



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“EFECTO DE LA EDAD SOBRE LA COLONIZACIÓN
GASTROINTESTINAL POR ARQUEAS METANOGÉNICAS, EN
BECERRAS HOLSTEIN”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

BIÓL. RAFAEL JUÁREZ MALDONADO

TUTOR:

DR. EZEQUIÁS CASTILLO LÓPEZ

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DR. VÍCTOR MANUEL DÍAZ SÁNCHEZ

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, septiembre 2023



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.

Salve María

Para mis padres y Davide

AGRADECIMIENTOS

Al Padre creador de todo, a mis Padres Violeta Maldonado González y Rafael Juárez Rodríguez por el amor que me han tenido siempre y por el apoyo en todas mis decisiones, sin duda también por el respaldo en mis peores momentos. Porque sin ustedes nada de esto sería posible, muchas gracias, los amo.

Al Dr. Ezequías Castillo López por recibirme como su alumno y por todos los conocimientos brindados en este tiempo. Por la paciencia y el apoyo permanente aún en la distancia. Muchas gracias por esta oportunidad doc.

A los doctores Hugo Ramírez Álvarez y Víctor Manuel Díaz Sánchez, quienes aceptaron conformar mi comité tutor. Muchas gracias por las observaciones y consejos recibidos desde la primera presentación hasta la culminación del escrito; aprendí un enfoque diferente y fui capaz de plasmarlo en el trabajo, gracias.

Al Biólogo Ignacio Cuevas Villalobos, gracias por entenderme y ser mi apoyo en mi momento más oscuro, gracias por no permitirme desertar del idioma y por creer en mí, cuando ni yo mismo lo hacía. En verdad, muchas gracias.

A David García Calderón, gracias ragazzo por todo lo compartido, porque sin ti no hubiera obtenido calificación perfecta en el último semestre y en el último tutorial, por tu apoyo en el idioma y porque siempre me inspiras a mejorar y seguir mis sueños. Gracias.

Aunque pocos, tuve grandes amigos en esta etapa, así que me daré el lujo de mencionarlos, gracias Luisito, Gaby, Jaz, Ariadna, Metzli, Daniel, Lau, Tere y

Denisse, por el apoyo académico así como personal. Porque sin ustedes esto no hubiera sido lo mismo, muchas gracias

Este estudio fue financiado con recursos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, proyecto número IA203618) y el Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME, proyecto número 201718). Por lo que expresamos nuestro agradecimiento. Los recursos originados de dichos proyectos sirvieron para financiar el envío y secuenciación de ADN, así como para cubrir una porción de los gastos de trabajo campo.

Índice general

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT	3
3.	INTRODUCCIÓN	5
3.1	GASES DE EFECTO INVERNADERO	5
3.2	GENERACIÓN DE METANO ENTÉRICO EN RUMIANTES.....	7
3.3	COLONIZACIÓN MICROBIANA DEL SISTEMA GASTROINTESTINAL	9
3.4	GEN 16S rRNA	10
3.5	DIFERENCIACIÓN ENTRE ARQUEAS Y BACTERIAS.....	12
3.6	CLASIFICACIÓN DE LAS ARQUEAS	15
3.7	SIMBIOSIS ENTRE ARQUEAS Y OTROS MICROORGANISMOS.....	17
3.8	INDUSTRIA LECHERA EN MÉXICO.....	20
4.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	21
5.	OBJETIVOS	22
5.1	OBJETIVO GENERAL:	22
5.2	OBJETIVOS PARTICULARES:	22
6.	HIPÓTESIS	22
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1	ANIMALES Y LUGAR DE ESTUDIO.....	23
7.2	ALIMENTACIÓN	24
7.3	COLECTA DE MUESTRAS.....	25
7.4	EXTRACCIÓN DE ADN.....	26
7.5	SECUENCIACIÓN DE ADN	26
7.6	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	27
7.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
8.	RESULTADOS.....	28
8.1	PRESENCIA DE VALORES ATÍPICOS (OUTLIERS).....	28
8.2	NORMALIDAD DE LOS DATOS.....	29
8.3	TAXONES ENCONTRADOS.....	29
8.4	PRESENCIA DE ARQUEAS SEGÚN LA EDAD DE LAS BECERRAS	31
8.5	CORRELACIONES ENTRE EDAD DE BECERRAS Y PRESENCIA DE ARQUEAS	34
9.	DISCUSIÓN	35
10.	CONCLUSIONES	38
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
12.	APÉNDICES.....	53

Índice de cuadros

<u>Cuadro 1. Dominios propuestos por Woese et al., 1990; y sus respectivas características principales.....</u>	<u>13</u>
<u>Cuadro 2. Composición química del alimento iniciador proporcionado a las becerras</u>	<u>25</u>
<u>Cuadro 3. Taxones encontrados de arqueas en el análisis metagenómico.....</u>	<u>30</u>
<u>Cuadro A. Pruebas de distribución normal para Methanobrevibacter.....</u>	<u>53</u>
<u>Cuadro B. Pruebas de distribución normal para Methanosphaera.....</u>	<u>53</u>
<u>Cuadro C. Porcentajes de abundancias de los géneros de arqueas y arqueas totales por semana de vida.....</u>	<u>54</u>

Índice de figuras

<u>Figura 1. Contribución mundial de metano en teragramos para el año 2017.....</u>	<u>6</u>
<u>Figura 2. Esquema del gen 16s RNAr.....</u>	<u>11</u>
<u>Figura 3. Dendrograma de relaciones filogenéticas de metanógenos y bacterias típicas.....</u>	<u>12</u>
<u>Figura 4. Árbol filogenético universal en forma de raíz, que muestra los tres dominios.....</u>	<u>14</u>
<u>Figura 5. Descripción general de la vía hidrogenotrófica.....</u>	<u>19</u>
<u>Figura 6. Producción de leche de bovino en México por entidad, durante el año 2020</u> <u>20</u>	
<u>Figura 7. Porcentajes de abundancia del género Methanobrevibacter.....</u>	<u>31</u>
<u>Figura 8. Porcentajes de abundancia del género Methanosphaera.....</u>	<u>32</u>
<u>Figura 9. Porcentajes de abundancia total de arqueas.....</u>	<u>33</u>
<u>Figura 10. Correlograma entre el tiempo y los géneros de arqueas.....</u>	<u>34</u>
<u>Figura A. Datos atípicos encontrados en la prueba “Distancia de Cook”.....</u>	<u>55</u>

1. Resumen

En el sistema gastrointestinal de rumiantes, las arqueas de los géneros *Methanobrevibacter* y *Methanosphaera* son algunas de las principales productoras de metano, un potente gas con efecto invernadero. Hasta hace algunos años, se consideraba que las arqueas eran parte de la comunidad bacteriana. Sin embargo, éstas conforman un dominio independiente al de células procariotas y eucariotas. La mayoría de los trabajos realizados hasta ahora sobre arqueas en ganado, se han llevado a cabo en el rumen de animales adultos. Debido a esto, existe información limitada sobre el proceso de colonización del sistema digestivo posterior a temprana edad. Por lo tanto, este trabajo evaluó la colonización del sistema intestinal por arqueas metanogénicas durante los primeros dos meses de vida en becerras Holstein. Para esto, se utilizaron muestras de heces colectadas en los días 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 63 de vida. La identificación de las arqueas se llevó a cabo por medio de secuenciación de un segmento del gen 16S rRNA. Las becerras fueron alimentadas con calostro en el primer día de vida, los días subsecuentes con leche y a partir de la segunda semana se empezó a ofrecer alimento iniciador y forraje. Se encontraron 3 clases de arqueas incluidas en 3 órdenes, mismos que contienen 2 familias, dentro de las cuales se identificaron 2 géneros de arqueas metanogénicas (*Methanobrevibacter* y *Methanosphaera*). A partir del primer día de vida hubo presencia de los géneros *Methanobrevibacter* y *Methanosphaera*, sin embargo, éstos no se consolidaron y disminuyeron en los días 7 y 14 de edad. No obstante, a partir del día 21, se observó presencia de ambos géneros de manera constante. Los mayores porcentajes se observaron en el día 63 de vida. La correlación entre edad de las becerras y porcentaje de arqueas fue baja ($r \leq 0.20$), lo cual indica que no hay un aumento paulatino según la edad. Sin embargo, se encontró una correlación positiva alta ($r = 0.92$) entre ambos géneros, lo cual indica la presencia simultánea de ambos. En conclusión, se detectó presencia de arqueas metanogénicas en el primer día de vida. Sin embargo, posibles cambios bruscos en el ambiente intestinal debido a una alimentación basada

solamente en calostro o leche no permitieron la consolidación de dichos géneros. La presencia constante y sostenida de ambos géneros a partir del día 21 de vida puede deberse al consumo de una dieta que incluye ingredientes sólidos además de leche (concentrado iniciador y forraje). Los mayores porcentajes de arqueas encontradas en el día 63 de vida, pueden deberse al posible incremento en el consumo de forraje, lo que favorece la fermentación de la fibra incrementando la generación de carbono e hidrógeno, los cuales son utilizados por las arqueas metanogénicas.

Palabras clave: Arqueas metanogénicas, Becerras Holstein, gen 16S rRNA.

2. Abstract

In the ruminant gastrointestinal system, archaea of the genera *Methanobrevibacter* and *Methanosphaera* are some of the main producers of methane, a potent greenhouse gas. Until a few years ago, archaea were part of the bacterial community. However, they form an independent domain from prokaryotes and eukaryotes cells. Most of the work done so far on archaea in cattle has been carried out in the rumen of adult animals. Due to this, there is limited information on the process of colonization of the digestive system later at an early age. Therefore, this work evaluated the colonization of the intestinal system by methanogenic archaea during the first two months of life in Holstein calves. For this, stool samples collected on days 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 63 of life were used. The identification of the archaea was carried out by means of sequencing a segment of the 16S rRNA gene. The calves were fed with colostrum on the first day of life, on subsequent days with milk, and from the second week onwards starter feed and forage were offered. 3 classes of archaea included in 3 orders were found, which contain 2 families, within which 2 genera of methanogenic archaea (*Methanobrevibacter* and *Methanosphaera*) were identified. From the first day of life there was presence of the genus *Methanobrevibacter* and *Methanosphaera*. However, these were not consolidated and decreased on days 7 and 14 of age. However, from day 21, the presence of both genders was observed constantly. The highest percentages were observed on day 63 of life. The correlation between the age of the calves and the percentage of archaea was low ($r \leq 0.20$), which indicates that there is no gradual increase according to age. However, a high positive correlation ($r = 0.92$) was found between both genders, which indicates the simultaneous presence of both. In conclusion, the presence of methanogenic archaea was detected on the first day of life. However, possible sudden changes in the intestinal environment due to a diet based solely on colostrum or milk did not allow the consolidation of these genera. The constant and sustained presence of both genders from day 21 of life may be due to the consumption of a diet that includes solid ingredients in addition to milk (starter

concentrate and forage). The higher percentages of archaea found on day 63 of life, may be due to the possible increase in forage consumption, which favors fiber fermentation, increasing the generation of carbon and hydrogen, which are used by methanogenic archaea.

Key words: Methanogenic archaea, Holstein calves, 16S rRNA gene.

3. Introducción

3.1 Gases de efecto invernadero

Con el aumento de las concentraciones de gases de efecto invernadero en la tropósfera, se prevé que en cada uno de los años comprendidos entre 2023 y 2026, la temperatura media anual global de la superficie terrestre supere la temperatura de los niveles preindustriales (años 1850 a 1900), y que ese aumento oscile entre 1.1°C y 1.7°C (Organización Meteorológica Mundial, 2023). Además, dicho aumento también induce la destrucción de la capa de ozono en la estratósfera (Primavesi *et al.*, 2004;). Otra consecuencia de este fenómeno es la ocurrencia de eventos climáticos extremos como sequías, tormentas e inundaciones, que afectan considerablemente el equilibrio de los ecosistemas y dañan también la vida humana (IDMC, 2019).

Hasta ahora, se sabe que el dióxido de carbono (CO₂) es el gas de efecto invernadero más abundante y que tiene el mayor aporte en el incremento del calentamiento global (McCaughey *et al.* 1997). Por otro lado, el metano (CH₄) es el hidrocarburo más sencillo que existe, y aunque es mucho menos abundante en la atmósfera que el CO₂, absorbe la radiación infrarroja térmica de modo más eficiente que los otros gases, en consecuencia, tiene un potencial en el calentamiento global (PCB) ~ 86 veces mayor por unidad de masa que el CO₂, en una escala de tiempo de 20 años, y 28 veces más potente en una escala de tiempo de 100 años (IPCC, 2014).

Las principales fuentes de emisión de metano son: el uso de combustibles fósiles, la agricultura, la ganadería, y los vertederos. También hay cierta contribución de las emisiones naturales generadas por los humedales, los sistemas de agua dulce y fuentes geológicas (Kirschke *et al.*, 2013; Sauniois *et al.*, 2016; Ganesan *et al.* 2019). Las tasas de acumulación de metano y CO₂ en la atmósfera han cambiado drásticamente en los últimos años, con un incremento de forma exponencial (Preston y Leng, 1989).

En 1955 se registró una producción de 500 millones de toneladas de metano, pero en 2017 se liberaron 596 millones de toneladas. La agricultura y la ganadería han contribuido en un 60% al incremento de metano en la atmósfera por actividades antropogénicas, aportando un aproximado de 227,000,000 de kilogramos de metano promedio en 2017 (**Figura 1**) (Jackson *et al.*, 2020). Estas emisiones se generan principalmente de la fermentación entérica de los rumiantes y en los cultivos de arroz. Sin embargo, los rumiantes solo producen alrededor del 33% de este total, y el resto por lo tanto, se origina de los sectores de la agricultura (Eckard *et al.*, 2010). Castelán *et al.* (2013) estiman que el metano producido por 32 millones de cabezas de ganado en México, oscila en 2,000,000,000 kg.

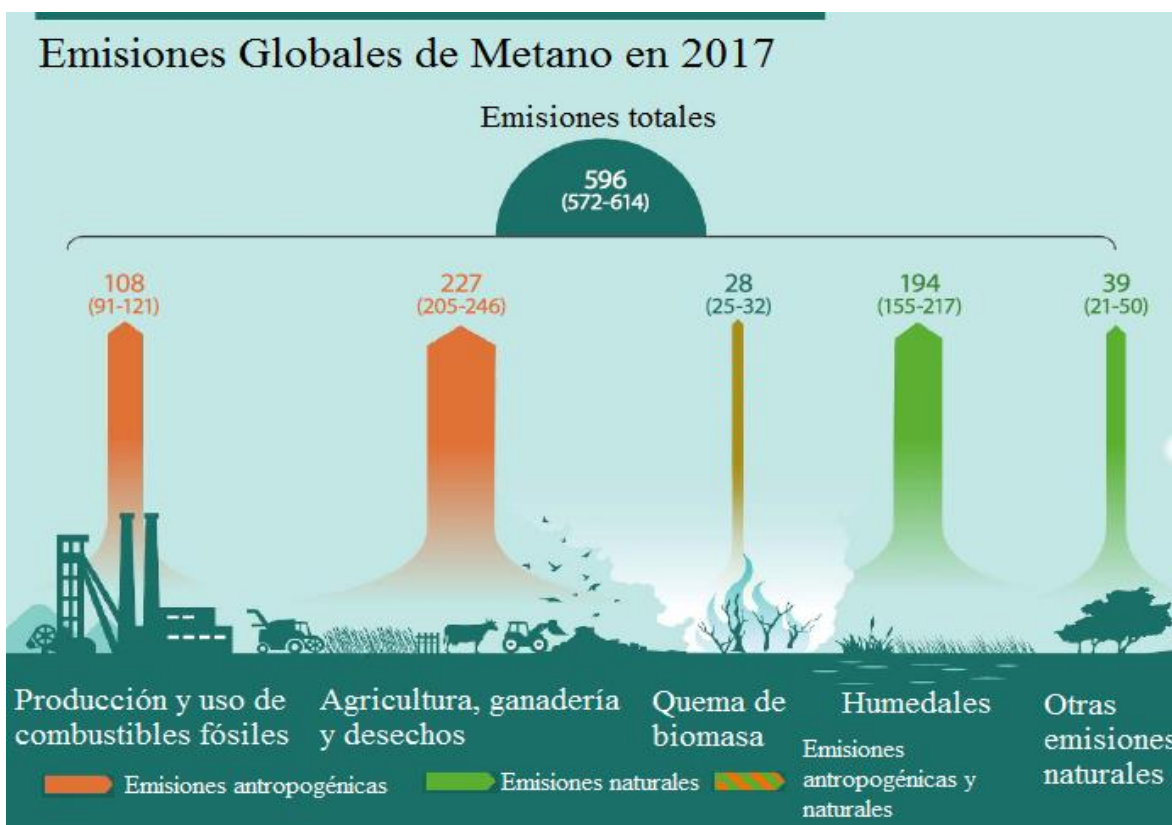


Figura 1. Contribución mundial de metano en teragramos para el año 2017. Fuentes y sumideros naturales (verde), fuentes antropogénicas (rojo) y fuentes mixtas que incluyen naturales y antropogénicas (sombreado naranja-verde). Modificado de Jackson *et al.*, 2020.

3.2 *Generación de metano entérico en rumiantes*

La raza Holstein (*Bos taurus primigenius*) es la más importante y utilizada a nivel mundial para la producción de leche, sus miembros son animales extremadamente especializados con una gran capacidad para convertir el alimento en proteínas aptas para el consumo humano, por lo tanto, la contribución de este sector ganadero puede considerarse como una de las fuentes más importantes de generación de metano. Esta raza se originó en los Países Bajos, específicamente en las provincias de Holanda del Norte y Frisia, que se encuentran a ambos lados del ahora lago Zuiderzee, dichas regiones se caracterizan por ser frías y templadas (Cuéllar-Sáenz, 2021; Mc Sweeney y McNamara, 2022). Los animales Holstein son grandes y elegantes, con patrones de coloración blanco y negro o rojo y blanco (alelo recesivo). Las novillas pueden criar a partir de los 15 meses de edad, aunque se recomienda que el primer parto sea entre los 24 y 27 meses de edad. Producen en promedio 25 litros de leche al día y su producción de leche anual varía entre 7,200 y 9,000 kg (Van Alfen, 2014). La popularidad de esta raza se debe a la producción extremadamente alta de leche y a que sus componentes tales como grasa y proteína, también son de una calidad superior a la de otras razas, además de que son un ganado muy grande (600 – 800kg) (Mc Sweeney y McNamara, 2022).

Tanto el metano como el CO₂ son subproductos naturales de la fermentación microbiana de los carbohidratos en el rumen y en el intestino. Las emisiones de metano en rumiantes representan una pérdida entre el 5% y el 7% por día del total de la energía ingerida (Hristov *et al.*, 2013). Sin embargo, se ha registrado una pérdida de solo 3% en ganado alimentado con dietas ricas en grano en condiciones cálidas, pero también se ha registrado pérdida de hasta 12% de energía en condiciones de pastoreo en zonas templadas (Murray *et al.*, 1976; Weimer, 1998). En general, la producción de metano es la principal estrategia de los rumiantes para mitigar el exceso de hidrógeno molecular (H₂) generado en el sistema gastrointestinal, este se libera al ambiente mediante el eructo en un 97%, mientras que el resto se libera a través del

recto (Muñoz *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2014). La mayor cantidad de metano se libera al momento de beber líquidos (368.7 partes por millón) seguido por el momento de la alimentación (284ppm), mientras que los momentos en que hay menor liberación de metano es al dormir (186.9ppm) y al caminar (106.8ppm) (Chagunda *et al.*, 2012).

El H₂ producido durante la glucólisis es perjudicial para el proceso fermentativo, ya que su acumulación inhibe la enzima NADH + H⁺ ferredoxina oxidoreductasa, impidiendo la regeneración de NAD⁺, debido a esto, es muy importante la eliminación de este gas (Ramírez *et al.*, 2014).

Producción de metano en el rumen. En el sistema digestivo de los rumiantes, el rumen es la cavidad donde se llevan a cabo los principales procesos de fermentación (Tharwat *et al.*, 2021). La digestión ruminal del alimento por parte de la microbiota resulta en la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), principalmente acetato, propionato y butirato, que son utilizados por el animal como fuente de energía. Durante este proceso, también hay producción de gases como el CO₂ y CH₄ que deben ser eliminados. La fermentación es un proceso oxidativo durante el cual los cofactores metabólicos reducidos (NADH, NADPH, FADH) se reoxidan (NAD⁺, NADP⁺, FAD⁺) mediante reacciones de deshidrogenación, las cuales liberan hidrógeno en el rumen. Tan pronto como se produce el hidrógeno, este es utilizado por los metanógenos para reducir el CO₂ a metano ($\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$ y $4\text{HCOOH} \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$). La producción de acetato y butirato genera como resultado una liberación neta de hidrógeno y favorece la producción de metano, mientras que la formación de propionato es una vía competitiva para el uso de hidrógeno en el rumen (Demeyer y Fievez, 2000). Un bovino adulto produce de 0.5 a 1 litro de gas/min. El CO₂ constituye del 60 al 70 % del gas ruminal, mientras que el metano representa del 30 al 40% (Cunningham y Klein, 2008; Domingues *et al.*, 2016).

Producción de metano en el sistema intestinal. Aunque la mayoría del metano entérico producido se genera en el rumen (87%), el resto se genera en los intestinos (13%) de una manera similar, ya que el intestino grueso cuenta con un ciego anaerobio de aproximadamente 90cm de largo con una capacidad de 7 litros (Murray *et al.*, 1976; Demeyer y Fievez, 2000). Por lo tanto, la formación de metano también es fundamental para un funcionamiento óptimo del sistema intestinal, ya que evita la acumulación de hidrógeno que conduciría a la inhibición de la actividad deshidrogenasa que se involucra en la oxidación de cofactores reducidos. Esto resalta la importancia de no enfocarse únicamente en el estudio del ambiente ruminal, sino también en el ambiente del sistema digestivo posterior, ya que este también cuenta con un proceso de fermentación.

La mayoría de los trabajos realizados hasta ahora sobre arqueas en ganado, que consisten en la caracterización de su comunidad, así como de algunas estrategias de mitigación de metano, se han llevado a cabo en el rumen de animales adultos (*i. e.* Shin *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2014) de modo que, existe información limitada sobre la colonización del sistema intestinal por arqueas en rumiantes a temprana edad. En este sentido, entender la colonización del sistema digestivo de los rumiantes por la comunidad de arqueas (grupos taxonómicos y proceso de establecimiento) puede ser un primer paso para posteriormente contribuir al desarrollo de estrategias para reducir la producción de metano (Benaouda *et al.*, 2017).

3.3 Colonización microbiana del sistema gastrointestinal

El sistema digestivo de una becerro recién nacida es un complejo estéril, la colonización microbiana del aparato digestivo de los rumiantes sigue una sucesión típica, en la que las bacterias proliferan en la fase líquida inmediatamente después del nacimiento y colonizan la pared ruminal en un plazo de 36 a 48 horas (Hespell *et al.*,

1997). Estas bacterias facilitan la posterior colonización secuencial del fluido por hongos y después por protozoarios, lo que resulta en un complejo consorcio que se desarrolla en la fase líquida, las partículas de alimento y en las superficies epiteliales. Este consorcio suele ser estable y solo se altera cuando se modifican los nutrientes. Los principales factores que influyen en la colonización por la microbiota son el tipo de dieta, el agua, la suciedad y la proximidad con otros rumiantes (Krause *et al.*, 2013).

En los primeros días de vida, las bacterias habitan predominantemente en el rumen, las arqueas metanogénicas han sido detectadas a partir de los primeros tres días de edad, pero es a partir de la primera semana de edad, cuando la cantidad se incrementa a 10^8 /g. El número de bacterias y arqueas aumentan considerablemente durante las primeras tres semanas de vida (Domingues *et al.*, 2016).

3.4 *Gen 16S rRNA*

El gen 16S de ARN ribosomal (rRNA) posee una longitud de 1542 pares de bases y contiene una estructura en mosaico, donde existen diez dominios altamente conservados y nueve hipervariables que son específicos de especie. Debido a esto es considerado como el mejor marcador molecular para estudios filogenéticos de procariontes y arqueas (**Figura 2**) (Gevers y Coenye, 2007; Cox *et al.*, 2013). Dadas sus características, se pueden utilizar iniciadores universales que se unen a las regiones conservadas para amplificar las regiones variables. Hasta el momento se han estandarizado una amplia gama de métodos numéricos basados en el gen 16S rRNA para realizar estudios de ecología microbiana (Woese *et al.*, 1990; Saengkerdsut y Ricke, 2014).

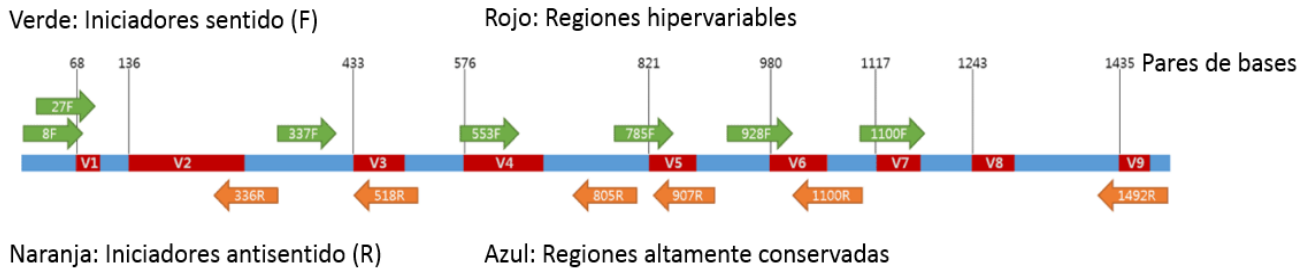


Figura 2. Esquema del gen 16s RNAr en el que se muestran las regiones conservadas e hipervariables. Modificado de <http://help.ezbiocloud.net/16s-rna-and-16s-rna-gene/> en mayo de 2021.

El gen 16S rRNA se ha utilizado principalmente en los estudios de microbioma del tracto gastrointestinal y tracto respiratorio de animales, así como en perfiles de suelo, aguas subterráneas y hábitats marinos (Bond *et al.*, 1995; Pollock *et al.*, 2018). El ADN obtenido se amplifica mediante PCR usando iniciadores específicos. Finalmente, las secuencias se analizan para su identificación taxonómica. Este método se puede utilizar tanto en bacterias como en arqueas, ya sean cultivables o no cultivables (McSweeney *et al.*, 2007). Dicho procedimiento es posible debido a la gran cantidad de secuencias de 16S rRNA disponibles en bases de datos como GenBank y SILVA, que se usan como referencia al evaluar las muestras bajo estudio (Saengkerdsub y Ricke, 2014).

La región hipervariable V4 del gen 16S rRNA, que consta de 252 pb de longitud, es adecuada para la identificación de arqueas y su posterior análisis, otorgando secuencias de alta calidad y similitudes de más del 95% en bases de datos (Simbahan *et al.*, 2005; Porat *et al.*, 2010).

3.5 Diferenciación entre arqueas y bacterias

En el artículo titulado “*Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization*” (Fox et al., 1977) se demuestra, mediante el análisis molecular de la subunidad 16S rRNA, la distancia filogenética que existe entre los microorganismos metanógenos y “bacterias típicas” (**Figura 3**). En el mismo año, el artículo titulado “*Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms*” (Woese y Fox, 1977); propone una nueva clasificación taxonómica para los organismos vivos compuesta por tres super reinos: 1.- *Eubacteria* (“bacterias típicas”), 2.- *Archaeobacteria* (bacterias metanógenas) y 3.- *Urkaryota* (organismos compuestos por células eucariotas) (Howland, 2000).

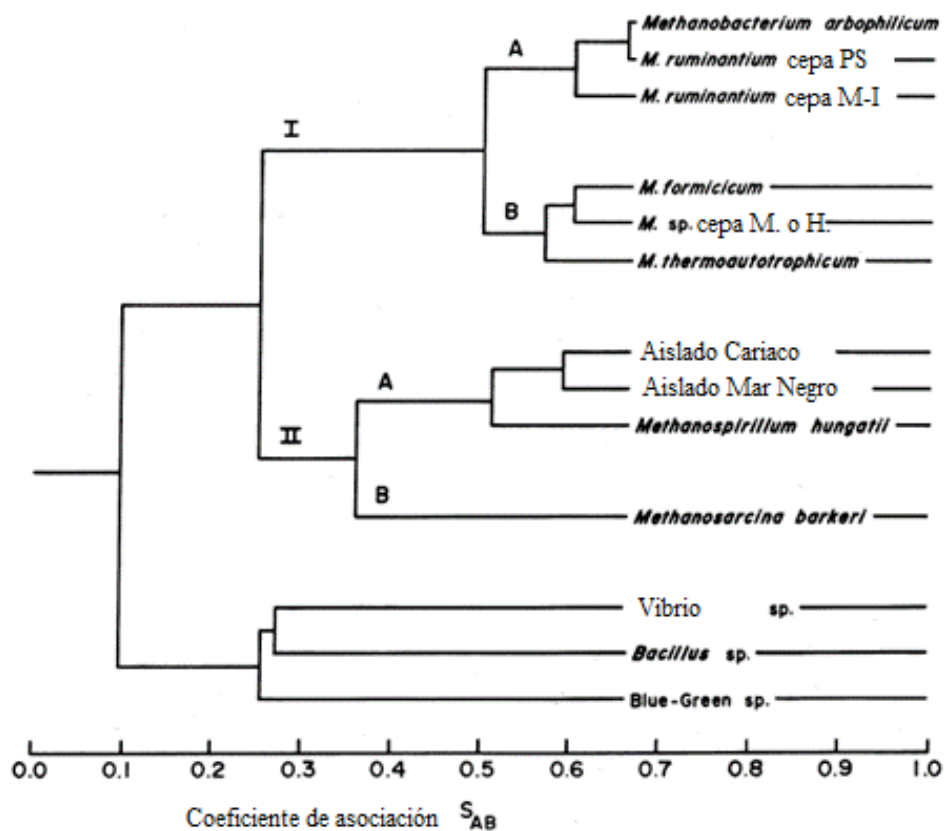


Figura 3. Dendrograma de relaciones filogenéticas de metanógenos (rama superior) y bacterias típicas (rama inferior). El coeficiente de asociación S_{AB} proporciona una estimación del grado de homología entre taxones. Modificado de Fox *et al.*, 1977.

13 años más adelante se publica el artículo “Towards a system of organisms; proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya” (Woese *et al.*, 1990) donde se propone el taxón “Dominio” con una categoría más alta a la del taxón Reino. El sistema filogenético, así como pruebas bioquímicas y fisiológicas, reconocen la primacía de estos tres grupos. Es aquí cuando se reconoce por primera vez el nombre de “Arquea” y se define que son organismos diferentes y evolutivamente distantes de las bacterias. Los dominios propuestos por Woese y colaboradores se enlistan en el **Cuadro 1**.

Cuadro 1. Dominios propuestos por Woese *et al.* (1990) y sus características principales respectivas.

Dominio	Características
<p><i>Bacteria</i></p> <p><i>βακτηριον</i>: vara pequeña o bastón.</p>	<p>-Célula procariota.</p> <p>-Lípidos de membrana predominantemente diésteres de diacilglicerol.</p> <p>-Ribosomas con ARN de tipo eubacteriano.</p>
<p><i>Archaea</i></p> <p><i>αρχαιος</i>: ancestral, primitivo.</p>	<p>-Célula similar a la procariota.</p> <p>-Lípidos de membrana predominantemente diéteres de glicerol o tetraéteres de glicerol.</p> <p>-Ribosomas con ARN de tipo arqueano.</p>
<p><i>Eukarya</i></p> <p><i>ευ</i>: verdadero</p> <p><i>καρυον</i>: nuez</p>	<p>-Célula eucariota.</p> <p>-Lípidos de la membrana celular predominantemente diésteres de ácido graso de glicerol.</p>

Se refiere a un núcleo bien definido

-Ribosomas con ARN tipo eucariótico.

Tanto las eubacterias como las arqueas carecen de organelos unidos a la membrana (como núcleo o mitocondria), carecen de citoesqueleto y presentan un único cromosoma circular (Blum y Dixit, 2004). Sin embargo, las membranas celulares y las capas superficiales de las arqueas son diferentes a las de las bacterias. Además, los genes para la síntesis, reparación y recambio de ADN, ARN y proteínas son homólogos a los de Eukarya (Sowers, 2004).

Utilizando secuencias de ARN ribosomal de los tres dominios, Woese y colaboradores construyeron un árbol filogenético (**Figura 4**) en el que se pone en evidencia la separación de estos 3 grupos. Además, se observa la divergencia de dos filos (Crenarchaeota y Euryarchaeota) dentro del dominio *Archaea* (Woese et al., 1990).

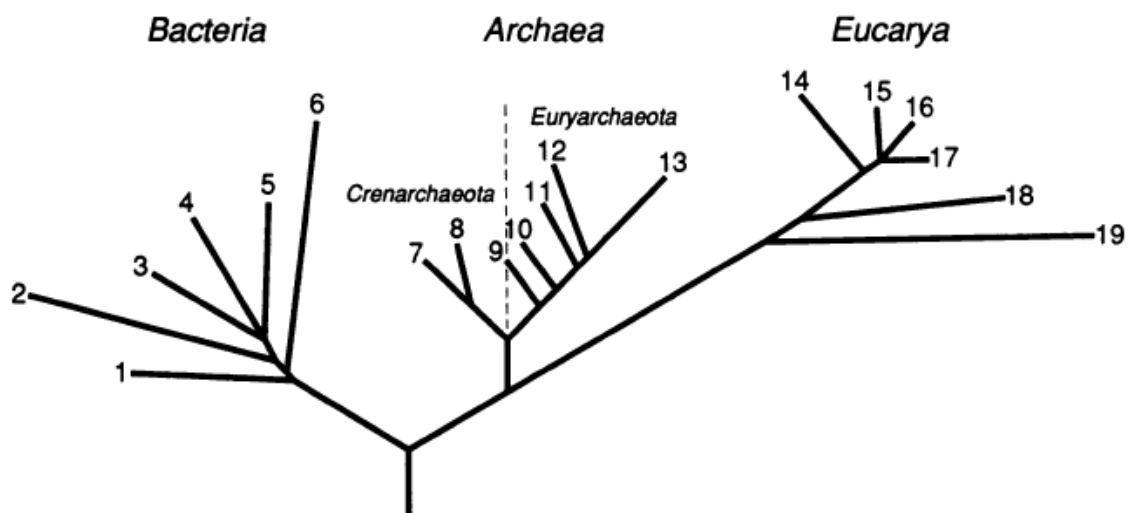


Figura 4. Árbol filogenético universal enraizado, que muestra los tres dominios. El orden de ramificación y las longitudes de las ramificaciones se basan en comparaciones de secuencias de ARNr. La posición de la raíz se determinó comparando secuencias de pares de genes parálogos que divergieron entre sí antes de que los tres linajes primarios emergieran de su condición ancestral común. Los números en las puntas de las ramas corresponden a los siguientes grupos de organismos. **Bacteria:** 1.- Thermotogales; 2.- Flavobacterias; 3.- Cianobacterias; 4.- Bacterias púrpuras; 5.- Bacterias Gram-positivas; y 6.- Bacterias verdes no sulfurosas. **Archaea:** Filo Crenarchaeota: 7.- *Pyrodictium*; y 8.- *Thermoproteus*; Filo Euryarchaeota: 9.- Thermococcales; 10.- Metanococcales; 11.- Methanobacteriales; 12.- Methanomicrobiales; y 13.- Halófilos extremos. **Eucarya:** Animales; 15.- Ciliados; 16.- Plantas vasculares; 17.- Hongos; 18.- Flagelados; y 19.- Microsporidios. Tomado de Woese *et al.*, 1990.

Dada la evidencia anterior, es importante resaltar que, aunque las bacterias y las arqueas tienen morfologías similares, estos son grupos distintos, con metabolismos que difieren y con una historia evolutiva diferente, aunque han divergido del mismo ancestro común.

3.6 Clasificación de las arqueas

El dominio Archaea se compone principalmente de tres grupos: 1.- Haloarchaea (halófilos que se encuentran en ambientes con altas concentraciones de sal), 2.- Termoacidófilos (crecen en ambientes ácidos a temperaturas superiores a los 50 °C) y 3.- Metanógenos (se encuentran en el sistema gastrointestinal de rumiantes y otros animales, producen metano para generar un gradiente electroquímico a través de la membrana celular para producir ATP) (Cavicchioli, 2011; Klieve *et al.*, 2012). Por lo general, las arqueas no metanogénicas cultivables son aisladas de ambientes terrestres

volcánicos y respiraderos hidrotermales de aguas profundas (Saengkerdsub y Ricke, 2014).

El filo Euryarcheota comprende a las arqueas metanogénicas; estas se dividen en cuatro clases principales: Methanobacteria (70.3%), Methanomicrobia (16.4%), Thermoplasmata (7.4%) y Methanopyri (0.03%); dentro de estas cuatro clases, los géneros más representativos son *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Methanobacterium*, *Methanomicrobium* y *Methanosarcina* (Kim *et al.* 2011). Aunque en el trabajo de Lee *et al.* (2012), se menciona que los grupos mayoritarios no se han identificado ni cultivado.

Estas arqueas constituyen alrededor de 2-4% de la comunidad microbiana en rumiantes (Domingues *et al.*, 2016). Según la revisión de Janssen y Kirs (2008), hay tres géneros principales, los cuales son: *Methanobrevibacter* (61.6%), *Methanomicrobium* (14.9%) y arqueas desconocidas o no cultivadas (15.8%), el 7.7% restante corresponde a otras arqueas ya descritas. *Methanobrevibacter sp.* es considerado el metanógeno dominante (Miller *et al.*, 1995; Wright *et al.*, 2007; Janssen y Kirs, 2008).

Las arqueas metanogénicas son anaerobias estrictas; como grupo, poseen la capacidad metabólica de producir metano a través de la reducción de CO₂, ácido acético y varios compuestos de un solo carbono (Cavicchioli, 2011). En 1996 se publicó la primera secuencia completa del genoma del metanógeno *Methanococcus jannaschii* (Bult *et al.*, 1996) y 10 años después, la primera secuencia completa del genoma de *Methanosphaera stadtmanae*, que fue aislada del tracto gastrointestinal humano (Fricke *et al.*, 2006).

Debido a que la diversidad de arqueas existentes es amplia, es importante hacer énfasis en los principales taxones metanogénicos, ya que estos son los que habitan

dentro del sistema gastrointestinal de rumiantes, y son los que les causan pérdida de energía metabólica.

3.7 Simbiosis entre arqueas y otros microorganismos

Las arqueas metanogénicas no pueden degradar moléculas complejas como la glucosa, así que dependen de las bacterias celulolíticas, hongos y protozoarios ciliados, tanto en el rumen como en el intestino posterior, para obtener los sustratos necesarios y poder llevar a cabo la metanogénesis, estos incluyen: H₂, CO₂, metilaminas, metanol, formiato (HCOO⁻) y acetato. Dichos sustratos se obtienen a partir de las actividades metabólicas de los otros microorganismos (Ellis *et al.*, 1990; Ferry y Kastead, 2007).

Las arqueas pueden asociarse intracelular y extracelularmente con los protozoarios ciliados, dichos microorganismos al tener un metabolismo anaeróbico fermentativo e hidrogenosomas, producen una gran cantidad de hidrógeno y formiato (Ushida, 2010; Belanche *et al.*, 2014). Los protozoarios más comunes en rumiantes que tienen tal relación son de los géneros *Entodinium*, *Polyplastron*, *Epidinium* y *Ophryoscolex*, mientras que las arqueas más frecuentemente asociadas con los protozoarios son de los órdenes Methanobacteriales y Methanomicrobiales, siendo el género *Methanobrevibacter* el más abundante (Sharp *et al.*, 1998; Williams y Coleman, 1991; Ushida, 2010). Aunque los protozoarios del rumen también son microorganismos anaerobios, cuentan con hidrogenosomas, que son organelos que además de producir H₂ y ATP, les permiten ser aerotolerantes (Domingues, 2016). Se ha descubierto también que hongos anaerobios, como *Neocallimastix frontalis*, también tienen una relación con los metanógenos que implica la transferencia de hidrógeno y formación de metano (Joblin *et al.*, 2002).

Las arqueas metanogénicas utilizan acetato, grupos metilo, CO₂ y H₂ como sustrato para la síntesis de metano (Cammack *et al.*, 2018). Estas producen metano principalmente a través de la vía hidrogenotrófica (Tapio *et al.*, 2017).

La vía comienza con la reducción de CO₂ en metanofurano (MFR) con ferredoxina reducida (Fd_{red}) a formil-MFR catalizada por formilmetanofurano deshidrogenasa; en la mayoría de los metanógenos hay dos isoenzimas, una que contiene molibdeno (Fmd) y la otra que contiene tungsteno (Fwd). Posteriormente, el grupo formilo de formil-MFR se transfiere a tetrahidrometanopterina (H₄MPT) por formiltransferasa (Ftr). N⁵-formil-H₄MPT se convierte posteriormente en metil-H₄MPT a través de metenil-H₄MPT y metileno-H₄MPT como productos intermedios utilizando metenil-H₄MPT+ ciclohidrolasa (Mch), metileno-H₄MPT deshidrogenasa dependiente de F₄₂₀ (Mtd) y metileno-H₄MPT dependiente de F₄₂₀. H₄MPT reductasa (Mer). Una reacción alternativa a Mtd es catalizada por la deshidrogenasa de metileno-H₄MPT formadora de H₂ (Hmd o [Fe]- hidrogenasa), que cataliza la conversión de metenil-H₄MPT+ a metileno-H₄MPT utilizando H₂ como donante de electrones. F₄₂₀ es una 5-deazaflavina que se convierte en la forma reducida (F₄₂₀H₂) por H₂ catalizada por [NiFe]-hidrogenasa (Frh) reductora de F₄₂₀. F₄₂₀H₂ se utiliza como donante de electrones para los dos pasos de reducción en la metanogénesis hidrogenotrófica y para otras reacciones anabólicas de reducción en las arqueas metanogénicas. En condiciones limitantes de níquel, la [NiFe]-hidrogenasa Frh se sustituye por Hmd; Hmd se acopla con Mtd para reducir F₄₂₀ con electrones de H₂. Después de que se forma metil-H₄MPT, su grupo metilo se transfiere a la coenzima M (CoM-SH), produciendo metil-S-CoM en una reacción exergónica catalizada por un complejo de metiltransferasa asociado a membrana (MtrA-H). La reacción exergónica de transferencia de metilo está acoplada a la translocación endergónica de iones de sodio (Gottschalk y Thauer, 2001). La fuerza motriz de iones de sodio así generada es utilizada por una ATP sintasa de tipo A₁A₀ para impulsar la fosforilación de ADP (Vonck *et al.*, 2009). En el siguiente paso, el metil-S-CoM se reduce con la coenzima

B (CoB-SH) a metano y un heterodisulfuro (CoM-S-S-CoB); esta reacción es catalizada por la metil-S-CoM reductasa (Ermler *et al.*, 1997). CoM-S-S-CoB se reduce con H₂ a CoM-SH y HS-CoB, catalizado por el complejo [NiFe]-hidrogenasa/heterodisulfuro reductasa bifurcador de electrones (MvhADG-HdrABC). Este complejo acopla la reducción exergónica de CoM-S-S-CoB con H₂ a la reducción endergónica de ferredoxina con H₂. La ferredoxina reducida así generada, se utiliza de nuevo en el primer paso de la metanogénesis hidrogenotrófica, la reducción de CO₂ a formil-MFR (Figura 5) (Wagner *et al.*, 2018).

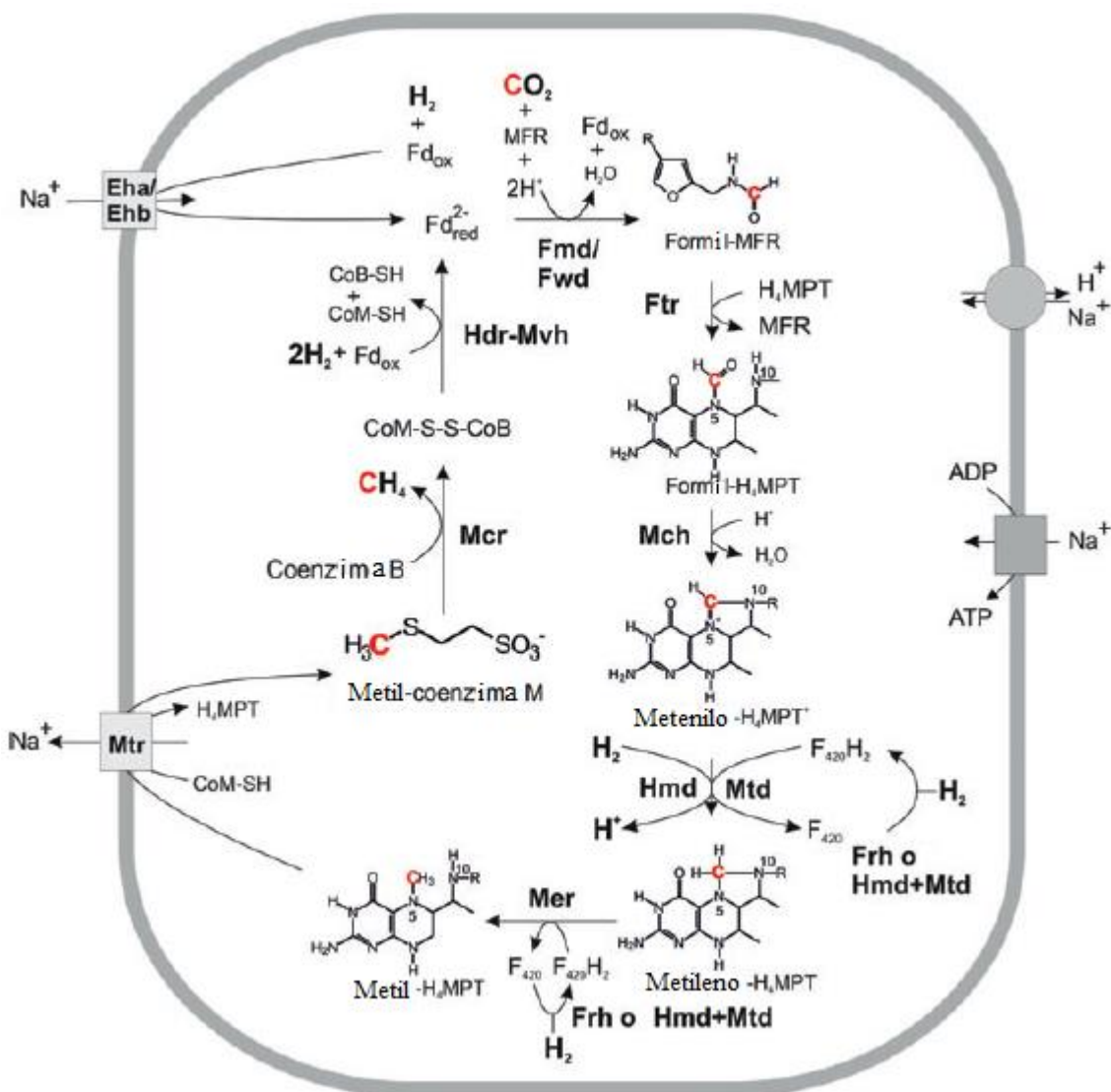


Figura 5. Descripción general de la vía hidrogenotrófica para la producción de metano. Modificada de Bai *et al.*, 2017.

3.8 Industria lechera en México

Al finalizar enero de 2023 se han obtenido 3,125 millones de litros de leche en México. Jalisco ha generado 648 millones de litros (20.7% del total nacional), Coahuila 368 millones (11.8%), Durango 364 millones (11.6%), Chihuahua 296 millones (9.5%), y el resto de los estados 1,450 millones de litros (46.4%) (SIAP, 2023).

México realiza mayores compras que ventas de leche de bovino. Anualmente importa alrededor de 381,000 toneladas de leche y exporta 69,000 toneladas. Durante marzo, la nación realizó el mayor volumen de compra en lo que va de 2023, alrededor de 40,000 toneladas, lo que significó 17.8% más que febrero pasado y 15.5% más respecto al mismo mes de 2022 (SIAP, 2023).

El volumen total de producción de leche en 2020 fue de 12,553.8 millones de litros, siendo Jalisco y Coahuila los mayores productores con 2,625.726 millones de litros y 1,457.972 millones de litros respectivamente. Mientras que los menores productores son Quintana Roo y Yucatán con 5.434 millones de litros y 2.742 millones de litros respectivamente (Figura 6) (SIAP, 2021).

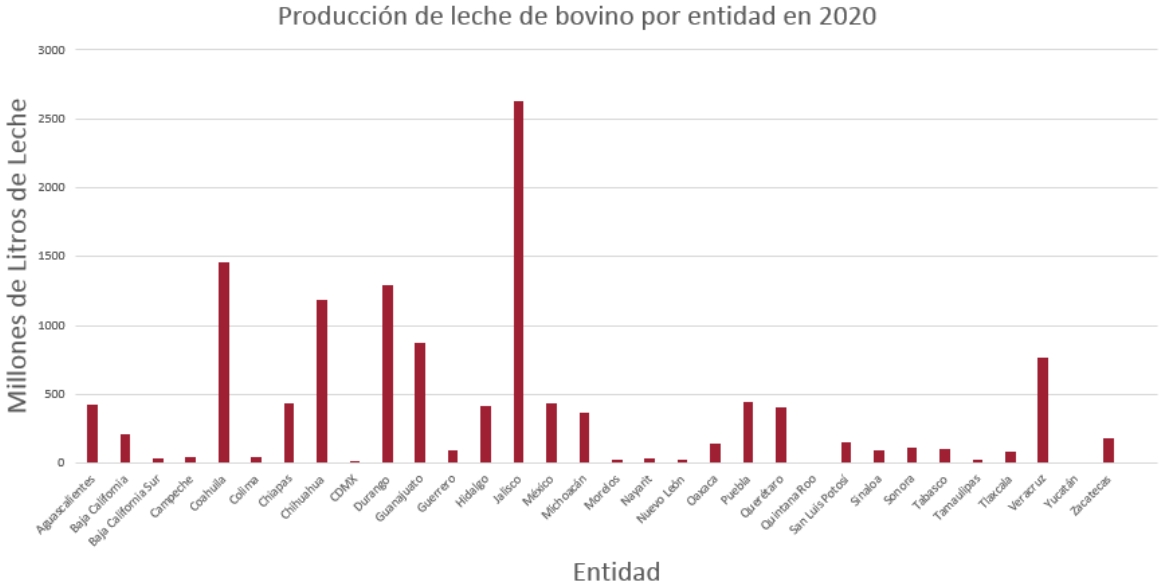


Figura 6. Producción de leche de bovino en México por entidad, durante el año 2020.

La producción de leche se genera en los periodos de lactancia en el ciclo reproductivo de las vacas que provienen del ganado especializado, cruza y ganado de doble propósito. En México cada vez se avanza más en el desarrollo de la genética y genómica de las razas puras de registro y principalmente del ganado Holstein que es el más significativo en la producción de leche (SADER, 2017; 2021).

4. Justificación del estudio

La gran mayoría de los estudios realizados sobre perfiles de arqueas en rumiantes, se han enfocado en animales adultos y han hecho énfasis en el contenido ruminal. Debido a esto, se desconoce en que momentos de la vida del rumiante neonato se lleva a cabo la colonización por parte de arqueas metanogénicas, y también se desconoce el perfil de arqueas que incluye a las establecidas en el intestino posterior. Dada esta situación, el presente estudio pretende ampliar la información generada sobre las comunidades de arqueas en ganado, específicamente en ganado Holstein-Friesian, ya que es el más utilizado a nivel mundial para la producción de la leche. De esta manera, se conocerá cual es el efecto que tienen la edad y su respectiva dieta sobre el comportamiento de la comunidad arqueana, y a futuro, en combinación con los conocimientos de formulación de dietas existentes, se podrán empezar a generar mejores estrategias para la mitigación del gas metano desde temprana edad.

5. *Objetivos*

5.1 *Objetivo general:*

Describir el proceso de colonización en el sistema gastrointestinal de becerras Holstein friesian por parte de arqueas metanogénicas, y caracterizar el efecto que tienen la edad y la dieta ofrecida a las becerras, sobre la comunidad de dichas arqueas.

5.2 *Objetivos particulares:*

- Identificar los taxones de la comunidad de arqueas hasta nivel de género y calcular sus abundancias.
- Calcular la abundancia diferencial de los géneros entre grupos por edad.
- Medir la correlación entre el tiempo de vida y la abundancia de los géneros.
- Sentar las bases teóricas y prácticas para el desarrollo de estudios de metagenómica.

6. *Hipótesis*

Así como hay una sucesión ecológica en el sistema gastrointestinal de rumiantes neonatos conforme avanza el tiempo de vida, las arqueas colonizarán y se establecerán en dicho sistema hasta que las becerras comiencen a consumir alimento sólido (principalmente forraje) y el rumen haya alcanzado un alto grado de madurez.

7. Materiales y métodos

7.1 Animales y lugar de estudio

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron muestras de heces previamente colectadas (Pérez-Avendaño, 2020). Cabe señalar que en el estudio de Pérez-Avendaño (2020) se realizó la caracterización de la comunidad bacteriana, mientras que el presente trabajo, se enfocó en el estudio únicamente de arqueas metanogénicas. Las muestras fueron tomadas de bovinos en edad temprana, estas se colectaron en el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT), Hidalgo, ubicado en el Km 50 de la carretera federal México-Pachuca. Específicamente en el establo #160 del complejo, el cual, tiene un manejo intensivo de tamaño mediano en la producción lechera. La población total era de 500 vacas de la raza Holstein-Friesian. El periodo total de muestreos comprendió los meses de julio a octubre de 2018, la cual fue época de lluvias. Dicho trabajo fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) de la FESC-UNAM, protocolo número C18-14.

Se colectaron muestras de heces de ocho becerras recién nacidas, identificadas con los códigos 1617, 1841, 1875, 2277, 2281, 2289, 2866 y 2989. El manejo de alojamiento de las becerras se llevó a cabo según lo establecido en el complejo, lo cual consiste en alojamiento individual desde el nacimiento hasta la semana 8 de vida. A partir de la semana 8, el alojamiento cambió de individual a grupal, donde las becerras de este estudio interactuaron entre ellas mismas y con otros individuos en crecimiento, los cuales tenían de 8 a 12 semanas de edad. Todos los animales compartían las áreas de echaderos, comederos y bebederos.

7.2 Alimentación

Los animales se sometieron al manejo y alimentación implementados en el establo, lo cual consistió en lo siguiente: calostro natural de la madre sin tratamiento, dos veces al día, a una razón del 10% del peso corporal durante las primeras 48 horas de vida. El calostro consumido por las becerras tuvo una concentración de IgG entre 50 y 70 mg de IgG/mL, de modo que este fue considerado de buena calidad (Campos *et al.*, 2007; Pérez-Avedaño, 2020), cabe mencionar que no se realizó conteo bacteriano ni se llevó a cabo pasteurización. En el tercer día, se ofreció una cubeta de cuatro litros de leche a las 8am y 4pm respectivamente; durante los días posteriores, se ajustó la cantidad de leche ofrecida conforme el aumento del peso vivo de las becerras. La leche proporcionada a los animales se analizó para composición química en el laboratorio comercial COFOCALEC, Estado de Jalisco (<https://www.cofocalec.org.mx>). En general, la leche tuvo en promedio 3.43% de proteína, 3.58% de grasa y 4.77% de lactosa. Estos valores se encuentran dentro del rango aprobado para la composición química de la leche en la raza Holstein (FAO, 2022). No se llevó a cabo conteo bacteriano ni pasteurización, y tampoco se correlacionó la composición de la leche con la colonización del rumen.

A partir de la segunda semana de vida se ofreció alimento iniciador concentrado *ad libitum* y a partir de la tercera semana de vida, también se ofreció alfalfa deshidratada *ad libitum*. La composición química de dichos alimentos se analizó en el laboratorio Forrajera de Ganaderos de Aguascalientes, SA de CV.; FOGASA, Estado de Aguascalientes (<https://fogasa.com.mx>). Dichos resultados de composición química se muestran en el **Cuadro 2**. Cabe mencionar que no se realizó conteo bacteriano. En todo momento, se ofreció agua a libre acceso.

En el **Cuadro 2** se presenta la composición química del concentrado iniciador consumido por las becerras durante este experimento, estos valores nutricionales son

similares a los proporcionados en establos comerciales productores de leche en México (Medina, 2016; Ávalos et al., 2017).

Cuadro 2. Composición química del alimento iniciador proporcionado a las becerras.

Parámetro	Alimento	
	Concentrado iniciador	Alfalfa deshidratada
Materia seca, %	90.20	81.27
Proteína cruda %	17.61	16.21
Grasa, %	3.51	2.35
Fibra detergente neutro, %	18.33	48.64
Fibra detergente ácido, %	8.55	37.00
Carbohidratos no fibrosos, %	54.20	20.44
Cenizas, %	6.34	12.36
Elementos libres de nitrógeno %	66.91	
Energía neta de mantenimiento %	1.91	
Energía neta de ganancia %	1.22	
Total de nutrientes digestibles, %	80.32	59.66

7.3 Colecta de muestras

El método utilizado para la obtención de muestras fecales fue estimulación anal gentil con guante estéril. Las heces se recibieron en una bolsa de plástico estéril y se depositaron en un tubo eppendorf estéril de 2 mL, cada muestra se tomó por duplicado (Uyeno *et al.*, 2010). Las muestras se congelaron inmediatamente a una temperatura de -20 °C. Una vez terminado el periodo de colecta, las muestras se almacenaron en el laboratorio de nutrición de la FES-Cuautitlán a la misma temperatura hasta el momento de su análisis.

El muestreo inició el primer día de vida (entre 12 y 24 horas después del nacimiento), posteriormente, se tomaron muestras semanales aproximadamente a las 9am, hasta la semana número 9 de edad. Debido a las actividades de agrupación de los animales en la semana 8 de vida, no se tomaron muestras, por lo que el último muestreo se realizó en la semana 9 de vida. Durante esta etapa de muestreos, se llevaron a cabo registros de sanidad de los animales, los disturbios digestivos (diarreas) fueron tratados según recomendaciones del personal autorizado.

7.4 Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras obtenidas se llevó a cabo en el laboratorio RTL Genomics Lubock, Texas EUA. (<https://rtlgenomics.com>), utilizando el kit Qiagen Power Soil siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración obtenida se midió con el fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

7.5 Secuenciación de ADN

En el laboratorio RTL Genomics, Lubock, Texas EUA. Se realizó la amplificación de la región hipervariable V4 del gen 16S rRNA mediante PCR con los iniciadores 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) y 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) que incluyen posiciones degeneradas. Esta región ha sido adecuada para la identificación de las arqueas metanogénicas (Simbahan *et al.*, 2005; Porat *et al.*, 2010). Se prepararon las bibliotecas genómicas para el análisis microbiano y posteriormente se llevó a cabo la secuenciación masiva de ADN mediante la plataforma Illumina Miseq®; dicha secuenciación se realizó en ambos sentidos para cada muestra. Los archivos de las secuencias se recibieron en formato FASTA y FASTQ, también se recibieron los archivos Qual que indican la calidad de la secuenciación. En el proceso de análisis, se utilizaron aquellas secuencias de alta calidad, esto se logró por medio del uso de un *Q score* con un valor mínimo de 30.

7.6 *Análisis bioinformático*

Mediante el programa Mothur (Schloss *et al.*, 2009) se hizo el alineamiento de las secuencias y la eliminación de errores de secuenciación, después del proceso de filtrado, se armaron las secuencias concatenadas de cada muestra. Posteriormente, utilizando el programa QIIME 2 (Bolyen *et al.*, 2019) se hizo la asignación de OTU (Unidad Taxonómica Operativa) tomando como referencia la base de datos SILVA (versión 128), y se hizo el cálculo de los porcentajes microbianos en los niveles taxonómicos: filo, clase, orden, familia y género.

7.7 *Análisis estadístico*

Antes de realizar los análisis estadísticos, se procedió a la búsqueda de datos atípicos (*outliers*) mediante la prueba de distancia D de Cook; esta se obtiene eliminando el *i*-ésimo punto de datos de un modelo de regresión y calculando de nuevo la regresión, de modo que resume cuanto cambian todos los valores en el modelo cuando se elimina la *i*-ésima observación. Cualquier punto mayor a $4/n$ (donde *n* es el número de observaciones) es considerado un *outlier*. Después de esto, se aplicaron cuatro pruebas de normalidad para conocer la distribución de los datos de cada género: Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Cramer-von Mises y Anderson-Darling; en las que un valor de $P < 0.05$ significa que los datos no tienen normalidad. Dichas pruebas se realizaron con el programa SAS (versión 9.4; Cary, NC; AS Institute Inc.). Posteriormente, los datos fueron introducidos en el paquete Maaslin 2 (versión 1.10; Mallick *et al.*, 2021) del programa R (versión 4.2.1; R Core Team, 2022) mediante la interfaz RStudio (RStudio Team, 2022), donde se llevó a cabo la normalización y análisis de los datos mediante la transformación de relación logarítmica centrada (CLR), la cual es un enfoque de análisis de datos de composición (CoDa) que utiliza la media geométrica de los recuentos de lectura de todos los taxones dentro de una muestra como referencia para esa misma muestra, así, todos los recuentos de lectura de taxones dentro de una muestra, se dividen por esta media geométrica y

posteriormente se comparan los cambios logarítmicos en esta proporción entre las diferentes muestras (Fernandes *et al.*, 2014). Sin embargo, debido a que la transformación logarítmica no se puede aplicar a ceros (que a menudo son más de la mitad de los recuentos de datos microbianos), estos se reemplazan con pseudoconteos, que son cifras de valores tan pequeños que no afectan el estudio (Paulson *et al.*, 2013; Mandal *et al.*, 2015). Finalmente, los valores P obtenidos se ajustaron mediante el método Benjamini-Hochberg, el cual, es una herramienta que disminuye la tasa de falso descubrimiento, es decir, ayuda a evitar errores de Tipo I (rechazar incorrectamente hipótesis nulas verdaderas, falsos positivos) (Benjamini y Hochberg, 1995). De esta manera se logró calcular la abundancia diferencial de las poblaciones de arqueas entre edades de las becerras.

La abundancia total de arqueas se calculó considerando también la abundancia total de bacterias, es decir, el porcentaje total obtenido de arqueas, es la proporción que corresponde únicamente a este dominio en el total de microbios encontrados en las muestras de heces.

Con el paquete ggplot2 (versión 3.3.6; Wickham, 2016) del programa R, se hicieron análisis de correlación y se construyeron correlogramas para evaluar el grado de la misma en cada género de arqueas con respecto al tiempo (edad de las becerras), y de la misma manera, también se evaluó el grado de correlación que existe entre los mismos géneros.

8. Resultados

8.1 Presencia de valores atípicos (Outliers)

Aplicando la prueba de identificación de datos atípicos “Distancia D de Cook”, se encontró que la población de *Methanobrevibacter* carece de ellos, mientras que en la

población de *Methanosphaera*, se identificaron cinco (observaciones 4, 15, 32, 41 y 50) (**Figura 1** del **Apéndice**), dichos *outliers* fueron eliminados del análisis estadístico para evitar sesgo en los resultados.

8.2 Normalidad de los datos

Se aplicaron las pruebas Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Cramer-von Mises y Anderson Darling en el programa SAS para la evaluación de la normalidad en la distribución de los datos. En ambos géneros, todas las pruebas indicaron que no hubo distribución normal, ($P < 0.05$), esto se puede apreciar en los **Cuadros A y B** del **apéndice**.

8.3 Taxones encontrados

En este análisis se encontró el filo Euryarcheota, el cual abarca a las arqueas metanogénicas. Dentro de este filo, se identificaron tres clases que incluyen un orden respectivamente, se encontraron también dos familias y tres géneros en total. Además se encontraron una familia y un género desconocidos. Esto se puede apreciar en el **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Taxones encontrados de arqueas en el análisis metagenómico en las muestras de heces colectadas de becerras desde el día 1 de vida hasta el día 63 de edad.

Dominio	Filo	Clase	Orden	Familia	Género
<i>Archaea</i>	Euryarcheota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobrevibacter</i>
<i>Archaea</i>	Euryarcheota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanosphaera</i>
<i>Archaea</i>	Euryarcheota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanocorpusculaceae	<i>Methanocorpusculum</i>
<i>Archaea</i>	Euryarcheota	Thermoplasmata	Thermoplasmatales	<i>Incertae sedis</i>	No cultivado

8.4 Presencia de arqueas según la edad de las becerras

El análisis de abundancia diferencial demostró que el factor “edad de la becerro” tiene una influencia significativa sobre las poblaciones de ambos géneros, *Methanobrevibacter* ($P < 0.01$) y *Methanosphaera* ($P < 0.01$).

El género *Methanobrevibacter* fue el más abundante. Su proporción máxima, en comparación con toda la microbiota encontrada en las becerras, fue de 0.62%, esto ocurrió en el día 63 de vida. El género *Methanosphaera*, que también tuvo una presencia cuantificable, contó con una proporción máxima de 0.057%, de igual manera, este valor máximo se observó en el día 63 de vida, estos datos se pueden apreciar en el apéndice Cuadro C.

En la **Figura 7** se presentan los porcentajes de abundancia de *Methanobrevibacter* por cada semana de vida expresado en días. Se incluyen las diferencias estadísticas significativas (superíndices, $P < 0.05$), las respectivas barras de error y la dieta consumida en cada semana.

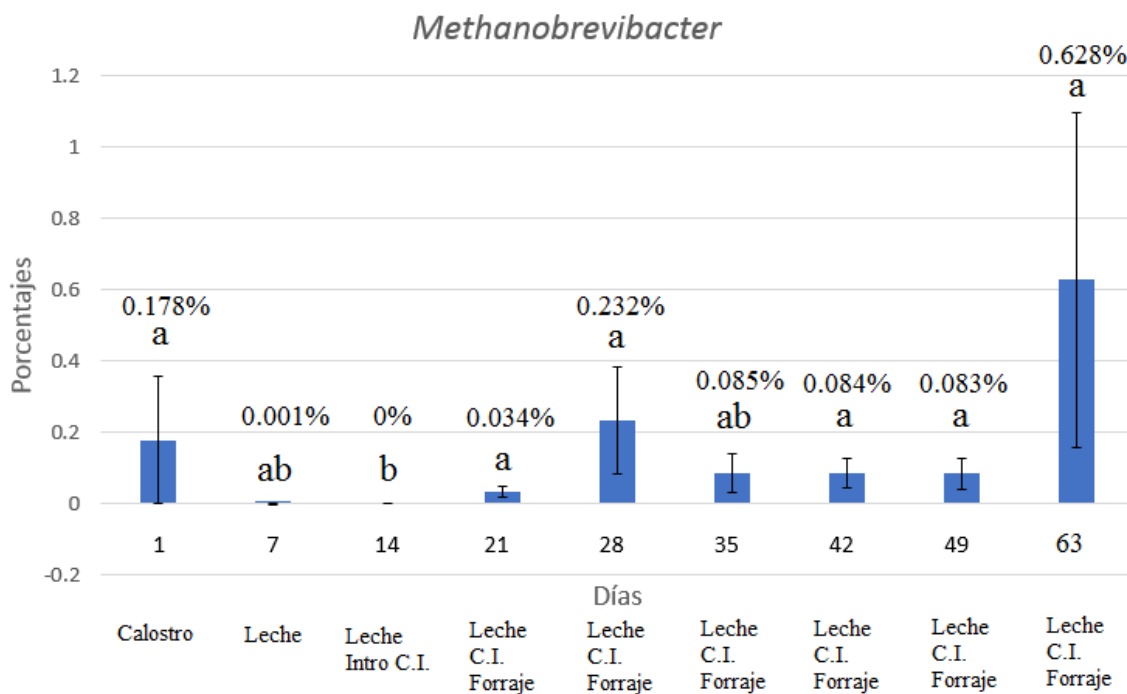


Figura 7. Porcentajes de abundancia del género *Methanobrevibacter* en muestras de heces de becerras según la edad expresado en días; los superíndices distintos indican diferencias estadísticas significativas. C.I.: concentrado iniciador.

En la **Figura 8** se presentan las abundancias del género *Methanosphaera* para cada semana de vida expresado en días. En este caso, no se encontró un efecto significativo o tendencia estadística de la edad de las becerras, sin embargo se puede apreciar como se modifican las proporciones de los porcentajes en los días.

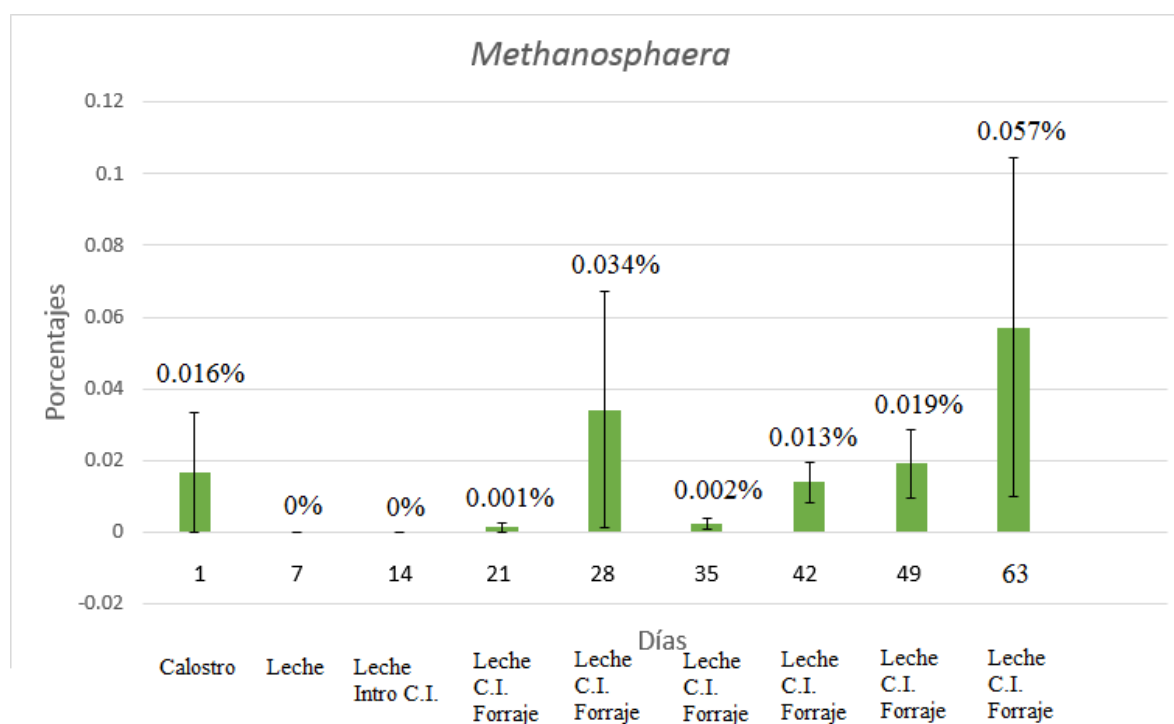


Figura 8. Porcentajes de abundancia del género *Methanosphaera* en muestras de heces de becerras según la edad expresado en días. C.I.: concentrado iniciador.

Finalmente, en la **Figura 9** se presenta el porcentaje total de arqueas encontrado en el microbioma de las becerras. Dicha figura cuenta con los porcentajes de abundancia

de arqueas totales por cada semana de vida expresado en días, se incluyen las diferencias estadísticas significativas (superíndices, $P < 0.05$).

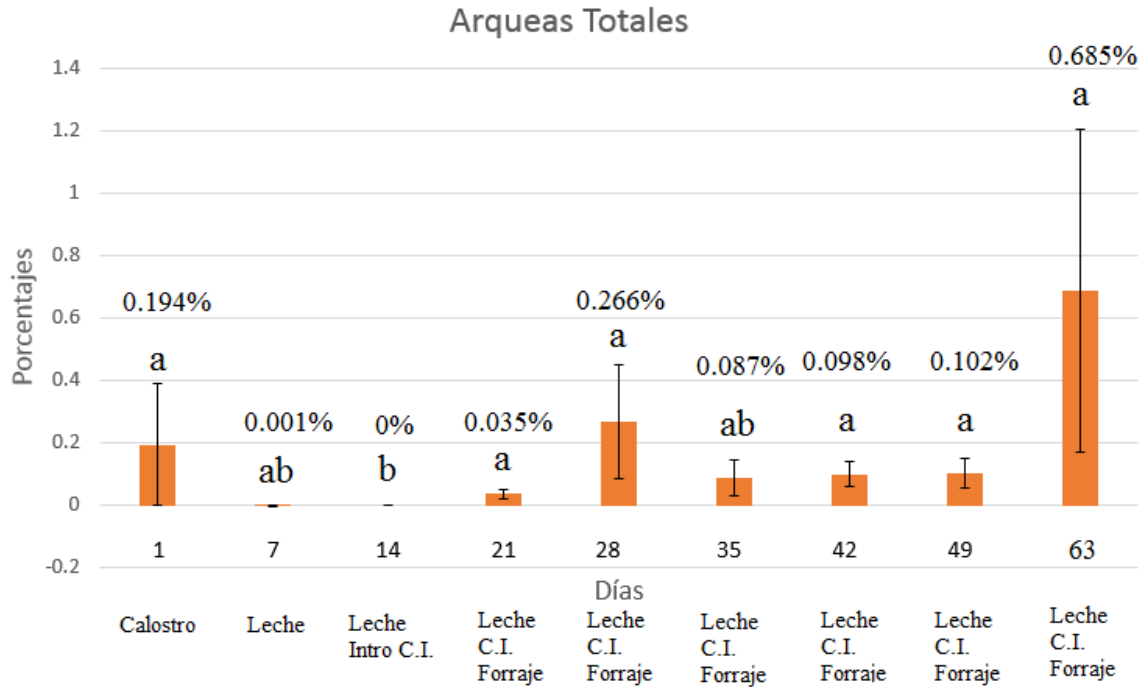


Figura 9. Porcentajes de abundancia total de arqueas en muestras de heces de becerras según la edad expresado en días; los superíndices distintos indican diferencias estadísticas significativas. C.I.: concentrado iniciador.

Por otra parte, el género *Methanocorpusculum* solo se detectó en dos ocasiones, esto sucedió en una becerro durante las semanas tres y siete. De modo similar, el género no cultivado del orden Thermoplasmatales, se detectó una vez en una becerro durante la semana siete de edad. Debido a esto, dichos géneros no fueron considerados para realizar análisis estadísticos.

8.5 Correlaciones entre edad de becerras y presencia de arqueas

Se hicieron análisis de correlación entre los géneros de arqueas y el tiempo de vida (semanas) de las becerras (**Figura 10**), así como de los géneros entre sí. Se encontró una correlación positiva débil entre el tiempo y los géneros. Por otro lado, se pudo observar una correlación positiva muy fuerte entre ambos géneros y en comparación con las arqueas totales.

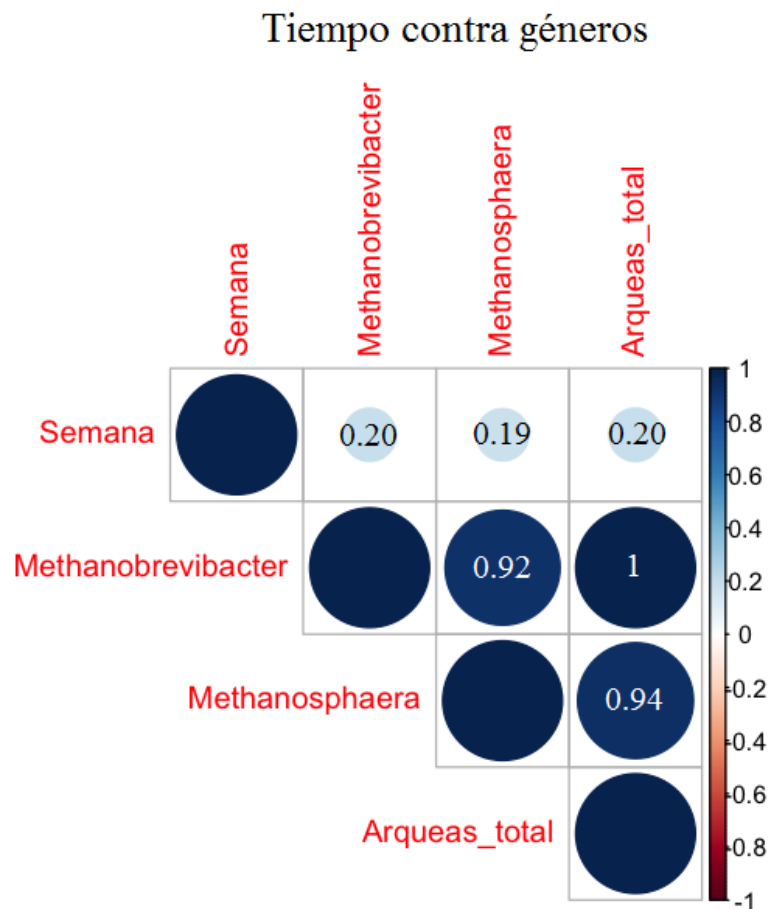


Figura 10. Correlograma entre la edad de las becerras y la presencia de los géneros de arqueas ($P < 0.05$).

9. *Discusión*

A pesar de la importancia de la comunidad de arqueas que habitan en el sistema gastrointestinal del ganado bovino, existen pocos trabajos sobre el proceso de colonización y establecimiento de estos microorganismos durante la etapa temprana de vida. Este es el primer trabajo en que se reporta la presencia de arqueas metanógenas en el sistema gastrointestinal de becerras a partir del primer día de vida, y que describe la proliferación semanal de los géneros principales de arqueas durante los dos primeros meses de vida en un sistema de producción de ganado lechero. Para lograr tal objetivo, se utilizaron muestras de heces, ya que la canulación intestinal, en particular a edad temprana, representaría un método sumamente invasivo.

En el primer día de vida la alimentación de las becerras se basó en el calostro materno. Dicho alimento no tuvo algún tratamiento previo para la eliminación de microorganismos ni se llevó a cabo conteo bacteriano, y aunque en el presente estudio no se realizó el análisis de la composición nutricional del calostro consumido, se sabe que este es rico en grasa y proteína. Tales nutrientes se digieren principalmente a nivel intestinal, ya que, al ser ingeridos estos van directamente al abomaso y sistema digestivo posterior por medio del canal esofágico (Domingues *et al.*, 2016). En este primer día de vida, se detectó la presencia de los metanógenos *Methanosphaera* y *Methanobrevibacter*, siendo este último el más abundante. Los resultados de los géneros encontrados concuerdan con reportes previos, donde se ha indicado su presencia y se menciona que *Methanobrevibacter* es el género más abundante en rumiantes (Wright *et al.*, 2007; Janssen y Kirs, 2008; Ushida, 2010); sin embargo, este hallazgo contrasta con lo encontrado por Domingues *et al.* (2016), quienes mencionan la aparición de arqueas hasta el tercer día de edad. De modo que, los géneros de arqueas detectados en el día 1 de vida, llegaron a las becerras mediante el contacto con la madre al momento del nacimiento o por medio del calostro ingerido. Cabe

señalar que en el presente estudio, se notó una disminución de las arqueas en los días 7 y 14 edad. Estos resultados sugieren que el sistema gastrointestinal aún no cuenta con las condiciones ambientales para albergar a las arqueas metanogénicas, permitir su establecimiento y proliferación.

Durante la primera semana de vida de las beceras, cuando la alimentación se basa en leche (misma que incluye principalmente proteína, grasa y lactosa) la digestión de los nutrientes se produce principalmente en los intestinos. De modo que a esta edad, ya existe una gran actividad enzimática y de fermentación a nivel intestinal aunque no se trate de un ambiente anaeróbico, probablemente los niveles de pH son fluctuantes. Domingues *et al.* (2016) mencionan que a esta edad las arqueas metanógenas aparecen en cantidades claramente cuantificables ($10^8/g$); sin embargo, estos autores no especifican si se trata de beceras aisladas o en contacto con su madre. En este estudio las beceras fueron alojadas de manera individual hasta el día 56 de vida. En el día 7 de vida, encontramos un porcentaje muy bajo (9.01^{-05}) del género *Methanobrevibacter* en solo una de las beceras. En el día 14 de vida no se reportó presencia alguna de arqueas en las muestras de heces. Esto enfatiza que, dada la alimentación basada en leche y la edad temprana de las beceras, el sistema gastrointestinal aún no cuenta con las condiciones necesarias para poder albergar arqueas metanogénicas.

A partir del día 21 de vida se observó un incremento significativo en la abundancia de arqueas en las muestras. Este incremento se mantuvo a partir de este día de edad. Lo cual significa que las condiciones gastrointestinales permitieron la proliferación de dichos microorganismos. Esto, quizás debido a un mejor balance de la fermentación y pH intestinal, así como una maduración en el rumen, resultado del consumo no solamente de leche sino también de concentrado iniciador y forraje. Por otro lado, esta abundancia sostenida de arqueas en el sistema gastrointestinal probablemente pudo

facilitarse debido al establecimiento de los protozoarios con los que comúnmente se asocian las arqueas.

En la semana ocho de vida no se llevó a cabo el muestreo correspondiente debido a que las becerras se trasladaron a un corral comunal. En la semana nueve, las arqueas alcanzaron su punto máximo de abundancia en este estudio, esto puede deberse a la interacción que hubo entre individuos y al tipo de alimentación, principalmente consumo de forraje. Se sabe que la fermentación del forraje genera carbono e hidrógeno, los cuales son utilizados por la comunidad de arqueas para la producción de su energía metabólica.

Reportes previos han sugerido que la comunidad de arqueas constituye del 2 al 4% de la comunidad microbiana en rumiantes (Domingues *et al.*, 2016), estos valores son mayores a los observados en este estudio, en donde el valor máximo encontrado fue de 0.685%. Por lo tanto, es probable que el porcentaje de arqueas siga en aumento conforme las becerras crecen, esto puede ser un tema de interés para trabajos futuros.

También se detectó el género *Methanocorpusculum* de la clase Methanomicrobia. A pesar que este género se encontró solamente una vez en una becerro, es de los mayormente asociados a protozoarios ciliados en rumiantes adultos (Ushida, 2010). La presencia escasa de *Methanocorpusculum* a edad temprana en las becerras, puede deberse a la diferencia de dieta proporcionada entre becerras y rumiantes adultos. Es posible que dicho género de arqueas esté mejor adaptado a una dieta totalmente sólida. Además, es posible que *Methanocorpusculum* este adaptado a condiciones de pH más bajos; aunque en este estudio no se midió el pH de las muestras colectadas, se conoce que el pH del rumen es menor que el pH intestinal (Domingues *et al.*, 2016).

La clase Thermoplasmata, así como su orden Thermoplasmatales, también han sido registrados en los estudios de arqueas en rumiantes (Kim *et al.*, 2011). Sin embargo,

no se logró identificar la familia ni el género de este taxón, además de que solo se encontró en un animal en proporciones muy bajas. Esto se puede deber a que se trata de un taxón que no está fuertemente asociado en la etapa temprana de beceras y que coloniza el sistema gastrointestinal conforme los ruminates alcanzan la edad adulta.

La correlación positiva encontrada entre la edad de las beceras y los respectivos porcentajes de *Methanobrevibacter* y de *Methanosphaera*, indican que conforme aumenta la edad también aumenta el porcentaje de arqueas, ya que van mejorando las condiciones para su establecimiento y desarrollo. Sin embargo, dicha correlación fue débil, lo cual indica que no hay un aumento lineal del porcentaje de los géneros conforme avanza la edad de las beceras. Por otro lado, la correlación positiva fuerte ($r = 0.92$) que hay entre los dos géneros, indica la presencia simultánea de ambos. Aunque los valores de *Methanosphaera* fueron tan pequeños que incluso no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, las proporciones de sus porcentajes siguieron la misma tendencia que los de *Methanobrevibacter*, esto sugiere alguna simbiosis del tipo mutualista entre los dos géneros, ya que se desarrollan en el mismo ambiente y bajo las mismas condiciones.

10. Conclusiones

Se encontró la presencia de arqueas en el sistema gastrointestinal de beceras Holstein a partir del primer día de vida. Sin embargo, a esa edad las condiciones ambientales de dicho sistema todavía no son las adecuadas para su establecimiento y proliferación. Fue hasta la tercera semana de edad, en la que ya se consume alimento sólido, cuando se encontraron las condiciones necesarias para el desarrollo de arqueas. El pico máximo de abundancia se alcanzó en la semana nueve, cuando las beceras consumen concentrado iniciador y forraje.

Methanobrevibacter fue el género más abundante, mientras que *Methanosphaera* fue el segundo más representativo. La colonización del sistema gastrointestinal de parte de ambos géneros sigue el mismo patrón dado que comparten el mismo ambiente, las mismas condiciones de edad y alimentación de las becerras. Esto se reflejó en la correlación positiva fuerte que hubo entre ellos (0.92).

La edad de las becerras ejerce una influencia significativa sobre la colonización y la abundancia de las arqueas; el tipo de alimentación, también influye sobre las mismas.

Prospectivas

Para estudios futuros, es recomendable evaluar la comunidad de arqueas a un plazo mayor de tiempo (entre uno o dos años), así se podrán conocer los momentos en que dicha comunidad alcanza su pico máximo de abundancia, cuando logra una estabilización, y con que tipo de dieta. Para complementar esta información, también se sugiere evaluar la comunidad de arqueas en el rumen, y de ser posible, evaluar la producción y cambios en el gas metano.

Combinar estos conocimientos con la formulación de dietas, ayudará a proponer estrategias eficientes para modificar desde edad temprana la comunidad de arqueas con base en la alimentación y así, mitigar la producción de metano.

11. Referencias bibliográficas

1. Ávalos, R. G., J. G. Ávalos, B. P. Revuelta, A. M. Reséndiz y J. L. Carrillo. 2017. Análisis del costo de alimentación y desarrollo de becerras de reemplazo lactantes. *Rev. Mex. Agro.* 40, 561-569.
2. Bai, L., T. Fujishiro, G. Huang, J. Koch, A. Takabayashi, M. Yokono, A. Tanaka, T. Xu, X. Hu, U. Ermler y S. Shima. 2017. Towards artificial methanogenesis: biosynthesis of the [Fe]-hydrogenase cofactor and characterization of the semi-synthetic hydrogenase. *Faraday Discuss.* 198: 37.
3. Belanche, A., G. De la Fuente y C. J. Newbold. 2014. Study of methanogen communities associated with different rumen protozoal populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90, 663-677.
4. Benaouda, M., M. González R., L. T. Molina y O. A. Castelán. 2017. Estado de la investigación sobre emisiones de metano entérico y estrategias de mitigación en América Latina. *Rev. Mex. Cienc. Agri.* 8(4): 965-974.
5. Blum, P. y V. Dixit. 2004. Archaea. In: Schaechter M, ed. The desk encyclopedia of microbiology. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 108–16.
6. Bolyen, E., J. R. Rideout, M. R. Dillon, et al. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857.
7. Bond, P. L., P. Hugenholtz, J. Keller y L.L. Blackall. 1995. Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing

- activated sludges from sequencing batch reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(5):1910-6.
8. Bonilla, J. A. y L. M. Clemente. 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 3(2): 215-246.
 9. Brody, S. 1945. Bioenergetics and growth. Reinhold Publ. Corp., New York, pp 69-78.
 10. Campos, R., A. Carrillo, V. Loaiza y L. Giraldo. 2007. El calostro: herramienta para la cría de terneros. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. Departamento de Ciencias Animales. Pp 12.
 11. Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Noah Fierer, N. y Knight, R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 4516–4522.
 12. Caporaso, J. G. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6, 1621–1624.
 13. Cammack, K. M., K. J. Austin, W. R. Lamberson, G. C. Conant y H. C. Cunningham. 2018. Ruminant nutrition symposium: Tiny but mighty: The role of the rumen microbes in livestock production. *Anim. Sci. J.* 96, 752–770.
 14. Castillo-Lopez, E., C. J. R. Jenkins, N. D. Aluthge, T. Westom, S.C. Fernando y P. J. Kononoff. 2017. The effects of regular or low-fat distillers grains and

- solubles on rumen methanogenesis and the rumen bacterial community. *Journal of Applied Microbiology*. 97(3), 1578-1593.
15. Cavicchioli, R. 2011. Archaea – timeline of the third domain. *Nat. Rev. Microbiol.* 9:51–61.
16. Chagunda, M. G. G., D. Ross, J. Rooke, T. Yan, J. L. Douglas, L. Poret, N. McEwan, N. Teeranavattanakul y D. J. Roberts. 2013. Remote measurement of enteric methane from ruminants under different conditions using a Laser Methane Detector. *Act. Agricul. Scan. – Anim Sci.* 63(2), 68-75.
17. Cornejo-Arteaga, P. M. L., 2021. Aplicaciones del metano. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Consultado en uaeh.edu.mx/scige/boletín/prepa3/n4/m2.html. el 3 de abril de 2022.
18. Cox, M. J., W. O. Cookson y M- F. Moffatt. 2013. Sequencing the human microbiome in health and disease. *Hum. Mol. Genet.* 22(R1): R88-94.
19. Cuéllar-Sáenz, J. A. 2021. Razas bovinas especializadas en leche. Consultado en veterinariadigital.com/articulos/razas-bovinas-especializadas-en-leche. El 20 de noviembre de 2022.
20. Cunningham, J. y B. Klein. 2008. Tratado de fisiología veterinaria. 4ª edición. Río de Janeiro: Editora Elsevier; 710p.
21. DeLong, E. F. y N. R. Pace. 2001. Environmental Diversity of Bacteria and Archaea. *Syst. Biol.* 50(4): 470-478.

22. Demeyer, D. y V. Fievez. 2000. Ruminants et environnement: la méthanogénèse. *Annales de Zootechnie*. 49: 95–112.
23. Domingues, M. D., M. D. B. Arrigoni y R. D. L. Pacheco. 2016. Rumenology. 1st edition. Springer. Switzerland.
24. Ermler, U., W. Grabarse, S. Shima, M. Goubeaud y R. K. Thauer. 1997. Crystal structure of methyl coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation. *Science*. 278: 1457-1462.
25. Fernandes, A. D., J. N. Reid, J. M. Macklaim, T. A. McMurrough, D. R. Edgell y G. B. Gloor. 2014. Unifying the analysis of high-throughput sequencing datasets: characterizing RNA-seq, 16S rRNA gene sequencing and selective growth experiments by compositional data analysis. *Microb.* 2, 15.
26. Ferry, J. G. y K. A. Kastead. 2007. Methanogenesis. En: Cavicchioli R. (ed) *Archaea: molecular and cellular biology*. ASM Press, Washongton, DC. Pp 288-314.
27. Fox, G. E., L. J Magrum, W. E. Balch, R. S. Wolfe y C. R. Woese. 1977. Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 4537–41.
28. Ganesan, A. L. *et al.* 2019. Advancing scientific understanding of the global methane budget in support of the Paris Agreement *Glob. Biogeochem. Cycles* 33: 1475–512.
29. Gevers, D. y T. Coenye T. 2007. Phylogenetic and genomic analysis. En: Hurst C.J., R. L. Crawford, J. L. Garland, D. A. Lipson, A. L. Mills y L. D.

Stetzenbach, eds. *Manual of Environmental Microbiology*. 3rd ed. Washington DC: ASM Press, 157–68.

30. Gottschalk, G. y R. K. Thauer. 2001. The Na⁺ -translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea. *Biochim. Biophys. Acta*. 1505: 28-36
31. Gloobe, H. 1989. *Anatomía aplicada del bovino*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Servicio Editorial IICA. 1ª edición. Costa Rica.
32. Hegarty, R. S. y A. V. Klieve. 1999. Opportunities for biological control of ruminal methanogenesis. *Aust. J. Agr. Res.* 50, 1315-1320.
33. Hespell, R. B., D. E. Aiken y B. A. Dehority. 1997. Bacteria, fungi, and protozoa in the rumen. En: Mackie RI, White BA, editors. *Gastrointestinal microbiology*. New York: Chapman & Hall; Pp. 59–141.
34. Howland, J. L. 2000. *The surprising archaea: discovering another domain of life*. New York, NY: Oxford University.
35. Hristov, A. N., J. Oh, J. L. Firkins, J. Dijkstra, E. Kebreab, G. Waghorn, H. P. Makkar, A. T. Adesogan, W. Yang, C. Lee, P. J. Gerber, B. Henderson y J. M. Tricarico. 2013. Special topics mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *J. Animal Sci.* 91(11): 5045-5069.
36. DMC. 2019. *IDMC Mid-Year Figures: Internal Displacement from January to June 2019* (Geneva: IDMC).

37. IPCC. 2014. Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change ed O Edenhofer et al (Cambridge: Cambridge University Press).
38. Jackson, R. B., M. Saunois, P. Bousquet, J. G. Canadell, B. Poulter, A. R. Stavert, P. Bergamaschi, Y. Niwa A. Segers y A. Tsuruta. 2020. Increasing anthropogenic methane emissions arise equally from agricultural and fossil fuel sources. *Environ. Res. Lett.* 15 071002.
39. Janssen, P. H. y Kirs M. 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(12): 3619-3625.
40. Joblin, K. N., H. Matsui, G. E. Naylor y K. Ushida. 2002. Degradation of fresh ryegrass by methanogenic co-cultures of ruminal fungi grown in the presence or absence of *Fibrobacter succinogenes*. *Current Microbiol.*, 45 (1), 46–53.
41. Kim, M., M. Morrison, y Y. Zhongtang. 2011. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 76 (1), 49–63.
42. Kirschke, S. *et al.* 2013. Three decades of global methane sources and sinks *Nat. Clim. Change* 6: 813–23.
43. Klieve, A. V., D. Ourwerkerk y A. J. Maguire. 2012. Archaea in the foregut of macropod marsupials: PCR and amplicon sequence-based observations. *J. Appl. Microbiol.* 113(5):1065-1075.

44. Krause, D. O., T. G. Nagaraja, A. D. G. Wright y T. R. Callaway. 2013. Board invited review: Rumen microbiology: leading the way in microbial ecology. *J Anim Sci.* 91:331–41.
45. Lee, H. J., Jung J. Y., Oh Y. K., Lee S. S., Madsen E. L y Jeon C. O. 2012. Comparative survey of rumen microbial communities and metabolites across one caprine and three bovine groups, using Bar-Coded Pyrosequencing and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *App. Env. Microbiol.* 78 (17) 5983-5993.
46. Mallick, H., A. Rahnavard, L. J. McIver, S. Ma, Y. Zhang, L. H. Nguyen, T. L. Tickle, G. Weingart, B. Ren, E. H. Schwager, S. Chatterjee, K. N. Thompson, J. E. Wilkinson, A. Subramanian, Y. Lu, L. Waldron, J. N. Paulson, E. A. Franzosa, H. C. Bravo y C. Huttenhower. 2021. Maaslin2. *PLoS Computational Biology*, 17 (11): e1009442.
47. Mandal, S., W. Van Treuren, R. A. White, M. Eggesbo, R. Knight y S. D. Peddada. 2015. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb. Ecol. Health Dis.* 26: 27663.
48. McSweeney, C. S., S. E. Denman, A-D.G. Wright y Z. Yu. 2007. Application of recent DNA/RNA-based techniques in rumen ecology. *Asian Australas J Anim Sci* 20:283–94.
49. Medina, O. E. 2016. Eficiencia alimenticia neta en becerras de los grupos raciales criollo Angus x Criollo y Hereford x Angus. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Chihuahua.

50. Miller, T. L. 1995. Ecology of methane production and hydrogen sinks in the rumen. Pp. 317–331. En von Engelhardt W., S. Leonhard-Marek, G. Breves y D. Giesecke. Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Germany.
51. Muñoz, C., T. Yan, D. A. Wills, S. Murray y A. W. Gordon. 2012. Comparison of the sulfur hexafluoride tracer and respiration chamber techniques for estimating methane emissions and correction for rectum methane output from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:3139-3148.
52. Murray, R. M., A. M. Bryant, y R. A. Leng. 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *Br. J. Nutr.* 36:1–14.
53. Organización Meteorológica Mundial. 15 Mayo de 2023. United in Science (Geneva: WMO). https://public.wmo.int/en/resources/united_in_science
54. Paulson J. N., O. C. Stine, H. C. Bravo y M. Pop. 2013. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat. Methods.* 10 (12): 1200-2.
55. Pérez-Avenida, R. sustentante. 2020. Caracterización de la población bacteriana del sistema digestivo en becerras durante temprana edad. Tesis para obtener título de maestría en ciencias de la Producción y de la Salud Animal. UNAM. México.
56. Pollock, J., L. Glendinning L, T. Wisedchanwet y M. Watson. 2018. The madness of microbiome: attempting to find consensus “best practice” for 16S microbiome studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 84: e02627-17.

57. Porat, I., T. A. Vishnivetskaya, J. J. Mosher, C. C. Brandt, Z. K. Yang, S. C. Brooks, L. Liang, M. M. Drake, M. Podar, S. D. Brown y A. V. Palumbo. 2010. Characterization of archaeal community in contaminated and uncontaminated surface stream sediments. *Microb. Ecol.* 60:784-795.
58. Primavesi, O., R. T. Shiraishi, M. Dos Santos, M. Aparecida, T. Teresinha y P. Franklin. 2004. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. *Pesq. Agropec. Bras.* 39 (3): 277-283.
59. Ramírez, J. F., S. P. Ochoa y R. Noguera. 2014. Metanogénesis ruminal y estrategias para su mitigación. *CES Med. Zootec.* 9(2): 307-323.
60. R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
61. RStudio Team. 2022. RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
62. SADER. 2017. Firme el sector lechero frente a modernización del TLCAN: SAGARPA. Consultado en <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/firme-el-sector-lechero-frente-a-modernizacion-del-tlcan-sagarpa> el 25 de mayo de 2023.
63. SADER. 2021. Prevén aumento de 3.2% en la producción de leche bovina este año en México. Consultado en <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/preven-aumento-de-3-2-en-la-produccion-de-leche-de-bovino-este-ano-en-mexico?idiom=es> el 25 de mayo de 2023.

64. Saengkerdsub, S. y Ricke S. C. 2014. Ecology and characteristics of methanogenic archaea in animals and humans, *Crit. Rev. in Microbiol.* 40:2, 97-116.
65. Sauniois, M. *et al.* 2016. The global methane budget 2000-2012. *Earth Syst. Sci. Data* 8: 697–751.
66. Schloss, P. D., S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. B. Oakley, *et al.* 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541.
67. Sharp, R., C. J. Ziemer, M. D. Stern, y D. A. Stahl. 1998. Taxon specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 26 (1) 71–78.
68. Shin, E. C., B. R. Choi, W. J. Lim, S. Y. Hong, C. L. An, K. M. Cho, Y. K. Kim, J. M. An, J. M. Kang, S. S. Lee, H. Kim, H. D. Yun. 2004. Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16S rDNA sequence. *Anaer.* 10(6):313-9.
69. SIAP. 2021. Escenario mensual de productos agroalimentarios. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Consultado en https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/621458/Escenario_leche_d_e_bovino_feb_2021.pdf el 25 de mayo de 2023.
70. SIAP. 2023. Escenario mensual de productos agroalimentarios. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Consultado en

www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/826876/Leche_de_Bovino_Abril.pdf el 25 de mayo de 2023.

71. Simbahan, J., E. Kurth, J. Schelert, A. Dillman, E. Moriyama, S. Jovanovich y P. Blum. 2005. Community analysis of a mercury hot spring supports occurrence of domain-specific forms of mercuric reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(12):8836–8845.
72. Sowers, K. R. 2004. Methanogenesis. In: Schaechter M, ed. The desk encyclopedia of microbiology. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 659–89.
73. Tapio, I., T. J. Snelling, F. Strozzi y R. J. Wallace. 2017. The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 8, 7.
74. Ushida, K. 2010. Symbiotic Methanogens and Rumen Ciliates. En: Hackstein, J. H., editor. (Endo) symbiotic Methanogenic Archaea. Springer; Pp. 25-34.
75. Valencia-Salazar, S.S., G. Jiménez-Ferrer, I. C. Molina-Botero, J. C. Ku-Vera, N. Chirinda y J. Arango. 2022. Methane mitigation potential of foliage of fodder trees mixed at two levels with a tropical grass. *Agr.* 12, 100.
76. Vonck, J., K. Y. Pisa, N. Morgner, B. Brutschy y V. Muller. 2009. Three-dimensional structure of A₁A₀ ATP synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* 284:10110-10119.

77. Wagner, T., T. Watanabe y S. Shima. 2018. Hydrogenotrophic Methanogenesis. En: Stams, A. y D. Sousa (eds) Biogenesis of Hydrocarbons. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Cham.
78. Weimer, P. J., 1998. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *J. Anim. Sci.* 76: 3114 – 3122.
79. Wickham, H. 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4.
80. Williams, A. G. y G. S. Coleman. 1991. The rumen protozoa. Springer, London.
81. Woese, C. R. y G. E. Fox. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5088–90.
82. Woese, C. R., L. J. Magrum y G. E. Fox. 1978. Archaeobacteria. *J. Mol. Evol.* 11:245–252.
83. Woese, C. R., O. Kandler y M. L. Wheelis. 1990. Towards a system of organisms; proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:4576–4579.
84. Wright, A., X. Ma y N. Obispo. 2007. *Methanobrevibacter* phylotypes are the dominant methanogens in sheep in Venezuela. *Microb. Ecol.* 56(2):390-4.
85. Zhou, M. E. Hernández-Sanabria y L. L. Guan. 2010. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host

feed efficiency conditions, as determined by PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(12): 3776-86.

12. Apéndices

Cuadro A. Pruebas de distribución normal para *Methanobrevibacter*.

Pruebas de normalidad <i>Methanobrevibacter</i>	
Prueba	Valor <i>P</i>
Shapiro-Wilk	<0.0001
Kolmogorov-Smirnov	<0.0100
Cramer-von Mises	<0.0050
Anderson-Darling	<0.0050

Cuadro B. Pruebas de distribución normal para *Methanosphaera*.

Pruebas de normalidad <i>Methanosphaera</i>	
Prueba	Valor <i>P</i>
Shapiro-Wilk	<0.0001
Kolmogorov-Smirnov	<0.0100
Cramer-von Mises	<0.0050
Anderson-Darling	<0.0050

Cuadro C. Porcentajes de abundancia de los géneros de arqueas y arqueas totales por semana de vida.

Día de vida	<i>Methanobrevibacter</i> (%)	<i>Methanosphaera</i> (%)	Arqueas totales (%)
1	0.17805146	0.01672306	0.19477454
7	0.00112625	0	0.00112625
14	0	0	0
21	0.0341864	0.00132429	0.0355107
28	0.23266921	0.03403963	0.26670934
35	0.0852028	0.00223	0.0874331
42	0.08481143	0.01384988	0.09866236
49	0.0835822	0.01909704	0.10267984
63	0.6282568	0.05710274	0.68536014

Figura A. Datos atípicos encontrados en la prueba “Distancia D de Cook” en el género *Methanosphaera*. $D \geq 4/n=0.056$.

