



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Implementación de técnicas de extracción de
ADN a partir de líquido ruminal para la
detección e identificación de microorganismos
mediante PCR**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

Alicia García Rodríguez



Ciudad de México.

AÑO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Martha Giles Gómez
VOCAL: Carmina Montiel Pacheco
SECRETARIO: Claudia Cecilia Márquez Mota
1º SUPLENTE: Genaro Jiménez Reyes
2º SUPLENTE: Francisco Javier Díaz García

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio de Bromatología 2, Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

CLAUDIA CECILIA MÁRQUEZ MOTA

SUSTENTANTE:

ALICIA GARCÍA RODRÍGUEZ

Agradecimientos

A la Dra. Claudia Cecilia Márquez Mota por brindarme la oportunidad y confianza de pertenecer a su equipo de trabajo así como por el apoyo, consejos, paciencia, orientación, y experiencias a lo largo de este proceso.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Bromatología 2 y del laboratorio de Microbiología ruminal por las experiencias compartidas.

Al Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por la asesoría brindada desde el primer día.

A la M. en C. Cindy Adriana Estrada Hernández del Departamento de Alimentos y Biotecnología por el material facilitado y el apoyo para el uso del equipo Gel Doc System.

A la M. en C. Rosa Isela Ortíz Huidobro del Instituto de Fisiología Celular por el apoyo en el uso del equipo Nanodrop 2000 Spectrophotometer.

A la Unidad de Investigación de FMVZ por el apoyo para el uso de los equipos Veriti Thermal Cycler y RotorGen.

A la M. en C. Ana Laura Pacheco Martínez y al Dr. José Luis López Cervantes del Laboratorio de Superficies por su generosidad en compartir conocimientos sobre el sistema de composición de textos LaTeX, software libre con el cual se elaboró esta tesis.

A las sinodales por el tiempo dedicado a leer esta tesis, por sus valiosas observaciones y sugerencias las cuales ayudaron a enriquecer el trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a las mexicanas y mexicanos que con su trabajo la sostienen. A todos ellos mis infinitas gracias.

Dedicatoria

A mis padres Angélica e Ignacio, por el esfuerzo constante, la confianza y paciencia durante este trayecto. Con todo mi amor y profundo agradecimiento.

A mi abuela María de los Ángeles Jurado (†), por trascender en mí como una fuente constante de fortaleza, admiración e inspiración.

A mi Tía Rosa y a mi Tía Lilian (†), por los cuidados y el cariño brindado, sin ellos no sería la persona que soy y no hubiera sido posible este trabajo, con amor y gratitud. A mis tíos Rodríguez, donde quiera que se encuentre cada uno, por el soporte y amor incondicional demostrados a lo largo de mi vida.

A mis primas García, más que eso hermanas Geli, Isa, Cala, Lydia, Angélica, Elizabeth, Rubén, gracias por ser mi familia. Así como a mis primos hermanos Rodríguez: Erika, Liliana, Mariel, Martha, Miguel, Eliezer, Brenda, Diana, Cynthia, Isa, Jorge, Ceci, Pedro, Irma, Oscar, Victor y Veka porque sigamos creciendo juntos con admiración y cariño.

A Fernanda y a Christian, cuando la vida nos acercó me di cuenta que son los hermanos menores que siempre quise tener ahhh jajaja, gracias por recordarme lo importante de ser familia en el momento que más lo necesitaba, la culminación de este proceso no hubiera sido posible sin ustedes. A mis sobrinos menores con entusiasmo y ánimos de despertar su curiosidad.

A Ana Laura por el amor brindado y las enseñanzas compartidas, no solo en Química sino en la vida misma. Gracias por acompañarme y apoyarme en esta etapa.

A Sheila, Gabriela y Yazmin porque lo que más le agradezco a la Química es que juntara nuestros caminos. Gracias por todas las experiencias, aprendizajes y aventuras juntas, en mi cora siempre amigas.

A Mildred, por llegar con su amistad en el momento preciso. Gracias por el cariño, los consejos y la comida a lo largo de este proceso.

A mis hermanites por siempre Sharon, Paola, Ada, Raian, gracias por crecer a mi lado y no soltarme, así como por su cariño y apoyo a lo largo de estos años.

A Claudia, Adrian y Eli por la amistad construida, las experiencias, el cálido apoyo y cariño.

Índice

1. Introducción	10
2. Antecedentes	11
2.1. Rumiantes	11
2.1.1. Rumen	12
2.1.2. Obtención de líquido ruminal	13
2.1.3. Microbiología	13
2.1.4. Efecto de la dieta sobre la microbiota ruminal	17
2.2. Identificación por análisis del gen 16S rRNA	18
2.2.1. Regiones del gen 16S rRNA	19
2.3. El Ácido Desoxirribonucleico (ADN)	21
2.3.1. Extracción de ADN	23
2.4. Electroforesis en gel de agarosa	24
2.4.1. Tinciones	26
2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
2.5.1. PCR tiempo real (qPCR)	30
2.5.2. Diseño de primers	32
3. Justificación	34
4. Hipótesis	34
5. Objetivos	34
5.1. Objetivo General	34
5.2. Objetivo Específico	34
6. Metodología experimental	35
6.1. Obtención de la muestra	35
6.2. Obtención de pellet bacteriano	36
6.3. Extracción de ADN Cromosomal Bacteriano (CB)	36
6.4. Extracción de ADN Genómico de Bacteria (GB)	37
6.5. Extracción de ADN mediante Perlas Acoplado a Columna (PAC)	38
6.6. Extracción de ADN mediante ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (ZBDMK)	39
6.7. Extracción de ADN mediante Stool DNA isolation kit Norgen (SDIK)	39
6.8. Cuantificación de las muestras	39
6.9. PCR	40
6.10. Diseño de primers	40
6.11. PCR punto final	40
6.12. Rangos dinámicos para PCR tiempo real (qPCR)	42
6.13. PCR tiempo real (qPCR)	42
6.14. Análisis de qPCR	43
6.15. Análisis estadístico	43

7. Resultados y discusión.	44
7.1. Extracciones de ADN	44
7.2. Electroforesis	46
7.3. PCR punto final	47
7.4. Rangos dinámicos para qPCR	49
7.5. PCR tiempo real (qPCR)	50
8. Conclusiones.	55
9. Perspectivas.	55
10. Anexos.	56
10.1. Preparación de soluciones para la extracción de ADN	56
10.2. Esquemas de técnicas de extracción de ADN	60
10.3. Gráficos de amplificación qPCR	65

Índice de figuras

1.	Sistema digestivo rumiantes	12
2.	Regiones del 16S rRNA.	19
3.	Regiones variables del 16S rRNA	20
4.	Rosalind Franklin y la fotografía 51 de la doble hélice	21
5.	Estructura doble hélice	22
6.	Extracción ADN.	23
7.	Electroforesis en gel de agarosa.	25
8.	Desnaturalización térmica ADN. En verde se esquematizan los primers y en morado los dNTPS	27
9.	Alineamiento ADN	28
10.	Extensión ADN.	28
11.	PCR ciclos.	29
12.	Mecanismo de acción del colorante SYBR Green	31
13.	Mecanismo de acción del método Taqman	32
14.	Esquema general de la técnica de PCR.	40
15.	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de muestra representativa de ADN aislado mediante diferentes protocolos. 1: Cromosomal Bacteriano (CB), 2: Genómico de Bacteria (GB), 3: Homogenización con perlas acoplado a columna (PAC). 4: Paquete comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (ZBDMK) y 5 Paquete comercial Stool DNA isolation kit (SDIK).	47
16.	Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de productos de PCR amplificados para el 16S. 1: Cromosomal Bacteriano (CB), 2: Genómico de Bacteria (GB), 3: Homogenización con perlas acoplado a columna (PAC). 4: Paquete comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (ZBDMK) y 5) Paquete comercial Stool DNA isolation kit (SDIK)	48
17.	Rangos dinámicos	49
18.	<i>Prevotella</i> spp.	51
19.	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	52
20.	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	53
21.	<i>Methanogenic</i> spp.	54
22.	Extracción de ADN Cromosomal Bacteriano (CB)	60
23.	Extracción de ADN Genómico de Bacteria (GB)	61
24.	PAC	62
25.	ZBDMK	63
26.	SDIK	64
27.	<i>Prevotella</i> spp. qPCR	65
28.	<i>Fibrobacter succinogenes</i> qPCR	65
29.	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> qPCR	66
30.	<i>Methanogenic</i> spp. qPCR	66

Índice de tablas

1.	Bacterias involucradas en funciones ruminales.	15
2.	Microorganismos involucrados en funciones ruminales.	16
3.	Porcentajes de agarosa para separación de fragmentos de ADN de diferentes tamaños	26
4.	Propiedades de los primers que influyen en la eficiencia de la amplificación.	33
5.	Par de primers diseñados para PCR punto final	41
6.	Condiciones para PCR punto final.	41
7.	Pares de primers empleados para PCR tiempo real.	42
8.	Condiciones para qPCR.	43
9.	Concentración y pureza de ADN aislado por diferentes métodos.	46
10.	Buffer de fosfatos PBS (10x)	56
11.	Reactivos utilizados para buffer de lisis CB	56
12.	Lisozima	57
13.	NaCl	57
14.	Buffer TE	58
15.	SDS	58
16.	CTAB/NaCl	58
17.	Buffer de lisis PAC	59
18.	Acetato de amonio	59

RESUMEN

La aplicación de técnicas moleculares para la identificación de microorganismos ruminales, requiere ADN de excelente calidad. El objetivo del presente estudio fue evaluar cinco protocolos para la extracción de ADN, a partir de líquido ruminal recolectado a través de sonda esofágica de cinco bovinos raza Holstein, el cual se almacenó a -80°C hasta su análisis. Para la extracción de ADN, se emplearon los siguientes protocolos:

1. ADN cromosomal bacteriano (CB)
2. ADN genómico de bacteria (GB)
3. Homogenización con perlas acoplado a columna (PAC)
4. Paquete comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (ZBDMK)
5. Paquete comercial Stool DNA isolation kit (SDIK)

Se determinó la pureza, concentración e integridad del ADN por espectrofotometría y en adición, para evaluar la calidad del ADN, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Todos los protocolos dieron como resultado extractos de buena calidad de acuerdo con la relación 260/280. Sin embargo, los extractos obtenidos por los protocolos CB, PAC y SDIK no cumplen con los parámetros de calidad correspondientes a la relación 260/230. El extracto obtenido con el protocolo GB obtuvo mayor concentración de ADN con respecto a los protocolos PAC, ZBDMK y SDIK, así como parámetros de pureza óptimos con respecto a los demás protocolos. La presencia de ADN genómico se confirmó mediante un PCR punto final donde para los cinco protocolos se obtuvo amplificación del producto esperado. La identificación de microorganismos ruminales específicos se efectuó mediante PCR tiempo real para todos los protocolos. Los resultados indicaron que la extracción de ADN genómico de bacteria (GB) fue el protocolo óptimo para el desarrollo de estudios posteriores dentro del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica.

1. Introducción

Los animales son transformadores biológicos de materia y energía en alimentos de alta calidad aptos para consumo humano, así como materias primas para vestimenta y accesorios utilizados en el cotidiano [1]. Desde su domesticación en el Neolítico, el ganado ha pertenecido a la riqueza cultural de la humanidad. La reconstrucción de su historia es un campo activo de investigación donde la base de datos arqueológicos se complementa con una diversidad de análisis de ADN de muestras modernas y antiguas de ganado [2].

En la actualidad, con la intención de asegurar la salud animal durante la mejora en el rendimiento de los sistemas pecuarios y para poder manipular mediante la alimentación el impacto ambiental, ha aumentado el interés por estudiar la diversidad, así como los cambios que ocurren en la población microbiana ruminal. Debido a sus características y requerimientos fisiológicos particulares, los microorganismos ruminales son muy difíciles de aislar y cultivar [3]. Las técnicas de biología molecular, al ser técnicas independientes de cultivo, son ampliamente utilizadas para el análisis de la estructura de comunidades bacterianas ruminales [4].

Por esta razón, se ha incursionado en el uso de métodos moleculares para la caracterización de microbiotas ruminales, donde el éxito recae en la calidad del extracto de ADN obtenido. Para extracciones a partir de muestras biológicas líquidas existen diferentes técnicas, las cuales pueden ser procedimientos tradicionales donde el experimentador es responsable de la preparación de reactivos, así como paquetes comerciales con protocolos estandarizados que facilitan la experimentación con un costo alto. Sin embargo, son escasos los estudios comparativos que evalúen la eficiencia de los diversos métodos.

Con la finalidad de obtener ADN puro e íntegro a partir de líquido ruminal bovino, se evaluaron cinco métodos de extracción para determinar, cual método es el óptimo para realizar estudios específicos posteriores.

2. Antecedentes

2.1. Rumiantes

Los mamíferos herbívoros que mastican durante lapsos prolongados el bolo alimenticio, como los bovinos, ovinos, caprinos y búfalos, son considerados rumiantes [5]. Estos animales conservan un enorme significado para la humanidad, ya que convierten la energía almacenada en polímeros de biomasa vegetal. Cuentan con la capacidad de degradar carbohidratos estructurales presentes en forrajes, los cuales no son digeribles para los humanos, transformándolos así en productos alimenticios digeribles como la carne y la leche [6].

En general, en las dietas para rumiantes los carbohidratos constituyen entre el 70 y 80 % de la materia seca (MS). Análisis actuales los dividen en fracciones relacionadas con sus características digestivas o fermentativas. Se pueden dividir en fibra y no fibra. Se considera que los carbohidratos no fibrosos (mono y disacáridos, oligosacáridos y fructanos), son más digeribles y pueden fermentar más rápido. En comparación, los considerados fibra detergente neutra (FDN), representan la fracción digerible solo por microorganismos ruminales y que típicamente fermentan más lento que otros carbohidratos, dentro de esta clasificación encontramos a la celulosa y a la hemicelulosa [7].

La celulosa es el componente primario de las paredes celulares de las plantas, sin embargo, los animales superiores no secretan enzimas que puedan digerirla por lo que dependen de las enzimas digestivas microbianas [8]. En el sistema digestivo de estos animales se alberga una red biológica compleja donde todas las formas primitivas, desde arqueas hasta protozoarios existen en estrecha proximidad [9].

Los rumiantes se han especializado en consumir material vegetal fibroso gracias a los microorganismos que habitan en simbiosis en el rumen [10]. El sistema digestivo de los rumiantes consta de cuatro cámaras: rumen, retículo, omaso y abomaso el cual es considerado como el estómago verdadero (Figura 1).

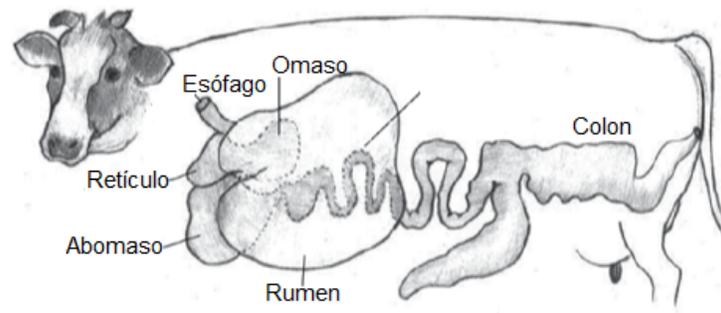


Figura 1: Sistema digestivo rumiantes
[1]

2.1.1. Rumen

El rumen es el principal órgano digestivo en rumiantes, un sistema eficiente de fermentación anaeróbica el cual le confiere a los bovinos, ovinos y caprinos ventajas que se representan como la eficiente digestión de largas cantidades de compuestos lignocelulíticos, la capacidad de utilizar fuentes de nitrógeno no proteico, así como mecanismos de desintoxicación [11].

Es una cámara especializada dentro del tracto gastrointestinal donde un complejo ecosistema microbiano se desarrolla de manera óptima y extrae nutrientes de una variedad de productos agrícolas consumidos por los animales los cuales son utilizados por los microorganismos, así como por el rumiante [12].

Está dividido por sacos musculares en craneal, dorsal, ventral, ciego caudodorsal y ciego caudoventral. Los sacos craneales y dorsales son para sólidos y el saco ventral para líquidos. La pared del rumen tiene pequeñas y extensas proyecciones tipo huella dactilar llamadas papilas, las cuales aumentan la superficie de contacto mejorando así las funciones de absorción de nutrientes y de productos de fermentación del rumen hacia la sangre. El rumen se desarrolla con la edad del animal, depende del consumo de dietas ricas en fibras y del establecimiento microbiano. Los microorganismos que colonizan el rumen provienen del entorno y de otros animales con los que entra en contacto el rumiante neonato, así como de la leche y alimento ingerido [1].

2.1.2. Obtención de líquido ruminal

El líquido ruminal se puede obtener mediante dos métodos: por medio de sondas o por rumenocentesis, la cual implica la aspiración del contenido ruminal y esta principalmente indicado para el diagnóstico de acidosis ruminal clínica [13].

La canulación ruminal se considera el método de referencia para la recolección de muestras representativas de digesta ruminal y, por lo tanto, se usa ampliamente en la investigación de nutrición en rumiantes. La cánula ruminal permite la recolección de fracciones tanto sólidas como líquidas de la digesta ruminal [14]. La obtención de líquido ruminal con sonda se realiza utilizando un tubo plástico o de goma de aproximadamente 2,3 m de largo y 1 cm de diámetro, el que se introduce vía oral. Puede ayudarse de bombas aspirantes [15].

Los estudios del ecosistema micobiano ruminal han requerido tradicionalmente la utilización de animales canulados, sin embargo los costos elevados de la cirugía y del mantenimiento de los animales limitan el acceso con facilidad a las muestras ruminales. Métodos como la utilización de sondas han sido empleados para hacer transfaunaciones de animales saludables a otros con desórdenes digestivos y enfermedades metabólicas, así como para la obtención de líquido ruminal para su análisis [16]. El líquido ruminal y las fracciones de contenido fibroso difieren sustancialmente en términos de naturaleza física y asociadas a microorganismos [17], por lo cual es importante diferenciar cual es la microbiota presente en el líquido ruminal.

2.1.3. Microbiología

La matriz biológica dentro del rumen es responsable de la degradación completa de la materia orgánica ingerida por los animales. Contiene aproximadamente 10^{11} células microbianas por gramo de contenido ruminal, dentro de esta comunidad encontramos arqueas, bacterias, protozoarios ciliados, hongos y virus [11].

La estructura así como la función del microbioma en el rumen depende principalmente de

la dieta ingerida por los animales. Además, la gran cantidad de enzimas que degradan la fibra expresadas en el rumen sirve como un recurso único para el descubrimiento de nuevas enzimas lignocelulolíticas útiles para la producción de biocombustibles [18].

Una sucesión compleja de microorganismos participan en el catabolismo cooperativo de sustratos en el rumen, así como en la fermentación. Sin microorganismos ruminales o cuando los ecosistemas ruminales son perturbados, se puede dar una cascada de efectos en la salud del animal y en la productividad [9].

Avances en biología molecular y genómica ayudan en la comprensión de la microbiología ruminal, ofreciendo nuevas oportunidades que permiten una examinación de la estructura y la función de las comunidades ruminales permitiendo así mejoras en el uso de alimentos, así como en la manipulación de la composición microbiana en los ganados.

La adhesión de microorganismos a sustancias sólidas resulta un factor importante en la digestión del alimento. Los microorganismos involucrados en las funciones ruminales pueden ser bacterias, bacteriófagos, hongos, metanógenos y protozoarios. La mayoría de la actividad enzimática se atribuye a bacterias ruminales (Tabla 1), las cuales se han clasificado con respecto a sus funciones en acetógenas, acidófilas, celulolíticas, hemicelulolíticas, lipolíticas, pectinolíticas, proteolíticas, sacarolíticas, taninolíticas y ureolíticas. Los principales bacteriófagos, hongos, metanógenos y protozoarios se describen en la (Tabla 2), [19].

La composición de la dieta ingerida por el animal es de los factores que más influyen a las comunidades microbianas ruminales y a los productos de su fermentación [20].

Tabla 1: Bacterias involucradas en funciones ruminales

TIPO MICROBIANO	GÉNEROS Y ESPECIES IMPORTANTES
Bacterias	
Acetogénicos	<i>Acetitomaculum ruminis</i> , <i>Eubacterium limosum</i>
Utilizadores de ácido	<i>Megasphaera elsdeni</i> , <i>Wolinella succinogenes</i> , <i>Veillonella gazogene</i> , <i>Micrococcus lactolytica</i> , <i>Oxalobacter formigenes</i> , <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> , <i>Desulfotomaculum ruminis</i> , <i>Succiniclasticum ruminis</i>
Celulolíticas	<i>Fibrobacter succinogenes</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Clostridium cellobioparum</i> , <i>Clostridium</i> <i>longisporum</i> , <i>Clostridium lochheadii</i> , <i>Eubacterium cellulosolvens</i>
Hemicelulolíticas	<i>Prevotella ruminicola</i> , <i>Eubacterium xylophilum</i> , <i>Eubacterium uniformis</i>
Lipolíticas	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>
Pectinolíticas	<i>Treponema saccharophilum</i> , <i>Lachnospira multiparus</i>
Proteolíticas	<i>Prevotella ruminicola</i> , <i>Ruminobacter amylophilus</i> , <i>Clostridium bifermentans</i>
Amilolíticas	<i>Streptococcus bovis</i> , <i>Ruminobacter amylophilus</i> , <i>Prevotella ruminicola</i>
Sacarolíticas	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> , <i>Succinivibrio amylolytica</i> , <i>Selenomonas</i> <i>ruminantium</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>fermentum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>helveticus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>globosum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium thermophilum</i> , <i>Bifidobacterium ruminale</i> , <i>Bifidobacterium ruminantium</i>
Taninolíticas	<i>Streptococcus caprinus</i> , <i>Eubacterium oxidoreducens</i>
Ureolíticas	<i>Megasphaera elsdenii</i>

Modificado de [19]

Tabla 2: Microorganismos involucrados en funciones ruminales

TIPO MICROBIANO	GÉNEROS Y ESPECIES IMPORTANTES
Bacteriofagos	Fago Ψ M1 de <i>Methanobacterium</i> , Fago Ψ M10 de <i>Methanobacterium</i> , Fago Ψ M100 de <i>Methanobacterium</i> , Fago Ψ M100 de <i>Methanothermobacter</i> , Fago Ψ M2 de <i>Methanobacterium</i>
Hongos	<i>Piromyces communis</i> , <i>Piromyces mae</i> , <i>Piromyces minutus</i> , <i>Piromyces dumbonicus</i> , <i>Piromyces rhizinflatus</i> , <i>Piromyces spiralis</i> , <i>Piromyces citronii</i> , <i>Piromyces polycephalus</i> , <i>Anaeromyces mucronatus</i> , <i>Anaeromyces elegans</i> , <i>Caecomyces communis</i> , <i>Caecomyces equi</i> , <i>Caecomyces sympodialis</i> , <i>Cyllamyces aberensis</i> , <i>Cyllamyces icaris</i> , <i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Neocallimastix patriciarum</i> , <i>Neocallimastix hurleyensis</i> , <i>Neocallimastix variabilis</i> , <i>Orpinomyces joynii</i> , <i>Orpinomyces intercalaris</i>
Metanógenas	<i>Methanobacterium formicicum</i> , <i>Methanobacterium bryantii</i> , <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> , <i>Methanobrevibacter smithii</i> , <i>Methanomicrobium mobile</i> , <i>Methanosarcina barkeri</i> ,
Protozoarios	<i>Entodinium bovis</i> , <i>Entodinium bubalum</i> , <i>Entodinium bursa</i> , <i>Entodinium caudatum</i> , <i>Entodinium chatterjeei</i> , <i>Entodinium parvum</i> , <i>Entodinium longinucleatum</i> , <i>Entodinium dubardi</i> , <i>Entodinium exiguum</i> , <i>Epidinium caudatum</i> , <i>Isotricha prostoma</i> , <i>Isotricha intestinalis</i> , <i>Dasytricha ruminantium</i> , <i>Diplodinium dendatum</i> , <i>Diplodinium indicum</i> , <i>Oligoisotricha bubali</i> , <i>Polyplastron multivesiculatum</i> , <i>Eremoplastron asiaticus</i>

Modificado de [19]

Es de suma importancia identificar a los microorganismos del rumen ya que la composición puede presentar variaciones que derivan de factores específicos en cada animal, tales como: composición de la dieta, tiempo destinado a la rumia, cantidad de saliva segregada, consumo de agua y capacidad de avance de la digesta [21].

2.1.4. Efecto de la dieta sobre la microbiota ruminal

El crecimiento microbiano ruminal depende de la capacidad de degradar y fermentar los ingredientes en la dieta [22].

Describir la influencia de diferentes dietas en la disposición comunitaria inherente y las actividades metabólicas asociadas de las fracciones ruminales más activas resulta de gran interés para la nutrición animal, la biotecnología y la climatología [18].

La selectividad en el pastoreo, velocidad de ingestión del alimento, fertilidad del terreno, localización geográfica y clima, son factores que pueden influenciar la calidad y cantidad de los nutrientes presentados a los microorganismos bacterianos del rumen. Las variaciones cíclicas que presentan las poblaciones bacterianas del rumen a lo largo del día, son afectadas por la frecuencia de la alimentación. La variación en el número de microorganismos es menor cuando los animales son alimentados frecuentemente dependiendo de la naturaleza de la dieta. Con respecto al efecto de la composición de la dieta, las observaciones no son del todo concluyentes. Dietas muy ricas en carbohidratos solubles producen una depresión de los microorganismos celulolíticos. Valores adecuados de proteínas en la dieta, implican usualmente un aumento del número de bacterias en comparación con dietas bajas en proteínas. Normalmente, el número de bacterias/g del contenido ruminal tiende a ser mayor en animales alimentados con pastos verdes, en comparación con aquellos alimentados con raciones secas [23].

Estrategias de alimentación, inclusión de aditivos y suplementos son utilizados para optimizar el rendimiento del animal, sin embargo los mecanismos de acción son considerados desconocidos e históricamente, la investigación en microbiología ruminal no ha podido correlacionar las diferencias

en las poblaciones bacterianas, su función o la filogenia con datos significativos. Dado que las transiciones dietéticas durante la vida del rumiante impactan directamente en la composición microbiana, es necesario considerar el periodo de adaptación que requiere el animal [24].

Con los enfoques de alto rendimiento basados en ácidos nucleicos, una comprensión microbiana de estrategias nutricionales comprobable puede sentar las bases para nuevos avances en la producción de rumiantes [24].

Técnicas convencionales basadas en el cultivo de microorganismos, como el aislamiento, enumeración y caracterización nutricional han provisto información significativa sobre la diversidad microbiana ruminal; sin embargo, en la actualidad con el desarrollo de nuevas tecnologías se ha enriquecido el conocimiento sobre los ecosistemas ruminales [25].

Con la identificación del genoma humano surgieron más herramientas biotecnológicas para el desarrollo de técnicas y enfoques científicos que permiten estudiar las relaciones del genoma con el comportamiento en cada organismo [26].

El microbioma ruminal, así como otros microbiomas, fueron investigados usando métodos dependientes de cultivo por muchas décadas hasta los años ochenta, cuando el gen 16S rRNA fue identificado y aplicado para análisis [27], debido a lo anterior resulta el acercamiento estándar para investigaciones independientes de cultivo sobre la diversidad microbiana [28].

Debido a la conservación evolutiva de los genes de 16S y 18S del RNA, se pueden utilizar técnicas que permiten enumerar microorganismos dirigidos dentro de un ecosistema complejo sin necesidad de medios de cultivo [25].

2.2. Identificación por análisis del gen 16S rRNA

Para estudiar la filogenia molecular se emplea el gen que codifica para 16S rRNA el cual está distribuido universalmente, es estable y por lo tanto altamente conservado entre los microorganismos [29]. Su función consiste en reconocer la secuencia conocida como Shine-Dalgarno presente en el

RNA mensajero para así comenzar la traducción.

Recientemente la secuenciación del rRNA se ha convertido en la estrategia más común para distinguir entre organismos así como para mostrar relación filogenética y en última instancia clasificar un organismo a nivel de género y especie [30].

La secuencia del amplicon del gen 16S rRNA es la estrategia utilizada para estudiar el microbioma del rumen. Estas tecnologías permiten la evaluación de estrategias nutricionales que permitan manipular el ecosistema ruminal para beneficiar al ganado y a la producción [31].

El 16S rRNA contienen aproximadamente 1500 nucleótidos, con varias regiones de secuencia altamente conservadas, pero al mismo tiempo presenta variabilidad de secuencia suficiente en otras regiones de la molécula [30].

2.2.1. Regiones del gen 16S rRNA

La identificación molecular basada en el análisis del 16S rRNA puede representar una ventaja tanto en tiempo como en precisión, llegando incluso a competir de manera favorable con otras técnicas rápidas y eficaces, como las inmunológicas [32].

El gen 16S rRNA tiene regiones altamente conservadas intercaladas con regiones variables. Las regiones conservadas sirven de ancla para diseñar los primers para PCR mientras que secuenciar las regiones variables permite la identificación de microorganismos [33] (Figura 2).

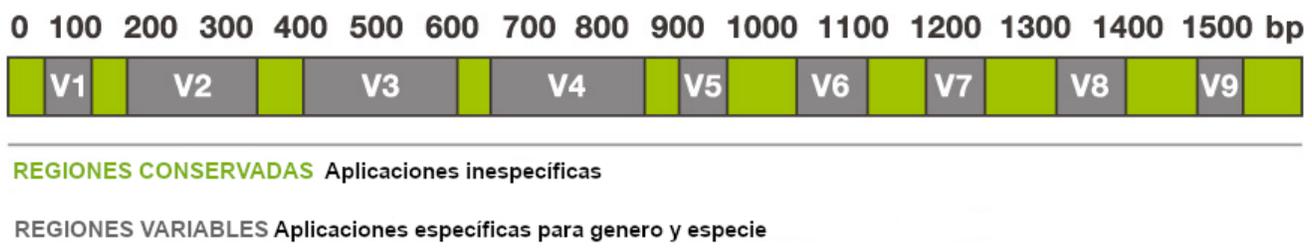


Figura 2: Regiones del 16S rRNA.
Modificado de [33]

Las regiones de alta variabilidad (Figura 3), permiten la identificación de bacterias estrechamente relacionadas mientras que las regiones conservadas determinan a las bacterias relacionadas de forma distante [34]. Las moléculas de ADN resultan los compuestos objetivo para la identificación de especies debido a su alta estabilidad comparado con proteínas y a su presencia en la mayoría de los medios biológicos [35].

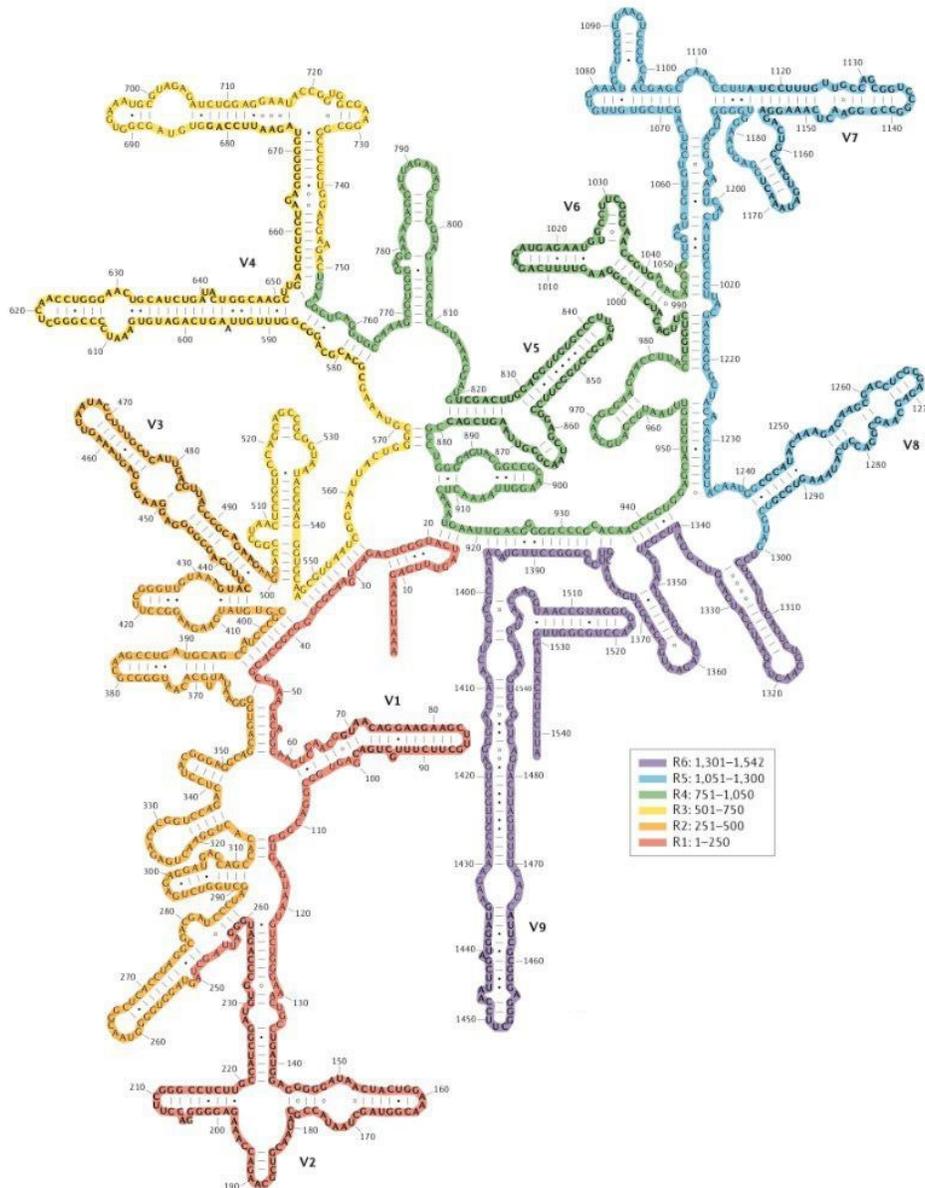


Figura 3: Regiones variables del 16S rRNA [36]

2.3. El Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

El ADN es la molécula que contiene la información genética de los organismos. Por lo anterior, para conocer como el ADN realiza las funciones genéticas de almacenamiento y replicación, fue indispensable determinar su estructura tridimensional.

La imagen que obtuvo la investigadora Rosalinda Franklin (Figura 4), mediante difracción de rayos X en 1952 muestra la estructura de doble hélice del ADN con claridad sorprendente. Lo anterior inspiró el desarrollo del modelo publicado sobre la estructura de los ácidos nucleicos.

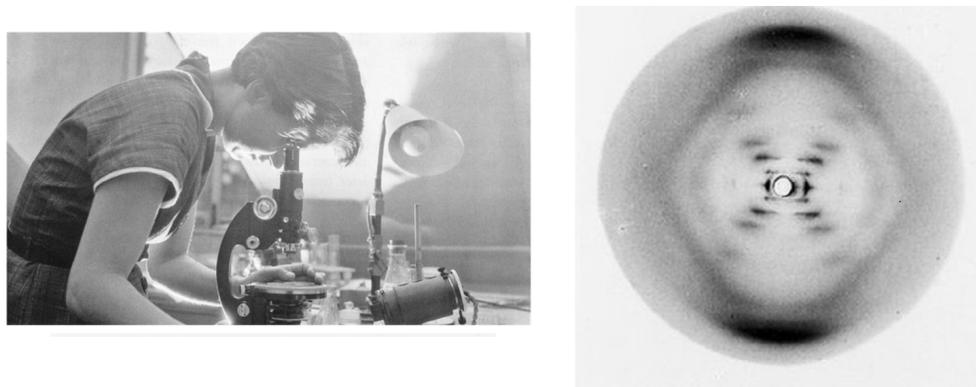


Figura 4: Rosalind Franklin y la fotografía 51 de la doble hélice [37]

La molécula de ADN está formada por tres componentes: un grupo fosfato el cual polimeriza la cadena, un azúcar (desoxirribosa), la cual da el sentido de 5' a 3' y una base nitrogenada, la cual confiere la especificidad y de manera complementaria con la base de la otra cadena se forma así la estructura en doble hélice.

Existen cuatro tipos de bases nitrogenadas y, por consiguiente, cuatro tipos de nucleótidos en el ADN. Las bases llamadas purinas son la adenina y la guanina y las pirimidinas son la citosina y la timina. La complementariedad entre las bases está dada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, generando estabilidad a la doble hélice, la carga eléctrica del ADN es negativa ya que la confiere los grupos fosfatos [38].

Los enlaces más estables ocurren cuando la guanina forma 3 puentes de hidrógeno con la citosina y la adenina 2 puentes de hidrógeno con la timina (Figura 5). El apareamiento específico de los nucleótidos significa que las dos cadenas son complementarias en su secuencia de bases. Las dos cadenas de ADN están enrolladas entre sí para formar una doble hélice.

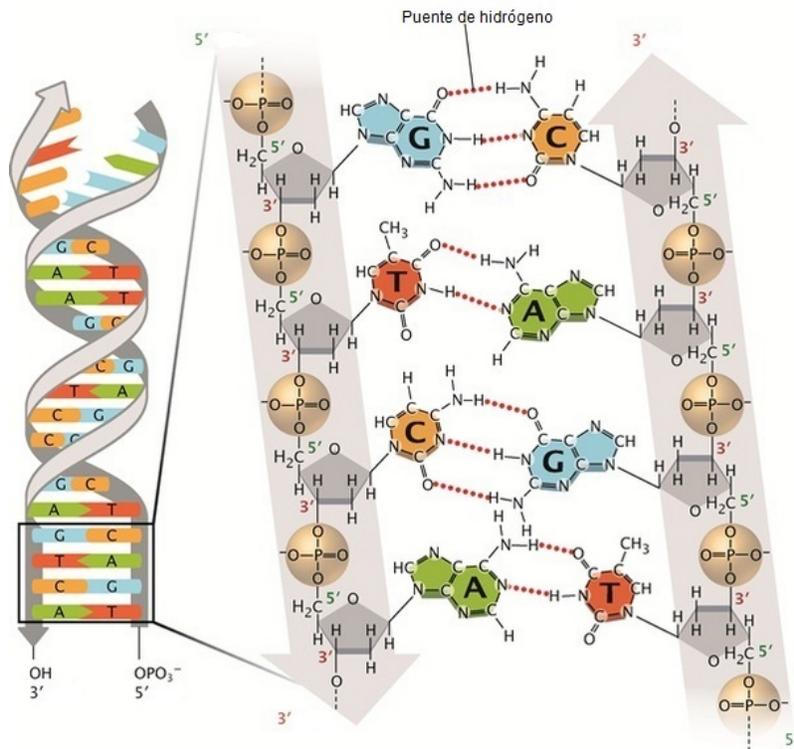


Figura 5: Estructura doble hélice
Modificado de [39]

La cantidad de genes varía de un organismo al otro y el tamaño de una molécula de ADN se puede expresar como el número de bases nucleotídicas o de pares de bases por molécula. Así, una molécula de ADN con 1000 bases es una kilobase (Kb) de ADN. Si el ADN es de doble hélice, se habla de pares de kilobases (Kbp). Por tanto, una doble hélice de 5000 pares de bases tendrá un tamaño de 5 Kbp.

El flujo de información genética empieza con la replicación que es la síntesis de ADN utilizando un molde o templado. Es un proceso semiconservativo que implica una batería de enzimas y procesos especiales. Si la doble hélice se abre, se puede sintetizar una nueva cadena como comple-

mento de cada una de las cadenas parentales. Así, la síntesis de ARN usando ADN como molde es conocida como transcripción [29].

2.3.1. Extracción de ADN

A lo largo del tiempo se han diseñado distintos protocolos con la finalidad de obtener concentraciones de calidad adecuada de ADN, así como garantizar la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten el tratamiento posterior de la molécula. Los métodos tradicionales, desarrollados en los años 50, utilizan solventes orgánicos para separar proteínas del ADN y una vez suspendido en la fase acuosa, aislarlo por precipitación con etanol. La extracción puede tomar horas y consiste en cinco pasos principales: homogenización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación ADN. Las técnicas acopladas a columnas de purificación facilitan el aislamiento del ADN empleando pasos de centrifugado, lavado y elución (Figura 6).

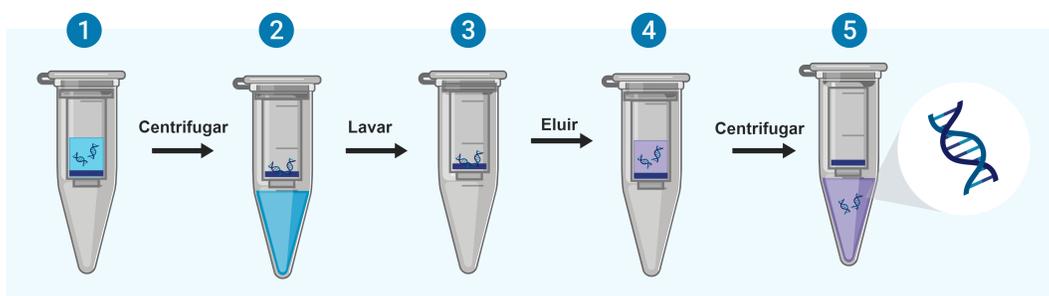


Figura 6: Extracción ADN.

Elaborada con www.biorender.com

Los principios generales para los procesos de extracción de ADN constan de tres partes, primero la desintegración de las células con el uso de detergentes y proteinasas, después extracción de proteínas y polisacáridos con fenol-clorofomo-alcohol isoamílico y al último la precipitación de ADN con etanol [40].

Los reactivos más usados son:

- Soluciones de lisis, las cuales contienen detergentes que desestabilizan la membrana celular y liberan el contenido al medio. Se componen por:
 - Tris base buffer pH 8
 - EDTA
 - SDS detergente que rompe la membrana celular y nuclear
- Proteinasa K: corta histonas del ADN
- Mezcla Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico: el fenol disocia las proteínas, el cloroformo desnaturaliza proteínas y lípidos y el alcohol evita la espuma.
- Etanol frío: precipita ADN
- Agua grado biología molecular.

A partir de los años 90 llegaron al mercado paquetes o kits comerciales de extracción que utilizan matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente capaces de retener ADN y separarlo del resto de las biomoléculas. Existen diferentes formas para evaluar la calidad de los extractos de ADN, puede ser a través de su integridad en geles de agarosa o a través de su cuantificación espectrofotométrica [41].

2.4. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis a través de geles de agarosa es utilizada para separar identificar y purificar fragmentos de ADN. Es una técnica simple, rápida de ejecutar y capaz de separar fragmentos de ácidos nucleicos que no pueden ser separados adecuadamente mediante otros métodos como centrifugación por densidad de gradientes [40].

La electroforesis es una técnica que separa las moléculas cargadas que migran en un campo

eléctrico. Cuando se aplica una corriente eléctrica, los ácidos nucleicos se mueven por el gel hacia el electrodo positivo a causa de sus grupos fosfatos cargados negativamente.

La presencia de la malla que forma el gel dificulta el progreso de ADN, y las moléculas pequeñas o compactas migran más rápidamente que las grandes. La velocidad de migración está determinada por la carga de la molécula, por su tamaño y forma (Figura 7).

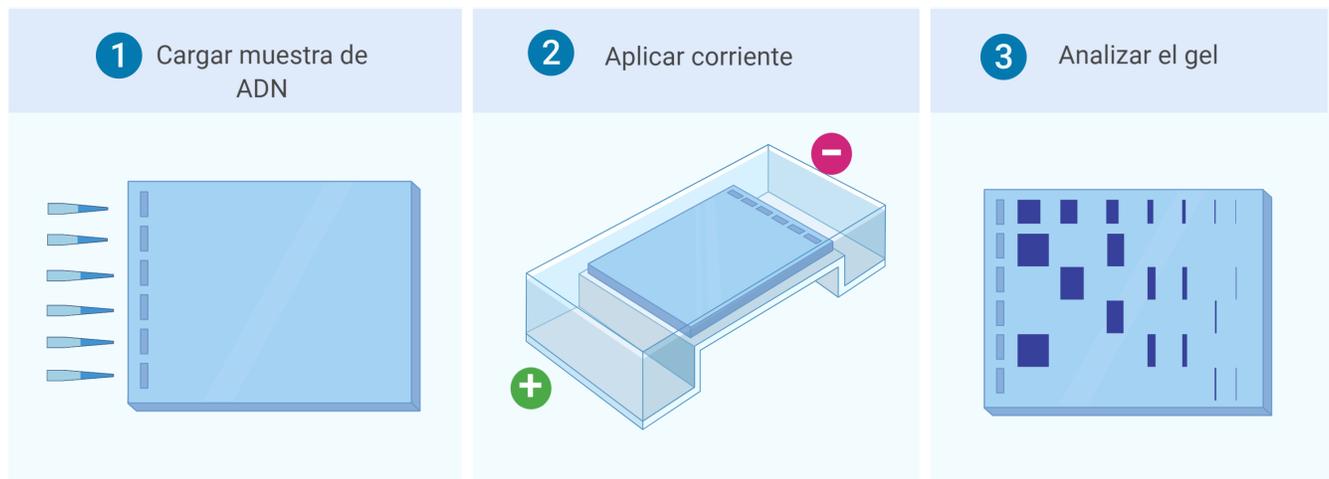


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa.

Elaborada con www.biorender.com.

En el gel se crean pozos para contener el ADN, las moléculas se separan en un medio poroso y no en solución. Los geles hechos con agarosa se utilizan para separar fragmentos de ADN. Las moléculas de alrededor de 200 nucleótidos hasta más de 20kb se separan en geles de agarosa [42]. Un fragmento lineal de ADN con determinado peso migra a diferentes velocidades a través de geles a distintas concentraciones de agarosa (Tabla 3).

Los ácidos nucleicos que han sido sometidos a electroforesis en gel de agarosa pueden ser detectados directamente con tinciones fluorescentes intercalantes y visualizados con luz UV a 300 nm [40].

Tabla 3: Porcentajes de agarosa para separación de fragmentos de ADN de diferentes tamaños

Agarosa (%)	Estándar	Alta fuerza del gel	Baja gelificación/ Temperatura de fusión	Baja gelificación/ Temperatura de fusión
0.3				
0.5	700 bp a 25 kb			
0.8	500 bp a 15 kb	800 bp a 10 kb	800 bp a 10 kb	
1.0	250 bp a 12 kb	400 bp a 8 kb	400 bp a 8 kb	
1.2	150 bp a 6 kb	300 bp a 7 kb\$	300 bp a 7 kb\$	
1.5	80 bp a 4 kb	200 bp a 4 kb	200 bp a 4 kb	
2.0		100 bp a 3 kb	100 bp a 3 kb	
3.0			500 bp a 1 kb	500 bp a 1 kb
4.0				100 bp a 500 bp
6.0				10 bp a 1 bp

Modificada de [40]

2.4.1. Tinciones

El bromuro de etidio ha sido utilizado por décadas para la detección de ácidos nucleicos en geles de agarosa porque no es caro, es bastante sensible para aplicaciones de rutina, así como simple de usar. Sin embargo, se ha demostrado que el bromuro de etidio es mutagénico por lo cual resulta peligroso para el personal del laboratorio y para el medio ambiente. Debido a esto se han desarrollado alternativas inocuas para la tinción de geles mejor conocidos como GelRed y GelGreen [43].

Adicionalmente de emplear el gel de agarosa, para estimar la calidad del ADN, también se emplea en conjunto con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), específicamente en la PCR tradicional, la cual en la actualidad es conocida como PCR punto final.

2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia específica es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células [38].

La PCR es la técnica indicada para obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN de interés partiendo de una concentración mínima. Las cantidades de ADN usualmente utilizadas por reacción para levaduras, bacterias y plásmidos son 10 ng, 1 ng y 1 pg respectivamente [40].

La muestra de ADN se separa en sus cadenas sencillas y se incuba con ADN polimerasa, desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP) y primers cuyas secuencias flanquean el segmento ADN de interés. En cada ciclo, las dos cadenas se separan por calor, los primers se aparean con sus segmentos de ADN complementarios y la ADN polimerasa dirige la síntesis de las cadenas complementarias. Con veinte ciclos de PCR se incrementa la cantidad de la secuencia objetivo en aproximadamente un millón de veces [44].

La reacción de PCR consta de tres etapas. La primera reacción consiste en la desnaturalización térmica de la molécula de ADN, la doble hélice se separa por ruptura de los puentes de hidrógeno (Figura 8).

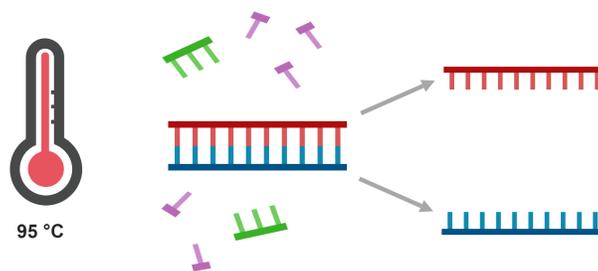


Figura 8: Desnaturalización térmica ADN. En verde se esquematizan los primers y en morado los dNTPS

Elaborada con www.biorender.com

A la segunda reacción se le conoce como alineamiento y consiste en la hibridación de los primers. En esta fase la temperatura disminuye para generar las condiciones donde se pueda dar la unión de los primers a las cadenas simples de ADN. Una temperatura de alineamiento óptima es 5°C por debajo de la T_m de los primers a utilizar. Las temperaturas en el rango de 55 a 72°C generan buenos resultados (Figura 9).

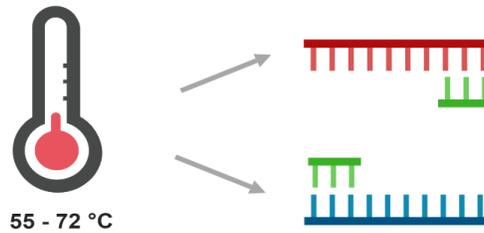


Figura 9: Alineamiento ADN
Elaborada con www.biorender.com

Por último, durante la extensión se incrementa la temperatura para activar a la polimerasa. La reacción se efectúa a 72°C y el tiempo de esta etapa depende del número de fragmentos a amplificar. Un tiempo de extensión de un minuto es considerado suficiente para productos de hasta 2 kb de longitud [45]. A esta temperatura la polimerasa alcanza su máxima actividad y continúa con la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los oligonucleótidos previamente alineados (Figura 10).

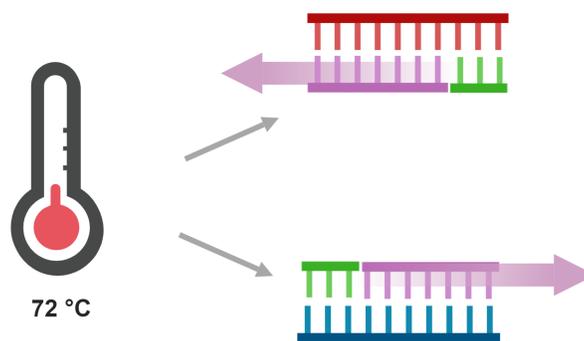


Figura 10: Extensión ADN
Elaborada con www.biorender.com

En el primer ciclo (Figura 11), con estas tres temperaturas, se sintetizarán los primeros fragmentos a partir del ADN genómico. En el segundo ciclo, los oligonucleótidos, además de unirse al ADN inicial, también se unirán a los fragmentos recién sintetizados. De esta forma con cada ciclo aumentará el número de fragmentos. Como cada pedazo sintetizado sirve como molde para sintetizar otros en el siguiente ciclo, el número de copias aumentará en forma exponencial [45].

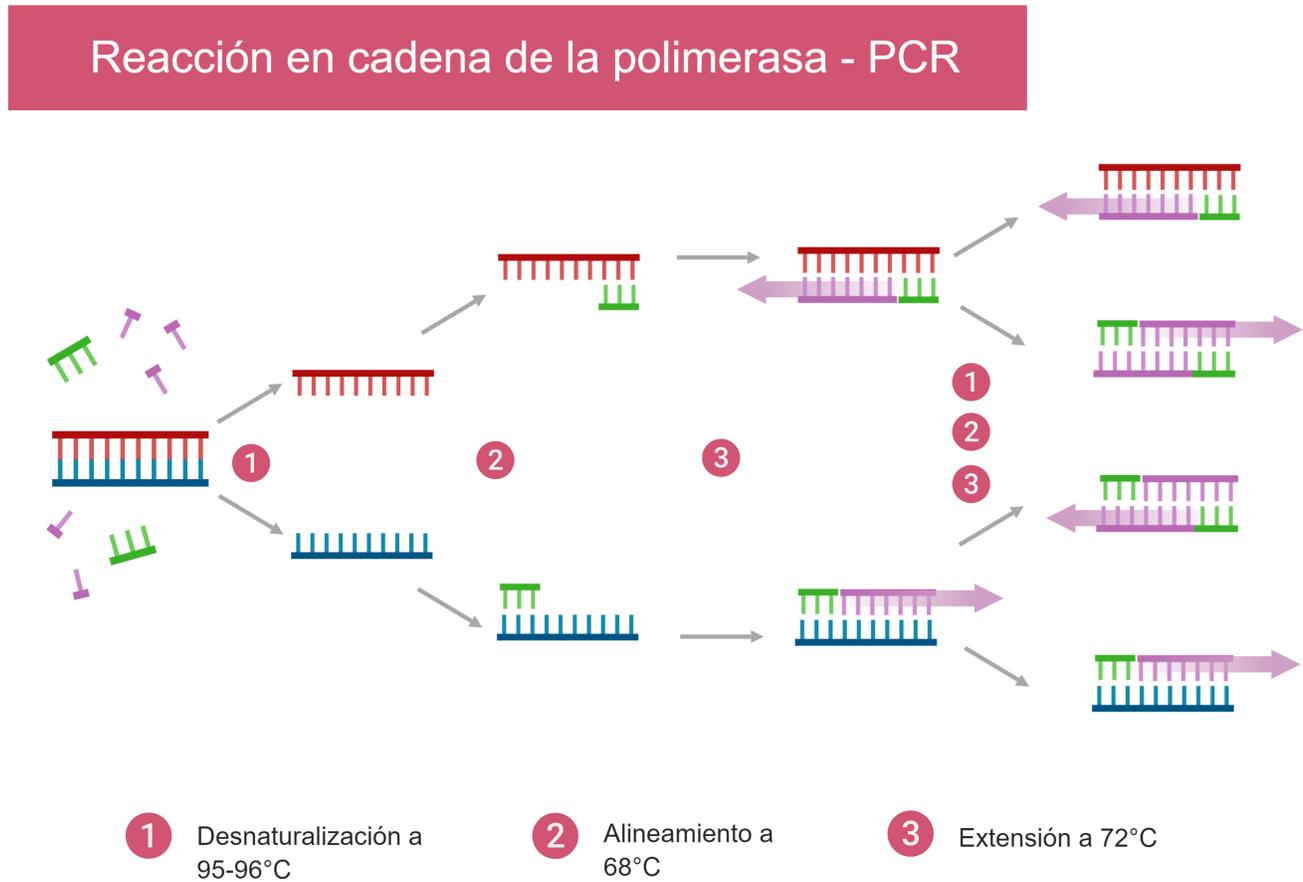


Figura 11: PCR ciclos

Elaborada con www.biorender.com

La falta de información cuantitativa obtenida con la PCR punto final, debido a la eficiencia inconstante a lo largo de los ciclos de amplificación, condujo al desarrollo de estrategias para la detección cuantitativa como la PCR tiempo real [35].

2.5.1. PCR tiempo real (qPCR)

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la reacción de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia [46]. En la última década, se ha convertido en la herramienta más utilizada para la cuantificación de secuencias específicas en mezclas complejas [47].

La qPCR resulta un procedimiento adecuado para cuantificar los niveles de expresión genética que permite determinar de forma precisa el número de copias de un gen particular [3]. Para la amplificación por esta técnica además de los reactivos que se emplean en la PCR punto final, es necesario emplear un fluoróforo. Debido a que la fluorescencia va aumentando conforme el producto se amplifica, se combinan los procesos de amplificación y detección en una sola etapa [46].

Su éxito reside en la capacidad de detectar, en cada ciclo de la PCR, la cantidad de producto utilizando fluorescencia [48]. Se emplea un termociclador que tiene acoplado un sistema de detección capaz de cuantificar la señal emitida. Los productos de amplificación se observan a medida que transcurren los ciclos. La qPCR está basada en la detección y cuantificación de fluorescencia, señal que aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción.

Tinciones de qPCR

Los fluoróforos que se emplean para seguir la amplificación del ADN durante la qPCR solo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado el fragmento de interés [46] pueden ser de dos tipos:

- Fluoróforos con afinidad por el ADN
- Sondas para fragmentos específicos

El método de fluorescencia usado con mayor frecuencia es un colorante no específico denominado SYBR Green (Figura 12), el cual se une a todas las hebras de ADN de doble cadena emitiendo un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR [8].

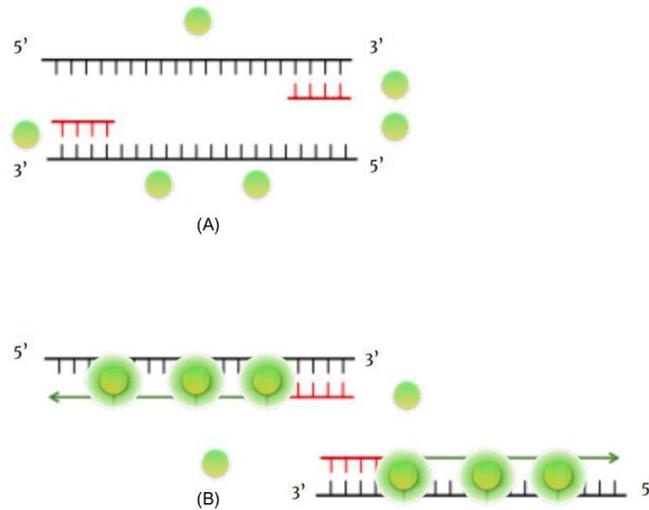


Figura 12: Mecanismo de acción del colorante SYBR Green [49]

(A) Cuando el ADN es desnaturalizado el colorante flota libre y emite baja fluorescencia. (B) El colorante se une a la doble cadena de los productos y emite alta fluorescencia

La disponibilidad de estas sondas fluorogénicas permitió el desarrollo de un método en tiempo real para detectar solo productos de amplificación específicos. Los sistemas de PCR en tiempo real se mejoraron mediante la introducción de sondas marcadas fluorogénicas que utilizan la actividad 5' nucleasa de la ADN polimerasa Taq.

Como cualquier PCR, los ensayos optimizados para PCR en tiempo real, TaqMan requieren una polimerasa, una plantilla de ADN, dos primers específicos para la región a amplificar, así como una sonda única, específica de secuencia (Figura 13).

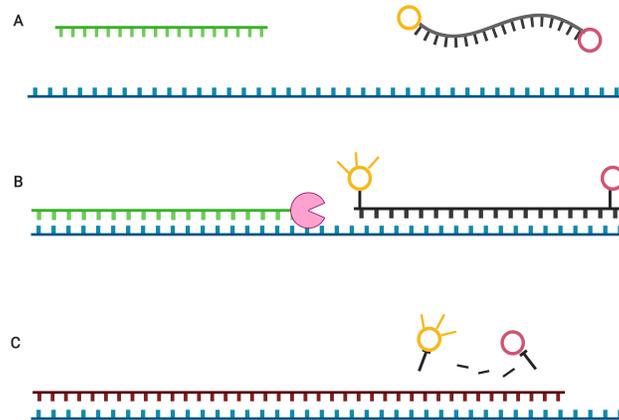


Figura 13: Mecanismo de acción del método Taqman

(A) Desnaturalización. (B) Alineamiento del primer/ hibridación de sonda. (C) Extensión. En amarillo se esquematiza a la fluoresceína y en rojo el quencher. Elaborada con www.biorender.com

La precisión de estos análisis depende de manera directa de la elección y del diseño de primers, por lo cual es considerado un punto crítico en el desarrollo de este tipo investigaciones [28].

2.5.2. Diseño de primers

Los oligonucleótidos iniciadores o primers son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN. El diseño de primers representa un punto crítico para la técnica de PCR, ya que deben diseñarse a partir del conocimiento de la secuencia de interés que se desea amplificar. Se utilizan dos secuencias diferentes de primers, una llamada forward y otra llamada reverse, ambas deben diseñarse de tal manera que hibriden con la secuencia de ADN de interés, sin exceder los porcentajes recomendados para las bases nitrogenadas [50].

El objetivo principal en el diseño de un primer es la especificidad, que se logra cuando cada miembro del par de primers se alinea de manera estable a la secuencia objetivo en el molde de ADN. Existen una serie de recomendaciones (Tabla 4), que pueden garantizar una buena amplificación de manera general [40].

Tabla 4: Propiedades de los primers que influyen en la eficiencia de la amplificación.

Propiedad	Diseño óptimo
Composición de la base	El contenido de G + C de 40 a 60 %, con una distribución de las cuatro bases a lo largo del primer
Longitud	La región del primer complementaria al molde debe tener de 18 a 25 nucleótidos. Los miembros del primer par no deben diferir en una longitud >3 bp
Secuencias autocomplementarias y repetidas	No deben estar presentes secuencias repetidas no invertidas o autocomplementarias >3 a lo largo del primer. Secuencias de este tipo tienden a formar estructuras hairpin, que en condiciones en la PCR pueden evitar el alineamiento efectivo
Complementariedad entre los miembros de los pares de primers	La secuencia terminal 3' de un primer no debe ser capaz de unirse a ningún sitio del otro primer. Como los primers están presentes en altas concentraciones en la PCR, incluso una complementariedad débil lidera formaciones híbridas en consecuencia la síntesis y amplificación de primers

Modificada de [40]

La selección de oligonucleótidos iniciadores es muy importante en la PCR. De ese paso depende el éxito en el trabajo experimental por lo cual es recomendable seguir estos criterios generales: tamaño ideal de 20 – 25 nucleótidos, la base en el extremo 3' debe ser una guanina o una citosina; el valor de la temperatura de fusión debe ser de 50 – 65°C, ya que sirve de referencia para fijar una temperatura para el alineamiento durante la reacción y un contenido de 40 – 60 % de guaninas y citosinas.

El método TaqMan para PCR en tiempo real utiliza un oligonucleótido que se alinea a una secuencia interna del fragmento de ADN a amplificar. Usualmente tiene de 20-24 bases de longitud y esta marcada en -una terminación con un grupo fluorescente [40].

3. Justificación

La extracción de ADN a partir de líquido ruminal, es una técnica de reciente uso en el departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Por lo que es necesaria la evaluación de diferentes protocolos de extracción, que permitan la detección e identificación de microorganismos y que se adecuen a los equipos y materiales disponibles en el laboratorio de Bromatología 2 ya que servirá para el desarrollo de estudios posteriores relacionados con los cambios en la microbiología ruminal con respecto a la alimentación.

4. Hipótesis

La técnica de extracción con mayor rendimiento será la que permita una mejor identificación de microorganismos ruminales.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Implementar una técnica de extracción de ADN a partir de líquido ruminal que permita la detección e identificación de microorganismos mediante PCR.

5.2. Objetivo Específico

Evaluar los protocolos modificados de acuerdo con los materiales y equipos presentes en el laboratorio de bromatología 2 del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica.

6. Metodología experimental

6.1. Obtención de la muestra

El protocolo de investigación (MC-2017/2–19) fue aprobado por el Subcomité Institucional para el Cuidado de Animales en Experimentación (SICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. El estudio fue realizado en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA), localizado en el kilómetro 29 de la carretera federal México-Cuernavaca a 2,800 metros sobre nivel del mar. La temperatura promedio anual es de 10 °C y la precipitación anual es de 1200 mm.

En un diseño completamente aleatorio, cinco vacas Holstein fueron utilizadas como donadores de líquido ruminal, fueron alimentadas con ensilados de avena y maíz (50 : 50, DM), las muestras ruminales fueron recolectadas a través de sonda esofágica de 12 cm y bomba de vacío (Pittsburg Automotive, EUA). El líquido ruminal de cada vaca fue sometido a los siguientes protocolos de extracción de ADN:

1. ADN cromosomal bacteriano (CB)
2. ADN genómico de bacteria (GB)
3. Homogenización con perlas acoplado a columna (PAC)
4. Paquete comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (ZBDMK)
5. Paquete comercial Stool DNA isolation kit (SDIK)

El líquido ruminal se filtró a través de cuatro capas de gasa estéril y se almacenó en tubos Falcon de 50 mL. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento del procesamiento para la extracción de ADN.

6.2. Obtención de pellet bacteriano

Las muestras de líquido ruminal fueron centrifugadas a 3650 RPM por 10 minutos (Thermo Scientific, Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge, Alemania). Se descartó el sobrenadante y la pastilla resultante se suspendió en 300 μL de PBS 1x (137 mM NaCl, IBI SCIENTIFIC, 2.7 mM KCl, J.T. Baker, 10 mM Na_2HPO_4 , J.T. Baker, 2 mM KH_2PO_4 Sigma-Aldrich) para posteriormente centrifugar a 500 RPM durante 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta su uso.

6.3. Extracción de ADN Cromosomal Bacteriano (CB)

Se realizaron modificaciones a la técnica reportada para aislamiento de ADN cromosomal a partir de bacterias gram positivas por Ulrich y Hughes [51]. Se tomaron 500 μL de pellet bacteriano y centrifugaron (Thermo Scientific, Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge, Alemania), a 5000 RPM por 10 minutos, se descartó el sobrenadante. A la pastilla, resultado de la centrifugación, se le agregaron 400 μL de buffer de lisis (50 mM EDTA, J.T. Baker, 50 mM Tris-HCl pH 8, Sigma-Aldrich, 5% Tritón X-100, Sigma-Aldrich) y se homogenizó. Se adicionaron 50 μL de lisozima (10 mg/mL, Sigma-Aldrich), se homogenizó y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se perforó el tapón del tubo para hervir en baño de agua durante un minuto. Se adicionaron 2 μL de RNAasa A (10 mg/mL, Sigma-Aldrich) y se incubó a 37°C (Thermo Scientific, Precision GP-05, E.U.A.) durante 30 minutos. Posteriormente se adicionó 1 μL de proteinasa K (20 mg/mL, Sigma-Aldrich) y se incubó a 50°C y 75°C durante 30 minutos, cada uno. Al concluir el periodo de incubación se adicionaron 160 μL de NaCl (5 M, IBI SCIENTIFIC). Se centrifugó a 14000 RPM por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se mezcló con 200 μL de cloroformo (Sigma-Aldrich). Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 14000 RPM por 15 minutos. Se agregó 1 x volumen de isopropanol frío (BDH) y se incubó por 16h a -20°C . Después de la incubación se centrifugó a 14000 RPM por 10 minutos. Se decantó el isopropanol y se realizaron dos lavados con 300 μL de etanol (70%, Sigma-Aldrich) y se centrifugó a 1000

RPM por 5 minutos. La pastilla de ADN se suspendió en 100 μL de agua grado biología molecular (Corning) y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

6.4. Extracción de ADN Genómico de Bacteria (GB)

Se realizaron modificaciones a la técnica reportada para obtener ADN genómico de bacteria por Wilson [52]. Se tomaron 500 μL del pellet bacteriano. Se centrifugó (Thermo Scientific, Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge, Alemania), a 5000 RPM por 10 minutos, se decantó el sobrenadante. A la pastilla, resultado de la centrifugación, se le agregaron 567 μL de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8, Sigma-Aldrich, 1 mM EDTA pH 8, J.T.Baker). Posteriormente se añadieron 50 μL de lisozima (10 mg/mL, Sigma-Aldrich) y se incubó a 37°C (Thermo Scientific, Precision GP-05, E.U.A.) durante 30 minutos. Se añadieron 30 μL de SDS (10 %, Bio-Rad) y 4 μL de proteinasa K (20 mg/mL, Sigma-Aldrich). Se incubó a 56°C durante una hora. Se adicionaron 100 μL de NaCl (5 M IBI SCIENTIFIC) y 100 μL de CTAB/NaCl (10 % CTAB, Sigma-Aldrich, 0.7 M NaCl, IBI SCIENTIFIC). Se incubó a 65°C por 10 minutos. Después se añadieron 80 μL de cloroformo: alcohol isoamílico (24 : 1, Sigma-Aldrich) y se centrifugó a 14000 RPM por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se agregó 1x volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25 : 24 : 1, Sigma-Aldrich). Se centrifugó a 14000 RPM por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante para adicionarle 200 μL de cloroformo (Sigma-Aldrich). Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para después centrifugar a 14000 RPM por 15 minutos. Al sobrenadante recuperado se le agregó 1x volumen de isopropanol frío (BDH) y se incubó por 16h a -20°C . Después de la incubación se centrifugó a 14000 RPM por 10 minutos. Se decantó el isopropanol y se realizaron dos lavados con 300 μL de etanol (70 %, Sigma-Aldrich) y se centrifugó a 1000 RPM por 5 minutos. La pastilla de ADN se suspendió en 100 μL de buffer TE y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

6.5. Extracción de ADN mediante Perlas Acoplado a Columna (PAC)

Se realizaron modificaciones a la técnica de extracción más reportada en estudios de rumiantes por Yu y Morrison [53]. Se transfirieron 200 μL de muestra a un tubo de 2 mL con perlas de zirconia y se adicionó 1 mL de buffer de lisis (50 mM EDTA, J.T. Baker, 50mM Tris-HCl pH 8, Sigma-Aldrich, 500 mM NaCl, IBI SCIENTIFIC, 0.4% SDS, MCB). Se homogenizó por 20 minutos en disruptor (Scientific Industries, Disruptor Genie, E.U.A.). El homogenizado se incubó a 70°C (Thermo Scientific, Precision GP-05, E.U.A.) durante 15 minutos y se centrifugó (Thermo Scientific, Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge, Alemania) a 15000 RPM durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo de 2 mL. Se adicionaron 300 μL de buffer de lisis al tubo con perlas de zirconia y se repitieron los pasos iniciales. Al pool de sobrenadantes se le adicionaron 260 μL de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ (10 M Sigma-Aldrich) e incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente se centrifugó 15000 RPM por 10 minutos a 4°C y se repartió el sobrenadante en dos tubos de 1.5 mL. Cada tubo se igualó en volumen con isopropanol (BDH). Se incubó en hielo durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó 15000 RPM por 15 minutos a 4°C y se removió el sobrenadante. La pastilla de ácidos nucleicos se lavó con 300 μL de etanol al (70%, Sigma-Aldrich). A continuación, se disolvieron las pastillas en 100 μL de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8, Sigma-Aldrich, 1 mM EDTA pH 8, J.T. Baker) y se realizó pool de alícuotas, que se purificó con columna del kit DNeasy Ultra Clean Microbial (Qiagen), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ADN se almacenó a -80°C hasta su análisis.

6.6. Extracción de ADN mediante ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (ZBDMK)

Se efectuaron las extracciones con el paquete comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep de la marca ZYMO RESEARCH para 200 μL de pellet bacteriano, siguiendo la metodología según el protocolo del fabricante. El ADN purificado se almacenó a -80°C hasta su análisis.

6.7. Extracción de ADN mediante Stool DNA isolation kit Norgen (SDIK)

Se efectuaron las extracciones con el paquete comercial Stool DNA isolation de la marca Norgen Biotek corp para 200 μL de pellet bacteriano, siguiendo la metodología según el protocolo del fabricante. El ADN purificado se almacenó a -80°C hasta su análisis.

6.8. Cuantificación de las muestras

Se determinaron absorbancias a 260, 280 y 230 nm para 2 μL de cada muestra utilizando un espectrofotometro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Nanodrop 2000 Spectrophotometer, EUA). La calidad del ADN se determinó mediante electroforesis; para esto se tiene que preparar un gel de agarosa al 0.8 %, para lo cual se disolvieron 0.28 g de agarosa en 35 mL de buffer TAE. Se realizó la electroforesis a 115 V durante 50 min.

Posteriormente el gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Thermo Fisher Scientific) y escaneado a través de un fotodocumentador Gel Doc System (Bio-Rad, Gel Doc XR+ System, E.U.A).

6.9. PCR

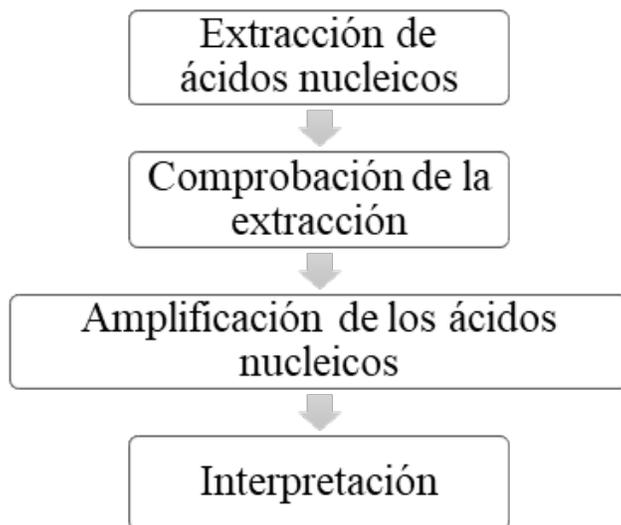


Figura 14: Esquema general de la técnica de PCR.

6.10. Diseño de primers

Para el diseño de los primers que se utilizaron para identificar la presencia de microorganismos ruminales, se buscó la secuencia del gen 16SrRNA para *Fibrobacter succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella* spp. y de *Methanogenic* spp. Se emplearon los siguientes programas bioinformáticos:

- OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>)
- Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)
- GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

6.11. PCR punto final

La mezcla de reacción para la PCR punto final fue preparada en un volumen final de 50 μL : 2 μL ADN, 1 μL primer forward, 1 μL primer reverse, 25 μL Mytaq polimerasa (Bioline, BIO-25041) y 21 μL agua biología molecular (Corning).

La pareja de primers utilizados fue proporcionada por la Maestra en Ciencias Cindy Adriana Estrada Hernández del Laboratorio 312, Departamento de Alimentos y Biotecnología. Las características de dicho par se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5: Par de primers diseñados para PCR punto final

Nombre del primer	Secuencia	T _m	Longitud amplicón	Referencia
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	46.8 °C	1800	[54]
rD1	AAGGAGGTGATCCAGCC			

Se realizó PCR punto final usando un termociclador Veriti (Thermo Fisher Scientific, Veriti 96 well Thermal Cycler, E.U.A.) programado con las condiciones proporcionadas por la Maestra en Ciencias Cindy Adriana Estrada Hernández del Laboratorio 312, Departamento de Alimentos y Biotecnología, mostradas en Tabla 6.

Tabla 6: Condiciones para PCR punto final.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	3 min
Desnaturalización	95°C	30 s
Alineación (35 ciclos)	42°C	30 s
Extensión	72°C	3 min
Extensión final	72°C	10 min

Para los productos de PCR punto final, se realizó electroforesis, para esto se tiene que preparar un gel de agarosa al 2%, para lo cual se disolvieron 0.7 g de agarosa en 35 mL de buffer TAE. Se realizó la electroforesis a 95 V durante 60 min. Posteriormente el gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL, Thermo Fisher Scientific) y escaneado a través de un fotodocumentador Gel Doc System (Bio-Rad, Gel Doc XR+ System, E.U.A).

6.12. Rangos dinámicos para PCR tiempo real (qPCR)

La mezcla de reacción para el rango dinámico fue preparada en un volumen final de 20 μL : 2 μL ADN (Concentración final 10 ng/ μL), 0.8 μL de primers, 10 μL de Kapa SYBR Green y 7.2 μL de agua grado biología molecular. La pareja de primers empleados fueron 27F y 519R que corresponden a la región V1-V3 del 16S rRNA.

6.13. PCR tiempo real (qPCR)

La mezcla de reacción para la amplificación PCR tiempo real fue preparada utilizando SYBR Green en un volumen final de reacción de 20 μL : 2 μL ADN (Concentración final 6 ng/ μL), 0.8 μL de primers, 10 μL de Kapa SYBR Green y 7.2 μL de agua grado biología molecular. Las parejas de primers utilizados se presentan en la Tabla 7 y amplifican para la región del gen 16S rRNA.

Tabla 7: Pares de primers empleados para PCR tiempo real.

Nombre del primer	Secuencia	T _m	Longitud amplicón	Referencia
Fibro_succ: F	GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA	56 °C	118	Este trabajo
Fibro_succ: R	CGCCTGCCCCTGAACTATC			
27: F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	60 °C	122	[55]
519: R	GTATTACCGCGGCTGCTG			
Prev_genus: F	GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT	58 °C	83	Este trabajo
Prev_genus: R	CGGACGTAAGGGCCGTGC			
B_fib: F	AGTAACGCGTGGGTAACCTG	60 °C	219	Este trabajo
B_fib: R	CGTGTCTCAGTCCCAATGTG			

Se realizó PCR punto final usando un termociclador Veriti (Thermo Fisher Scientific, Veriti 96 well Thermal Cycler, E.U.A.) programado con las condiciones proporcionadas por la Doctora

Claudia Cecilia Márquez Mota, mostradas en Tabla 8.

Tabla 8: Condiciones para qPCR.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	3 min
Desnaturalización	95°C	3 s
Alineación (40 ciclos)	60°C	20 s
Extensión	60°C	20 s

6.14. Análisis de qPCR

La estrategia de análisis para la PCR tiempo real consistió en la cuantificación relativa basada en los niveles de expresión de un gen objetivo contra uno de referencia. Para calcular la expresión de un gen objetivo en relación con un gen de referencia adecuado, se establecen varios modelos matemáticos. Los cálculos se basan en la comparación del ciclo distinto determinado por diversos métodos, por ejemplo, puntos de cruce y valores de umbral (Ct) a un nivel constante de fluorescencia [56].

6.15. Análisis estadístico

El experimento se llevó a cabo en un diseño completamente al azar, con cinco extracciones por técnica por duplicado. Los valores se expresan como las medias \pm EEM. La concentración de ADN, las relaciones 260/280 y 260/230 se compararon mediante ANOVA de una vía seguido del análisis post hoc de Tukey (SAS, versión 9.1, SAS Inst., Inc., Cary, NC).

7. Resultados y discusión.

7.1. Extracciones de ADN

En el presente trabajo se analizó la concentración y calidad de extractos de ADN aislados a partir de líquido ruminal mediante cinco técnicas distintas. Esto con la finalidad de implementar la adecuada a la infraestructura del laboratorio de bromatología 2 del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica. La primera técnica evaluada (CB) es una modificación a la reportada por Ulrich y Hughes [51], considerada una técnica tradicional que permite obtener ADN cromosomal bacteriano a partir de cepas aisladas gram positivas. La segunda técnica evaluada (GB) es una modificación a la reportada por Wilson donde se obtiene ADN genómico de bacteria a partir de cultivos líquidos saturados. La tercera técnica evaluada (PAC) es una modificación a la reportada por Yu y Morrison [53] para extracciones a partir de muestras digestivas y fecales, la cual utiliza disrupción con perlas y purificación acoplada a columna. La cuarta técnica evaluada (ZBDMK) corresponde al paquete comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit, el cual dentro de las especificaciones garantiza la obtención de ADN libre de inhibidores a partir de muestras de origen variado (heces, suelo, agua, biopelículas, fluidos corporales, etc.) lo cual resulta óptimo para el desarrollo de aplicaciones posteriores incluyendo PCR y secuenciación del gen del 16S rRNA. La quinta técnica evaluada (SDIK) corresponde al paquete comercial Stool DNA Isolation Kit, el cual mediante una combinación de homogenización química, física y lisis sin utilizar fenol-cloroformo, garantiza ADN de alta calidad compatible con aplicaciones posteriores como PCR y secuenciación. Para cada técnica, se analizó la concentración, calidad y pureza del ADN. La concentración de ADN en las muestras fue cuantificada mediante análisis espectrofotométrico a una absorbancia de 260 nm. La concentración menor (91.6 % $P < 0.05$) de ADN se obtuvo con la técnica PAC comparando con los protocolos CB, GB y ZDMK, se puede atribuir esto a la falta de lisozima en dicha técnica, la lisozima es una enzima capaz de hidrolizar el enlace $\beta - (1, 4)$ entre N-acetil glucosamina y los residuos de N-acetil murámico presentes en el proteoglicano en las paredes celulares bacterianas [40].

En cuanto a diversidad, la técnica con la cual se obtuvo mayor concentración (CB) presentó altos niveles de expresión relativa para *Prevotella* spp y *Butyrivibrio fibrisolvens* por lo cual se recomienda para estudios de aproximación para dichos microorganismos. Para *Fibrobacter succinogenes* y arqueas metanogénicas se recomienda la técnica GB.

Es importante considerar que se utilizó el equipo de homogenización disruptor genie analógico, el cual es un equipo que ofrece una acción multidireccional en donde permite la homegenización y la mezcla a una alta velocidad. Sin embargo, a pesar de las características antes mencionadas este equipo no es el óptimo para esta técnica [53].

Los protocolos comúnmente usados para la extracción de ADN a partir de cultivos bacterianos: CB y GB presentaron la concentración mayor de ADN ($P < 0.05$) en comparación con los paquetes comerciales. Obtener concentraciones altas de ADN con parámetros de calidad aceptables resulta útil para aplicaciones posteriores, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o para secuenciación de nueva generación (NGS). Técnicas que utilizan proteinasa K obtienen concentraciones mayores de ADN.

Una vez determinada la concentración, antes de utilizar las muestras de ADN en técnicas analíticas, la calidad del extracto debe ser determinada mediante indicadores que consideren la pureza y la integridad. Con la finalidad de obtener los parámetros de calidad de cada muestra es necesario determinar absorbancias a 280 nm y a 230 nm, la relación de la absorbancia a 260 nm con el primero nos permite detectar la contaminación con proteínas y con el segundo indica la presencia de compuestos orgánicos como fenoles o tiocianatos [40]. Por lo tanto, es común reportar las relaciones 260/280 y 260/230 para determinar la pureza de los extractos de ADN. Para el primer parámetro los cinco protocolos presentaron resultados dentro del límite ($\text{Ratio } 260/280 = 1.6-1.8$ y $\text{Ratio } 260/230 = 1.8-2.0$) para ser considerados extractos libres de contaminación proteica por lo tanto de pureza aceptable (Tabla 9). En cuanto a la relación 260/230 resultó un parámetro decisivo en la evaluación de técnicas, ya que el protocolo GB fue el único técnica donde los extractos obtenidos resultaron libres de sales, carbohidratos y fenoles.

Tabla 9: Concentración y pureza de ADN aislado por diferentes métodos.

Método	ADN [ng/ μ L]	Relación 260/280	Relación 260/230
CB	364.1 \pm 11.4 ^a	1.71 \pm 0.01 ^b	1.3 \pm 0.03 ^c
GB	165.4 \pm 11 ^b	1.84 \pm 0.007 ^a	1.9 \pm 0.03 ^a
PAC	16.2 \pm 0.9 ^d	1.84 \pm 0.01 ^a	0.6 \pm 0.03 ^e
ZBDMK	47.6 \pm 2.7 ^c	1.84 \pm 0.02 ^a	1.6 \pm 0.04 ^b
SDIK	37.2 \pm 0.43 ^{cd}	1.76 \pm 0.007 ^b	1.1 \pm 0.01 ^d

CB: ADN cromosomal bacteriano, GB: ADN genómico de bacteria, PAC: Homogenización con perlas acoplado a columna, ZBDMK: Paquete comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit y SDIK: Paquete comercial Stool DNA isolation Kit. Los valores son la media \pm EEM por tratamiento, n=5. Medias en una columna sin letra común difieren entre sí, $p < 0.05$ (a>b>c>d). Las diferencias se determinaron mediante ANOVA de una vía, se usó prueba Tukey como post hoc.

7.2. Electroforesis

Se determinó la integridad de los extractos de ADN mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (Figura 15). Se observa que las muestras obtenidas con los protocolos CB Y PAC muestran una mancha de desplazamiento, se ha informado que esto podría deberse a una sobrecarga de muestra; sin embargo, este no es el caso porque se cargaron 10 ng de cada muestra en el gel. La mancha podría ser una fragmentación de las muestras, en el caso del protocolo PAC pudo ocurrir durante la homogenización. Para los kits comerciales ZBDMK y SDIK, así como para el protocolo GB observamos una línea tenue en la parte superior del gel que indica la presencia de ADN genómico.

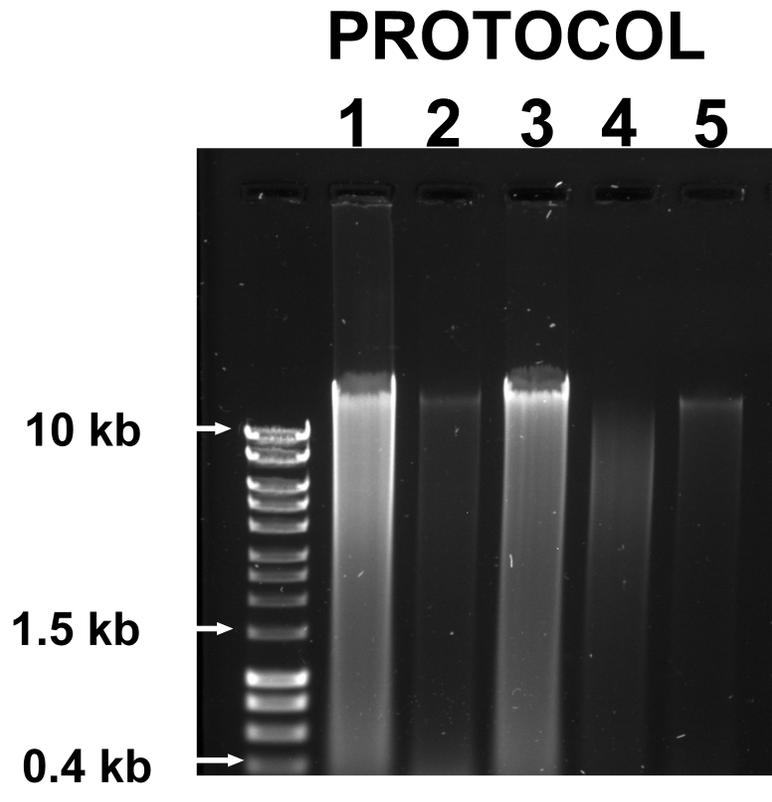


Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de muestra representativa de ADN aislado mediante diferentes protocolos. 1: Cromosomal Bacteriano (CB), 2: Genómico de Bacteria (GB), 3: Homogenización con perlas acoplado a columna (PAC). 4: Paquete comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (ZBDMK) y 5 Paquete comercial Stool DNA isolation kit (SDIK).

7.3. PCR punto final

Para confirmar la presencia de ADN genómico, se realizó PCR punto final para amplificar el gen 16S rRNA, observamos productos de 1.6 Kb para todos los protocolos (Figura 16). El análisis mediante el 16S rRNA resulta una aproximación estándar para la identificación de diversidad microbiana.

Los resultados obtenidos muestran que todos los protocolos permiten el aislamiento de ADN genómico, sin embargo, presentan diferencias en los productos obtenidos; en el caso de GB, PAC y paquetes comerciales, las bandas correspondientes a los carriles 1, 3, 4, y 5 respectivamente, se observan productos y bandas inespecíficas, esto podría ser por un exceso de producto o por la

fragmentación posterior de las muestras y puede estar también asociada a las particularidades de cada método.

La fragmentación de las muestras podría causar una unión inespecífica de los cebadores del ADN y probablemente esa sea la razón por la que observamos los productos de alto peso molecular. En el caso de GB, carril 2, se observa la banda más clara para el producto de 1.6 kb, así como menor fragmentación.

Al ser la temperatura de alineamiento de 42 °C se favorece la amplificación de bandas inespecíficas para lo cual se sugiere aumentar la temperatura de alineamiento.

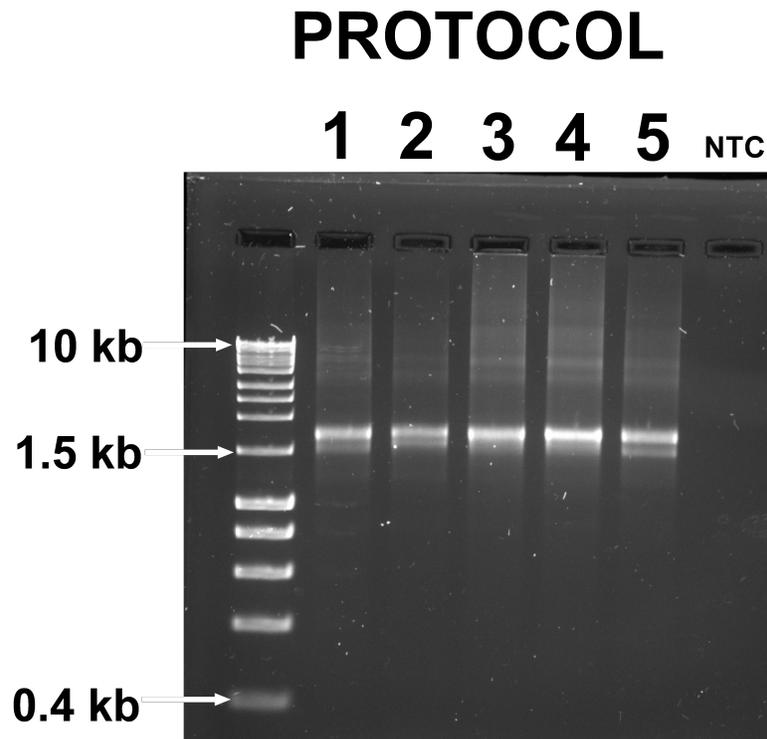


Figura 16: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de PCR amplificados para el 16S. 1: Cromosomal Bacteriano (CB), 2: Genómico de Bacteria (GB), 3: Homogenización con perlas acoplado a columna (PAC). 4: Paquete comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (ZBDMK) y 5) Paquete comercial Stool DNA isolation kit (SDIK)

7.4. Rangos dinámicos para qPCR

Lo anterior permitió continuar con la identificación de microorganismos específicos a través de la técnica de qPCR. Para lo cual es necesario realizar rangos dinámicos que permiten determinar la concentración de ADN óptima para realizar la qPCR. Para los rangos dinámicos se realizó pool de alícuotas de las 5 técnicas a una concentración final de 10 ng/ μ L. Se realizó una curva de calibración con diluciones 1 : 2 dentro del rango de concentraciones de 10 y 0.625 ng/ μ L.

Para cada concentración de ADN de cada técnica se llevó a cabo la PCR en tiempo real por triplicado incluyendo blancos. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para la región variable V1-V3 del gen 16SrRNA, el cual ha sido reportado como la mejor región para estudios del microbiota ruminal.

La concentración para la qPCR fue calculada de la siguiente forma: se determinó el Ct y a partir de estos valores se realizó una curva de calibración graficando Ct en función del logaritmo de la concentración de ADN.

Se determinó la linealidad, la eficiencia y el rango dinámico (Figura 17).

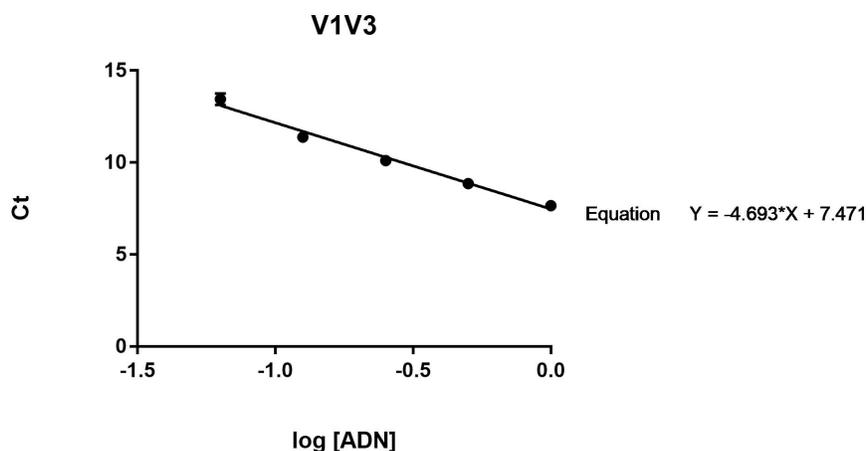


Figura 17: Rangos dinámicos

La concentración óptima de ADN, resultado de este análisis, fue de 6 ng/ μ L. El valor del Ct nos dice la eficiencia del primer. Se ocupó la aplicación de Thermo Fisher Scientific (qPCR Efficiency

Calculator) para determinar la eficiencia de amplificación de la qPCR basada en el análisis de la ecuación de la recta. El valor de -4.7 para la pendiente nos indica una eficiencia del 63%. Lo que indica que se puede mejorar el diseño del primer para aumentar la eficiencia.

Una vez determinada la concentración adecuada de ADN con referencia a la región variable V1-V3, se efectuó PCR tiempo real (qPCR) para la identificación específica de las bacterias celulolíticas *Fibrobacter succinogenes* y *Butyrivibrio fibrisolvens*, así como para identificación general de *Prevotella* spp. y de *Methanogenic* spp.

La qPCR es la técnica más sensible y específica para la detección de ácidos nucleicos. A pesar de que ha existido por más de treinta años y es preferida en aplicaciones de investigación, aún tiene que ganar aceptación en la práctica de rutina en el laboratorio [57].

7.5. PCR tiempo real (qPCR)

De acuerdo a la diversidad microbiana presente en el rumen determinar 4 microorganismos no es suficiente para decir que el método funciona sin embargo 2 de los utilizados en este trabajo son representativos de bacterias celulolíticas, uno para hemicelulíticas y otro para metanógenos.

Bacterias del género *Prevotella* spp., dos especies de bacterias celulolíticas, incluyendo *Fibrobacter succinogenes* y *Butyrivibrio fibrisolvens* se cuantificaron a partir de líquido ruminal mediante qPCR tiempo real, así como arqueas metanogénicas.

***Prevotella* spp.**

Se ha observado a *Prevotella* como la especie bacteriana dominante en el rumen bajo diversas condiciones dietéticas. Este género, es uno de los más abundantes en el rumen [58]. Además, tres especies ruminales del género *Prevotella* representan hasta el 70% de la población bacteriana ruminal [24].

Para *Prevotella* spp. los protocolos CB y SDIK obtuvieron la mayor expresión relativa, mientras la técnica GB presentó la menor expresión relativa para este microorganismo (Figura 18).

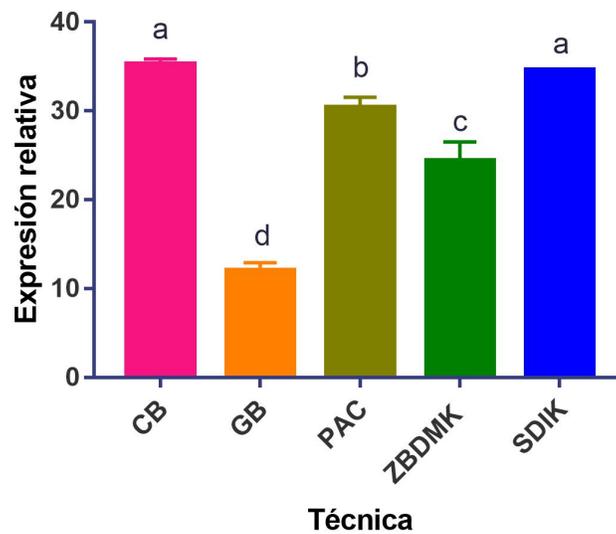


Figura 18: *Prevotella* spp.

CB: ADN cromosomal bacteriano, GB: ADN genómico de bacteria, PAC: Homogenización con perlas acoplado a columna, ZBDMK: Paquete comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit y SDIK: Paquete comercial Stool DNA isolation Kit. Los valores son la media \pm EEM por tratamiento, $n=3$. Medias en una columna sin letra común difieren entre sí, $p < 0.05$ ($a > b > c$). Las diferencias se determinaron mediante ANOVA de una vía, se usó prueba Tukey como post hoc.

La diversidad de especies dentro del género *Prevotella* spp. incluye microorganismos hemicelulolíticos, proteolíticos así como amilolíticos y se ha encontrado de manera abundante en líquido ruminal Angus proveniente de bovinos criados para el consumo de su carne [19], por lo cual es recomendable su uso en estudios en los cuales estos sean los microorganismos blanco.

Fibrobacter succinogenes

La técnica de extracción de ADN genómico de bacteria (GB) obtuvo la mayor proporción ($P < 0.05$) de *Fibrobacter succinogenes*, bacteria degradadora de celulosa mientras ZBDMK identificó la menor cantidad (Figura 19).

Fibrobacter succinogenes usa una variedad de enzimas hemicelulolíticas para acceder a la celulosa. El genoma de *F. succinogenes* revela una bacteria que se especializa en celulosa como única fuente de energía y su estudio proporciona información sobre nuevas estrategias para la degradación de celulosa [59].

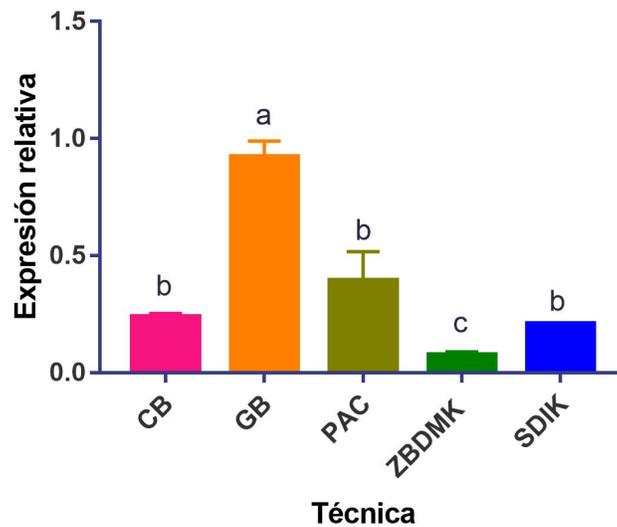


Figura 19: *Fibrobacter succinogenes*

CB: ADN cromosomal bacteriano, GB: ADN genómico de bacteria, PAC: Homogenización con perlas acoplado a columna, ZBDMK: Paquete comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit y SDIK: Paquete comercial Stool DNA isolation Kit. Los valores son la media \pm EEM por tratamiento, $n=3$. Medias en una columna sin letra común difieren entre sí, $p < 0.05$ ($a > b > c$). Las diferencias se determinaron mediante ANOVA de una vía, se usó prueba Tukey como post hoc.

Butyrivibrio fibrisolvens

Butyrivibrio fibrisolvens representa aproximadamente del 10-30 % del cultivo bacteriano ruminal, desempeña un rol importante en la degradación de fibra y se identifica como la principal especie bacteriana que participa en el proceso de biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados presentes en las dietas basadas en forraje, granos y aceites [60].

La técnica de extracción de ADN Cromosomal bacteriano (CB) presentó la mayor expresión relativa ($P < 0.05$) de *Butyrivibrio fibrisolvens* en comparación con las demás técnicas (Figura 20).

Butyrivibrio fibrisolvens fermenta todos los xilanos y la glucosa mejor que cualquiera de las cepas de *Prevotella*, que no difieren entre sí [61].

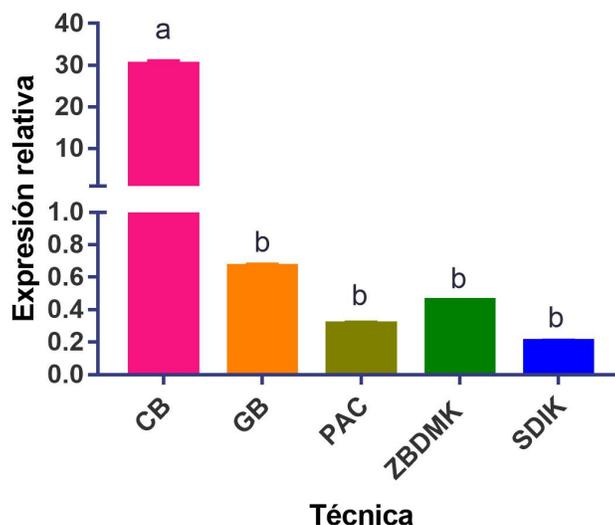


Figura 20: *Butyrivibrio fibrisolvens*.

CB: ADN cromosomal bacteriano, GB: ADN genómico de bacteria, PAC: Homogenización con perlas acoplado a columna, ZBDMK: Paquete comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit y SDIK: Paquete comercial Stool DNA isolation Kit. Los valores son la media \pm EEM por tratamiento, $n=3$. Medias en una columna sin letra común difieren entre sí, $p < 0.05$ ($a > b > c$). Las diferencias se determinaron mediante ANOVA de una vía, se usó prueba Tukey como post hoc.

Methanogenic spp.

La investigación de estrategias que permitan la cuantificación de metanógenos con el fin de mitigar las emisiones de metano en bovinos resulta de suma importancia en la actualidad. La técnica de extracción de ADN genómico de bacteria (GB) refleja los mejores resultado para la identificación de este tipo microbiano partiendo de líquido ruminal.

Los sistemas pecuarios influyen de manera significativa en el fenómeno conocido como calentamiento global. El cambio climático representa un problema con consecuencias ambientales, económicas, políticas y sociales. Las emisiones de dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O) generadas directa o indirectamente en las actividades pecuarias, contribuyen ampliamente en las emisiones antropogénicas de gases de efecto invernadero (GEI) [8].

El CH_4 corresponde a un 21 % de los gases derivados de la fermentación entérica del ganado, siendo los bovinos los principales responsables de dichas emisiones [62].

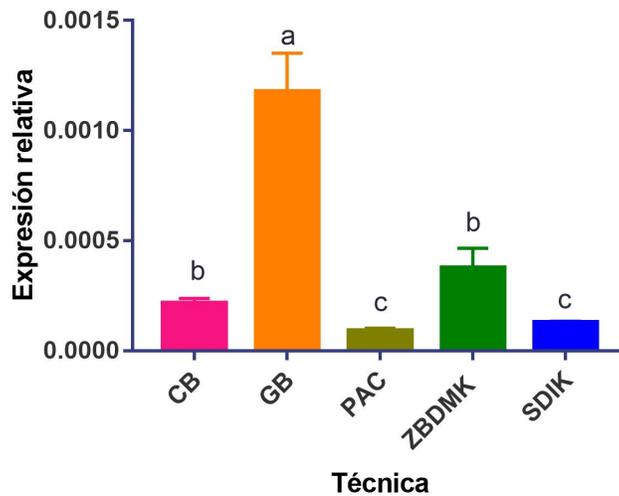


Figura 21: *Methanogenic* spp.

CB: ADN cromosomal bacteriano, GB: ADN genómico de bacteria, PAC: Homogenización con perlas acoplado a columna, ZBDMK: Paquete comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit y SDIK: Paquete comercial Stool DNA isolation Kit. Los valores son la media \pm EEM por tratamiento, $n=3$. Medias en una columna sin letra común difieren entre sí, $p < 0.05$ ($a > b > c$). Las diferencias se determinaron mediante ANOVA de una vía, se usó prueba Tukey como post hoc.

Se ha estimado que el tiempo de vida atmosférica para este gas es de aproximadamente 12 años [63]. Existe una diversidad de arqueas metanogénicas en el rumen como *Methanobrevibacter rumiantium* que se ha comprobado presenta adhesión a protozoarios mediante proteínas [64].

Las diferencias observadas entre protocolos se pueden atribuir a diferentes factores. Uno de ellos es la fragmentación asociada a cada técnica, ya que en las muestras fragmentadas resulta complicado que los primers encuentren la sección específica a amplificar.

Debido a lo anterior, al momento de diseñar un experimento en donde se quieran identificar microorganismos ruminales, es importante considerar el método de extracción de ADN a emplear.

8. Conclusiones.

- Los protocolos evaluados permiten la extracción de ADN a partir de líquido ruminal.
- En términos de concentración, y calidad, el aislamiento de ADN genómico de bacteria (GB) resulta el protocolo que mejor se adecua a las condiciones e infraestructura del departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Todos los protocolos amplificaron para el gen rRNA 16S.
- El protocolo genómico de bacteria (GB) obtuvo mejor producto en PCR punto final así como expresiones relativas altas para *Fibrobacter succinogenes* y *Methanogenic* spp en la qPCR.
- Bacterias del género *Prevotella* se identificaron mejor con el paquete comercial ZymoBIO-MICS DNA Miniprep Kit (SDIK).
- La técnica extracción de ADN Cromosomal Bacteriano (CB) resultó el protocolo óptimo para la identificación de *Butyrivibrio fibrisolvens*.
- La técnica de extracción de ADN genómico de bacteria (GB) resultó el protocolo óptimo para la identificación de *Fibrobacter succinogenes*.

9. Perspectivas.

1. Estudiar la microbiota ruminal a través de secuenciación masiva.
2. Estudios direccionados a microorganismos y dietas en particular.

10. Anexos.

10.1. Preparación de soluciones para la extracción de ADN

Obtención de pellet bacteriano.

- El buffer para la obtención de los pellets bacterianos se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10: Buffer de fosfatos PBS (10x)

	100 mL	250 mL	1 L
$NaCl$ (g)	8	20	80
KCl (g)	0.2	0.4	2
Na_2HPO_4 (g)	2.56	6.4	25.6
KH_2PO_4 (g)	0.2	0.4	2

Soluciones para técnica de extracción de ADN Cromosomal Bacteriano (CB).

- El buffer de lisis empleado para la técnica CB se describe en la Tabla 11.

Tabla 11: Reactivos utilizados para buffer de lisis CB

	[] Inicial	[] Final	25 mL	50 mL	100 mL
EDTA (mL)	0.5 M	50 mM	2.5	5	10
Tris-HCl pH 8 (mL)	1 M	50 mM	1.25	2.5	5
Tritón (mL)	100 %	5 %	1.25	2.5	5

- La preparación de Lisozima se describe en la Tabla 12.

Tabla 12: Lisozima

	Cantidad (g)	Volumen (mL)	[] Final
Lisozima	0.01	1	10 mg/mL

- La preparación de RNAasa se describe a continuación:

Disolver RNAasa a una concentración de 10 mg/mL en 0.01 M de acetato de sodio pH 5.2. Calentar a 100 °C por 15 min. Permitir que se enfríe a temperatura ambiente. Ajustar el pH añadiendo 0.1 volúmenes de 1 M Tris-Cl pH 7.4, hacer alícuotas y almacenar a -20 °C

- La preparación de NaCl se describe en la Tabla 13.

Tabla 13: NaCl

	Cantidad (g)	Volumen (mL)	[] Final
NaCl	29.22	100	5 M

Soluciones para técnica de extracción de ADN Genómico de Bacteria (GB)

- El buffer TE se describe en la Tabla 14.

Tabla 14: Buffer TE

	[] Inicial	[] Final	25 mL	50 mL	100 mL
EDTA (mL)	0.5 M	1 mM	0.05	0.1	0.2
Tris-HCl pH 8 (mL)	1 M	10 mM	0.25	0.5	1

- SDS se describe en la Tabla 15.

Tabla 15: SDS

	Cantidad (g)	Volumen (mL)	[] Final
SDS	10	100	10 %

- El CTAB/NaCl se describe en la Tabla 16.

Tabla 16: CTAB/NaCl

	[] Final	100 mL	250 mL
CTAB (g)	10 %	10	25
NaCl (g)	0.7 M	4.1	11.25

Soluciones para técnica de extracción de ADN mediante Perlas Acoplado a Columna (PAC).

- El buffer de lisis empleado para la técnica PAC se describe en la Tabla 17.

Tabla 17: Buffer de lisis PAC

	[] Inicial	[] Final	25 mL	50 mL	100 mL
EDTA (mL)	0.5 M	50 mM	2.5	5	10
Tris-HCl pH 8 (mL)	1 M	50 mM	1.25	2.5	5
NaCl (mL)	5 M	500 mM	2.5	5	10
SDS (mL)	10 %	0.4 %	1	2	4

- La preparación de Acetato de amonio se describe en la Tabla 18.

Tabla 18: Acetato de amonio

	Cantidad (g)	Volumen (mL)	[] Final
Acetato de amonio	77	100	10 M

10.2. Esquemas de técnicas de extracción de ADN

CB

Extracción de ADN Cromosomal Bacteriano (CB)

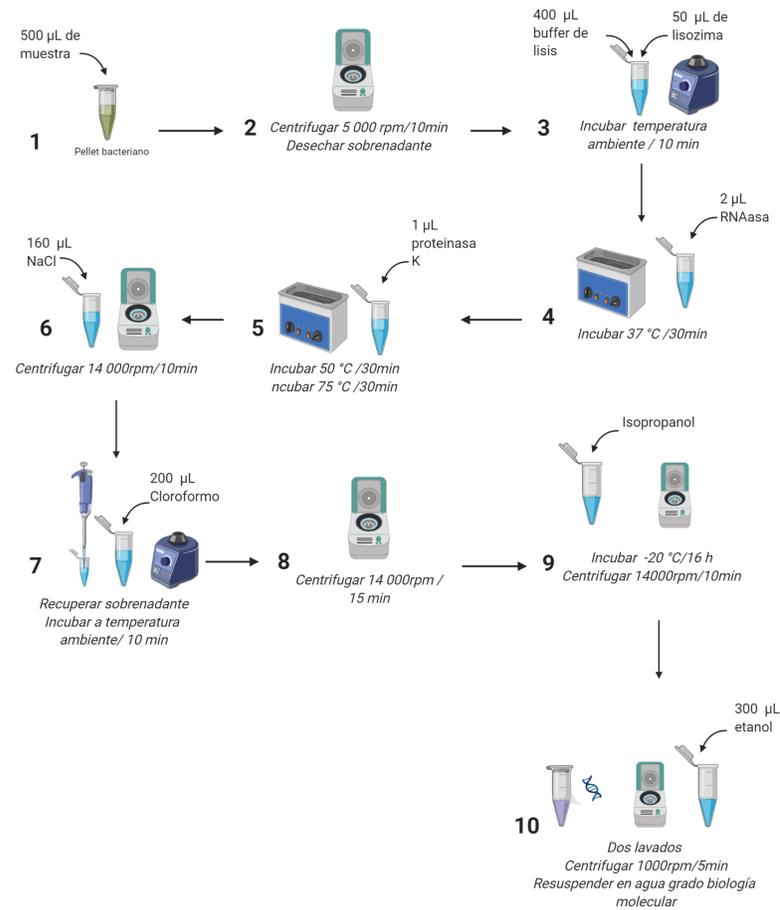


Figura 22: Extracción de ADN Cromosomal Bacteriano (CB)

Elaborada con www.biorender.com

GB

Extracción de ADN Genómico de Bacteria (GB)

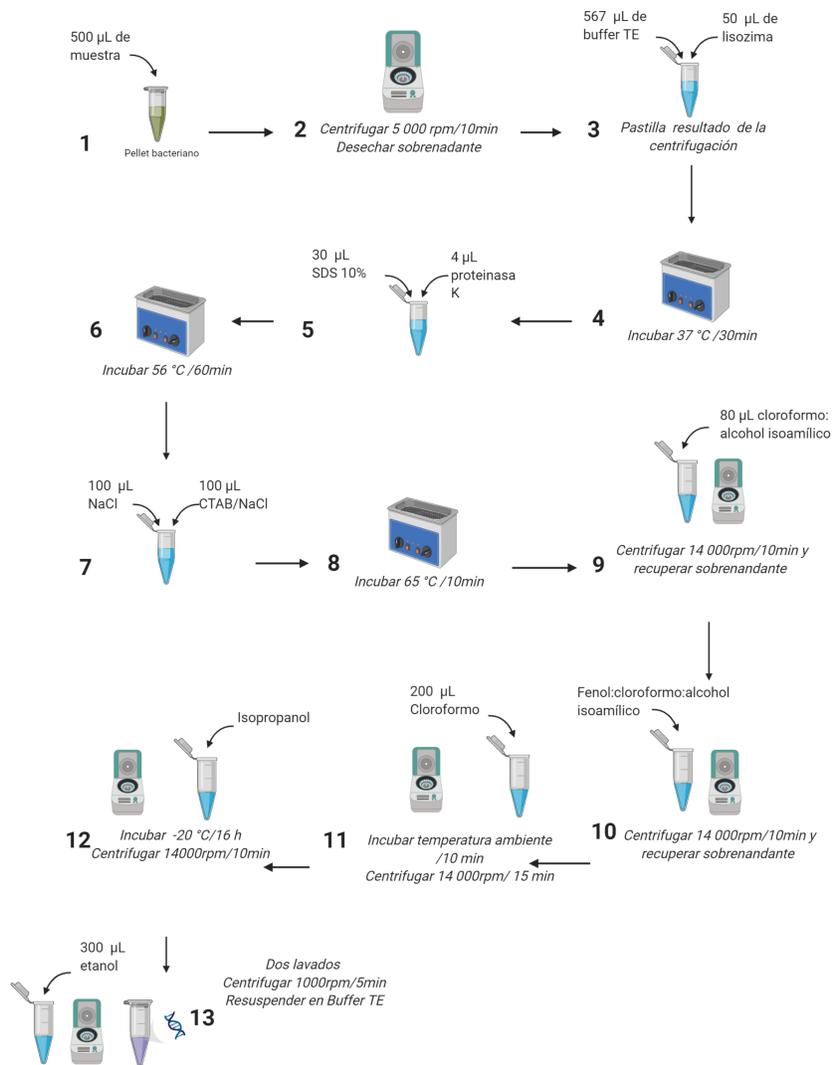


Figura 23: Extracción de ADN Genómico de Bacteria (GB)

Elaborada con www.biorender.com

PAC

Extracción de ADN mediante Perlas Acoplado a Columna (PAC)

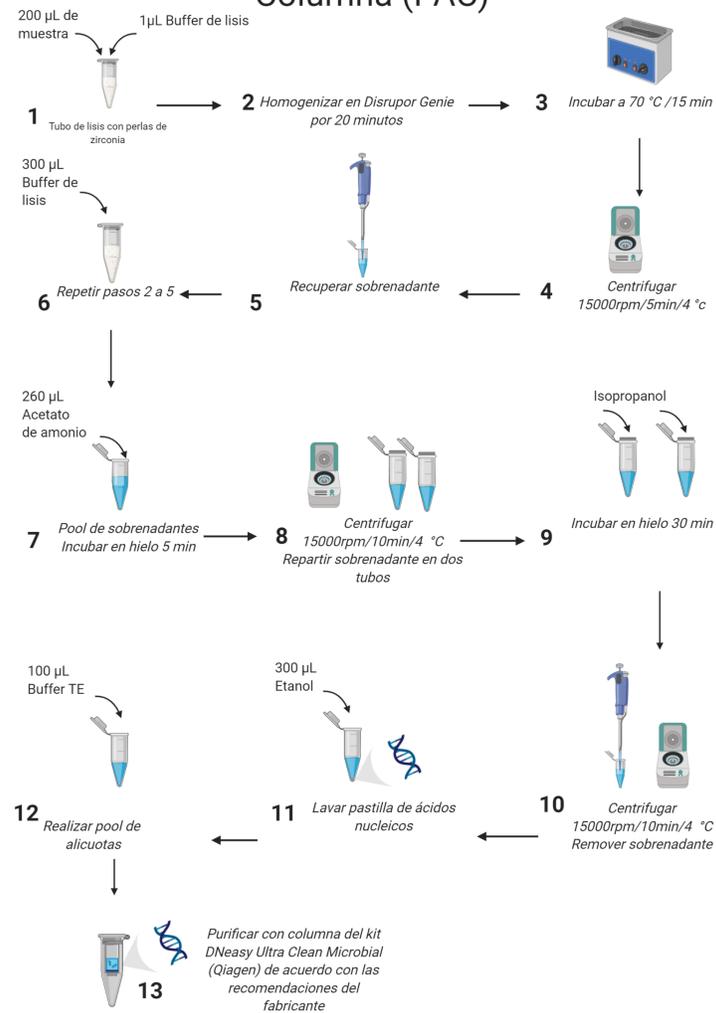


Figura 24: PAC

Elaborada con www.biorender.com

ZBDMK

ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit

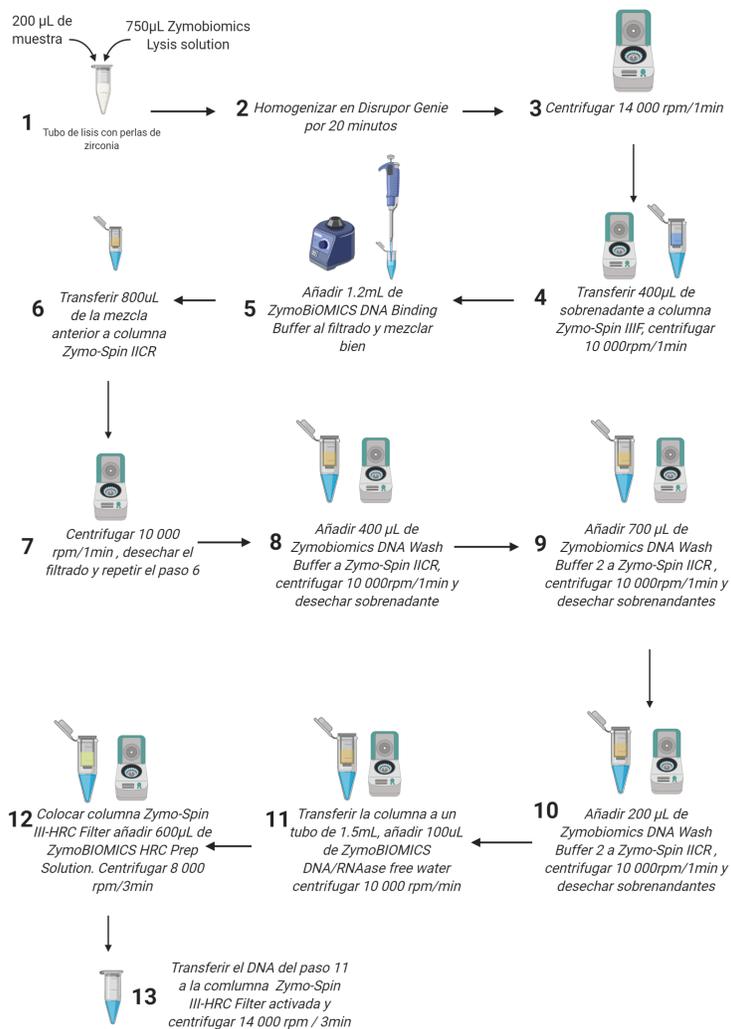


Figura 25: ZBMDK
Elaborada con www.biorender.com

SDIK

Stool DNA isolation kit Norgen

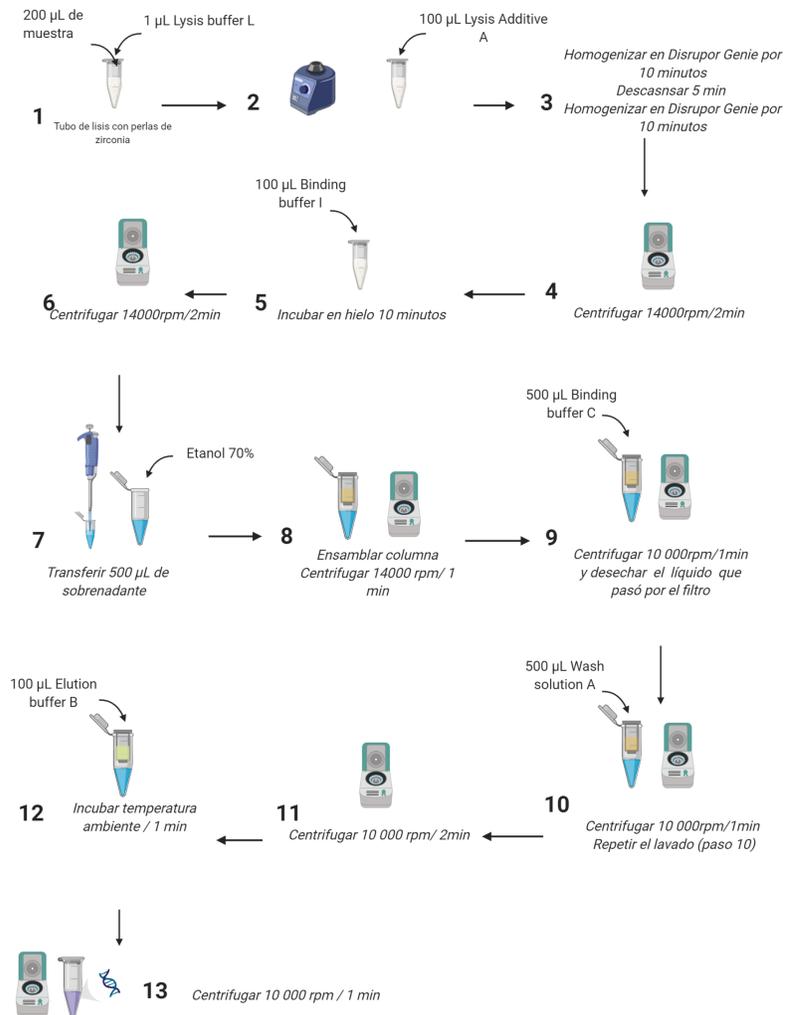


Figura 26: SDIK
Elaborada con www.biorender.com

10.3. Gráficos de amplificación qPCR

Gráfico de amplificación para *Prevotella* spp.

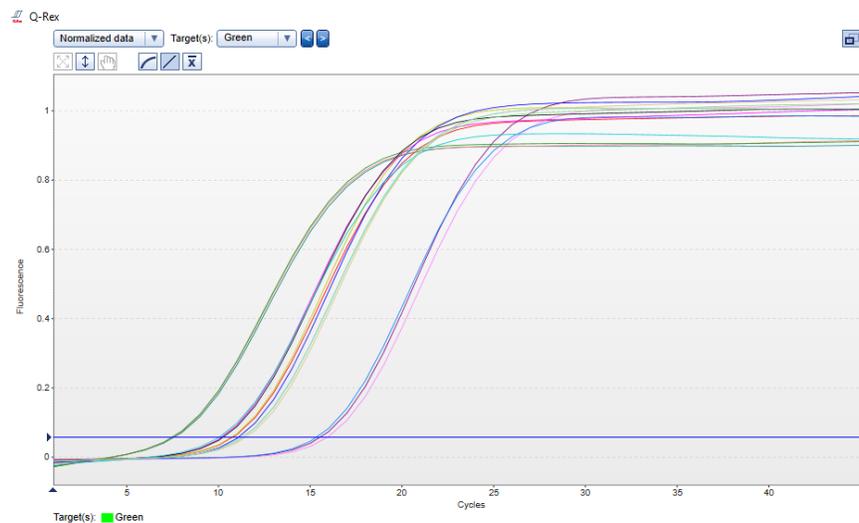


Figura 27: *Prevotella* spp. qPCR

Gráfico de amplificación para *Fibrobacter succinogenes*

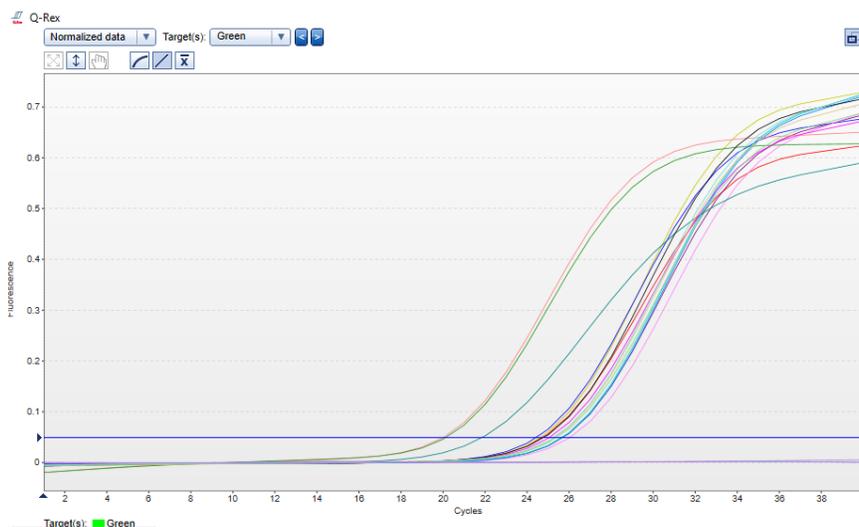


Figura 28: *Fibrobacter succinogenes* qPCR

Gráfico de amplificación para *Butyrivibrio fibrisolvens* spp.

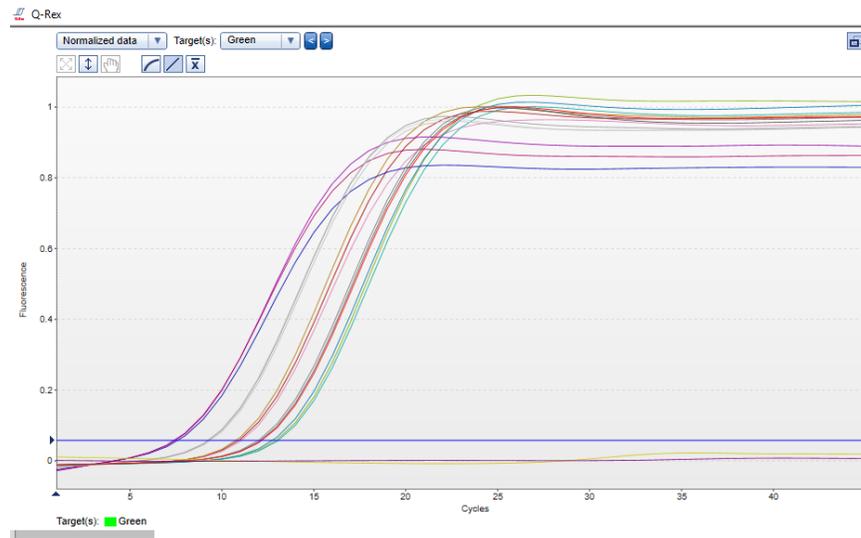


Figura 29: *Butyrivibrio fibrisolvens* qPCR

Gráfico de amplificación para *Methanogenic* spp.

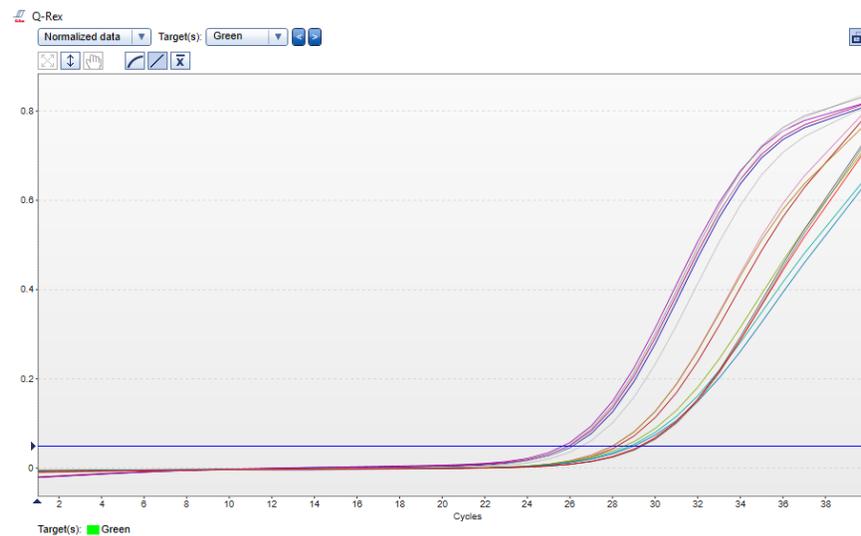


Figura 30: *Methanogenic* spp. qPCR

Referencias

- [1] Guoyao Wu. *Principles of animal nutrition*. CRC Press, 2018.
- [2] Paolo Ajmone & José Fernando García & Johannes Lenstra. On the origin of cattle: how aurochs became domestic and colonized the world. *Evolutionary Anthropology*, 19:148 – 157, 2010.
- [3] M. Zhou & A. McAllister & L.L. Guan. Molecular identification of rumen methanogens: technologies, advances and prospects. *Animal Feed Science and Technology*, 166– 167:76– 86, 2011.
- [4] A. Abrar, H. Watanabe, T. Kitamura, M. Kondo, T. Ban-Tokuda, y H. Matsui. Diversity and fluctuation in ciliate protozoan population in the rumen of cattle. *Animal Science Journal*, 2016.
- [5] FAO. Chapter 3: Cattle, sheep, goats and buffalo. *En línea.*, Ultimo acceso 29 julio 2019.
- [6] A. Doron-Faigenboim T. Durman S. Yaacoby M. E. Berg B. A. White N. Shterzer I. Mizrahi S. Kruger, G. Sasson. Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. *The ISME Journal* 10, 2958–2972, 2016.
- [7] M. Hall. Feed analyses and their interpretation. *CrossMark*, 2014.
- [8] J. H. Méndez Ramírez. Cambios en las poblaciones de bacterias metanogénicas y en la fermentación ruminal de bovinos alimentados bajo diferentes estrategias de alimentación. Tesis de Maestría, U.N.A.M. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Estado de México., 2017.
- [9] P. K. Choudhury. Harnessing the diversity of rumen microbes using molecular approaches. *ResearchGate*, 2012.
- [10] O. Araujo. Propiedades físicas y químicas del rumen. *XXX Reunión APPA-Cusco-Perú*, 2007.

-
- [11] S. Kittelmann-V. Heidarian M. Zethof S. J. Noel G. C. Waghorn P. H. Janssen G. Henderson, F. Cox. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbialcommunities. *Journal Pone*, 2013.
- [12] N. Agarwal, D. Nandan, y L. C. Chaudhary. Rumen microbial ecosystem of domesticated ruminants. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*, 2015.
- [13] Peter D. Constable Walter Grünberg. Function and dysfunction of the ruminant forestomach. collection of rumen fluid. *Food Animal Practice Fifth Edition*, 2009.
- [14] A.I. Martín-García E. Ramos-Morales, A. Arco-Pérez. Use of stomach tubing as an alternative to rumen cannulationto study ruminal fermentation and microbiota in sheep and goats. *Animal Feed Science and Technology*, 2014.
- [15] Cárdenas Muñoz Fernando Rodrigo. Evaluación de la ruminocentesis dorsal como método de obtención de líquido ruminal para el diagnóstico de alteraciones ácido-base ruminales en vacas lecheras. Tesis de Maestría, Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias, 2009.
- [16] Solains; Rodríguez Jorge; Rodríguez Fernando Martín Elizabeth; Pérez, Edward; Cañón. Sonda oro-ruminal experimental como alternativa para la obtención de microorganismos anaeróbicos del rumen. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agorpecuaria*, 2005.
- [17] Joan E. Edwards Jos Boekhorst Sanne van Gastelen Edoardo Saccenti Caroline M. Plugge Jueeli D. Vaidya, Bartholomeus van den Bogert y Hauke Smidt. The effect of DNA extraction methods on observed microbial communities from fibrous and liquid rumen fractions of dairy cows. *Frontiers in Microbiology*, 2018.
- [18] S. Deusch, A. Camarinha-Silva, J. Conrad, U. Beifuss & M. Rodehutschord, y J. A structural and functional elucidation of the rumen microbiome influenced by various diets and microenvironments. *Frontiers in Microbiology 8:1605.*, 2017.

- [19] M. Salem R. Jena S. Kumar R. Singh A. Kumar P. Kumar, A. Zeidan. Rumen microbiology: An overview. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*, 2015.
- [20] Melanie B. Lengowski & Maren Witzig & Gero M. Seyfang & Markus Rodehutsord. Effects of corn silage and grass silage in ruminant rations on diurnal changes of microbial populations in the rumen of dairy cows. *Anaerobe*, 2016.
- [21] J. A. LLamas Rivarola. Aislamiento e identificación de la microflora bacteriana ruminal en vacas Holstein alimentadas con subproductos de cervecería. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Agraria, 2011.
- [22] Ezequias Castillo-Lopez María G. Domínguez-Ordóñez. Factores que afectan la composición microbiana ruminal y métodos para determinar el rendimiento de la proteína microbiana. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias 10(1):120-148*, 2019.
- [23] José Luis Grudsky P., Roberto y Arias B. Aspectos generales de la microbiología del rumen. *Monografías de Medicina Veterinaria, Vol.5, N°2*, 1983.
- [24] Joshua C. McCann & Tryon A. Wickersha & Juan J. Looor. High-throughput methods redefine the rumen microbiome and its relationship with nutrition and metabolism. *Bioinformatics and Biology Insights*, 2014:8 1.
- [25] F. Chaucheyras & F. Ossa. The rumen microbiome: composition, abundance, diversity and new investigative tools. *The Professional Animal Scientist 30*, 2014.
- [26] T. A. Brown. *Genomas*. Médica Panamericana, 2008.
- [27] M. Morrison & Z. Yu. M. Kim. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *Federation of European Microbiological Societies*, 2010.
- [28] A. Schweer T. Peplies J. Quast C. Horn M. Oliver F. Klindworth, A. Pruesse. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research, 2013, Vol. 41, No. 1*, 2012.

-
- [29] M. T. Madigan & J. M. Martinko & P. V. Dunlap & D. Clark. *Brock Biología de los microorganismos*. Pearson, 2009.
- [30] A. O. Cervantes Salinas. Identificación de cepas de bacterias lácticas por criterios fenotípicos y análisis de secuencias del gen ADN ribosomal 16S. Tesis de Maestría, UNAM Facultad de Química., 2010.
- [31] J. J. Loor & J. C. McCann & A. A. Elolimy. Rumen microbiome, probiotics, and fermentation additives. *Vet Clin Food Anim* 33 539–553, 2017.
- [32] M. Rodicio y C. Mendoza. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiológicas Clin* 22(4):238-45, 2004.
- [33] A. Amir A. Zeisel P. J. Turnbaugh Y. Soen & N. Shental G. Fuks, M. Elgart. Combining 16S rRNA gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling. *Microbiome*, 2018.
- [34] Reilly K. 16S ribosomal DNA probes for the detection and enumeration of proteolytic rumen bacteria. Tesis de Maestría, Massey University, 1999.
- [35] P. P. Oliveira I. Mafra, O. Ferreira. Food authentication by PCR-based methods. *Euro Food Res Technol* 227:649–665, 2007.
- [36] P. Yarza & P. Yilmaz Pruesse. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 2014.
- [37] BBC. Rosalind Franklin, la olvidada científica detrás del descubrimiento de la estructura del ADN, uno de los más importantes para la medicina moderna. *En línea.*, Último acceso 10 octubre 2019.
- [38] L. B. López Barragán. Detección de trigo *Triticum* spp. transgénico en productos comerciales, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR. Tesis de Maestría, Universidad

- Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, 2017.
- [39] P. Celec T. Szemes G. Minarik T. Sedlackova, G. Repiska. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biological Procedures Online*, 2013.
- [40] Sambrook J. *Molecular cloning : a laboratory manual.*, 2001.
- [41] Romero A. Alejos Velázquez L. P. Aragón Martínez M. C. Cornejo. Extracción y purificación. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*, 2015.
- [42] Y. Cruz Hernández. Detección de caña de azúcar, maíz y levadura en miel de abeja mediante PCR. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, 2019.
- [43] C. Park Weung L. Roberts Guzaev, M. X. Li. Comparison of nucleic acid gel stains cell permeability, safety, and sensitivity of ethidium bromide alternatives. *Glowing Products for Science*, 2017.
- [44] A. Trejo Mercado. Expresión recombinante de una enzima capaz de polimerizar óxidos de silicio en *Leishmania tarentolae*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, 2016.
- [45] Asuar L. Espinosa. Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecología Molecular. Capítulo 17*, 2007.
- [46] Martha Graciela Rocha Munive Benjamín Pineda Olvera y María Elena Chánez Cárdenas Penélope Aguilera, Martha Ruiz Tachiquín. PCR en tiempo real. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*, 2014.
- [47] S. Fenster D. Fraga, T. Meulia. Real-time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques 10.3.1-10.3.40*, 2014.

-
- [48] K. Bransfield F. Leong S. Douglas S. L. Field S. M. Bell V. Combaret A. Puisieux J. Mighell A. Robinson C. Inglehearn J. D. Isaacs A. F. Markham. F. Ponchel, C. Toomes. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 3:18, 2003.
- [49] Michael Wangler. Action of sybr green dye. *ResearchGate*, 2017.
- [50] A. Rodríguez P. Roca, J. Oliver. *Bioquímica. Técnicas y métodos*. 2003.
- [51] T.A. Hughes Ulrich R. L. A rapid procedure for isolating chromosomal DNA from Lactobacillus species and other gram-positive bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 52-56, 2001.
- [52] K. Wilson. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2001.
- [53] M. Morrison Z. Yu. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques* 36:808-812, 2004.
- [54] Hector Ulises Mandrakez Flores. Estudio de microbiota bacteriana de sal proveniente de la laguna de Cuyutlán. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, 2019.
- [55] Vivian P Miao Sean Turner, Kathleen M Pryer y Jeffrey Palmer. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot Microbiology*, 1999.
- [56] M. W. Pfaffl. Quantification strategies in real-time PCR. *A-Z of quantitative PCR. International University Line.*, 2004.
- [57] J. Björkman B. Sjögren L. Linz M. Kubista A. Forootan, R. Sjöback. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR).

- Biomolecular Detection and Quantification*, 2017.
- [58] P. J. Weimer M. Stevenson. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 2007.
- [59] David M. Stevenson Frank O. Aylward Julie Boyum Jan Deneke Colleen Drinkwater Natalia N. Ivanova Natalia Mikhailova Olga Chertkov Lynne A. Goodwin Cameron R. Currie David Mead Phillip J. Brumm Garret Suen, Paul J. Weimer. The complete genome sequence of *Fibrobacter succinogenes* S85 reveals a cellulolytic and metabolics specialist. *PLoS ONE*, 2011.
- [60] Diana Polanco Lina Gutiérrez Licet Molina G, Luis Giraldo V. Densidad poblacional de bacterias celulolíticas y de *Butyrivibrio fibrisolvens* al suplementar dietas forrajeras (*Pennisetum clandestinum*). *Revista MVZ Córdoba*, 2015.
- [61] Elianna L. Emerson & Paul J. Weimer. Fermentation of model hemicelluloses by *Prevotella* strains and *Butyrivibrio fibrisolvens* in pure culture and in ruminal enrichment cultures. *Applied Microbial And Cell Physiology*, 2017.
- [62] Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). Inventario Nacional de Emisiones de Gases y Compuestos de Efecto Invernadero. *México*, 2018.
- [63] G. McBride W. Hook, Sarah E. Wright. Methanogens: Methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea* 945785, 11 pages, 2010.
- [64] L. Patchett T. Attwood H. Janssen J. Rakonja D. Gagic Filomena N, S. Kittelmann. An adhesin from hydrogen-utilizing rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* M1 binds a broad range of hydrogen-producing microorganisms. *Environmental Microbiology*, 2016.