

Apuntes de la diversidad microbiana de un coprolito humano del sitio arqueológico El Morro Orgánico, Aramberri, Nuevo León, México

J.A. Valadez-Lira^{1*}, K.K. Hernández-Salinas¹, R. Canales-Del Castillo¹,
A. Rivera-Estrada², D. Quistián-Martínez¹

¹ Facultad de Ciencias Biológicas- UANL, Ciudad Universitaria,
San Nicolás de los Garza, Nuevo León. México.

² Centro INAH Nuevo León,
Colonia Obisado, Monterrey, Nuevo León. México.

*Autor para correspondencia: jose.valadezlr@uanl.edu.mx

Resumen

El estudio de biomoléculas en muestras arqueológicas tiene como propósito generar información que permita reconstruir el entorno y el origen de estas. Los estudios bioarqueológicos se fundamentan en el análisis de biomoléculas, como carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Aunque estos componentes pudieron experimentar transformaciones derivadas de las actividades humanas, los procesos de degradación y las condiciones ambientales de preservación, su recuperación y análisis permiten obtener información relevante para la interpretación arqueológica. En la presente investigación se analizó un coprolito humano procedente del sitio arqueológico El Morro Orgánico, ubicado en el municipio de Aramberri, Nuevo León, México, estimando una edad de 1169 ± 24 años. El objetivo fue describir la diversidad microbiana intestinal presente en el coprolito. La metodología comprendió la extracción de ADN total y la secuenciación masiva de nueva generación, conocida como NGS (*Next-Generation Sequencing*), dirigida al gen ribosomal 16S. Esta estrategia permitió identificar ocho géneros bacterianos asociados con la microbiota humana, entre los cuales predominaron microorganismos pertenecientes a la familia Bacillaceae. Estos resultados evidencian la posibilidad de un análisis molecular de coprolitos para aproximarse al conocimiento de la microbiota ancestral y aportar información complementaria sobre las prácticas alimentarias y las condiciones de vida de las poblaciones antiguas.

Palabras clave: coprolito, sitio El Morro Orgánico, diversidad microbiana, Next-Generation Sequencing (NGS).

Abstract

The study of biomolecules in archaeological samples aims to generate information that allows for the reconstruction of their environment and origins. Bioarchaeological studies rely on the analysis of biomolecules such as carbohydrates, lipids, proteins, and nucleic acids. Although these components may have undergone transformations due to human activities, degradation processes, and environmental preservation conditions, their recovery and analysis yield information relevant to archaeological interpretation. This study analyzed a human coprolite from the El Morro Orgánico archaeological site in the municipality of Aramberri, Nuevo León, Mexico, which was estimated to be $1,169 \pm 24$ years old. The objective was to characterize the gut microbial diversity present in the coprolite. The methodology involved total DNA extraction and *Next-Generation Sequencing* (NGS) targeting the 16S ribosomal gene. This approach identified eight bacterial genera associated with human microbiota, with microorganisms belonging to the Bacillaceae family predominating. These results demonstrate the potential of molecular analysis of coprolites to gain insight into ancestral microbiota and provide complementary information regarding the dietary practices and living conditions of ancient populations.

Keywords: coprolite, El Morro Orgánico site, microbial diversity, Next-Generation Sequencing (NGS).

Introducción

En el campo de la arqueología, las primeras etapas de investigación suelen enfocarse en la identificación física y morfológica de los restos recuperados, para su posterior análisis histórico, taxonómico, ecológico o geográfico. Sin embargo, en algunos casos, por el tipo de muestra o por la manera de preservación u obtención, no puede ser claramente identificada o clasificada por métodos tradicionales. En estos casos, el uso de técnicas moleculares para el análisis de ácido desoxirribonucleico (ADN) resulta ser una opción viable para complementar la identificación morfológica. Estas técnicas permiten comparar las secuencias génicas recuperadas de las muestras arqueológicas con las registradas en bases de datos de organismos contemporáneos, lo que favorece una identificación taxonómica más precisa y contribuye a ampliar la información disponible para su interpretación arqueológica.

En el estado de Nuevo León se ha documentado una diversidad de restos biológicos en contextos arqueológicos, entre los que se incluyen materiales de origen animal y vegetal, restos y coprolitos humanos, además de objetos vinculados con la vida cotidiana y manifestaciones rupestres, como los petrograbados. En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo caracterizar la diversidad microbiana asociada con los grupos humanos que se asentaron en la Sierra Madre Oriental, al sur de Nuevo León, mediante la aplicación de técnicas moleculares.

Antecedentes

El sitio arqueológico El Morro Orgánico, ubicado al sur de la cabecera municipal de Aramberri, Nuevo León, corresponde a un abrigo rocoso de origen natural a aproximadamente 100 m del cauce del río Blanco, que ofreciendo un amplio dominio visual fue utilizado como refugio por grupos humanos. Perte-

nece a la provincia fisiográfica de la Sierra Madre Oriental, caracterizada por la presencia de estratos plegados de rocas sedimentarias formadas durante los períodos del Jurásico y Cretácico (INEGI, 1983).

Entre los restos encontrados por el proyecto arqueológico “Sierra Madre Oriental” a cargo del Centro INAH-Nuevo León, figuran restos de huesos y numerosas heces humanas subfosilizadas, localizados en todas las unidades de excavación y la mayor parte de los niveles estratigráficos. Estos fueron identificados de origen humano con base en su forma, composición y ubicación específica, ya que solo se encontraron en una zona particular del sitio arqueológico, la cual se ha interpretado como una posible letrina utilizada por los antiguos pobladores (Rivera-Estrada, 2023).

La relevancia del estudio de coprolitos para conocer aspectos de la dieta del contexto arqueológico en el que se encuentran fue inicialmente señalada por Reinhard y Bryant (1992); ya que es posible recuperar componentes como bacterias o virus, hongos, polen, fitolitos, parásitos, semillas, hojas u otras estructuras vegetales, huesos e insectos. Por lo tanto, son una fuente valiosa de información que puede analizarse para describir microbiomas humanos antiguos a partir de la identificación de microorganismos y su dominancia. Esta información permite interpretar, por ejemplo, la diversidad de la microbiota de los antiguos pobladores, la exploración de los microorganismos no expuestos a dietas modernas o al uso de antibióticos, así como la prevalencia de patógenos.

A la fecha se han caracterizado más de 1,000 bacterias intestinales comprendidas en cuatro grandes grupos bacterianos; un gran porcentaje de la microbiota bacteriana está dominada por el filo Firmicutes y filo Bacteroidetes, en tanto que el filo Proteobacteria, Actinobacteria y Verrumicrobiota son representa-

dos modestamente y en proporciones equivalentes, en organismos sanos (Valencia et al., 2025).

Para el estudio de la diversidad microbiana, los métodos microbiológicos clásicos utilizados para identificar cepas bacterianas, como el cultivo microbiológico, tinciones, pruebas bioquímicas son limitadas, ya que algunas cepas no pueden cultivarse en condiciones de laboratorio o requieren condiciones de cultivo difíciles de reproducir. En este contexto, el análisis de ácidos nucleicos constituye una alternativa que permite estudiar la diversidad microbiana sin depender exclusivamente del cultivo. Aunque estas biomoléculas pueden haber experimentado procesos de degradación y transformación a lo largo del tiempo, la aplicación de técnicas moleculares permite recuperar información genética útil para la identificación taxonómica y la caracterización de las comunidades microbianas presentes en muestras arqueológicas.

Los estudios basados en ADN han permitido realizar análisis de regiones específicas del genoma y posteriormente, de genomas completos (Gokcumen & Frachetti, 2020); aunque principalmente realizados en restos humanos, estas técnicas también han sido aplicadas a restos botánicos (Klister et al., 2020) y de animales (McHugo et al., 2019). En esta investigación se exploró la diversidad microbiana mediante secuenciación NGS (del inglés *Next-Generation Sequencing*) proveniente de un coprolito humano localizado en el sitio arqueológico El Morro Orgánico, Aramberri, Nuevo León, México. Este enfoque permitió recuperar información genética de la muestra y aproximarse a la caracterización taxonómica de la microbiota intestinal de antiguos pobladores de la Sierra Madre Oriental.

Material y Métodos

Muestras arqueológicas

El presente análisis se realizó en una muestra de coprolito humano, proveniente del sitio El Morro Orgánico, cuadrante NE-2, a una profundidad correspondiente al nivel 22, recuperada por la arqueóloga A. Rivera-Estrada, como parte del proyecto Sierra Madre Oriental-INAH. El contexto arqueológico asociado cuenta con una datación radiocarbónica obtenida a partir de una muestra de carbón (INAH-3305), con una edad de 1169 ± 24 años AP, correspondiente al intervalo calibrado de 770–900 d.C., con una probabilidad del 84.3 %.

Extracción de ADN genómico

La muestra fue hidratada en solución de fosfato trisódico al 0.5% e incubada por tres semanas a 4°C. El ADN total se obtuvo utilizando un protocolo modificado de Schenk et al., (2023). Brevemente, se tomaron 500 µl de la muestra hidratada y se transfirieron a un microtubo estéril de 2 ml, a continuación, se añadieron 500 µl de buffer de lisis CTAB 10%-NaCl, y la mezcló por agitación en vórtex por 10 segundos. Se agregaron 500 µl de fenol y se volvió a mezclar por vórtex 10 segundos. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperaron 200 µl del sobrenadante y se transfirió a un microtubo estéril de 1.5 ml. Posteriormente, se añadieron 200 µl de NaCl 150 mM y etanol absoluto en una proporción de 2:1, para después centrifugar nuevamente a 14,000 rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, obteniendo una pastilla (pellet de ADN) en el fondo del microtubo. Esta pastilla se lavó con 100 µl de etanol absoluto, se decantó y dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, la pastilla resultante se resuspendió en agua estéril libre de nucleasas. Se comprobó la calidad y concentración de ADN genómico por medio de espectrofotómetro en Nanodrop2000 (ThermoScientific®, USA).

Secuenciación Next-Generation Sequencing (NGS)

Las muestras de ADN obtenidas y purificadas de los coprolitos, con una concentración de 30 ng/μl, se enviaron a los servicios de la compañía ZymoBIO-MICS® (Zymo Research, Irvine, CA - USA) para procesar en la plataforma Illumina® MiSeq™ en la cual se diseñaron librerías dirigidas a la región V3-V4 del gen 16S (bacterias) con el kit Quick-16S™. Las secuencias amplificadas y secuenciadas se analizaron por bioinformática en la base de datos mediante los servicios de análisis de la compañía ZymoResearch. Para el análisis de taxonomía, composición y diversidad alfa para la determinación de la riqueza taxonómica de un sitio específico se utilizó el algoritmo Uclust (QIIME v.1.9.1) que agrupa secuencias similares en OTUs (Unidades Taxonómicas Operativas) con porcentaje de similitud del 97% (Figura 1).

Resultados y Discusión

El método más ampliamente utilizado en estudios de ADN bacteriano está basado en la secuenciación de la subunidad ribosomal 16S de las regiones V3-V4, permitiendo desarrollar estudios que exploran la diversidad microbiana en ambientes diversos, independientemente de la necesidad o posibilidad de su aislamiento y cultivo *in vitro*. Gracias a este marcador molecular, el gen 16S, ha sido posible conocer el microbioma asociado al cuerpo humano tanto en condiciones de salud como en condiciones de enfermedad

(Human Microbiome Project Consortium, 2012). La secuenciación de microbiomas de intestinos sanos, consistentemente son dominados por los filos Firmicutes y Bacteroidetes (Thursby & Juget, 2017).

En este trabajo, con la secuenciación del gen 16S amplificado de los coprolitos se determinó su composición bacteriana, siendo el filo Firmicutes el de mayor prevalencia, con un 98% de total de secuencias bacterianas identificadas (Figura 2). Rajilić-Stojanović et al. (2007), reportan a Firmicutes, como el grupo más diverso en el tracto gastrointestinal humano seguido de Bacteroidetes estos filos incluyen al 90% de los microorganismos intestinales; seguidos de los filos Proteobacteria y Actinobacteria.

El filo Firmicutes (también conocido como Bacillota) está constituido mayormente por bacterias Gram-positivas, entre las que predominan bacterias anaerobias esporuladas, en las que algunas especies presentan capacidad aeróbica facultativa, lo que les confiere una notable capacidad de adaptación. Se ha postulado que diversos mecanismos, como la supervivencia en el ambiente mediante la capacidad de formar esporas, el aprovechamiento de nutrientes complejos del hospedero incluidos los glicanos y la producción de ácidos grasos de cadena corta, asociada a la transferencia y/o persistencia en el intestino del huésped, podrían explicar la alta prevalencia del filo Firmicutes en la microbiota de los vertebrados (Dias et al., 2025).

La dominancia del filo Firmicutes fue reportada tam-

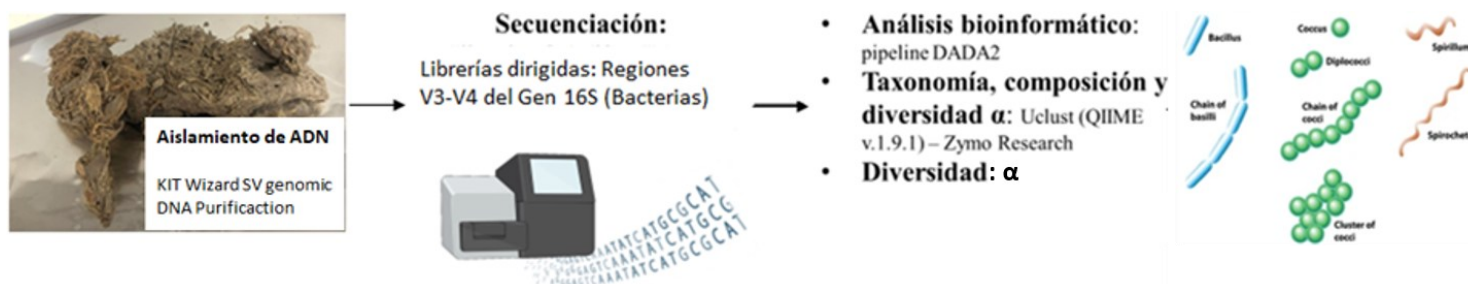


Figura 1. Estrategia experimental para el análisis de ADN de la composición microbiana, mediante aislamiento de ADN y secuenciación.

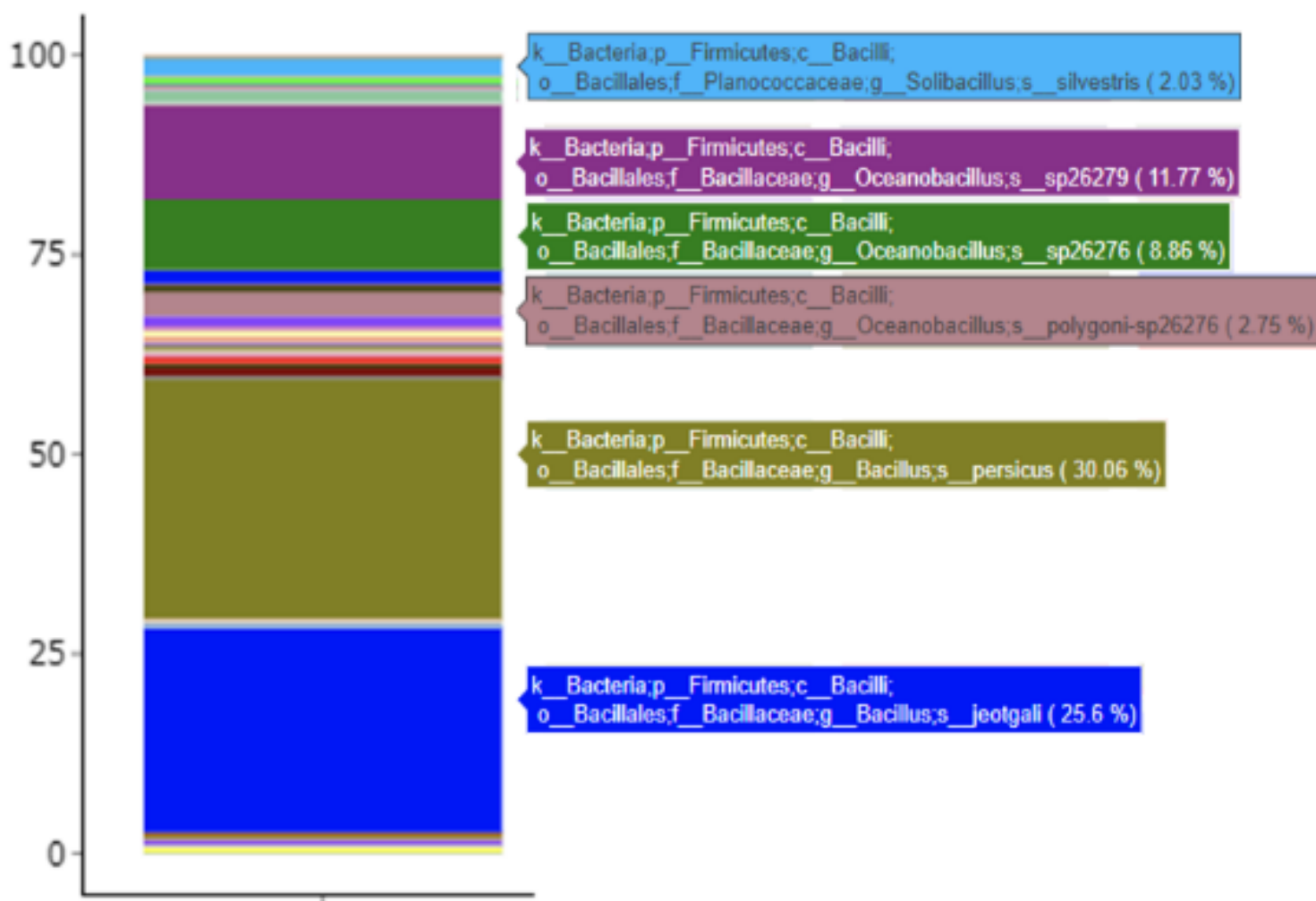


Figura 2. Composición microbiana y diversidad de especies de bacterias en macrorresto de heces (coprolito), identificadas a partir de la secuenciación del gen 16S mediante la plataforma Illumina® MiSeq™.

bién para muestras de coprolitos de una antigüedad aproximada de 1,300 años proveniente del sitio El Zape, Durango, México (Tito et al., 2008). Los resultados revelaron, por una parte, una alta similitud entre la microbiota moderna y la antigua. En este sentido, la conservación en la composición de microbiota intestinal entre especies de vertebrados y, en este caso, entre la misma especie, coloca a Firmicutes como el filo más prevalente. Esto se debe a que este grupo se ve especialmente favorecido por condiciones intestinales estables, tales como temperatura constante, suministro continuo de nutrientes y, particularmente, un ambiente intestinal anaeróbico (Rychlik, 2020).

Otro aspecto evidenciado en los coprolitos de El Zape, fue la considerable variación taxonómica observada entre dos muestras independientes de un mismo coprolito, aunque dicha variación no se reflejó en su perfil funcional. Se ha establecido que la composición de la microbiota está influenciada por muchos factores, tales como la hipoxia, ritmo circadiano, temperatura, actividad física, patrones de sueño y la dieta (Liang et al., 2026). Sin embargo, presentan cierto grado de estabilidad que no se ha explicado completamente. Algunos estudios explican esta estabilidad al identificar tres grupos diferenciados de microbiomas, denominados enterotipos, dominados

por *Bacteroides* (enterotipo I), *Prevotella* (enterotipo II) y *Ruminococcus* (enterotipo III). Estos enterotipos, que pudiendo diferir en la composición de especies bacterianas, pueden ser agrupadas según el componente funcional (características metabólicas de los microorganismos) asociado a la fuente de Carbono del cual obtienen energía; ya sea mediante la fermentación de carbohidratos (enterotipo I) o a partir de las glucoproteínas de la mucina (enterotipos I y III), pudiendo también diferir en cuanto a los niveles de producción de vitaminas (Arumugam et al., 2011)

Otro estudio reciente de caracterización de microbioma humano ancestral corresponde a la exploración del contenido intestinal y paleoheces de restos momificados de un antiguo poblador prehispánico de Zimapan, Hidalgo, México. El análisis reveló grupos típicamente asociados al microbioma humano, incluyendo familias como Peptostreptococcaceae, Clostridiaceae, Enterobacteriaceae y Enterococcaceae (Rosas-Plaza, et al., 2025). Según Rinninella et al. (2019) en la microbiota intestinal, para el filo Firmicutes, *Clostridium* corresponde al género más representado, seguido de *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* y *Ruminococcus*. El filo Bacteroidetes por su parte, constituido por bacterias Gram-negativas, se encuentran representadas en la microbiota intestinal por *Bacteroides*, *Prevotella*, *Parabacteroides* y *Alistipes* (Gomes et al., 2018).

Respecto a taxones bacterianos representados, en nuestra investigación, la familia Bacillaceae dominó la composición bacteriana de la muestra de El Morro Orgánico particularmente el género *Bacillus*. Especies del género *Bacillus* pueden formar parte de la microbiota intestinal humana, aunque generalmente se encuentra en proporciones variables y no constituye uno de sus grupos dominantes (Duc et al., 2004). Su presencia en el tracto gastrointestinal puede estar asociada con el consumo de alimentos, la interacción

con el ambiente y la resistencia de sus endosporas a condiciones adversas (Lee et al., 2019). La capacidad de numerosos integrantes de la familia Bacillaceae para formar esporas podría haber favorecido su persistencia en el ambiente y, por consiguiente, la elevada representación en la muestra analizada puede corresponder a la microbiota intestinal original o a procesos de incorporación y colonización posteriores a la deposición.

Un género representado en la muestra de coprolitos fue *Leuconostoc* sp. (Figura 3), bacteria ácido-láctica Gram positiva asociada a perfiles de probióticos. Diferentes cepas de *Leuconostoc* están presentes en variados ambientes ecológicos, sin embargo, pobremente representados comparados con bacterias aerobias. Este es un género comensal en humanos y en muy baja frecuencia, patógeno oportunista, es reconocido como generalmente seguro (GRAS - Generally Recognized as Safe) (Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004). *Leuconostoc mesenteroides* se ha descrito como un habitante transitorio de la microbiota humana cuya fuente de origen principal corresponde al consumo de bebidas fermentadas tradicionales (Jung et al., 2012), lo que representa claramente el reflejo de la práctica de elaboración de bebidas ancestrales sobre la composición bacteriana intestinal.

También se encontró representado el género *Lysinibacillus* (Figura 3). Especies del género bacteriano *Lysinibacillus*, se desarrollan principalmente en sustratos ambientales como suelos, sedimentos, agua, etc. Sin embargo, existen reportes de casos de infecciones humanas de las especies *L. sphaericus*, *L. fusiformis* describiéndose el cuadro patológico como bacteriemia, endocarditis y peritonitis (Celis-Olivares & Cruz-Choappa, 2025), por lo que puede asociarse positivamente al origen del coprolito.

Es interesante destacar que, entre los grupos típicos

de la microbiota humana, en el hombre de Zimapán se encontró a *Jeotgalicoccus*, un género de bacterias Gram positivas halotolerantes (Rosas-Plaza et al., 2025). De manera similar, en la muestra analizada de El Morro Orgánico se determinó la presencia del género halófilo *Oceanobacillus* (Figura 3).

En 2016, Khelaifia et al. reportaron una nueva espe-

cie de *Oceanobacillus*, *O. jeddahense* sp. nov., y señalaron que las bacterias halófilas y sus efectos sobre la salud y las enfermedades humanas han sido escasamente considerados en los estudios de la microbiota humana.

Aunque estos microorganismos se asocian principalmente con ambientes naturales de elevada salinidad,

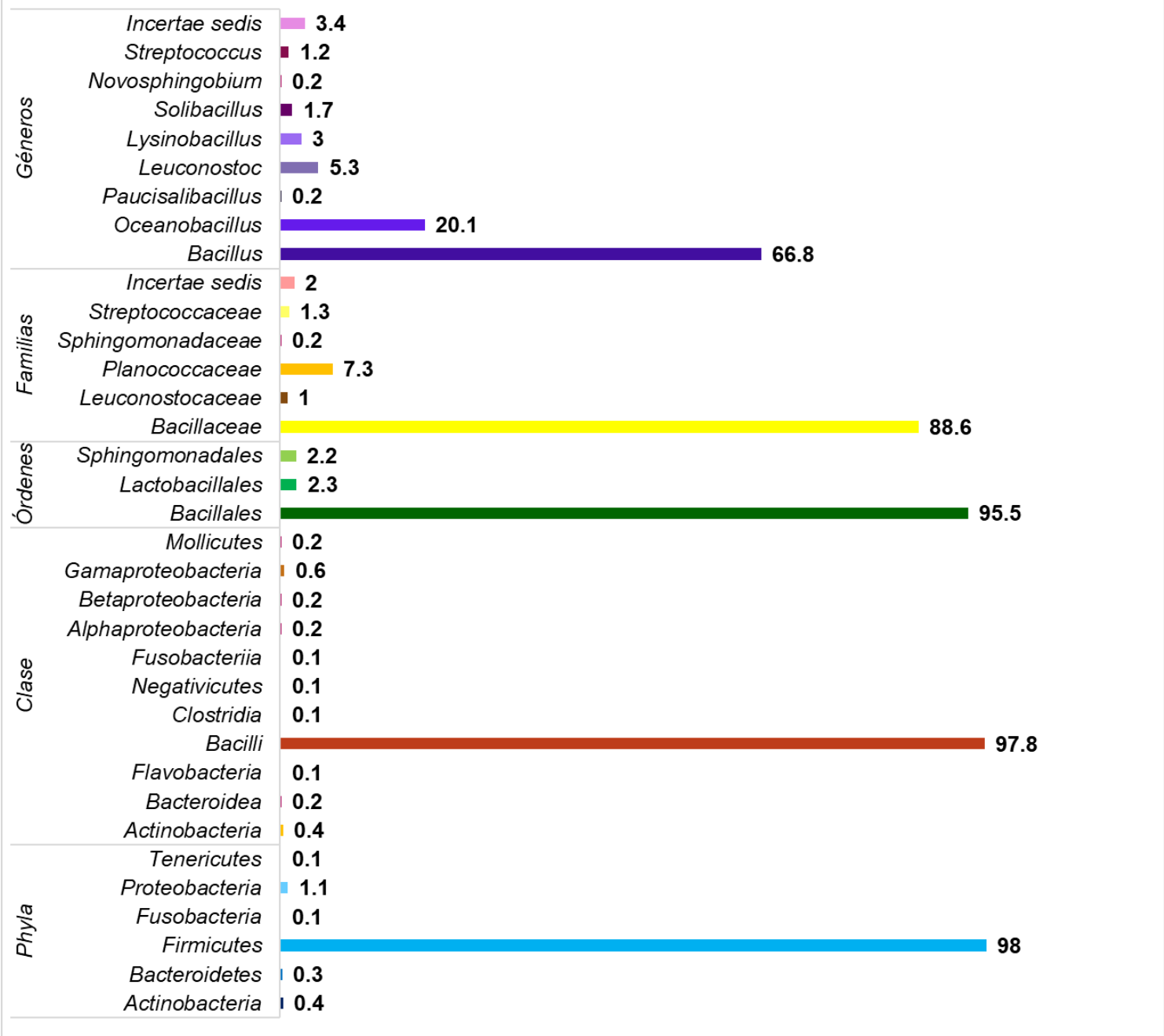


Figura 3. Abundancia y diversidad de grupos microbianos por Filum, Clase, Orden, Familia y géneros representativos de bacterias en macrorresto de heces (coprolito), identificadas a partir de la secuenciación del gen 16S mediante Illumina® MiSeq™.

como salmueras, salinas solares y depósitos salinos, otros hábitats incluyen los alimentos conservados por salazón como pescados y mariscos (Yoon et al., 2003). En este sentido, la presencia de bacterias halófilas o halotolerantes en muestras intestinales antiguas podría estar relacionado con el consumo de alimentos conservados con sal, ya sea por el manejo de la técnica de conservación de alimentos o el contacto con pobladores o productos de sitios distantes; además de la posibilidad de otras fuentes tales como la exposición ambiental.

Tanto el individuo conocido como “hombre de Zimapan” (datado para el año 936 AP), descubierto dentro de la frontera septentrional de Mesoamérica, y la muestra de El Morro Orgánico localizada al norte de México, además de contribuir al conocimiento de microbiomas ancestrales, pueden estudiarse también en los contextos geográficos en los que fueron localizados. En este sentido, se ha planteado previamente la existencia de una relación estrecha de la microbiota intestinal y la etnicidad, es decir la relación entre la constitución genética del hospedero, el entorno geográfico, las condiciones de vida, los hábitos alimentarios, las tradiciones culturales y demás factores ambientales observados entre distintos grupos étnicos (Liang et al., 2026). El estudio comparativo con enfoque geográfico ha establecido patrones de abundancia y funcionalidad de comunidades bacterianas intestinales de los principales grupos étnicos de diferentes regiones del mundo. En el contexto de salud pública, el conocimiento de microbiomas antiguos y contemporáneos puede aportar información complementaria para orientar estrategias de salud específicas, que considere el perfil microbiano y el contexto socio geográfico de la población. En el ámbito histórico, este tipo de estudios puede ampliar la comprensión de patrones culturales en conjunto con las evidencias arqueológicas.

Conclusiones

La caracterización molecular del coprolito confirma la posibilidad de recuperar ADN e identificar componentes de la microbiota ancestral, lo que demuestra la utilidad de estas técnicas para el estudio de comunidades microbianas del pasado. El análisis taxonómico permitió identificar géneros bacterianos asociados con la microbiota humana, con un predominio de microorganismos pertenecientes a la familia Bacillaceae. Detectando géneros bacterianos con potencial probiótico y de categoría halotolerante. Estos estudios pueden ser realizados idealmente en muestras protegidas del contexto ambiental para incrementar el nivel de información efectivamente relacionada a la microbiota intestinal. En conjunto, estos resultados preliminares presentan una posible aproximación al conocimiento de las relaciones socioculturales de las poblaciones humanas de la región y su entorno ambiental específicamente en el sitio arqueológico El Morro Orgánico. Por otra parte, la composición de la microbiota ancestral en pobladores de la región noreste de México y proporcionan información que puede ser relevante y complementaria para la interpretación de restos en contextos arqueológicos del estado de Nuevo León.

Referencias

- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., & Batto, J.M. (2011) Enterotypes of the Human Gut Microbiome. *Nature*, 473, 174–180.
- Celis-Olivares, F., & Cruz-Choappa, R. (2025). *Lysinibacillus xylanilyticus*. *Revista Chilena de Infectología*, 42(2), 167-168.
- Dias, B.D.C., Lamarca, A.P., Machado, D. T., Kloh, V.P., de Carvalho, F.M., & Vasconcelos A.T.R. (2025). Metabolic pathways associated with Firmicutes prevalence in the gut of multiple livestock animals and humans. *Animal microbiome*, 7(1), 20.
- Duc, L.H., Hong, H.A., Barbosa, T.M., Henriques, A.O., &

- Cutting, S.M. (2004). Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied and environmental microbiology*, 70(4), 2161-2171.
- Gokcumen, O., & Frachetti, M. (2020). The impact of ancient genome studies in archaeology. *Annual Review of Anthropology*, 49(1), 277-298.
- Gomes, A.C., Hoffmann, C., & Mota, J.F. (2018). The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut microbes*, 9(4), 308-325.
- Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14(6), 467-494.
- Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207-14.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). (1983). Síntesis Geográfica de Nuevo León. Secretaría de Programación y Presupuesto, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México, D.F.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Lee, H.J., Seo, H.Y., Park, W.S., & Jeon, C.O. (2012). Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *International journal of food microbiology*, 153(3), 378-387.
- Khelaifia, S., Lagier, J.C., Bibi, F., Azhar, E.I., Croce, O., Padmanabhan, R. Jiman-Fatani, A.A., Yasir, M., Robert, C., Andrieu, C., Fournier, P.E., & Raoult, D. (2016). Microbial Culturomics to Map Halophilic Bacterium in Human Gut: Genome Sequence and Description of *Oceanobacillus jeddahense* sp. nov. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 20(4), 248-258.
- Kistler, L., Bieker, V.C., Martin, M.D., Pedersen, M.W., Ramos Madrigal, J., & Wales, N. (2020). Ancient plant genomics in archaeology, herbaria, and the environment. *Annual review of plant biology*, 71(1), 605-629.
- Liang, L., Zhang, X., & Nian X. (2026). The ethnicity and gut microbiota hypothesis: analyzing multifactorial interactions and their health implications. *Frontiers in Microbiology*, 17, 1765775.
- Lee, N.K., Kim, W.S., & Paik, H.D. (2019). *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier: N.-K. Lee et al. *Food science and biotechnology*, 28(5), 1297-1305.
- McHugo, G. P., Dover, M. J., & MacHugh, D. E. (2019). Unlocking the origins and biology of domestic animals using ancient DNA and paleogenomics. *BMC biology*, 17(1), 98.
- Rajilić-Stojanović, M., Smidt, H., & De Vos, W.M. (2007). Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental microbiology*, 9(9), 2125-2136.
- Reinhard, K.J., & Bryant, V.M. (1992). Coprolite analysis: a biological perspective on archaeology. *Archaeological method and theory*, 4, 245-288.
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G.A.D., Gasbarrini, A., & Mele, M.C. (2019). What Is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem Across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, 7, 14.
- Rivera-Estrada, A. (2023). Hallazgos del poblamiento de la zona serrana del sur de Nuevo León por grupos recolectores-horticultores. En P. A. Malbrán, L. V. Ortega, & S. A. Martínez (eds.), *Arqueología en la frontera norte* (pp. 400). Sindicato Nacional de Profesores de Investigación Científica y Docencia del Instituto Nacional de Antropología e Historia.
- Rosas-Plaza, S., Mainou, L., Delgado, G., Morales, R., Aguilar-Romero, A., Escalante, A.E., & Cerritos, R. (2025). Microbiome characterization of a pre-Hispanic man from Zimapan, Mexico: Insights into ancient gut microbial communities. *PLoS One*, 20(10): e0331137.
- Rychlik, I. (2020). Composition and function of chicken gut microbiota. *Animals*, 10(1), 103.
- Schenk, J.J., Becklund, L.E., Carey, S.J., & Fabre, P.P. (2023). What is the “modified” CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol. *Applications In Plant Sciences*, 11(3), e11517.
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical journal*, 474(11), 1823-1836.
- Tito, R.Y., Macmil, S., Wiley, G., Najar, F., Cleeland, L., Qu, C., Wang, P., Romagne, F., Leonard, S., Ruiz, A.J., Reinhard, K., Roe, B.A., & Lewis C.M. (2008). Phylotyping and Functional Analysis of Two Ancient Human Microbiomes. *PLoS ONE*, 3(11), e3703.
- Valencia, S., Zuluaga, M., Florian-Pérez, M.C., Montoya-Quintero, K.F., Candamil-Cortés M. S., & Robledo S. (2025). Human gut microbiome: A connecting organ between nutrition, metabolism, and health. *International journal of molecular sciences*, 26(9), 4112.
- Yoon, J.H., Kang, K.H., & Park, Y.H. (2003). *Psychrobacter jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(2), 449-454.