que el término microbiota se refiere al conjunto de microorganismos existente en una comunidad microbiana y el

término microbioma hace referencia a la totalidad de genomas y transcriptomas existentes en el ambiente que se estudia (Li, Neves, Ghoshal & Guan, 2018).

Actualmente, se han identificado miles de filogenias microbianas utilizando técnicas moleculares cultivo-independientes para predecir las funciones de cada filotipo (Li *et al.*, 2018), como se realizó en el proyecto pionero Hungate1000. El desarrollo de la metagenómica y la metatranscriptómica, en conjunto con métodos bioinformáticos, contribuyen a comprender mejor los mecanismos de fermentación ruminal con el fin de obtener información que pueda usarse como estrategia para mitigar la liberación del CH_4 , sin obstaculizar la productividad, ni dañar la función del animal (Wallace, Snelling, McCartney, Tapiro & Strozzi, 2017), por consiguiente se exponen tanto el impacto que la industria ganadera tiene en el calentamiento global, como la importancia de los estudios que han utilizado la metagenómica y la metatranscriptómica.

EFFECTO DE LAS EMISIones DE GEI POR RUMIANTES

Descripción del Efecto Invernadero y sus consecuencias

Cuando el sol irradia energía a la Tierra en longitudes de onda cortas cargadas hacia la luz visible y ultravioleta, aproximadamente un tercio de ella se refleja de vuelta al espacio, los dos tercios restantes son absorbidos por la superficie terrestre y por la atmósfera en menor medida, Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC), por sus siglas en inglés, 2007. La energía que es absorbida por la superficie terrestre calienta la Tierra y en consecuencia se emite radiación terrestre en longitudes de onda más largas, principalmente de la parte infrarroja del espectro (Caballero, Lozano & Ortega, 2007). Esa energía infrarroja emitida por la superficie terrestre es nuevamente detenida y absorbida por los GEI de la atmósfera, que como resultado calientan la troposfera que a su vez irradia calor, manteniendo a la Tierra a 33 grados Celsius más caliente de lo que estaría sin este fenómeno (Osnaya, Fernández Bremauntz & Martínez, 2004).

Los GEI incluyen el vapor de agua (H_2O), el CO_2 , el CH_4 , el N_2O y algunos productos químicos artificiales como los clorofluorocarbonos (CFC) (IPCC, 2007). Las propiedades de estos gases son parte fundamental para la regulación del clima en el planeta, no obstante, se ha incrementado su concentración debido a las actividades humanas, intensificando el efecto invernadero natural y contribuyendo al calentamiento global (Caballero *et al.*, 2007). Las consecuencias al respecto incluyen un aumento en el nivel del mar e inundaciones costeras, la extinción de diversas especies, la acidificación del océano, riesgos para la seguridad alimentaria y períodos de calor extremo, por mencionar algunas (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2018).

Contribución del metano al efecto invernadero

El metano, también es emitido por (a) fuentes naturales que incluyen: el CH_4 fósil de fuentes geológicas, emisiones por

humedales, de termitas y del océano en pequeñas cantidades, al igual que por **(b) fuentes antropogénicas** como las emisiones causadas por fugas de la extracción, el uso de combustibles fósiles, quema de la biomasa vegetal (puede ser antropogénica y natural), agricultura de arrozales, tratamiento de desechos y **(c) ganadería de rumiantes** (Ciais *et al.*, 2013). En la actualidad se estima que, del total de las emisiones de metano, entre el 50 y el 65% provienen de fuentes antropogénicas (Ciais *et al.*, 2013) y se considera el segundo gas de efecto invernadero más abundante, solo por debajo del CO₂ (Global Methane Emissions and Mitigation Opportunities [GMI], 2020). El CH₄ tiene un tiempo de vida de solo 12 años en la atmósfera, pero debido a su gran poder de calentamiento en la actualidad ha contribuido aproximadamente con un tercio de los GEI (GMI, 2020).

Emisiones de los GEI por rumiantes

Para las emisiones de GEI generadas por la ganadería de rumiantes, se toman en cuenta diferentes actividades de la cadena de suministro de la industria. Entre ellas se encuentran las emisiones generadas por la producción de piensos (N₂O y CO₂), por la gestión del estiércol (N₂O y CH₄) y por la fermentación entérica (CH₄) (Gerber *et al.*, 2013).

De acuerdo con lo anterior, se cuantifica la huella del carbono contabilizando los diferentes GEI generados como equivalentes del dióxido de carbono, el valor se obtiene multiplicando la emisión de cada uno por su potencial de calentamiento global (GWP) en un periodo de 100 años (Ritchie & Roser, 2020).

Se estima que a nivel global los tres mayores gases de efecto invernadero emitidos por esta industria son el CH₄, el CO₂ y el N₂O. Variaciones generales en las cantidades de GEI emitidos

por estos animales dependen de aspectos como región, prácticas de manejo, calidad de la alimentación, salud y genética del animal (Opio *et al.*, 2013). No obstante, se ha establecido que a nivel global el gas más emitido por la industria ganadera es el metano producido en la fermentación entérica (Opio *et al.*, 2013).

De acuerdo con el Segundo Informe Bienal de Actualización ante la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC) del año 2018, las emisiones de México en el 2015 fueron de 699,564.28 Gigagramos de dióxido de carbono equivalente (Gg de CO₂e), sin considerar a los sumideros de CO₂ (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales & Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, 2018). De esta cantidad, el sector de la Agricultura contribuyó con el 15% (102,059.5 Gg de CO₂e) de las emisiones totales del país, de las que el 10.1% (70,567.6 Gg de CO₂e) fueron generadas por la ganadería. Para esta última, los GEI contabilizados fueron los generados en la fermentación entérica y en la gestión del estiércol (sin considerar las emisiones por la producción de piensos), que aportaron el 7.64% (53442.72 Gg de CO₂e) y el 2.45% (17,124.88 Gg de CO₂e) respectivamente. En la gestión del estiércol el 1.8% (12,688.80 Gg de CO₂e) correspondió al CH₄ y el 0.6% al óxido nitroso (4,436.08 Gg de CO₂e) y en cuanto a la fermentación entérica la totalidad correspondió al metano (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales & Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, 2018) (**Figura 1**).

FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA DIGESTIVO Y METANOGENÉSIS RUMINAL

Los animales rumiantes presentan características morfológicas y fisiológicas digestivas que los distinguen de otro tipo de

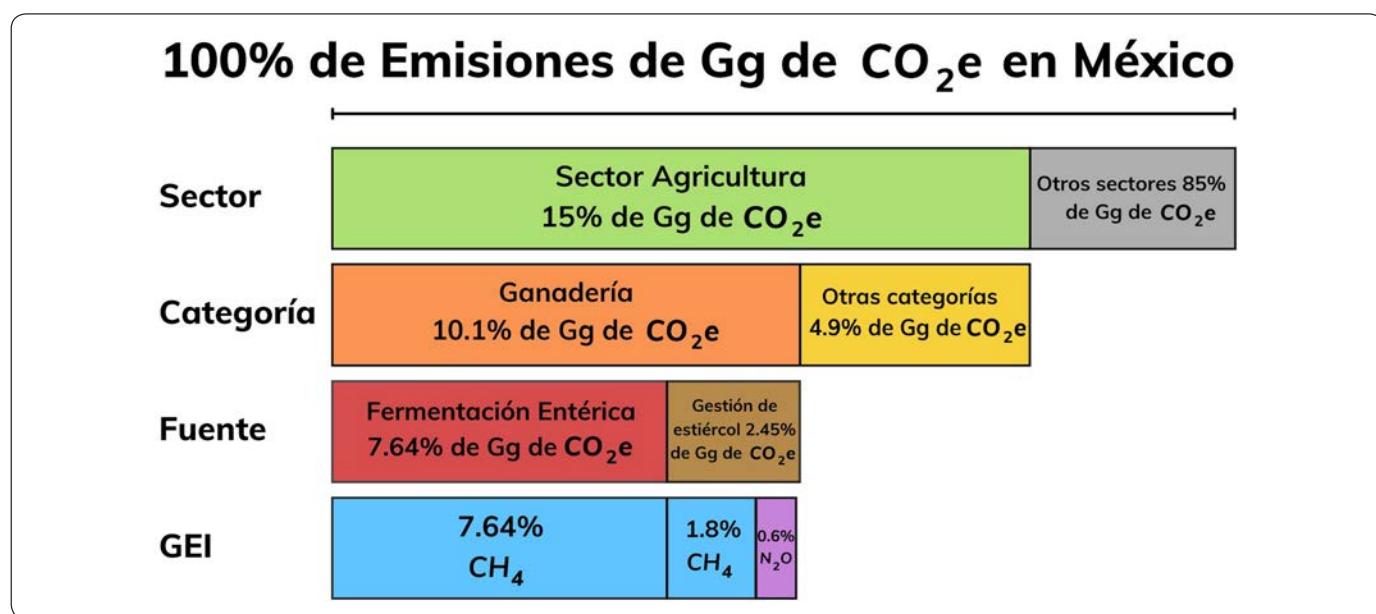


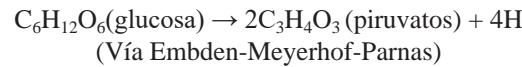
Figura 1. Porcentaje de emisiones de Gg de CO₂e totales en México, modificado de Ritchie & Roser (2020).

animales; la degradación de los alimentos que consumen se realiza en sus órganos localizados antes del duodeno (García, 2016). El funcionamiento digestivo de estos animales se lleva a cabo en dos etapas: el **consumo de alimento** y la **rumia**. Esta última etapa permite hacer un mejor aprovechamiento de los carbohidratos estructurales como la celulosa, hemicelulosa y pectina de las plantas consumidas (Del Rosario, 1999). El alimento se desplaza por el esófago hasta llegar al rumen (Parish, Rivera & Bolan, 2017), posteriormente, el rumiante regurgita el alimento hasta la boca para realizar el proceso de masticación, regresar el alimento al rumen y se lleva a cabo la digestión. Cuando el alimento regresa al rumen, este es fermentado y descompuesto, facilitando el aprovechamiento del alimento vegetal consumido por estos animales (Parish *et al.*, 2017).

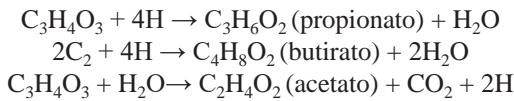
El estómago de un rumiante adulto puede llegar a ocupar el 75% de la cavidad abdominal representando el 30% de su peso vivo. Este se divide en cuatro cavidades, abomaso, omaso, retículo y rumen (García, 2016). Estos últimos tres son considerados como proventrículos debido a que están cubiertos por un epitelio queratinizado, mientras que el abomaso es conocido como “estómago verdadero”, ya que está cubierto por una membrana mucosa glandular (Giuliodori, Mattioli, Picco & Relling, 2013). El abomaso recibe compuestos de partículas no-fermentadas de alimentos, secreta enzimas digestivas y ácidos fuertes (Pérez & Sirias, 2007). En el omaso se separa el material sólido captado del contenido ruminal, permitiendo el reciclaje de agua y minerales que retornan al rumen y se absorben los residuos de ácidos grasos que hayan logrado pasar a su interior (Pérez & Sirias, 2007). El retículo tiene la función de movilizar el alimento digerido hacia el rumen en la regurgitación del bolo alimenticio después de la rumia, la cual inicia por el contacto del alimento grueso con los receptores nerviosos de la pared ruminal (Giuliodori *et al.*, 2013). El rumen tiene la capacidad de funcionar como cámara de fermentación almacenando entre 180 y 225 litros de bolo alimenticio, internamente se encuentra dividido en saco dorsal y ventral, ambos funcionan simultáneamente para humedecer el bolo alimenticio con la microbiota del líquido ruminal y descomponerlo (Pérez & Sirias, 2007), además es el principal lugar de asimilación de los ácidos grasos volátiles (AGV) que son su principal fuente de energía.

Una vez que el bolo alimenticio se encuentra en el rumen, la degradación anaeróbica de la biomasa vegetal se lleva a cabo en tres pasos clave: (I) degradación de los polisacáridos vegetales complejos; (II) fermentación de los carbohidratos a AGV y (III) metanogénesis (Söllinger *et al.*, 2018). En el rumen, esta conversión del material alimenticio a CH_4 involucra las actividades integradas de diferentes especies microbianas que incluyen bacterias, arqueas, hongos y protozoarios, el paso final se lleva a cabo por estos microorganismos metanogénicos (Boadi, Benchaar, Chiquette & Massé, 2011).

Las bacterias, protozoos y hongos descomponen el bolo alimenticio hidrolizando proteínas y convirtiendo la celulosa, el almidón y otros nutrientes ingeridos en aminoácidos y azúcares como la glucosa (Boadi *et al.*, 2011). La fermentación de la glucosa es un proceso oxidativo que ocurre en la vía Embden-Meyerhof-Parnas bajo condiciones anaerobias (Moss, Jouany & Newbold, 2000):



En este paso, los microorganismos fermentan a los carbohidratos produciendo hidrógeno (H^+) como producto final, que resulta perjudicial, ya que es un proceso desfavorable para la fermentación desde el punto de vista termodinámico, además dificulta la regeneración de NAD^+ a partir del cofactor reducido NADH , por estas razones es necesario eliminarlo (Castillo-González, Burrola-Barraza, Domínguez-Viveros & Chávez-Martínez, 2014). Para esto, el H^+ puede ser utilizado por otras bacterias presentes en el ecosistema microbiano para la formación de AGV, H_2 y CO_2 como productos finales (Parish *et al.*, 2017):



Los AGV son absorbidos como nutrientes por el animal huésped, mientras que el H_2 y el CO_2 son utilizados en el rumen por microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea* generando CH_4 , que es expulsado al exterior por el animal (Parish *et al.*, 2017): (**Figura 2**).

Durante este proceso, los metanógenos ruminales utilizan principalmente el H_2 para reducir el CO_2 a CH_4 , mediante una serie de reacciones, donde el CO_2 es utilizado como fuente de carbono y el H_2 como el principal donador de electrones (Ramírez, Posada Ochoa & Noguera, 2014) (**Figura 3**).

Metanogénesis:



Para el rumiante es más eficiente energéticamente la vía del propionato, ya que a diferencia del acetato y el butirato, el propionato sirve como una vía competitiva para el uso del H_2 y no promueve la formación del metano (Castillo, Abuelo & Hernández, 2016). Sin embargo, la metanogénesis es la vía más utilizada y la manera más sencilla de eliminar el hidrógeno (Moss *et al.*, 2000).

Aunque la mayor parte del CH_4 que se sintetiza es producto de la reducción que se da a partir de H_2 y CO_2 , esta reducción también puede obtenerse mediante la oxidación del formiato,

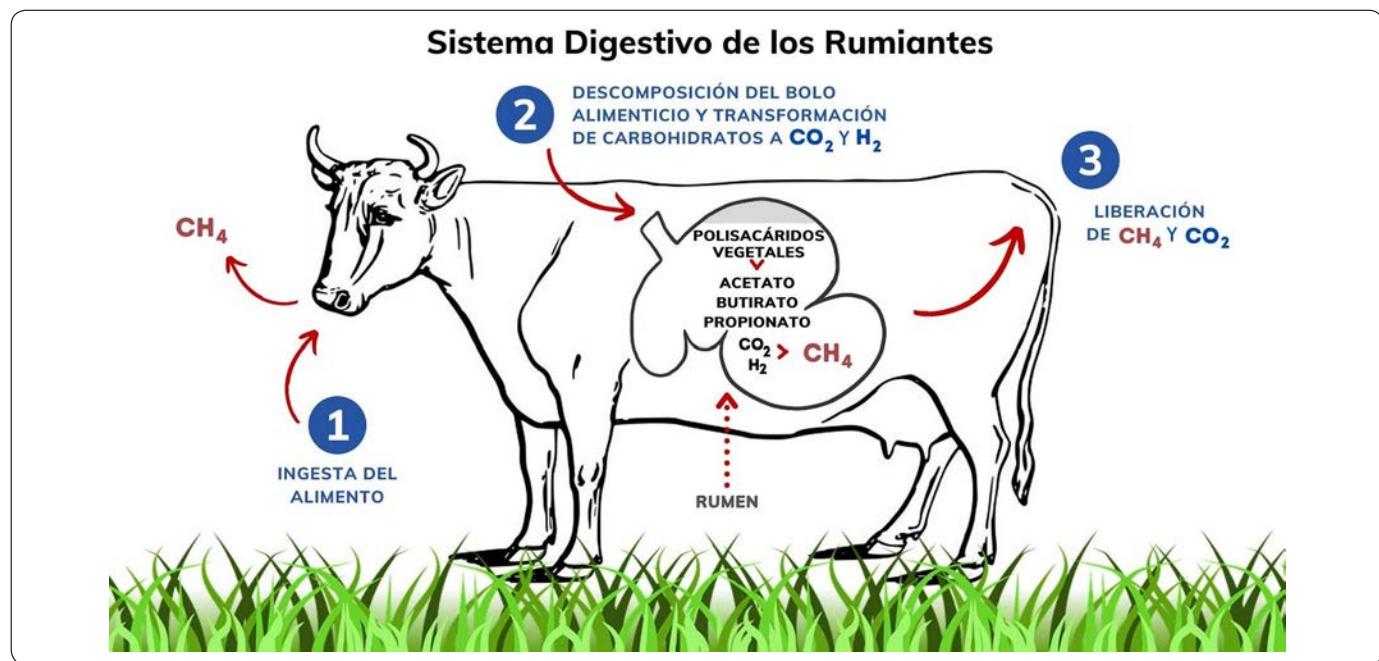


Figura 2. Sistema digestivo de los animales rumiantes, modificado de Duin *et al.* (2016).

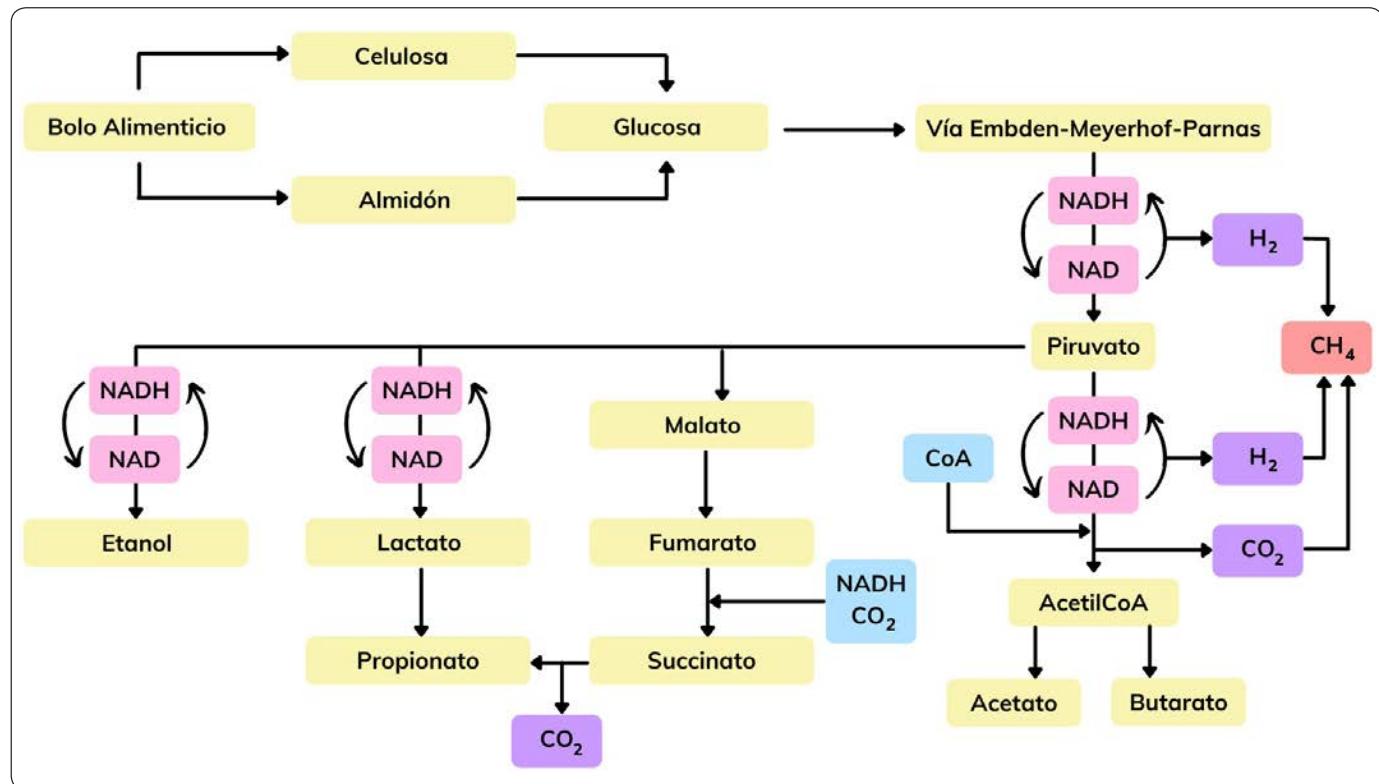


Figura 3. Vías metabólicas de la metanogénesis, modificado de Ramírez *et al.* (2014).

metanol, las metilaminas o el acetato (Sosa, Galindo & Bocourt, 2007), debido a que los metanógenos son capaces de utilizar diferentes sustratos y pueden ser clasificados en tres grupos: hidrogenotróficos, acetoclásticos y metilotróficos (Lyu, Shao, Akinyemi & Whitman, 2018).

Actualmente, los estudios del microbioma del rumen se encuentran a la vanguardia de la investigación agrícola animal, debido a la evidencia reciente que vincula la diversidad de la población con los rasgos fisiológicos del animal (Mizrahi & Jami, 2018).

METASECUENCIACIÓN: ¿CUÁLES SON LOS MICROORGANISMOS PRESENTES?

Análisis y metodología general de la metasecuenciación

En años recientes, el desarrollo de las tecnologías cultivo-independientes han permitido un avance para describir y comprender la existencia o interacción de diversos microorganismos en los ecosistemas microbianos (Shakya, Lo & Chain, 2019). Entre estas alternativas moleculares cultivo-independientes se encuentra la identificación de especies basada en la secuenciación del DNA o “*barcoding*”, que se ha diseñado utilizando marcadores moleculares como los mitocondriales y nucleares, entre ellos el 16S rDNA/rRNA para las bacterias y las arqueas, el 18S rDNA/rRNA para los protozoos y el espaciador intergénico transcripto (ITS) para los hongos (Paz, González & Crawford, 2011). La secuenciación consiste en la determinación del orden de los nucleótidos que componen un fragmento del DNA o del RNA (Pacheco-Arjona & Sandoval-Castro, 2018). Este sistema ha permitido clasificar grupos de microorganismos mediante estos genes taxonómicamente informativos, en sus inicios estos marcadores moleculares eran secuenciados por el método de Sanger, que solo permitía identificar una especie a la vez, sin embargo, debido al avance de las técnicas de secuenciación ahora es posible identificar varias al mismo tiempo en muestras de alta diversidad microbiana, a menudo llamada metasecuenciación o “*metabarcoding*” (Pavan-Kumar, Babu & Lakra, 2015).

La técnica de metasecuenciación identifica múltiples especies con DNA extraído de una muestra ambiental, se realiza utilizando PCR con cebadores o *primers* universales específicos para la amplificación de regiones específicas en los genes, posteriormente estos fragmentos son secuenciados con tecnologías de alto rendimiento o de nueva generación (NGS). Entre estas técnicas de secuenciación, se encuentran: la pirosecuenciación 454 (454 Life Sciences), la secuenciación por síntesis (Illumina) y la secuenciación por ion semiconductor (Ion Torrent) (Reuter, Spacek & Snyder, 2015), por mencionar algunas.

Las lecturas o secuencias del DNA resultantes pasan por un control de calidad y una posterior agrupación en unidades taxonómicas operativas (OTUs, por sus siglas en inglés) con base en la similitud de su código genético (típicamente 97%)

(Ruppert, Kline & Rahman, 2019). La asignación de OTUs a especies o taxones se lleva a cabo mediante la comparación con bases de datos de referencia públicas. Las más utilizadas para su identificación en el rumen han sido NCBI, Greengenes, SILVA y RDP (Li *et al.*, 2018). Además, para estimar la comunidad de arqueas en el rumen se ha creado una base de datos específica llamada RIM-DB (Ruminal and Intestinal Methanogen Database) desarrollada por Janssen & Kirs (2008). Las herramientas bioinformáticas más utilizadas para realizar el análisis metasecuencial son: QIIME2 (dada2), MG-RAST, Galaxy y OBITools (Bikel *et al.*, 2015).

Microbioma central del rumen

El estudio más completo hasta ahora utilizando la metasecuenciación, ha sido el proyecto Global Rumen Census, que ha demostrado la existencia en el mundo de un microbioma central (*core microbiome*) similar en la comunidad ruminal, sin importar la dieta o la especie del huésped. Los resultados fueron obtenidos tras el análisis de 742 muestras de la microbiota de 32 distintas especies de rumiantes y camélidos, en 35 países (Henderson *et al.*, 2015).

En este estudio, las 7 bacterias más abundantes pertenecen a los géneros *Prevotella*, *Butyrivibrio* y *Ruminococcus*, así como especies no clasificadas incluidas en las familias Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Bacteroidales y Clostridiales, por esto se le considera el núcleo bacterial microbiano (Creevey, Kelly, Henderson & Leahy, 2014). Otros estudios también han demostrado, una gran dominancia del género *Prevotella* por encima de la comunidad bacteriana ruminal (Jami, Israel, Kotser & Mizrahi, 2013; Mizrahi & Jami, 2018; Stevenson & Weimer, 2007), a este género se le atribuyen funciones como la producción de enzimas degradadoras del almidón y la hemicelulosa en la pared celular de las plantas y la actividad proteolítica (Danielsson *et al.*, 2017). En otro estudio, se analizó la comunidad bacteriana del rumen de bovinos desde el nacimiento hasta la edad adulta y se encontró que el género *Ruminococcus* estaba presente tanto en animales de corta edad como en el rumen funcional maduro, se identificó a este género como de gran importancia para el correcto funcionamiento del rumen (Jami *et al.*, 2013).

Por otro lado, la mayoría de las arqueas presentes en el rumen fueron identificadas como metanógenas, con predominancia del género *Methanobrevibacter* spp. (Morgavi, Forano, Martin & Newbold, 2010). Las dos especies más abundantes identificadas en el Global Rumen Census son *Methanobrevibacter gottschalkii* y *Methanobrevibacter ruminantium*, representando el 74% de las arqueas totales (Henderson *et al.*, 2015). El 77.7% de las arqueas fueron metanogénicas hidrogenotróficas y el 22.1% capaces de usar hidrógeno o grupos metilo derivados del metanol o metilaminas (Henderson *et al.*, 2015). Los metanógenos capaces de usar acetato fueron muy pocos, menos del 0.015%, pertenecientes a los géneros *Methanosaeta* y *Methanosarcina*,

este último capaz de utilizar también otros sustratos como el metanol, las metilaminas y en ocasiones el H₂ y el CO₂ (Maeder *et al.*, 2006).

La tecnología de secuenciación de ampliación de regiones específicas en los genes por metasecuenciación, es útil para identificar a los microorganismos (Petrosino, Highlander, Luna, Gibbs & Versalovic, 2009). Así mismo, ha otorgado un panorama amplio y un comienzo en la comprensión del microbioma ruminal, pero aún no ha sido capaz de representar con precisión la dinámica microbiana del microbioma de los rumiantes y de proponer estrategias para el aumento de su producción y la disminución de emisiones del metano generado. Además, este análisis puede estar sesgado por la selección del cebador de la PCR, por las condiciones del ciclo de amplificación y está muy limitado para encontrar nuevos filotipos debido a que los cebadores se diseñan de acuerdo con secuencias ya conocidas (Li *et al.*, 2018). Asimismo, la identificación de OTUs permitiría inferir sobre el fenotipo funcional cuando se tienen valores muy altos de similitud con los genomas de referencia, sin embargo, no se podría

llegar a un resultado certero, ya que las diferentes cepas pueden tener cambios dramáticos en cuanto a la función de sus capacidades (Denman, Martínez-Fernández, Shinkai, Mitsumori & McSweeney, 2015). Otras formas de aplicación de la biología molecular son a través de la metagenómica y la metatranscriptómica prometedoras para avanzar en la comprensión del microbioma ruminal.

METAGENÓMICA Y METATRANSRIPTÓMICA PARA LA COMPRENSIÓN DEL MICROBIOMA RUMINAL

La metagenómica y la metatranscriptómica son útiles para la evaluación taxonómica y funcional, basada en el DNA (especies y genes) y en el RNA (metabolismo activo), respectivamente, del microbioma de un ecosistema (Suenaga, 2011), ya que proporcionan información más detallada para evaluar la dinámica de una comunidad microbiana y contestar las siguientes preguntas: ‘¿Quién está ahí?’, ‘¿en qué cantidad?’ y ‘¿qué están haciendo?’. Con la información obtenida se relacionan la composición microbiana, la diversidad de genes, las enzimas y su funcionamiento, con rasgos fisiológicos, como la eficiencia energética y la emisión del metano por el animal.

Tabla I. Herramientas bioinformáticas para el análisis metagenómico y metatranscriptómico

Acciones	Programas	Páginas web
Control de calidad	Trimmomatic TopHat2 FastQC	http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmmomatic https://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/
Ensamblaje basado en referencia	AMOS MIRA GEMmapper	http://amos.sourceforge.net/wiki/index.php/AMOS https://sourceforge.net/p/mira-assembler/wiki/Home/ https://github.com/smarco/gem3-mapper
Ensamblaje <i>de novo</i>	Meta-Velvet SOAPdenovo2 IDBA-UD MEGAHIT IDBA-MTP Trinity	http://metavelvet.dna.bio.keio.ac.jp/ https://github.com/aquaskyline/SOAPdenovo2 https://i.cs.hku.hk/~alse/hkubrg/projects/idba_ud/index.html https://github.com/voutcn/megahit https://i.cs.hku.hk/~alse/hkubrg/projects/idba_mt/index.html https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki
Predicción de genes	FragGeneScan MetaGeneMark MetaGeneAnnotator	https://sourceforge.net/projects/fraggenescan/ https://digitalinsights.qiagen.com/plugins/metagenemark/ http://metagene.nig.ac.jp/
Anotación funcional	USEARCH BLAST DIAMOND MG-RAST HUMAnN MEGAN	https://www.drive5.com/usearch/ https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi https://github.com/bbuchfink/diamond https://www.mg-rast.org/ https://github.com/biobakery/humann https://bio.tools/megan
Asignación taxonómica	Greengenes Kraken2	http://greengenes.secondgenome.com/ https://ccb.jhu.edu/software/kraken2/
Mapeo a vías metabólicas	Minipath iPath	https://omics.informatics.indiana.edu/MinPath/ https://pathways.embl.de/

Con estos dos métodos, se obtiene una cantidad masiva de datos biológicos, por lo que la bioinformática y el análisis computacional son vitales para la metagenómica y la metatranscriptómica (por *shotgun*), algunas de las que se mencionan en este artículo aparecen en la (Tabla I).

Metagenómica

La metagenómica es el análisis de los genomas contenidos en una muestra ambiental, tiene la capacidad de realizar vínculos entre microorganismos cultivables y no cultivables de la comunidad microbiana (ej. microbiota del rumen), de un huésped (ej. rumiante) y el fenotipo de su huésped (ej. emisión de metano por rumiante) (Thomas, Gilbert & Meyer, 2012). Se divide en dos tipos: (i) la **metagenómica dirigida (metasecuenciación)** y (ii) la **metagenómica de secuenciación masiva o de escopeta**, conocida también como “Shotgun Metagenomic Sequencing” (SMS) (Cortés-López, Ordoñez & Viveros, 2020). En sus inicios la metagenómica se basó en el análisis dirigido (i), que entre sus técnicas cuenta con la clonación del DNA en un vector (ej. fagos, fósvidos y cósmidos) (Suenaga, 2015).

El segundo tipo (ii) se ha desarrollado a partir de la reciente reducción de costos y al avance de técnicas de secuenciación masiva o de nueva generación (NGS). La metagenómica de secuenciación masiva o de escopeta *shotgun* se considera la más integral y completa para la evaluación de un microbioma, pues permite la secuenciación aleatoria de todo su contenido genómico (Bernal, 2015). En lugar de amplificar un marcador molecular o dirigir un *locus* genómico específico, todo el DNA se corta en pequeños fragmentos para secuenciarlos de forma independiente, con la finalidad de ensamblar genomas completos (Sharpton, 2014). Es decir, se captura todo el repertorio genómico de los microorganismos cultivables y no cultivables, se perfilan genes y se reconstruyen genomas microbianos individuales, para asociarlos con su perfil funcional y vías metabólicas (Petrosino *et al.*, 2009).

Metatranscriptómica

La metatranscriptómica permite evaluar la actividad funcional del microbioma en conjunto y hacer aproximaciones del fenotipo a partir de los transcriptos expresados (Shakya *et al.*, 2019). Es una ciencia que implica un análisis comparativo de transcriptomas y ayuda a comprender la respuesta de las comunidades microbianas hacia un entorno cambiante (Kaul *et al.*, 2016). El transcriptoma es el conjunto de todas las moléculas de RNA presentes en una célula o grupos de células en un punto de tiempo dado, es la parte activa de un microbioma, el RNA varía con el tiempo y de célula a célula, en contraste con el DNA que es fijo en el tiempo y en todas las células de un organismo. La metatranscriptómica proporciona información de los microorganismos activos y registra las transcripciones expresadas de una comunidad microbiana en un punto en el tiempo y bajo condiciones ambientales específicas (Aguiar-Pulido *et al.*, 2016), esto es sumamente

relevante, ya que las transcripciones expresadas representan una aproximación del fenotipo real. En contraste, la metagenómica solo distingue a los miembros que están presentes, sin explicar si estos realmente están contribuyendo al funcionamiento del ecosistema (Shakya *et al.*, 2019). La metatranscriptómica *shotgun* se basa en la técnica de secuenciación RNA-Seq, que por lo regular utiliza bibliotecas de cDNA para llevarse a cabo, comúnmente se realiza utilizando Pirosecuenciación 454, o más recientemente a partir de Illumina (Toseland, Moxon, Mock & Moulton, 2014). Aunque la tecnología RNA-Seq continúa implementando mejoras, actualmente presenta muchas ventajas sobre otros métodos de análisis de RNA, puesto que no se limita al estudio de secuencias ya conocidas, sino que permite identificar nuevas, y con ello encontrar genes de especial interés para las distintas áreas de la biotecnología (Wang, Gerstein & Snyder, 2009).

En esta revisión se muestra un panorama general del flujo de trabajo de los proyectos que utilizan la metagenómica y la metatranscriptómica, para el análisis del microbioma del rumen (Figura 4).

FLUJO DE TRABAJO GENERAL PARA EL ANÁLISIS DEL MICROBIOMA

Extracción del DNA y su secuenciación

Para el análisis a través de la **metagenómica shotgun** se aborda como primer paso la extracción del DNA, es deseable obtener la mayor cantidad y calidad para una mayor representación de la muestra ambiental y evitar un sesgo que afecte el resultado final; para la extracción de muestras del DNA ruminal se encuentran disponibles diversos métodos (Henderson *et al.*, 2013; Villegas-Rivera *et al.*, 2013; Yu & Morrison, 2004). El DNA extraído se fragmenta en pequeños pedazos que se secuencian individualmente, como resultado se obtienen lecturas de secuencia; la preparación de librerías metagenómicas y la longitud de las lecturas varía de acuerdo con la plataforma de secuenciación utilizada (NGS), de éstas las más aplicadas en estudios metagenómicos del rumen han sido 454 Roche e Illumina. Es deseable obtener lecturas largas, ya que se facilita el ensamblaje y la posterior interpretación de los datos (Thomas *et al.*, 2012).

De la misma forma, la secuenciación **metatranscriptómica shotgun**, comienza con la extracción del RNA de alta calidad, siguiendo protocolos disponibles (Wang *et al.*, 2011). Para este segundo análisis, la extracción del RNA comienza con la evaluación de la calidad de los datos crudos, que incluye separar los fragmentos del RNA dependiendo de su naturaleza (Shakya *et al.*, 2019): los RNAs mensajeros (mRNA) representan los patrones de expresión génica entre las especies, mientras que los RNAs ribosomales (rRNA) que representan aproximadamente el 90% del total del RNA permiten conocer la composición de la comunidad microbiana y son útiles para los análisis filogenéticos (Kopylova, Noé & Touzet, 2012). Trabajar con el RNA total

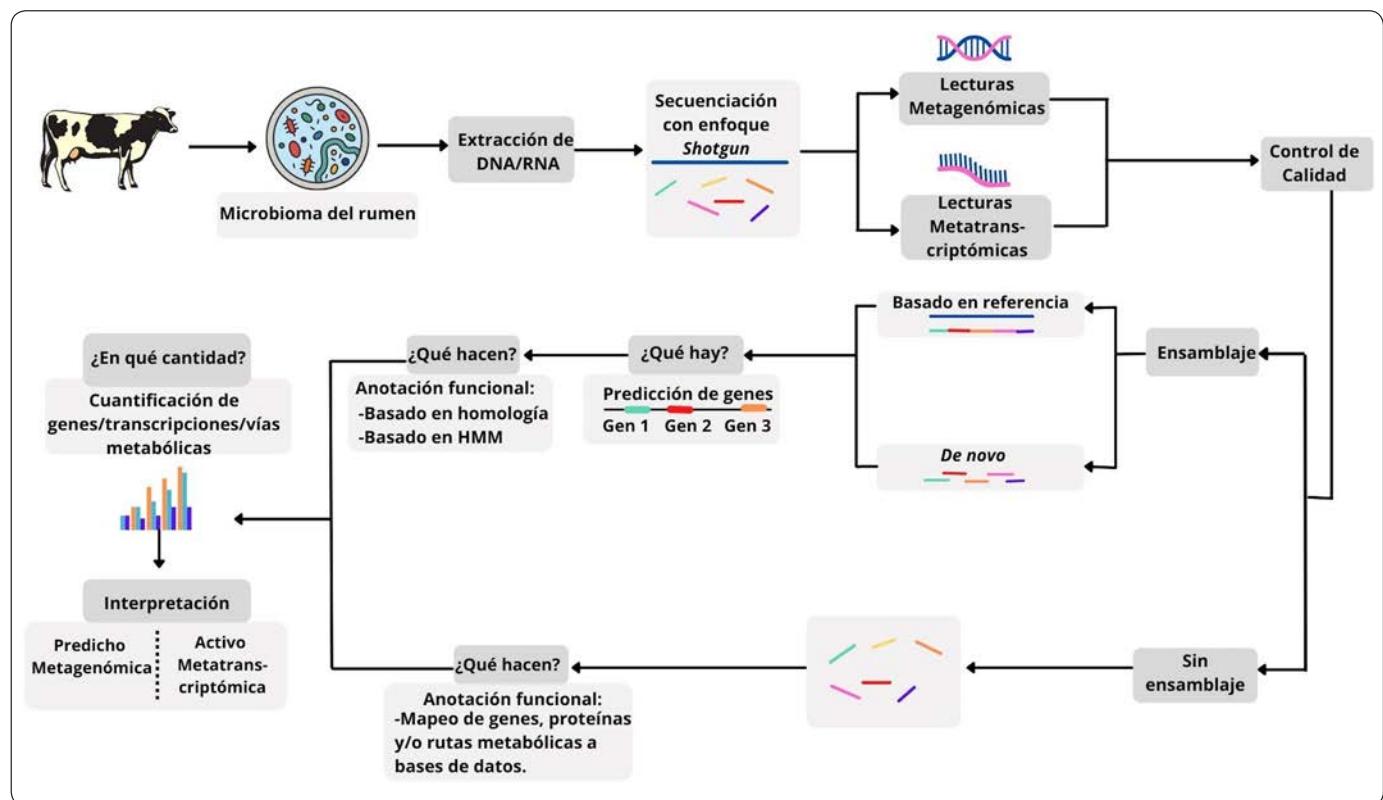


Figura 4. Flujo de trabajo general del estudio del microbioma ruminal mediante la metagenómica y/o la metatranscriptómica, modificado de McCann *et al.* (2014) y Choi *et al.* (2015).

de la muestra hace posible generar perfiles composicionales y funcionales utilizando los mismos datos metatranscriptómicos. No obstante, generalmente los rRNAs son de menor interés, por lo que son removidos antes de la secuenciación mediante procedimientos moleculares (Hrdlickova, Tolue & Tian, 2017). Además, la remoción de los rRNAs y el enriquecimiento de los RNAs mensajeros otorga información funcional más relevante (Li *et al.*, 2018).

Control de calidad y ensamblaje de secuencias del DNA microbianas

Una vez obtenidas las secuencias del DNA o del RNA, deben pasar por un control de calidad que filtre secuencias residuales artificiales, bases de baja calidad, así como las secuencias del huésped (rumiante), pues éstas interfieren en el posterior ensamblaje de las secuencias microbianas y conducen a conclusiones erróneas (Li *et al.*, 2018). Para evitar estas interferencias, se utilizan los programas Trimmomatic y TopHat2 (Bikel *et al.*, 2015). Posteriormente, se lleva a cabo el ensamblaje de las secuencias cortas resultantes para obtener fragmentos más largos del DNA (*contigs*) o RNA y que reconstruyan la secuencia original antes de ser fragmentada (Choi, Lee & Sul, 2015). Existen dos tipos de ensamblaje, el ensamblaje basado en referencia y el ensamblaje *de novo*.

En la metagenómica, para el ensamblaje **basado en referencia**, las lecturas obtenidas se mapean a genomas de referencia localizados en bases de datos (ej. Joint Genome Institute, SILVA, RDP) para identificar taxones microbianos y detectar genes de interés (Hernández, Quijada, Rodríguez-Lázaro & Eiros, 2020); este ensamblaje se realiza con las herramientas bioinformáticas AMOS, MIRAY GEMmapper. Este método está limitado para las comunidades microbianas que no se encuentren bien caracterizadas en bases de datos y no es útil para encontrar nuevos microorganismos y genes (Jovel *et al.*, 2016). Debido a lo anterior, la segunda estrategia de ensamblaje *de novo* es la más utilizada y recomendada para comunidades microbianas como las del rumen que son complejas y poco caracterizadas.

La estrategia *de novo* ensambla lecturas de secuencia sin utilizar información genómica de referencia y encuentra nuevos genomas y genes. Está basada en las gráficas de Bruijn y en el montaje de diseño superpuesto [Overlap Layout Consensus (OLC)] para reconstruir *contigs* (Bikel *et al.*, 2015). Las desventajas del ensamblaje *de novo* es que necesita una mayor capacidad computacional y puede generar ambigüedades; las herramientas bioinformáticas para este ensamblaje incluyen Meta-Velvet, SOAPdenovo2 y IDBA-UD (Hernández *et al.*, 2020).

De la misma manera para la metatranscriptómica, posterior al control de calidad, se lleva a cabo el ensamblaje a partir de una referencia o con ensamblaje *de novo*. Para el ensamblaje *de novo* se pueden utilizar las plataformas de ensamblaje metagenómico, IDBA-UD o MEGAHIT, no obstante, podrían existir algunas inconsistencias, por lo que se han desarrollado nuevas plataformas y específicamente para la metatranscriptómica, IDBA-MT, IDBA-MTP, Trinity y Transcript Assembly Graph (TAG) (Shakya *et al.*, 2019).

Interpretación funcional: ¿Qué hay?, ¿qué hacen? y ¿en qué cantidad?

Una vez ensambladas las secuencias, se realiza la interpretación de los datos obtenidos, los genomas y transcriptomas de los organismos presentes en el microbioma codifican las funciones colectivas que realizan sobre la fisiología de la comunidad microbiana, por ello la diversidad funcional puede ser cuantificada mediante la anotación de secuencias metagenómicas y metatranscriptómicas con funciones (Sharpton, 2014).

En la metagenómica, esto implica, como primer paso, identificar las lecturas que contengan secuencias de genes codificantes y utilizar las siguientes herramientas bioinformáticas: FragGeneScan, MetaGeneMark y MetaGeneAnnotator (Thomas *et al.*, 2012). Como segundo paso, las secuencias que fueron identificadas como genes o elementos genómicos relevantes se comparan con bases de datos de genes, proteínas, o rutas metabólicas cuyas funciones se infieren de acuerdo con su similitud (Abubucker *et al.*, 2012). Este segundo paso, se lleva a cabo a través de la búsqueda de una homología basada en secuencias de nucleótidos o de proteínas traducidas, utilizando los softwares USEARCH, BLAST y DIAMOND; para identificar secuencias con baja identidad a referencias se utilizan programas basados en Hidden Markov Models (HMM), (Li *et al.*, 2018). Las bases de datos más aceptadas para la anotación funcional son KEGG, eggNOG, COG/KOG, SEED y UniProt.

Los datos que resulten de este análisis son evaluados mediante los recuentos de las lecturas asignadas a taxones o funciones y son utilizados para describir las funciones potenciales, abundancia y expresión relativa en el metagenoma (Nayfach & Pollard, 2016). El objetivo final del análisis metagenómico es identificar cómo diversos tratamientos (ej. dieta del rumiante) influyen en la composición funcional de una comunidad microbiana y revela aquellas funciones que se asocian con variables ambientales o fisiológicas específicas del huésped (Loft *et al.*, 2012).

En el análisis metatranscriptómico, después del ensamblaje se pueden o no omitir las predicciones de los genes para la posterior anotación funcional, de acuerdo con el flujo de trabajo y los objetivos específicos del estudio. Para la anotación funcional, las secuencias del RNA obtenidas se comparan directamente con las bases de datos (ej. KEGG, eggNOG y UniProt). Una vez realizada la anotación, se lleva a cabo el análisis de las

vías metabólicas mediante el mapeo de funciones enzimáticas utilizando las herramientas bioinformáticas Minipath e iPath (Shakya *et al.*, 2019; Yamada, Letunic, Okuda, Kanehisa & Bork, 2011; Ye & Doak, 2009). Todo el análisis metatranscriptómico finaliza con la cuantificación de la expresión y la abundancia relativa, los valores resultantes proporcionan información para comprender qué genes y vías metabólicas son importantes para un fenotipo en particular (ej. emisión de metano), mediante la comparación de la expresión genética relativa entre condiciones específicas y un tiempo dado (Aguiar-Pulido *et al.*, 2016).

También existe un enfoque del análisis *sin ensamblaje*, este depende en gran medida de la correcta y completa caracterización de la comunidad microbiana en las bases de datos, pues las lecturas de secuencia después de pasar por el control de calidad se alinean a genomas de referencia para su directa anotación funcional (Li *et al.*, 2018). Este análisis se lleva a cabo utilizando los softwares MG-RAST, HUMAnN, Kraken2 y MEGAN. Para los estudios en el rumen este análisis es difícilmente factible, ya que las bases de datos no cuentan con la información genómica del funcionamiento de las especies y los genes presentes en el microbioma. No obstante, el proyecto Hungate1000, ha reunido una colección de genomas de referencia de todas las especies de arqueas y bacterias hasta ahora encontradas en la microbiota ruminal. Este catálogo engloba 501 genomas de referencia (480 bacterias y 21 arqueas), y ha logrado identificar el 75% de los taxones presentes hasta el nivel de género y asignar vías metabólicas a microorganismos individuales involucrados en el funcionamiento del rumen (Seshadri *et al.*, 2018).

Estos proyectos tienen como objetivo desarrollar tecnologías de mitigación del metano y encontrar un equilibrio entre la producción de alimentos y emisiones de gases de efecto invernadero (RMG Network - Hungate1000, 2016). Los datos del proyecto Hungate1000 se encuentran actualmente disponibles en el portal del Joint Genome Institute <https://img.jgi.doe.gov> y facilitan los análisis metagenómicos y metatranscriptómicos.

El combinar ambos métodos ómicos en estudios integradores, ayuda a obtener mejores resultados y evita que los análisis metagenómicos sobreestimen o subestimen la relevancia funcional de la codificación de los genes en metagenomas, distingue entre la abundancia de genes a nivel metagenómico y a nivel metatranscriptómico (Bikel *et al.*, 2015). Los hallazgos encontrados en diferentes estudios realizados desde lo metagenómico y metatranscriptómico para la comprensión del microbioma ruminal se resumen en la **Tabla II**.

CONCLUSIONES

Las ciencias ómicas otorgan información biológica detallada acerca de las interacciones que se desempeñan en una comunidad microbiana. Gracias al uso de la metagenómica y la metatranscriptómica se han llevado a cabo investigaciones que han encontrado la relación entre la estructura y función del

Tabla II. Estudios metagenómicos y metatranscriptómicos del microbioma ruminal.

Título	Enfoque	Hallazgos principales	Herramientas de secuenciación	Referencias
The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle	Metagenómica	El ganado vacuno con menor emisión de metano presentó mayor abundancia de <i>Succinivibrionaceae</i> . La abundancia de genes de arqueas se correlaciona con el nivel de emisiones del metano.	Illumina HiSeq	(Wallace et al., 2015)
Investigating the effect of two methane-mitigating diets on the rumen microbiome using massively parallel sequencing	Metagenómica	La dieta tiene un efecto significativo en los perfiles microbianos del rumen y de las heces fecales, a partir de esto es posible identificar patrones de la población microbiana asociados a bajas emisiones de metano.	Illumina HiSeq2000	(Ross, Moate, Marett, Cocks & Hayes, 2013)
Methane yield phenotypes linked to differential gene expression in the sheep rumen microbiome	Metagenómica y metatranscriptómica	En grupos de ovejas tanto de alta como de baja emisión de metano, se observó una abundancia similar de los genes involucrados en la vía de la metanogénesis. Sin embargo, hubo un aumento significativo en la transcripción de estos en el grupo de alta emisión.	Illumina HiSeq2000	(Shi et al., 2014)
Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal the breed effect on the rumen microbiome and its associations with feed efficiency in beef cattle	Metagenómica y metatranscriptómica	La actividad del microbioma ruminal se ve mayormente influenciada por factores ambientales, mientras que el factor genético influye a un menor nivel.	Illumina HiSeq2000	(Li, Hitch, Chen, Creevey & Guan, 2019)
Effect of dietary forage sources on rumen microbiota, rumen fermentation and biogenic amines in dairy cows	Metatranscriptómica	En las vacas, una dieta con alta proporción de heno alfalfa beneficia la producción de leche y mantiene una microbiota ruminal sana que atribuye a una mayor degradación de la materia orgánica en el rumen equilibrando proteínas y carbohidratos para un crecimiento microbiano ruminal óptimo.	454 GS FLX	(Zhang, Zhu, Zhu, Liu & Mao, 2014)
Comparative analysis of microbial profiles in cow rumen fed with different dietary fiber by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing	Metatranscriptómica	La pirosecuenciación del gen rRNA 16S en vacas, reveló una disminución de <i>Fibrobacteraceae</i> y <i>Ruminococcaceae</i> al llevar a cabo una dieta baja en fibra.	454 GS FLX	(Thoetkiattikul et al., 2013)

Tabla II. Estudios metagenómicos y metatranscriptómicos del microbioma ruminal (*continuación*).

Título	Enfoque	Hallazgos principales	Herramientas de secuenciación	Referencias
High throughput whole rumen metagenome profiling using untargeted massively parallel sequencing	Metagenómica	Existe una mayor variación en el metagenoma del rumen entre animales que en las réplicas del mismo rumen.	Illumina GAIIx	(Ross <i>et al.</i> , 2012)
Phage-bacteria relationships and CRISPR elements revealed by a metagenomic survey of the rumen microbiome	Metagenómica	Una pirosecuenciación aleatoria de metagenomas (viromas) aislados del líquido del rumen bovino, mostró que los bacteriófagos del rumen son diversos y únicos del mismo por lo que probablemente influyen en la comunidad microbiana del rumen.	Illumina GAIIx 454 GS FLX	(Berg Miller <i>et al.</i> , 2012)
Next generation sequencing to define prokaryotic and fungal diversity in the bovine rumen	Metagenómica	Dentro del rumen, las comunidades arqueales y fúngicas son más consistentes en fracciones líquidas y sólidas en comparación con la comunidad bacteriana.	454 GS FLX	(Fouts <i>et al.</i> , 2012)
Holistic assessment of rumen microbiome dynamics through quantitative metatranscriptomics reveals multifunctional redundancy during key steps of anaerobic feed degradation	Metatranscriptómica	El aumento en las emisiones de metano tras la alimentación no se debe a cambios en la comunidad microbiana del rumen, sino a la respuesta que tiene el microbioma en los diferentes pasos de la degradación anaeróbica del alimento.	Illumina HiSeq 2500	(Söllinger <i>et al.</i> , 2018)
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	Metagenómica	Los genes de la metanogénesis (McrA y fmdB) se asociaron con las emisiones del metano, mientras que los genes de interferencia entre el microbioma del huésped (TSTA3 y FucI) se asociaron con la eficiencia de la digestión alimenticia.	Illumina HiSeq 2500	(Roehe <i>et al.</i> , 2016)
Metagenomic analysis of the rumen microbial community following inhibition of methane formation by a halogenated methane analog	Metagenómica	Al suministrar altas concentraciones de BCM a las cabras, la emisión de se redujo, las emisiones de aumentaron y la fermentación se desplazó hacia la vía de la producción de propionato de metilo.	454 GS FLX	(Denman <i>et al.</i> , 2015)

Tabla II. Estudios metagenómicos y metatranscriptómicos del microbioma ruminal (*continuación*).

Título	Enfoque	Hallazgos principales	Herramientas de secuenciación	Referencias
Metatranscriptomic Profiling Reveals Linkages between the Active Rumen Microbiome and Feed Efficiency in Beef Cattle	Metatranscriptómica	El microbioma ruminal activo es uno de los factores biológicos que pueden contribuir a las variaciones en la eficiencia alimentaria del ganado de carne. El estudio destaca la posibilidad de mejorar tanto la utilización de los nutrientes como la eficiencia de la alimentación mediante la alteración de las funciones microbianas del rumen.	Illumina HiSeq2000	(Li & Guan, 2017)
Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential	Metagenómica	El microbioma del rumen se establece antes del consumo de los alimentos sólidos, pero la ingesta de los alimentos sólidos determina la composición del microbioma.	454 GS FLX	(Rey et al., 2014)
The Rumen Metatranscriptome Landscape Reflects Dietary Adaptation and Methanogenesis in Lactating Dairy Cows	Metratranscriptómica	Los cambios inducidos por la dieta dieron como resultado una reducción de la emisión del metano. El análisis metatranscriptómico proporciona información sobre los mecanismos subyacentes clave y abre el camino a nuevos métodos racionales para reducir aún más la producción de metano de los animales rumiantes.	Illumina HiSeq 2500	(Hornung et al., 2018)

microbioma del rumen con las emisiones de metano, a fin de encontrar estrategias para mitigarlas.

Entre estas estrategias se encuentra el estudio de diferentes variables como la dieta del animal, el uso de aditivos alimenticios o probióticos, así como el efecto de factores genéticos y ambientales. Lo anterior, para determinar cómo modular estas variables, los agentes impulsores clave (ej. microorganismos y genes enzimáticos) afectan la dinámica del proceso ruminal y la relación huésped-microbioma, promoviendo vías metabólicas que incrementan o disminuyen las tasas de la metanogénesis (Choi et al., 2015). Considerando que la dieta proporciona el sustrato para el microbioma, esta variable permanecerá como un concepto fundamental para el diseño experimental y la interpretación de los datos (McCann, Wickersham & Loor, 2014).

A pesar de los avances en la comprensión del microbioma ruminal, la viabilidad, precisión y potencial de los estudios metatranscriptómicos y los metagenómicos continúan siendo limitados, ya que depende mucho de la calidad y cantidad de los datos de referencia disponibles. Actualmente sólo una pequeña

cantidad de secuencias del RNAm del microbioma ruminal pueden mapearse contra bases de datos como KEGG (Li et al., 2018), por esta razón es de suma importancia fortalecer los esfuerzos por llevar a cabo la identificación del microbioma ruminal con proyectos como el Hungate1000, y generar bases de datos de referencia que contenga las secuencias genómicas de los microorganismos presentes en el rumen.

Asimismo, las herramientas bioinformáticas continúan en desarrollo, por lo que es necesario optimizar los algoritmos, los parámetros analíticos y estadísticos que permitan obtener resultados funcionales relevantes y reducir errores de acuerdo con los objetivos específicos de cada estudio.

Teniendo en cuenta el impacto negativo que genera la industria ganadera en el medio ambiente, la metagenómica y la metatranscriptómica abren una nueva oportunidad para crear una ganadería más sostenible, reducir en gran porcentaje la contaminación ambiental provocada por ésta y al mismo tiempo mantener o incluso incrementar la productividad animal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Campus Querétaro, al Centro de Escritura de esta Institución y al profesor José Manuel Velázquez Hurtado por su apoyo en la edición de la redacción.

REFERENCIAS

Abubucker, S., Segata, N., Goll, J., Schubert, A. M., Izard, J., Cantarel, B. L., Rodriguez-Mueller, B., Zucker, J., Thiagarajan, M., Henrissat, B., White, O., Kelley, S. T., Methé, B., Schloss, P. D., Gevers, D., Mitreva, M. & Huttenhower, C. (2012). Metabolic Reconstruction for Metagenomic Data and Its Application to the Human Microbiome. *PLOS Computational Biology*, **8(6)**, e1002358. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002358>

Aguiar-Pulido, V., Huang, W., Suarez-Ulloa, V., Cickovski, T., Mathee, K. & Narasimhan, G. (2016). Metagenomics, Metatranscriptomics, and Metabolomics Approaches for Microbiome Analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **12(S1)**, 5–16. <https://doi.org/10.4137/EBO.S36436>

Berg Miller, M. E., Yeoman, C. J., Chia, N., Tringe, S. G., Angly, F. E., Edwards, R. A., Flint, H. J., Lamed, R., Bayer, E. A. & White, B. A. (2012). Phage-bacteria relationships and CRISPR elements revealed by a metagenomic survey of the rumen microbiome. *Environmental Microbiology*, **14(1)**, 207–227. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02593.x>

Bernal, M. L. (2015). La era de las ciencias ómicas. Academia de Farmacia “Reino de Aragón.” Recuperado de <https://www.academiadefarmaciacidearagon.es/docs/Documentos/Documento73.pdf>

Bikel, S., Valdez-Lara, A., Cornejo-Granados, F., Rico, K., Canizales-Quinteros, S., Soberón, X., Del Pozo-Yauner, L. & Ochoa-Leyva, A. (2015). Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: Towards a systems-level understanding of human microbiome. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **13**, 390–401. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.06.001>

Boadi, D., Benchaar, C., Chiquette, J. & Massé, D. (2011). Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Canadian Journal of Animal Science*, **84(3)**, 319–335. <https://doi.org/10.4141/A03-109>

Caballero, M., Lozano, S. & Ortega, B. (2007). Efecto invernadero, calentamiento global y cambio climático: Una perspectiva desde las ciencias de la tierra. *Revista Digital Universitaria*, **8(10)**, 2–12. <http://www.revista.unam.mx/vol.8/num10/art78/int78.htm>

Castillo, C., Abuelo, A. & Hernández, J. (9 de mayo de 2016). El desafío de la metanogénesis en bovinos. *NutriNews, La revista de nutrición animal*. Recuperado el 24 de agosto de 2020 de <https://nutricionanimal.info/el-desafio-de-la-metanogenesis-en-bovinos/>.

Castillo-González, A. R., Burrola-Barraza, M. E., Domínguez-Viveros, J. & Chávez-Martínez, A. (2014). Rumen microorganisms and fermentation. *Archivos de Medicina Veterinaria*, **46(3)**, 349–361. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000300003>

Choi, K. Y., Lee, T. K. & Sul, W. J. (2015). Metagenomic Analysis of Chicken Gut Microbiota for Improving Metabolism and Health of Chickens—A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **28(9)**, 1217–1225. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0026>

Ciais, P., Sabine, C., Bala, G., Bopp, L., Brovkin, V., Canadell, J., Chhabra, A., DeFries, R., Galloway, J., Heimann, M., Jones, C., Le Quéré, C., Myneni, R. B., Piao, S. & Thornton, P. (2013). Carbon and Other Biogeochemical Cycles. In: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Stocker, T. F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P. M. Midgley (Ed.)]. (pp. 465–570). Recuperado de https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/02/WG1AR5_Chapter06_FINAL.pdf

Cortés-López, N., Ordóñez, P. & Viveros, J. (2020). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, **11(4)**, 1150–1173. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5202>

Creevey, C. J., Kelly, W. J., Henderson, G. & Leahy, S. C. (2014). Determining the culturability of the rumen bacterial microbiome. *Microbial Biotechnology*, **7(5)**, 467–479. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12141>

Danielsson, R., Dicksved, J., Sun, L., Gonda, H., Müller, B., Schnürer, A. & Bertilsson, J. (2017). Methane Production in Dairy Cows Correlates with Rumen Methanogenic and Bacterial Community Structure. *Frontiers in Microbiology*, **8(226)**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00226>

Del Rosario, M. (1999). Bacterias ruminantes. *Sitio Argentino de Producción Animal*. Recuperado de https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/69-bacterias_ruminantes.pdf

Denman, S. E., Martínez Fernández, G., Shinkai, T., Mitsumori, M. & McSweeney, C. S. (2015). Metagenomic analysis of the rumen microbial community following inhibition of methane formation by a halogenated methane analog. *Frontiers in Microbiology*, **6(1087)**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01087>

Duin, E. C., Wagner, T., Shima, S., Prakash, D., Cronin, B., Yáñez-Ruiz, D. R., Duval, S., Rümbeli, R., Stemmler, R. T., Thauer, R. K. & Kindermann, M. (2016). Mode of action uncovered for the specific reduction of methane emissions from ruminants by the small molecule 3-nitrooxypropanol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113(22)**, 6172–6177. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600298113>

Fouts, D. E., Szpakowski, S., Purushe, J., Torralba, M., Waterman, R. C., MacNeil, M. D., Alexander, L. J. &

Nelson, K. E. (2012). Next generation sequencing to define prokaryotic and fungal diversity in the bovine rumen. *PloS One*, **7(11)**, e48289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048289>

García, I. A. (2016). Sistema digestivo en rumiantes: Anatomofisiología. *Universidad Nacional Autónoma de Chihuahua*, **2(1)**, 2-7. <https://www.angelfire.com/ar/iagg101/docum/digrum.PDF>

Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A. & Tempio, G. (2013). *Tackling climate change through livestock: A global assessment of emissions and mitigation opportunities*. Recuperado de <https://www.fao.org/3/i3437e/i3437e.pdf>

Giuliodori, M., Mattioli, G., Picco, S. & Relling, A. (2013). Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. *CCB Academic Press*, **104(3)**, 978-987. <http://hdl.handle.net/11336/151276>

Global Methane Initiative. (2020). *Global Methane Emissions and Mitigation Opportunities*. Recuperado el 27 de enero de 2021 de https://www.globalmethane.org/documents/analysis_fs_en.pdf.

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)**, e74787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074787>

Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W. & Janssen, P. H. (2015). Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports*, **5(1)**, 14567. <https://doi.org/10.1038/srep14567>

Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D. & Eiros, J. M. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología*, **52(2)**, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>

Hoegh-Guldberg, O., Jacob, D., Taylor, M., Bindi, M., Brown, S., Camilloni, I., Diedhiou, A., Djalante, R., Ebi, K. L., Engelbrecht, F., Hijioka, Y., Mehrotra, S., Payne, A., Seneviratne, S. I., Thomas, A., Warren, R. & Zhou, G. (2018). Impacts of 1.5°C of Global Warming on Natural and Human Systems. In: Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty. [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, H.-O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P.R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J.B.R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M.I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, and T. Waterfield (eds.)]. (pp. 177-181). Recuperado de <https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/sites/2/2019/06/>

SR15_Chapter3_Low_Res.pdf

Hornung, B., van den Bogert, T., Davids, M., Martins dos Santos, V., Plugge, C., Schaap, P. & Smidt, H. (2018). The Rumen Metatranscriptome Landscape Reflects Dietary Adaptation and Methanogenesis in Lactating Dairy Cows, **116**, 245-257. <https://doi.org/10.1101/275883>

Hrdlickova, R., Toloue, M. & Tian, B. (2017). RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, **8(1)**, e1364. [10.1002/wrna.1364](https://doi.org/10.1002/wrna.1364). <https://doi.org/10.1002/wrna.1364>

IPCC (2007). Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, Pachauri, R.K and Reisinger, A. (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 104 pp.

Jami, E., Israel, A., Kotser, A. & Mizrahi, I. (2013). Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The ISME Journal*, **7(6)**, 1069–1079. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.2>

Janssen, P. H. & Kirs, M. (2008). Structure of the Archaeal Community of the Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, **74(12)**, 3619–3625. <https://doi.org/10.1128/AEM.02812-07>

Johnson, K. A. & Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, **73(8)**, 2483–2492. <https://doi.org/10.2527/1995.7382483x>

Jovel, J., Patterson, J., Wang, W., Hotte, N., O'Keefe, S., Mitchel, T., Perry, T., Kao, D., Mason, A. L., Madsen, K. L. & Wong, G. K.-S. (2016). Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, **7(459)**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00459>

Kaul, S., Sharma, T. & Dhar, M. K. (2016). “Omics” Tools for Better Understanding the Plant–Endophyte Interactions. *Frontiers in Plant Science*, **7(955)**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00955>

Kopylova, E., Noé, L. & Touzet, H. (2012). SortMeRNA: Fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, **28(24)**, 3211–3217. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts611>

Pavan-Kumar, A., Babu, G. & Lakra, W. S. (2015). DNA Metabarcoding: A New Approach for Rapid Biodiversity Assessment. *Journal of Cell Science and Molecular Biology*, **2(1)**, 111. <https://www.opensciencepublications.com/fulltextarticles/JCMB-2350-0190-2-111.html>

Li, F., & Guan, L. L. (2017). Metatranscriptomic Profiling Reveals Linkages between the Active Rumen Microbiome and Feed Efficiency in Beef Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, **83(9)**, e00061-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00061-17>

Li, F., Hitch, T. C. A., Chen, Y., Creevey, C. J. & Guan, L. L. (2019). Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal the breed effect on the rumen microbiome and its associations with feed efficiency in beef cattle.

Microbiome, **7(6)**, 2-21. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0618-5>

Li, F., Neves, A. L. A., Ghoshal, B. & Guan, L. L. (2018). Symposium review: Mining metagenomic and metatranscriptomic data for clues about microbial metabolic functions in ruminants 1. *Journal of Dairy Science*, **101(6)**, 5605–5618. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13356>

Looft, T., Johnson, T. A., Allen, H. K., Bayles, D. O., Alt, D. P., Stedtfeld, R. D., Sul, W. J., Stedtfeld, T. M., Chai, B., Cole, J. R., Hashsham, S. A., Tiedje, J. M. & Stanton, T. B. (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109(5)**, 1691–1696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120238109>

Lyu, Z., Shao, N., Akinyemi, T. & Whitman, W. B. (2018). Methanogenesis. *Current Biology*, **28(13)**, R727–R732. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.021>

Maeder, D. L., Anderson, I., Brettin, T. S., Bruce, D. C., Gilna, P., Han, C. S., Lapidus, A., Metcalf, W. W., Saunders, E., Tapia, R. & Sowers, K. R. (2006). The Methanosaerina barkeri genome: comparative analysis with Methanosaerina acetivorans and Methanosaerina mazei reveals extensive rearrangement within methanosaerinal genomes. *Journal of bacteriology*, **188(22)**, 7922–7931. <https://doi.org/10.1128/JB.00810-06>

McCann, J. C., Wickersham, T. A. & Loor, J. J. (2014). High-throughput Methods Redefine the Rumen Microbiome and Its Relationship with Nutrition and Metabolism. *Bioinformatics and Biology Insights*, **8**, 109–125. <https://doi.org/10.4137/BBI.S15389>

Mizrahi, I. & Jami, E. (2018). Review: The compositional variation of the rumen microbiome and its effect on host performance and methane emission. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, **12(2)**, 220–232. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001957>

Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C. & Newbold, C. J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, **4(7)**, 1024–1036. <https://doi.org/10.1017/S175173110000546>

Moss, A. R., Jouany, J. P. & Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*, **49(3)**, 231–253. <https://doi.org/10.1051/animres:2000119>

Nayfach, S. & Pollard, K. S. (2016). Toward Accurate and Quantitative Comparative Metagenomics. *Cell*, **166(5)**, 1103–1116. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.007>

Opio, C., Gerber, P., Motter, A., Falcucci, A., Tempio, G., MacLeod, M., Vellinga, T., Henderson, B. & Steinfeld, H. (2013). Greenhouse gas emissions from ruminant supply chains – A global life cycle assessment. Recuperado de <http://www.fao.org/publications/card/es/c/ff905a47-1479-595c-b891-d345ea13c0a0/>.

Osnaya, P., Fernández Bremauntz, A. & Martínez, J. (2004). Cambio climático: Una visión desde México. Recuperado de [http://www.data.sedema.cdmx.gob.mx/cambioclimaticocdmx/images/biblioteca_cc/Cambio-climatico-una-vision-desde-Mexico-\(Julia-Martinez-y-Adrian-Fernandez-Bremauntz-compilado.pdf](http://www.data.sedema.cdmx.gob.mx/cambioclimaticocdmx/images/biblioteca_cc/Cambio-climatico-una-vision-desde-Mexico-(Julia-Martinez-y-Adrian-Fernandez-Bremauntz-compilado.pdf)

Organización de las Naciones Unidas (1 de noviembre de 2021) *Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CP 26)*. Recuperado de <https://www.un.org/es/food-systems-summit-2021-es/conferencia-de-las-naciones-unidas-sobre-el-cambio-climático-cp-26>

Pacheco-Arjona, J. R. & Sandoval-Castro, C. A. (2018). Rumen metagenome sequencing technology. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, **21**, 587–598. <https://www.revista.ccba.uday.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/2780>

Parish, J., Rivera, D. & Bolan, H. (2017). Understanding the Ruminant Animal Digestive System. Recuperado el 17 de junio de 2020. <http://extension.msstate.edu/publications/publications/understanding-the-ruminant-animal-digestive-system>

Paz, A., Gonzalez, M. & Crawford, A. J. (2011). Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana*, **16(3)**, 161–176. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-548X2011000300011&lng=en&nrm=iso&tlang=es

Pérez, E. & Sirias, R. (2007). Transferencia de líquido ruminal o transfaunación en terneros de 2 a 4 meses con trastornos de poco desarrollo corporal en la Finca las Mercedes de la UNA. *Repositorio Institucional UNA*, **70**, 438. <https://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/1395>

Servicio de Información Alimentaria y Pesquera (14 de septiembre de 2017). *Rumiantes: Los que sí clasifican*. Recuperado el 5 de junio de 2020 de <http://www.gob.mx/siap/articulos/rumiantes-los-que-si-clasifican>

Petrosino, J. F., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. A. & Versalovic, J. (2009). Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clinical Chemistry*, **55(5)**, 856–866. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.107565>

Ramírez, J. F., Posada Ochoa, S. & Noguera, R. (2014). Metanogénesis ruminal y estrategias para su mitigación. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, **9(2)**, 307–323. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1900-96072014000200014&lng=en&nrm=iso&tlang=es

Reuter, J. A., Spacek, D. & Snyder, M. P. (2015). High-Throughput Sequencing Technologies. *Molecular Cell*, **58(4)**, 586–597. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004>

Rey, M., Enjalbert, F., Combes, S., Cauquil, L., Bouchez, O. & Monteils, V. (2014). Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. *Journal of Applied Microbiology*, **116(2)**, 245–257. <https://doi.org/10.1111/jam.12405>

Ritchie, H. & Roser, M. (2020). *Environmental impacts of food production*. Our World in Data. Recuperado de <https://ourworldindata.org/environmental-impacts-of-food>

ourworldindata.org/environmental-impacts-of-food

RMG Network—Hungate1000. (2016). *Hungate 100- A catalogue of reference genomes from the rumen microbiome*. Recuperado el 12 de abril de 2021 de <http://www.rmgnetwork.org/hungate1000.html>

Roehe, R., Dewhurst, R. J., Duthie, C.-A., Rooke, J. A., McKain, N., Ross, D. W., Hyslop, J. J., Waterhouse, A., Freeman, T. C., Watson, M. & Wallace, R. J. (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), e1005846. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005846>

Ross, E. M., Moate, P. J., Bath, C. R., Davidson, S. E., Sawbridge, T. I., Guthridge, K. M., Cocks, B. G. & Hayes, B. J. (2012). High throughput whole rumen metagenome profiling using untargeted massively parallel sequencing. *BMC Genetics*, **13**(53) <https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-53>

Ross, E. M., Moate, P. J., Maret, L., Cocks, B. G. & Hayes, B. J. (2013). Investigating the effect of two methane-mitigating diets on the rumen microbiome using massively parallel sequencing. *Journal of Dairy Science*, **96**(9), 6030–6046. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6766>

Ruppert, K. M., Kline, R. J. & Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, **17**(2019), e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales e Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (2018). *Méjico, Sexta Comunicación Nacional y Segundo Informe Bienal de Actualización ante la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático*. Recuperado de <http://cambioclimatico.gob.mx:8080/xmlui/handle/publicaciones/117>

Seshadri, R., Leahy, S. C., Attwood, G. T., Teh, K. H., Lambie, S. C., Cookson, A. L., Eloe-Fadrosh, E. A., Pavlopoulos, G. A., Hadjithomas, M., Varghese, N. J., Paez-Espino, D., Perry, R., Henderson, G., Creevey, C. J., Terrapon, N., Lapebie, P., Drula, E., Lombard, V., Rubin, E., Kyriides, N. C., Henrissat, B., Woyke, T., Ivanova, N. N. & Kelly, W. J. (2018). Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 Collection. *Nature Biotechnology*, **36**(4), 359–367. <https://doi.org/10.1038/nbt.4110>

Shakya, M., Lo, C. C. & Chain, P. S. G. (2019). Advances and Challenges in Metatranscriptomic Analysis. *Frontiers in Genetics*, **10**(904), <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00904>

Sharpton, T. J. (2014). An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in Plant Science*, **5**(209). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00209>

Shi, W., Moon, C. D., Leahy, S. C., Kang, D., Froula, J., Kittelmann, S., Fan, C., Deutsch, S., Gagic, D., Seedorf, H., Kelly, W. J., Atua, R., Sang, C., Soni, P., Li, D., Pinares-Patiño, C. S., McEwan, J. C., Janssen, P. H., Chen, F., Visel, A., Wang, Z., Attwood, G. T. & Rubin, E. M. (2014). Methane yield phenotypes linked to differential gene expression in the sheep rumen microbiome. *Genome Research*, **24**(9), 1517–1525. <https://doi.org/10.1101/gr.168245.113>

Söllinger, A., Tveit, A. T., Poulsen, M., Noel, S. J., Bengtsson, M., Bernhardt, J., Frydendahl Hellwing, A. L., Lund, P., Riedel, K., Schleper, C., Højberg, O. & Urich, T. (2018). Holistic Assessment of Rumen Microbiome Dynamics through Quantitative Metatranscriptomics Reveals Multifunctional Redundancy during Key Steps of Anaerobic Feed Degradation. *MSystems*, **3**(4), e00038-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00038-18>

Sosa, A., Galindo, J. & Bocourt, R. (2007). Metanogénesis ruminal: Aspectos generales y manipulación para su control. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, **41**(2), 105–114. <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-cubana-de-ciencia-agricola/articulo/metanogenesis-ruminal-aspectos-generales-y-manipulacion-para-su-control>

Stevenson, D. M. & Weimer, P. J. (2007). Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **75**(1), 165–174. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0802-y>

Suenaga, H. (2011). Targeted metagenomics: A high-resolution metagenomics approach for specific gene clusters in complex microbial communities. *Environmental Microbiology*, **14**(1), 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02438.x>

Suenaga, H. (2015). Targeted metagenomics unveils the molecular basis for adaptive evolution of enzymes to their environment. *Frontiers in Microbiology*, **6**(1018) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01018>

Thoetkattikul, H., Mhuantong, W., Laothanachareon, T., Tangphatsornruang, S., Pattarajinda, V., Eurwilaichitr, L. & Champreda, V. (2013). Comparative analysis of microbial profiles in cow rumen fed with different dietary fiber by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing. *Current Microbiology*, **67**(2), 130–137. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0336-3>

Thomas, T., Gilbert, J. & Meyer, F. (2012). Metagenomics—A guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, **2**(3). <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>

Toseland, A., Moxon, S., Mock, T. & Moulton, V. (2014). Metatranscriptomes from diverse microbial communities: assessment of data reduction techniques for rigorous annotation. *BMC Genomics*, **15**(901). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-901>

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 of Microbiology and Biotechnology*, **29**(2), 301–307. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1183-2>

Wallace, R. J., Rooke, J. A., McKain, N., Duthie, C.-A., Hyslop, J. J., Ross, D. W., Waterhouse, A., Watson, M. & Roehe, R. (2015). The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle. *BMC Genomics*, **16**(839). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2032-0>

Wallace, R. J., Snelling, T. J., McCartney, C. A., Tapiro, I. & Strozzi, F. (2017). Application of meta-omics techniques to understand greenhouse gas emissions originating from ruminal metabolism. *Genetics, Selection, Evolution*, **49**(9), <https://doi.org/10.1186/s12711-017-0285-6>

Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, **10**(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>

Wang, P., Qi, M., Barboza, P., Leigh, M. B., Ungerfeld, E., Selinger, L. B., McAllister, T. A. & Forster, R. J. (2011). Isolation of high-quality total RNA from rumen anaerobic bacteria and fungi, and subsequent detection of glycoside hydrolases. *Canadian Journal of Microbiology*, **57**(7), 590–598. <https://doi.org/10.1139/w11-048>

Wyness, L. (2016). The role of red meat in the diet: Nutrition and health benefits. *Proceedings of the Nutrition Society*, **75**(3), 227–232. <https://doi.org/10.1017/S0029665115004267>

Yamada, T., Letunic, I., Okuda, S., Kanehisa, M. & Bork, P. (2011). iPath2.0: Interactive pathway explorer. *Nucleic Acids Research*, **39**(suppl_2), W412–W415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr313>

Ye, Y. & Doak, T. G. (2009). A Parsimony Approach to Biological Pathway Reconstruction/Inference for Genomes and Metagenomes. *PLOS Computational Biology*, **5**(8), e1000465. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000465>

Yu, Z. & Morrison, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques*, **36**(5), 808–812. <https://doi.org/10.2144/04365ST04>

Zhang, R., Zhu, W., Zhu, W., Liu, J. & Mao, S. (2014). Effect of dietary forage sources on rumen microbiota, rumen fermentation and biogenic amines in dairy cows. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **94**(9), 1886–1895. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6508>