

Artículo metodológico

Análisis comparativo de calidad de ADN de líquido ruminal obtenido por diferentes métodos de extracción**Comparative analysis of ruminal fluid DNA quality obtained by different extraction methods**

Francisco Augusto Uñates Pellene¹; Ramón Alberto Nieto¹; Ana Verónica Juárez Sequeira^{1,2}; María Esperanza Cerón-Cucchi³; Gustavo Adolfo Palma^{1,2}; María Sumampa Coria^{1,2*}

¹ Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE). Av. Belgrano (S) 1912, Santiago del Estero (G4200ABT), Argentina.

² Laboratorio de Producción y Reproducción Animal, Instituto de Bionanotecnología del NOA, CONICET-UNSE. RN 9, Km 1125, Santiago del Estero (G4206XCP), Argentina.

³ Instituto de Patobiología Veterinaria, Centro de Investigación en Ciencias Agropecuarias y Agronómicas, Unidad Ejecutora de doble dependencia INTA-CONICET. De los Reseros y Nicolás Repetto S/N, Hurlingham (B1686), Buenos Aires, Argentina.

*Correo electrónico: sumicoria@gmail.com

Resumen

Los rumiantes poseen un sistema digestivo que les confiere la capacidad de aprovechar y convertir material fibroso en alimentos de alta calidad nutritiva, debido a comunidades microbianas existentes en el rumen. La identificación de dichos microorganismos se puede realizar mediante estudios de ADN. El objetivo del presente trabajo es comparar la eficacia de cinco métodos de extracción de ADN de líquido ruminal. Las muestras de fluido ruminal se obtuvieron de un novillo Braford fistulado. Se realizó la extracción de ADN por triplicado aplicando los siguientes métodos: precipitación salina con dodecilsulfato de sodio, precipitación con acetato de potasio, método fenol-cloroformo, con reactivo DNAzol y un kit comercial. Se evaluó el rendimiento, la integridad y la pureza del ADN mediante espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa. A su vez, se evaluó la integridad mediante la amplificación de fragmentos de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa. El análisis espectrofotométrico y electroforético permitió determinar que todos los métodos generaron ADN íntegro, con excepción del acetato de potasio; las relaciones 260/280 y 260/230 obtenidas permitieron identificar contaminantes en todas las muestras. El ADN obtenido por los métodos DNAzol y kit comercial fue amplificable en el 100 % de las muestras. Los resultados obtenidos sugieren que el método DNAzol genera ADN con integridad y pureza similares al kit comercial e igual de eficaz para su uso en técnicas de biología molecular.

Palabras clave: Biología molecular; Bovinos; Microbiota ruminal; Reacción en cadena de la polimerasa.

Abstract

Ruminants possess a digestive system that allows them to convert fibrous material into highly nutritious food, thanks to the microbial communities present in the rumen. Microorganism identification can be achieved through DNA analysis. This study aimed to compare the efficiency of five DNA extraction methods from ruminal liquid. Ruminal fluid samples were collected from a fistulated Braford steer. DNA extraction was carried out in triplicate using the following methods: saline precipitation with sodium dodecyl sulfate, precipitation with potassium acetate, phenol-chloroform method, DNAzol reagent, and a commercial kit method. DNA yield, integrity, and purity were assessed using spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. The integrity was confirmed by polymerase chain reaction amplification of DNA fragments. Spectrophotometric and electrophoretic analyses revealed that all methods generated DNA with integrity, except for the potassium acetate method. The 260/280 and 260/230 ratios indicated the presence of contaminants in all methods. DNA obtained through the DNAzol and commercial kit methods was amplifiable in 100% of the samples. The results suggest that the DNAzol method produces DNA with integrity and purity comparable to the commercial kit method, making it equally effective for molecular biology techniques.

Keywords: Bovine; Molecular biology; Polymerase chain reaction; Rumen microbiota.

Introducción

Los rumiantes poseen un sistema digestivo que tiene la capacidad de aprovechar y convertir material fibroso con alto contenido de carbohidratos estructurales, en alimentos de alta calidad nutritiva, gracias a su población microbiana (Carmona *et al.*, 2005). La diversidad de bacterias, protozoos y hongos anaeróbicos presentes en el rumen varía en función a la dieta, salud, edad, entre otros factores (Chaucheryas-Durand *et al.*, 2014).

Actualmente, es posible estudiar estas poblaciones mediante diferentes técnicas de bioinformática y biología molecular (Voaides *et al.*, 2017). El desarrollo de técnicas de secuenciación de alto rendimiento permitió el análisis detallado de poblaciones microbianas a gran escala, posibilitando la detección de cambios en la composición de la comunidad microbiana (Henderson *et al.*, 2013). Independientemente de la técnica a utilizar, es importante realizar una correcta extracción de ADN, para obtener un buen rendimiento y calidad (Voaides *et al.*, 2017). En este contexto, se ha determinado que el método de extracción de ADN utilizado tiene un impacto en la representación de la comunidad microbiana en muestras de diferentes hábitats (Ariefdjohan *et al.*, 2010; Bergmann *et al.*, 2010), incluido el rumen (Yu y Morrison, 2004). La técnica de muestreo (sonda estomacal oral o recolección a través de una fistula ruminal), el tipo de muestra (líquido o sólido) o el procesamiento (filtración, compresión o centrifugación) también pueden tener impacto en los parámetros de la comunidad microbiana (Geishauser y Gitzel, 1996; de Menezes *et al.*, 2011; Fouts *et al.*, 2012; Fliegerova *et al.*, 2014).

En este sentido, se han utilizado múltiples protocolos de extracción de ADN (Krause *et al.*, 2001; Villegas-Rivera *et al.*, 2013; Voaides *et al.*, 2017). Los métodos utilizados pueden clasificarse según el tipo de lisis celular en físicos y químicos. Previamente se ha descrito el uso de perlas de vidrio o *bead-beating* como método tradicional de lisis física, el cual genera un elevado rendimiento y baja integridad (Villegas-Rivera *et al.*, 2013). La lisis química, por otro lado, es muy utilizada por su sencillez y bajo costo. Así mismo, se han recomendado múltiples kits comerciales (Min *et al.*, 2012; Henderson *et al.*, 2013; Fliegerova *et al.*, 2014). Para permitir la comparación directa de los datos de la estructura de la comunidad ruminal de estudios realizados en diferentes laboratorios y

regiones del mundo, es crucial que los métodos de muestreo ruminal, almacenamiento y extracción de ADN estén estandarizados, o al menos se haya demostrado que producen resultados similares (Henderson *et al.*, 2013). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue comparar la eficacia de cinco métodos de extracción de ADN para el estudio de comunidades microbianas en muestras de líquido ruminal obtenidas mediante una fistula ruminal.

Materiales y métodos

Se trabajó con muestras de líquido ruminal obtenidas de un novillo Braford fistulado de 7 años de edad y 536 Kg, alimentado con alfalfa (*Medicago sativa*, 88 % MS, 14 % PB, 47 % FDN) y bagazo de limón (81,7 % MS, 8,1 % PB, 37,1 % FDN, 27,4 % FDA) en una proporción 60:40 (pH 6,78) procedente de la Estación Experimental “Francisco Cantos” INTA Santiago del Estero (AVAL CICUAE ID 02-2019). Con 7 días de diferencia, se realizaron dos muestreos. El fluido ruminal fue recolectado manualmente desde el centro, saco craneal, saco ventral, saco caudal y saco dorsal del rumen, 4 horas post alimentación. Se reunieron las 5 porciones en un recipiente, las cuales sumaron aproximadamente 500 ml, se mezclaron, filtraron con gasa doble, se almacenaron en condiciones anaeróbicas a 37 °C y se trasladaron hasta el Laboratorio de Producción y Reproducción Animal (INBIONATEC) donde fueron almacenadas y conservadas a -20 °C.

1- Extracción de ADN:

1.1- Precipitación salina con dodecilsulfato de sodio (SDS)

Se adaptó el protocolo de Chen *et al.* (2010). En un tubo se colocó 1 ml de muestra, se agregó 1 ml del Buffer de Lisis I (Tris HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 5 mM) y se homogeneizó suavemente. Posteriormente se centrifugó a 4.600 *xg* durante 5 min y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido con 450 µl del Buffer de Lisis I. Se añadieron 20 µl de SDS 10 % y se homogeneizaron 15 s en vortex para lisar las células. Seguidamente se agregaron 200 µl de NaCl 6 M y se homogeneizó en vortex durante 15 s. Se realizó una centrifugación a 13.600 *xg* durante 5 min y se tomaron 500 µl del sobrenadante, que fueron transferidos a otro tubo. Se agregaron 500

µl de isopropanol, y se homogeneizó suavemente. Posteriormente se centrifugó a 13.600 xg durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 700 µl de etanol 70 %, seguidos de centrifugación a 13.600 xg durante 5 min. Finalmente, se resuspendió el ADN en 25 µl de agua estéril.

1.2- Método de acetato de potasio (AK)

Se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Dellaporta *et al.* (1983), con pequeñas modificaciones. En un tubo se colocó 1 ml de muestra de líquido ruminal y se agregó 1 ml de Buffer Lisis (Tris HCl 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM, SDS 1 %, β- mercaptoetanol 10 mM, pH 8). Se mezcló con vortex e incubó por 10 min a 65 °C. Seguidamente se agregaron 200 µl de Buffer SN3 (ácido acético glacial 11 % y acetato de potasio 5 M), y se mezcló por inversión. La mezcla se colocó en hielo durante 20 min y luego se centrifugó durante 10 min a 11.600 xg a 4 °C. Luego, 300 µl del sobrenadante fueron transferidos a un nuevo tubo y precipitados con el mismo volumen de isopropanol. Seguidamente, se centrifugó 15 min a 11.600 xg a 4 °C y se realizaron dos lavados con 500 µl de etanol 70 %. Finalmente, se resuspendió el ADN en 25 µl de agua estéril.

1.3- Método de fenol-cloroformo (FC)

Teniendo en cuenta el protocolo propuesto por Sambrook y Green (2001), en un tubo se colocó una alícuota de 1 ml de muestra de líquido ruminal y se agregó 900 µl del Buffer A (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM y EDTA 100 mM; pH 7,6), 100 µl SDS 10 % y 5 µl de Proteínasa K (Qiagen, GmbH). Posteriormente, se agitó el tubo en vortex durante 1 min y se dejó reposar el mismo a 40 °C por 5 min. Luego, la muestra se separó en 2 tubos de 2 ml y se agregaron 500 µl de fenol. Se mezcló por inversión y se centrifugó por 5 min a 11.600 xg a 4 °C. A continuación, se extrajo la fase acuosa superior y se agregaron 500 µl de fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló en vortex y se centrifugó por 5 min a 11.600 xg a 4 °C. Seguidamente, se extrajo la fase acuosa y se agregó 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó 5 min a 11.600 xg a 4 °C. Se tomó la fase acuosa y se mezcló con 1 ml de etanol 96 % para lograr la precipitación. Posteriormente se centrifugó por 5 min a 11.600

xg y 4 °C, se lavó el pellet con 500 µl de etanol 70 % y se centrifugó a 11.600 xg a 4 °C durante 5 min. Para finalizar, se dejó secar y se resuspendió en 25 µl de agua estéril.

1.4- Método DNAzol

De acuerdo con las indicaciones del fabricante, se colocó 100 µl de líquido ruminal en un tubo de 1,5 ml con 1 ml del reactivo DNAzol® Genomic DNA isolation reagent (MRC). Posteriormente se realizó una centrifugación a 10.000 xg durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante fue precipitado con 500 µl de etanol 96 % en un nuevo tubo. Luego, el ADN fue lavado dos veces con etanol 75 % y resuspendido en 25 µl de agua estéril.

1.5- Kit Comercial (KC)

Se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante del kit comercial QIAmp Fast DNA Stool Mini kit (QIAGEN®), con pequeñas modificaciones. Se tomó 1 ml de la muestra de líquido ruminal y se colocó en hielo durante 5 min, y posteriormente se agregó 1 ml de Buffer inhibitEX. Seguidamente, se agitó con vortex por 1 min y se centrifugó durante 1 min. Luego, se agregaron 25 µl de proteínasa K y 600 µl de buffer AL y se mezcló con vortex por 15 s. Seguidamente, se incubó la muestra a 70 °C durante 10 min y se agregó 600 µl de etanol al 96 % para precipitar el ADN. Posteriormente, se tomaron 600 µl del lisado y se colocaron en la columna provista por el kit, se centrifugó por 1 min y se descartó el filtrado. Se quitaron las impurezas de la columna con el agregado de 500 µl del buffer AW1. Se centrifugó por 1 min y se descartó el filtrado. Se repitió el paso anterior utilizando 500 µl del buffer de lavado AW2 y dos centrifugaciones de 3 min cada una a 13.600 xg. Finalmente se colocó la columna en un tubo de 1,5 ml y se añadieron 25 µl de buffer de elución provisto por el kit (10 mM Tris-Cl pH 8,3, 0,1 mM EDTA, 0,04 % NaN₃).

2- Determinación de concentración y pureza del ADN extraído

La concentración del ADN obtenido se calculó mediante lecturas de absorbancia a $\lambda=260$ nm empleando el espectrofotómetro NanoDropp 2000c (ThermoFisher) (Osorio *et al.*, 2013). La pureza de la muestra de ADN se estimó teniendo en cuenta la relación de absorbancias a $\lambda=260$ nm y $\lambda=280$ nm y $\lambda=230$ nm. Se estimó

el rendimiento por ml de muestra analizada y los resultados del mismo fueron evaluados mediante análisis de la varianza (ANOVA). Las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD, Fischer) con un nivel de significancia del 5 % utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2016).

3- Determinación de integridad del ADN extraído

La calidad de las extracciones de ADN se corroboró mediante una corrida en geles de agarosa al 1 % en buffer TAE 1X, con el agente intercalante de ADN GelGreen (Biotium) siguiendo el protocolo de Paz *et al.* (2023). Para tal fin, se sembraron 5 µl de eluido de cada muestra, junto con el buffer de siembra (TAE 1X, glicerol y azul de bromofenol). La corrida se realizó por 30 min a un voltaje constante de 100 V en una cuba de electroforesis horizontal (Clever Scientific). Las bandas de ADN se observaron mediante luz azul en el transiluminador BluePad (Bio-Helix).

4- Reacción en cadena de la polimerasa

A su vez, se evaluó la integridad del ADN, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final. Se realizó la amplificación del gen ARNr 16S utilizando los siguientes cebadores: ARNr 16S-F: 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'; ARNr 16S-R: 5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3'. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 10 µl que contenía 50 ng de ADN molde, 0,5 µM de cada cebador, 5 µl de Supermix iTaq (BioRad) y agua para completar el volumen. El programa de PCR utilizado consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min, 40 ciclos de: desnaturalización a 95 °C 15 s, hibridación a 58 °C por 30 s y elongación a 60 °C durante 2 min. Finalmente, se realizó una elongación a 60 °C por 7 min. Se evaluó el resultado en geles de agarosa al 1 % en buffer TAE 1 X, con el agente intercalante de ADN GelGreen (Biotium) mediante electroforesis. El tamaño del amplicón esperado es de 1512 pb. Las reacciones se hicieron por duplicado utilizando como control positivo una muestra obtenida por el KC y como negativo agua estéril. Se estimó el porcentaje de amplificación teniendo en cuenta el número de muestras que dieron positivo en función del total de muestras evaluadas.

Resultados y Discusión

La calidad y el rendimiento del ADN en una extracción son factores críticos para realizar ensayos de biología molecular posteriores. La eficacia en las etapas de extracción de ADN es esencial para la posterior amplificación, debido a que hay múltiples compuestos, como los polisacáridos, lípidos o solventes orgánicos, que pueden ser co-purificados con el ADN e inhibir la extensión en la PCR (Voaides *et al.*, 2017).

Los métodos de extracción en líquido ruminal pueden generar ADN con diferentes concentraciones, pureza e integridad (Figura 1). En el presente trabajo, se evaluó el rendimiento, la pureza y la capacidad de amplificación mediante PCR de las muestras de ADN obtenidas por diferentes métodos. En la Tabla 1 se indican los resultados obtenidos de rendimiento, pureza e integridad evaluada mediante PCR. Los métodos ensayados generaron rendimientos entre 20,7 y 824,9 ng/ µl por ml de líquido ruminal. El método de FC fue el que obtuvo mejor rendimiento, seguido por el método de AK, KC, DNAzol y precipitación con SDS. El rendimiento obtenido mediante el KC QIAmp DNA Stool, utilizado como control, fue similar al obtenido por Henderson *et al.* (2013) con el mismo kit, pero menor al obtenido por los mismos autores con los kits comerciales ZR Fecal DNA MiniPrep y PSP@Spin Stool DNA, y a su vez, los valores obtenidos son mayores al obtenido por Voaides *et al.* (2017) con el kit Wizard Genomic.

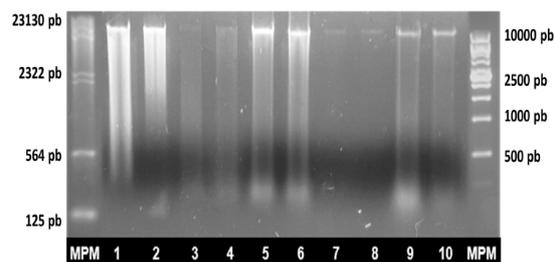


Figura 1. Gel de agarosa 1% con muestras de ADN obtenidas por diferentes métodos: precipitación con acetato de potasio (calle 1 y 2), precipitación salina con SDS (calle 3 y 4), con fenol-cloroformo (calle 5 y 6), con el reactivo DNAzol (calle 7 y 8) y con el kit comercial (calles 9 y 10). MPM: Marcador de peso molecular. Izquierda: Lambda/HindII. Derecha: Marcador de 1 kb.

En el caso del DNAzol, la concentración fue menor a la obtenida por Voaides *et al.* (2017) y Villegas-Rivera *et al.* (2013). La diferencia obtenida puede deberse a que estos autores

Tabla 1. Rendimiento (25 ng/ μ l/ml de líquido ruminal), pureza y porcentaje de amplificación en muestras de ADN obtenidas por diferentes métodos.

	Métodos de extracción de ADN				
	Precipitación con SDS	Acetato de Potasio	Fenol-Cloroformo	DNAzol	Kit Comercial Qiagen
Rendimiento	20,7 \pm 4,2 a	747,8 \pm 86,2 c	824,9 \pm 103,0 d	25,3 \pm 5,3 a	183,9 \pm 19,73 b
Pureza	260/280	1,3	1,4	2,5	1,6
	260/230	0,4	0,3	0,2	0,9

Letras diferentes indican diferencias significativas según el test LSD de Fisher ($P < 0.05$).

utilizaron una relación (1:0,25), es decir, 1 ml del reactivo DNAzol por cada 250 μ l de líquido ruminal en la etapa de lisis celular, mientras que en el presente trabajo se utilizó 1 ml de DNAzol por cada 100 μ L de líquido ruminal. En este sentido, los resultados del presente trabajo sugieren que el método DNAzol permitiría obtener ADN de calidad amplificable a partir de un menor volumen de muestra, lo cual en muchos casos resulta de importancia debido a la limitante en la obtención de la misma.

Por otro lado, el análisis de la pureza se realizó mediante espectrofotometría UV. En este sentido, una proporción entre 1,8-2,0 es aceptada como ADN puro mientras que proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción de absorbancias 260/230; los valores aceptados se encuentran en el rango establecido como ideal. Relaciones menores indican la presencia de contaminantes como carbohidratos, etanol u otros solventes orgánicos utilizados durante la extracción (Lehninger *et al.*, 1975). Los resultados de pureza obtenidos en el presente trabajo permitieron determinar en todas las muestras la presencia de contaminantes (Tabla 1). En el caso del kit comercial, los valores obtenidos, menores a los informados por el fabricante, pueden deberse a las modificaciones realizadas en el protocolo, y a que el mismo ha sido desarrollado específicamente para heces. Sin embargo, se debe resaltar que la pureza obtenida por otros autores tampoco se encuentra en el rango establecido (Voaides *et al.*, 2017; Villegas-Rivera *et al.*, 2013; Henderson *et al.*, 2013). En este contexto, se debe destacar que el líquido ruminal contiene múltiples sustancias que pueden copurificarse y dar lugar a este resultado, como los taninos, carbohidratos, compuestos aromáticos, ácidos húmicos, fenoles o proteínas, algunos de

los cuales pueden inhibir la amplificación del DNA en etapas sucesivas (Henderson *et al.* 2013).

La integridad del ADN extraído se determinó visualmente en un gel de agarosa al 1 % y mediante la reacción en cadena de la polimerasa. En el gel de agarosa, es posible observar una banda estrecha cercana al pocillo de siembra del ADN cuando el ADN está íntegro. Si el mismo está fragmentado, se observa una banda de más de un centímetro de ancho o un sendero luminoso en la calle de la muestra. El ADN fragmentado dificulta la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular y afecta la reproducibilidad de las técnicas (Golenberg *et al.*, 1996). Los métodos que generaron mayores rendimientos (FC y AK) dieron lugar a ADN fragmentado, lo cual puede deberse a múltiples factores, entre los que se destaca el calentamiento realizado durante la etapa de lisis celular. Por el contrario, se visualizó ADN íntegro en las muestras obtenidas por los métodos DNAzol, SDS y KC. De forma similar, otros autores demostraron integridad en las muestras de ADN obtenidas mediante los métodos DNAzol, KC y con bromuro de hexadeciltrimetilamonio, (Voaides *et al.*, 2017; Villegas-Rivera *et al.*, 2013; Henderson *et al.*, 2013). Vaydia *et al.* (2018) sugirieron que el método FC genera ADN de buena calidad. Se debe destacar que estos autores realizan previamente una lisis mecánica con perlas de vidrio.

A su vez, la integridad del ADN se midió analizando el porcentaje de amplificación del gen ARNr 16S de bacterias con la *Taq* polimerasa en el ADN extraído. En la Figura 2 se muestran los resultados de amplificación, indicando que el ADN obtenido por el método de AK no permitió la amplificación. La ausencia o bajo porcentaje de amplificación puede deberse a la fragmentación del ADN, como también a la presencia de inhibidores de la enzima polimerasa utilizados en los métodos

de extracción (Paz *et al.*, 2023). Por otro lado, los métodos de precipitación salina con SDS y FC permitieron la amplificación en el 33 % de las muestras. Finalmente, el método de DNAzol fue igual de eficiente que el kit comercial, generando extracciones de ADN íntegros que permiten la amplificación en el 100 % de las muestras.

El método de DNAzol generó ADN íntegro y de calidad amplificable. A su vez, la relación de DNAzol: líquido ruminal utilizada en el presente trabajo permite el análisis de muestras de menor volumen, sugiriendo que esta técnica es útil para la extracción de ADN de muestras de líquido ruminal de animales fistulados.

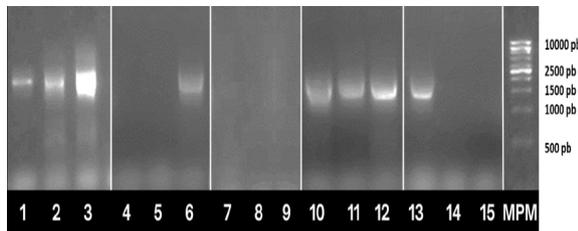


Figura 2. Gel de agarosa 1% con productos de amplificación del gen ARNr 16S de bacterias en muestras de ADN obtenidas por el kit comercial (calles 1, 2 y 3), precipitación salina con SDS (calle 4, 5 y 6), precipitación con acetato de potasio (calle 7, 8 y 9), con el reactivo DNAzol (calle 10, 11 y 12) y con fenol-cloroformo (calle 13, 14 y 15). MPM: Marcador de peso molecular de 1 kb.

Conclusión

El éxito de numerosos estudios biológicos depende de la extracción de ADN. Una técnica ideal de extracción debe optimizar el rendimiento de ADN y minimizar su degradación para su posterior uso en técnicas de biología molecular. El método DNAzol evaluado en el presente trabajo en muestras de líquido ruminal de animales fistulados resulta una metodología óptima para posteriores análisis debido a su mayor pureza e integridad, aunque menor rendimiento.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer al Dr. Eduardo Alberto Parellada por su asistencia técnica en las determinaciones realizadas en el laboratorio, al Dr. Agustín López, al Mg. Olegario Hernández y al técnico de Laboratorio INTA Héctor Fissolo por su colaboración en el muestreo. El presente trabajo fue financiado por la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación [PICT 2020 00062 y

PICT 2020 00695] y la Universidad Nacional de Santiago del Estero [UNSE 23/A262 y UNSE 23/A289].

Bibliografía

- Ariefdjohan M.W., Savaiano D.A., Nakatsu C.H. (2010). Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. *Nutrition Journal* 9: 23.
- Bergmann I., Mundt K., Sontag M., Baumstark I., Nettmann E. (2010). Influence of DNA isolation on Q-PCR-based quantification of methanogenic Archaea in biogas fermenters. *Systematic and Applied Microbiology* 33: 78-84.
- Carmona J., Bolívar D., Giraldo L. (2005). El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 18 (1): 49-63.
- Chaucheyras-Durand F., Ossa F. (2014). REVIEW: The Rumen Microbiome: Composition, Abundance, Diversity, and New Investigative Tools. *The Professional Animal Scientist* 30 (1): 1-12.
- Chen H., Rangasamy M., Tan S.Y., Wang H., Siegfried B.D. (2010). Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS ONE* 5: e11963.
- de Menezes A.B., Lewis E., O'Donovan M., O'Neill B.F., Clipson N. (2011). Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS Microbiology Ecology* 78: 256-265.
- Dellaporta S., Wood J., Hicks J. (1983). A plant minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Report* 1: 19-20.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2016). InfoStat versión 2016. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>
- Fliegerova K., Tapio I., Bonin A., Mrazek J., Callegari M.L., Bani P. (2014). Effect of DNA extraction and sample preservation method on rumen bacterial population. *Anaerobe* 29: 80-84.
- Fouts D.E., Szpakowski S., Purushe J., Torralba M., Waterman R.C. (2012). Next generation sequencing to define prokaryotic and fungal diversity in the bovine rumen. *PLOS ONE* 7: e48289.
- Geishauser T., Gitzel A. (1996). A comparison of rumen fluid sampled by oro-ruminal probe versus rumen fistula. *Small Ruminant Research* 21: 63-69.
- Golenberg E.M., Bickel A., Weihs P. (1996). Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Research* 15 (24): 5026-5033.
- Henderson G., Cox F., Kittelmann S., Miri V.H., Zethof M., Noel S.J., Waghorn G.C., Janssen P.H. (2013).

- Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. *PLoS One* 8 (9): e74787.
- Krause D.O., Smith W.J., McSweeney C.S. (2001). Extraction of microbial DNA from rumen contents containing plant tannins. *Biotechniques* 31: 294-298.
- Lehninger, A.L. (1975). *Biochemistry: the molecular basis of cell structure and function* (Vol. 2). New York: Worth Publishers.
- Min B.R., Pinchak W.E., Hernandez K., Hernandez C., Hume M.E., Valencia E., Fulford J.D. (2012). Effects of plant tannin supplementation on animal responses and in vivo ruminal bacterial populations associated with bloat in heifers grazing wheat forage. *The Professional Animal Scientist* 28 (4): 464-472.
- Osorio J., Pachajoa H., Hurtado P. (2013). Concentración y pureza del ADN de muestras sanguíneas en papel Whatman FTA almacenadas entre 1 a 3 años. *Revista Estomatológica y Salud* 21 (1): 35-38.