

# ELUCIDANDO LA RELACIÓN ENTRE LA MICROBIOTA RUMINAL Y LA EMISIÓN DE GASES DE EFECTO INVERNADERO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LA GENÓMICA

## ELUCIDATING THE RELATIONSHIP BETWEEN RUMEN MICROBIOME AND GREENHOUSE GAS EMISSION THROUGH THE APPLICATION OF GENOMICS

Espinoza-Velasco, B.<sup>1</sup>; Ramírez-Mella, M.<sup>2</sup>; Sánchez-Villarreal, A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Programa de Ganadería. Carretera México-Texcoco km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México. C. P. 56230. <sup>2</sup>CONACYT-Colegio de Postgraduados Campus Campeche. Carretera Haltunchén-Edzná km 17.5. Sihochac, Champotón, Campeche. C. P. 24450. <sup>3</sup>Colegio de Postgraduados Campus Campeche. Carretera Haltunchén-Edzná km 17.5. Sihochac, Champotón, Campeche. C. P. 24450.

\*Autor de correspondencia: asanchezv@colpos.mx

### RESUMEN

Dada la naturaleza digestiva de los rumiantes, estos animales han evolucionado para obtener nutrientes a partir de sustratos lignocelulolíticos, particularmente butirato, propionato y acetato, los cuales son los productos de degradación del tejido vegetal por acción del consorcio microbiano que habita en el rumen. Esta microbiota constituida por bacterias, arqueas, hongos y protozoarios se desarrolla en un ambiente anóxico y aunque benéfica para el animal, produce una de las mayores cantidades de metano de la actividad pecuaria. Diversos estudios y tratamientos se han enfocado en abatir la generación de metano ruminal; sin embargo, a la fecha no hay un método viable establecido que disminuya el impacto que genera la actividad ganadera en el cambio climático. El desconocimiento de la comunidad microbiana del rumen, dada su dificultad para aislarlos y cultivarlos *in vitro*, es una de las causas de lo anterior. Actualmente las herramientas genómicas permiten estudiar los consorcios microbianos en ambientes complejos sin la necesidad de aislar a los microorganismos. La aplicación de la metagenómica ha permitido una vasta descripción de la estructura del microbioma ruminal, así como los factores intrínsecos y extrínsecos que la modifican. No obstante, no basta determinar las tasas microbianas del rumen para comprender su función y actividad fisiológica; para ello será necesario el uso de las otras herramientas genómicas que permitan obtener una visión holística de la microbiota ruminal y con ello establecer estrategias que permitan abatir la generación de gases efecto invernadero.

**Palabras clave:** Cambio climático, gases de efecto invernadero, genómica, rumiantes.

### ABSTRACT

Given the digestive nature of ruminants, these animals have evolved to obtain nutrients from lignocellulosic substrates, particularly butyrate, propionate and acetate as byproducts from the degradation of plant tissues due to the action of the ruminal microbial consortia. This microbiome is composed by bacteria, archaea, fungi and protozoa which

**Agroproductividad:** Vol. 11, Núm. 2, febrero. 2018, pp: 3-8.

**Recibido:** diciembre, 2017. **Aceptado:** febrero, 2018.

thrive in an anoxic habitat and, although beneficial to the ruminant, produce the highest amounts of methane derived from livestock production activities. Several studies and treatments have focused in diminishing ruminal methane emissions; however, as of today there is not a viable method established that reduces the impact of livestock on climate change. This in part due to the lack of knowledge of the ruminal microbiome given the difficulty to isolate and grow these organisms *in vitro* conditions. Today, genomic tools allow the study of microbial consortia without the need to isolate the microorganisms. The use of metagenomics has described the ruminal microbiome structure, as well as the intrinsic and external factors that modify it. However, to understand the physiological function and activity of the microbial taxa, it will be necessary to employ other genomic tools in order to attain a holistic view of the ruminal microbiota and with that, to establish strategies that allow decreasing the generation of greenhouse gases.

**Keywords:** Climate change, greenhouse effect gases, genomics, ruminants.

agrícolas de baja calidad, comunes en los países de regiones tropicales y subtropicales favorecen la producción de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> (Delgado *et al.*, 2012). En México, cerca del 40 % de la carne y 15 % de la leche bovina se producen en regiones tropicales (SIAP, 2015), generalmente en sistemas de doble propósito y principalmente bajo pastoreo extensivo (Orantes-Zebadúa *et al.*, 2014). Lo anterior indica que los sistemas de producción de rumiantes en nuestro país contribuyen de manera significativa a las emisiones de gases de efecto invernadero, por lo que es necesario promover estrategias que permitan disminuirlas.

Existen varias alternativas enfocadas a la reducción de las emisiones de GEI provenientes de los rumiantes, tales como el uso de ionóforos, la defaunación, la suplementación de forrajes de baja calidad con proteína, carbohidratos fermentables y/o grasas, el uso de metabolitos secundarios, probióticos, potenciadores de propionato, estimuladores de microorganismos acetógenos, el desarrollo de bacteriocinas, bacteriófagos y vacunas, así como la selección genética de animales con baja producción de CH<sub>4</sub> (Patra, 2012). Sin embargo debido a la toxicidad de estos químicos en los animales, al alto costo de suplementos o a los efectos poco duraderos en la disminución de la metanogénesis ruminal, es crítico buscar opciones viables que disminuyan el impacto que los rumiantes ejercen en el cambio climático.

### Microbiota ruminal

Históricamente la microbiología del rumen ha sido estudiada mediante técnicas de cultivo permitiendo la descripción de varias especies de microorganismos; pero debido a

## INTRODUCCIÓN

El rumen, órgano pregástrico de los rumiantes, es un ecosistema en el cual distintos microorganismos incluyendo bacterias, arqueas, hongos y protozoarios, establecieron una simbiosis que permite la degradación de forrajes bajo condiciones anaeróbicas. Estos microorganismos juegan un papel primordial en la salud y nutrición de rumiantes, así como también en la producción de gases de efecto invernadero (GEI), principalmente dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y metano (CH<sub>4</sub>). El microambiente en el rumen es anaeróbico, tiene una velocidad de paso de los alimentos relativamente rápida y disponibilidad de CO<sub>2</sub> e hidrógeno (H<sub>2</sub>) derivados de la fermentación de los forrajes. Lo anterior favorece el establecimiento de una comunidad de arqueas, la mayoría metanogénicas, distinta a la de otros ambientes anóxicos. Estas arqueas son hidrogenotróficas a pesar de las elevadas concentraciones de acetato en el rumen, lo cual favorecería al grupo de arqueas acetoclásticas (Patra *et al.*, 2017). Los metanógenos ruminales, aprovechan el H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> producidos por otros miembros de la microbiota ruminal, generando como subproducto el CH<sub>4</sub>. Otros substratos empleados por los microorganismos metanógenos ruminales son el ácido fórmico y la metil-amina, los cuales también son producidos por el consorcio microbiano del rumen. El nicho ecológico que ocupan las arqueas metanogénicas en relación con el resto de la microbiota ruminal es la transferencia de H<sub>2</sub>, evitando la acumulación de éste y por lo tanto de la inhibición de la fermentación ruminal (Brul y Stumm, 1994; Vogels *et al.*, 1980). La mayoría de los metanógenos habitan de manera libre en el líquido ruminal o forman parte de biopelículas en las partículas de alimento, mientras que un menor porcentaje desarrolla una simbiosis ya sea del tipo ectosimbiótica o endosimbiótica (Valle *et al.*, 2015).

La alimentación de los rumiantes es uno de los factores que influye directamente en las emisiones de GEI; las dietas a base de forrajes y residuos

que la mayoría de éstos no son cultivables, aún no se ha logrado explicar fehacientemente la relación entre las poblaciones microbianas y su función ecológica, con la fisiología del ganado y las respuestas de los animales a suplementos y/o dietas particulares (McCann *et al.*, 2014). En consecuencia, entender la relación de la microbiota ruminal y la modulación de sus poblaciones por factores intrínsecos y extrínsecos es un tema de prioridad mundial para entender su relación con la producción de GEI en rumiantes (Henderson *et al.*, 2015).

La comunidad microbiana del rumen posee tanto microorganismos generalistas como especialistas y se considera existe una redundancia en la comunidad microbiana puesto que los cambios observados en la composición de las poblaciones microbianas no forzosamente provoca cambios en los parámetros de fermentación ruminal como el pH y los ácidos grasos volátiles (AGV) (Henderson *et al.*, 2015).

A pesar de que la dieta tiene un efecto en la composición de las poblaciones microbianas del rumen, se ha descrito un "core" o núcleo microbiano constituido por el phylum Firmicutes, destacando dentro de éste los géneros *Ruminococcus* y *Butyrivibrio*, y el phylum Bacteroides, particularmente *Prevotella*. Se considera que la microbiota ruminal es altamente resistente a cambios y es específica del huésped. Los 30 grupos bacterianos más abundantes encontrados en un estudio global fueron *Prevotella*, *Butyrivibrio*, *Ruminococcus*, así como grupos de las familias *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidales* y *Clostridiales* (Henderson *et al.*, 2015), los cuales representan hasta

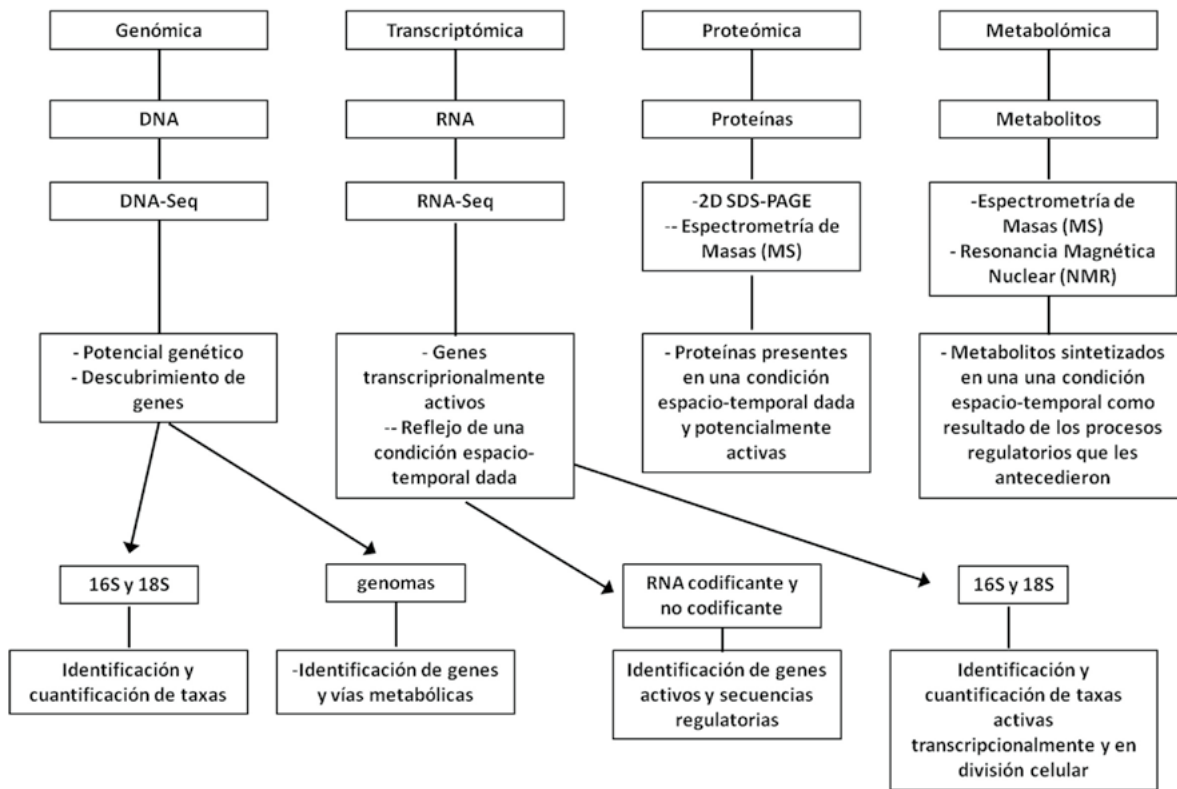
el 67 % del total de bacterias. Por otra parte, la mayoría de las arqueas residentes en el rumen son metanógenas, siendo las especies preponderantes *Methanobrevibacter gottschalkii*, *M. ruminantium*, así como *Methanosphaera* sp. y dos grupos de *Methanomassiliicoccaceae*; los cuales en su conjunto conforman el 89 % de las arqueas metanogénicas. El 11 % restante de las arqueas pueden crecer con grupos derivado de metanol o metil-aminas. Las arqueas metanogénicas que habitan en el rumen pueden estar o no asociadas a otros organismos como hongos o protozoarios (Belanche *et al.*, 2014). El género *Methanobrevibacter* representa alrededor del 65 % de los metanógenos ruminales, y se encuentra tanto en forma libre como asociado a protozoarios del rumen (hasta en un 32 % de la población de arqueas metanógenas), lo que supone una probable asociación selectiva con los protozoarios ruminales (Patra *et al.*, 2017). Esto último resulta importante puesto que al contrario de las bacterias y arqueas, las poblaciones de protozoarios varían ampliamente entre animales, mostrando una alta especificidad entre huésped-hospedero.

De entre todas las poblaciones microbianas que varían dependiendo de la dieta y el hospedero, las bacterias son el grupo responsable de determinar la variabilidad y composición microbiana del rumen, lo cual es reflejo de la versatilidad metabólica de este grupo microbiano en comparación con las arqueas y los protozoarios. A pesar de que la actividad bacteriana produce los substratos para el desarrollo de las arqueas metanogénicas al proveer de hidrógeno y grupos metilo, no existe una correlación entre la presencia de los grupos bacterianos y de las arqueas más abundantes; sin embargo, sí se observa una correlación positiva entre la presencia de grupos de bacterias y arqueas menos abundantes (Henderson *et al.*, 2015). Tampoco hay una fuerte correlación entre los protozoarios con los grupos más abundantes de bacterias y de arqueas metanógenas (Henderson *et al.*, 2015). Todo lo anterior sugiere que existe una competencia por nichos ecológicos, derivando en una flexibilidad entre las poblaciones microbianas productoras y consumidoras de hidrógeno.

### La genómica como herramienta en el entendimiento de las emisiones entéricas de CH<sub>4</sub>

El advenimiento de las ciencias genómicas y su creciente aplicación ha permitido el estudio global de un sistema biológico. La genómica se define como el estudio de la secuencia de DNA y de las propiedades de los genomas. Por tanto elucidar el genoma de un organismo (genómica) o el de una población (metagenómica) permite conocer el potencial genético de los mismos. Las otras ciencias ómicas son la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica; su aplicación en conjunto resulta en la biología de sistemas del inglés "Systems Biology" (Figura 1). Al permitir el estudio de una microbiota compleja y la cual es mayoritariamente incultivable en condiciones de laboratorio, la genómica favorece un mejor conocimiento del consorcio microbiano del rumen. La secuenciación masiva de dicha microbiota (metagenómica) permite la construcción de un catálogo de genes (un microbioma ruminal) y mediante éste conocer el potencial genético y sus funciones. Lo anterior es una herramienta invaluable para el desarrollo de estrategias que mejoren la eficiencia de la digestión de los alimentos y la reducción de la producción de

BIOLOGÍA DE SISTEMAS ("SYSTEMS BIOLOGY")



**Figura 1.** Las Ciencias Genómicas y su Aplicación. En cada columna se indica una de las cuatro ciencias genómicas, las macromoléculas de estudio, las tecnologías empleadas y el potencial de los resultados de su aplicación. En el caso de la genómica y la transcriptómica, se indican las diferencias de un estudio dirigido al gen ribosomal (rRNA 16S y/o 18S) o uno global.

metano entérico, cumpliendo así el desafío de la sostenibilidad y mitigación del cambio climático.

A la fecha, la mayoría de los estudios genómicos del rumen se han enfocado en la identificación y cuantificación de grupos de microorganismos mediante el RNA ribosomal (rRNA) 16S y 18S (McCann *et al.*, 2014; Ross, 2012), lo cual ha permitido obtener un panorama del microbioma ruminal y comparar su diversidad y riqueza, así como el efecto de aditivos o variaciones de la microbiota dependiendo de la raza y región geográfica (McCann *et al.*, 2014; Henderson *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2009). El esfuerzo internacional del Global Rumen Census concluyó que el microbioma ruminal posee un núcleo microbiano presente independientemente de la raza, genética y distribución geográfica de los animales siendo la dieta el factor más preponderante en las modificaciones de las poblaciones microbianas (Henderson *et al.*, 2015).

Con respecto a la emisión de CH<sub>4</sub>, mediante análisis metagenómicos se caracterizaron las comunidades de arqueas metanogénicas en el rumen del búfalo, identi-

ficando los genes involucrados en la síntesis de metano y de la ruta acetoclástica (Singh *et al.*, 2015), que es la ruta alterna de la metanogénesis (Wallace *et al.*, 2017). Mediante el uso de bromoclorometano, un inhibidor enzimático de la metanogénesis, se concluyó que la contribución de la ruta acetoclástica fue mínima (Denman *et al.*, 2015), y se asoció la disminución de la metanogénesis en cabras al incremento en las poblaciones de *Prevotella* y *Selenomonas* spp. y la síntesis de propionato derivada de éstos.

La comparación individual de bovinos con alta y baja producción de metano mostró que en los primeros hay una mayor abundancia de secuencias que codifican para enzimas involucradas directa o indirectamente en la síntesis de metano; mientras que, en los animales con menor producción de CH<sub>4</sub>, la población de *Succinivibrionaceae* es más elevada y está asociada a una disminución en la producción de acetato e hidrógeno (Wallace *et al.*, 2015). Roehe *et al.* (2016) identificaron en cruza de animales un total de 3,970 genes de los cuales 20 estaban asociados a emisiones de metano (entre ellos *mcrA* y *fmdB*) y 49 a eficiencia alimenticia y estos repre-

sentaron el 81 % y 86 % de las variaciones en la producción de este gas y eficiencia alimenticia respectivamente. Estos resultados sugieren que las variaciones en la eficiencia alimenticia y la producción de CH<sub>4</sub> están relacionadas con la genética de los animales, y por tanto con la existencia de un control ejercido por el hospedero hacia su microbiota ruminal.

En estudios *ex vivo* relacionados con la eficiencia alimenticia en vacas lecheras concluyeron que los animales más eficientes y con menor producción de CH<sub>4</sub> se asociaban a una menor diversidad de especies microbianas y de genes (Shabat *et al.*, 2016). Asimismo el porcentaje de propionato, butirato e isovalerato era mayor en los animales eficientes, lo anterior concuerda con haber encontrado que los "contigs" correspondientes a los genes que codifican la ruta del acrilato en *Megasphaera elsdenii* para la producción de propionato eran más frecuentes en el ganado eficiente. La ruta de acrilato estabiliza la fermentación ruminal al convertir el lactato en propionato y butirato (Counotte *et al.*, 1981).

Aunque estos estudios contribuyen a esclarecer la relación de la microbiota ruminal con la producción de GEI en rumiantes y el efecto de tratamientos en la mitigación de estos gases; los estudios genómicos y metagenómicos están limitados ya que el estudiar los genomas de las poblaciones microbianas, podemos identificar éstas y su abundancia, así como conocer su potencial genético; es decir qué genes poseen y cuáles son sus funciones. Sin embargo conocer el papel funcional de los genes no esclarece su actividad y función en un ambiente o condi-

ción dado y por tanto el posible nicho ecológico de los microorganismos identificados y en consecuencia su relevancia en el metabolismo ruminal (McCann *et al.*, 2014). Para lo anterior es necesario determinar los genes transcripcionalmente activos (meta-transcriptómica).

Al analizar los cambios en la actividad microbiana, la transcriptómica podría elucidar la relación entre la emisión de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> con el consorcio microbiano puesto que a la fecha la emisión de GEI no está vinculada con la cantidad de ciertas especies y taxas microbianas o al cambio de poblaciones de la microbiota (Wallace *et al.*, 2015). Los estudios meta-transcriptómicos al circunscribirse sólo a los genes expresados permitiría determinar la fisiología e interrelaciones entre los grupos microbianos. A este respecto Qi *et al.* (2011) empleó la meta-transcriptómica en poblaciones eucariotas del rumen del buey almizclero identificando genes con actividad lignocelulítica no descritos previamente. Recientemente también se caracterizó el microbioma de bovinos con alta y baja conversión alimenticia mediante RNA-Seq determinando tanto las poblaciones microbianas activas como genes asociados al metabolismo de los carbohidratos (Li y Guan, 2017). Referente a la producción de metano, un estudio meta-transcriptómico del rumen de ovejas con alta y baja producción de CH<sub>4</sub>, concluyó que la diferencia de síntesis de este gas se debía a una mayor tasa de expresión de los genes involucrados en la formación de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, puesto que la comunidad microbiana entre los animales alto y bajo productores de CH<sub>4</sub> eran idénticas (Shi *et al.*, 2014). Aunque aún no puede concluirse que la producción de CH<sub>4</sub>

se deba a los cambios de expresión genética del consorcio microbiano (Wallace *et al.*, 2015), estos ensayos demuestran el potencial de la meta-transcriptómica para estudiar una población compleja y de difícil estudio en el laboratorio.

Concerniente al uso de la proteómica y metabolómica en el estudio de la microbiota ruminal, éste se ha visto restringido debido a limitaciones técnicas y de falta de bases de datos; sin embargo, los resultados parecen indicar que no existen diferencias significativas del metaproteoma y el metaboloma entre animales con diferente eficiencia alimenticia o de producción de metano. Sin embargo conforme se continúen los estudios ómicos y se genere más información que nutra las bases de datos y permita análisis comparativos y complementarios entre genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, será posible obtener un panorama completo del microbioma ruminal, comprender sus cambios y por tanto desarrollar estrategias que beneficien al productor y disminuyan la emisión de GEI.

## AGRADECIMIENTOS

Este artículo forma parte del proyecto No. 417 de la Convocatoria de Proyectos de Desarrollo Científico para Atención a Problemas Nacionales 2015 de CONACYT.

## LITERATURA CITADA

- Belanche A., De Fuente G., Newbold C.J., 2014. Study of methanogen communities associated with different rumen protozoal populations. *FEMS Microbiology and Ecology* 90: 663-677.
- Brul S., Stum C.K. 1994. Symbionts and organelles in anaerobic protozoa and fungi. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 319-324.
- Counotte G.H., Prins R.A., Janssen R.H., Debie M.J. 1981. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of dl-

- [2-C] lactate in the rumen of dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 42: 649-655.
- Delgado D.C., Galindo J., González R., González N., Sculll I., Dihigo L., Cairo J., Aldama A.I., Moreira O. 2012. Feeding of tropical trees and shrubs foliage as a strategy to reduce ruminal methanogenesis: studies conducted in Cuba. *Tropical Animal Health and Production* 44: 1097-1104.
- Denman S.E., Martínez-Fernández G., Shinkai T., Mitsumori M., McSweeney C.S. 2015. Metagenomic analysis of the rumen microbial community following inhibition of methane formation by a halogenated methane analog. *Frontiers in Microbiology* 6: 1087.
- Henderson G., Cox F., Ganesh S., Jonker A., Ypung W., Global Rumen Census Collaborators, Janssen P.H. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Science Reproduction* 5: 14567.
- Li F., Guan L.L. 2017. Metatranscriptomic profiling reveals linkages between the active rumen microbiome and feed efficiency in beef cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 83: Article e00061-17.
- McCann J.C., Wickersham T.A., Looor J.L. 2014. High-throughput methods redefine the rumen microbiome and its relationship with nutrition and metabolism. *Bioinformatics and Biology Insights* 8: 109-125.
- Orantes-Zebadúa M.A., Platas-Rosado D., Córdova-Avalos V., De los Santos-Lara M.C., Córdova-Avalos A. 2014. Caracterización de la ganadería de doble propósito en una región de Chiapas, México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 1: 49-59.
- Patra A.K. 2012. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. *Environmental Monitoring and Assessment* 184: 1929-1952.
- Patra A.K., Park T., Kim M., Yu Z. 2017. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 8:13.
- Qi M., Wang P., O'Toole N., Barboza P.S., Ungerfeld E., Leigh M.B., Selinger L.B., Butler G., Tsang A., McAllister T.A., Forster R.J. 2011. Snapshot of the Eukaryotic Gene Expression in Muskoxen Rumen - A Metatranscriptomic Approach. *PLoS ONE* 6(5).
- Roehe R., Dewhurs R.J., Duthie C.-A., Rooke J.A., McKain N., Ross D.W., Hyslop J.J., Waterhouse A., Freeman T. C., Watson M., Wallace R. J. 2016. Bovine Host Genetic Variation Influences Rumen Microbial Methane Production with Best Selection Criterion for Low Methane Emitting and Efficiently Feed Converting Hosts Based on Metagenomic Gene Abundance. *PLoS Genetics* 12(2):e1005846.
- Ross E.M., Moate P.J., Bath C.R., Davidson S.E., Sawbridge T.I., Guthridge K.M., Cocks B.G., Hayes B.J. 2012. High throughput whole rumen metagenome profiling using untargeted massively parallel sequencing. *BMC Genetics* 13:53.
- Shabat S.K., Sasson G., Doron-Faigenboi, A., Durman T., Yaacoby S., Berg-Miller M.E., White B.A., Shterzer N., Mizrahi I. 2016. Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. *The ISME Journal* 10: 2958-2972.
- Shi W., Moon C.D., Leahy S. C., Kang D., Froula J., Kittelmann S., Fan Ch., Deutsch S., Gagic D., Seedorf H., Kelly W.J., Atua R., Sang C., Soni P., Li D., Pinares-Patiño C.S., McEwan J.C., Janssen P.H., Chen F., Visel A., Wang Z., Attwood G.T., Rubin E. M. 2014. Methane yield phenotypes linked to differential gene expression in the sheep rumen microbiome. *Genome Research* 24: 1517-1525.
- SIAP. 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. [www.siap.gob.mx/ganaderia-resumen-estatal-pecuario/](http://www.siap.gob.mx/ganaderia-resumen-estatal-pecuario/)
- Singh K.M., Patel A.K., Shah R.K., Reddy B., Joshi C.G. 2015. Potential functional gene diversity involved in methanogenesis and methanogenic community structure in Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) rumen. *Journal of Applied Genetics* 56: 411-426.
- Valle E.R., Henderson G., Janssen P.H., Cox F., Alexander T.W., McAllister T.A. 2015. Considerations in the use of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and confocal laser scanning microscopy to characterize rumen methanogens and define their spatial distributions. *Canadian Journal of Microbiology* 61: 417-428.
- Vogels G.D., Hoppe W.F., Stumm C.K. 1980. Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. *Applied and Environmental Microbiology* 40: 608-612.
- Wallace R.J., Rooke J.A., McKain N., Duthie C.-A., Hyslop J.J., Ross D.W., Waterhouse A., Watson M., Roehe R. 2015. The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle. *BMC Genomics* 16: 839.
- Wallace R.J., Snelling T.J., McCartney C.A., Tapio I., Strozzi F. 2017. Application of meta-omics techniques to understand greenhouse gas emissions originating from ruminal metabolism. *Genetics Selection Evolution* 49:9.
- Zhou M., Hernandez-Sanabria E., Le L.G., 2009. Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6524-6533.

