



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología

Caracterización fenotípica de enterobacterias de crías de elefante marino del Norte (*Mirounga angustirostris*) nacidas en el Archipiélago de San Benito y análisis de resistencia a antibióticos

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Biología

Presenta:

María Fernanda Félix Huergo

Dirigida por:

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse

SINODALES

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse
Directora

Fabiola Guerrero de la Rosa
Sinodal

Fausto Arellano Carbajal
Sinodal

Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández
Sinodal

Mónica Elisa Queijeiro Bolaños
Sinodal

Dr. José Guadalupe Gómez Soto

Director de la Facultad de Ciencias
Naturales

Dr. Israel Gustavo Carrillo Ángeles

Coordinador de la Licenciatura en
Biología



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Caracterización fenotípica de enterobacterias de crías
de elefante marino del Norte (*Mirounga angustirostris*)
nacidas en el Archipiélago de San Benito y análisis de
resistencia a antibióticos

por

María Fernanda Félix Huergo

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: CNLIN-279349

Resumen

En este trabajo se evaluó la resistencia a antibióticos de las enterobacterias aisladas a partir de hisopados anales de crías de elefante marino del Norte, *Mirounga angustirostris*, con metodologías basadas en cultivo, aislamiento y caracterización. Se caracterizaron los morfotipos de enterobacterias y se analizaron conforme a los años de muestreo, condición corporal y sexo de las crías. También se realizaron antibiogramas en bacterias cultivables. Se encontró evidencia de cambios anuales en bacterias integrantes de la microbiota entérica, y diferencias metabólicas entre años y entre sexos. Se registró la presencia de enterobacterias con resistencia a 11 de los 14 antibióticos utilizados, con más del 50% de las cepas desplegando resistencia a antibióticos comunes, lo que constituye el primer registro en el elefante marino del Norte en aguas mexicanas. La tesis discute cómo el elefante marino del Norte, como especie centinela, puede proveer información del estado de salud del ecosistema y resalta la problemática de presencia de resistencia a antibióticos en ecosistemas marinos.

Palabras clave: Antibióticos, elefante marino del norte, microbiota entérica, *Mirounga angustirostris*, resistencia a antibióticos.

Abstract

In this research, the antibiotic resistance of enterobacteria isolated from anal swabs collected from Northern elephant seal, *Mirounga angustirostris*, pups were evaluated using culture-based methodologies, isolation, and characterization. The enterobacteria morphotypes were characterized and analysed according to sampling year, body condition, and sex of the pups. Antibiotic resistance tests were also performed on the culturable enterobacteria. Evidence of annual changes in bacteria composing the enteric microbiota was found, as well as metabolic differences between years and sex. Presence of bacteria resistant to 11 out of 14 antibiotics tested was recorded, with over 50% of strains exhibiting resistance to common antibiotics, being the first record in the Northern elephant seal in Mexican waters. In this thesis we analyse how the Northern elephant seal, as a sentinel species, can provide information on the health status of the ecosystem and highlights the issue of antibiotic resistance presence in marine ecosystems.

Keywords: Antibiotics, northern elephant seal, enteric microbiota, *Mirounga angustirostris*, antibiotic resistance.

Dedicatoria

A Dionisio Félix por inspirarme a intentar comprender a la vida y a
Martha Barros por enseñarme a conectar con ella.

Agradecimientos

A mis Padres y familia por enseñarme sobre el amor y hacerme un ser humano consciente y empático.

A Karina por transmitirme su pasión y conocimiento desde que pude conocerla en la universidad.

A Pau, Yara, Carla, Itzel, Mario, Vero, Brandon, Emilio, Mara, Zoé y Norma por ser compañeros de campo, de congreso, de aventuras, de carrera, de logros, de laboratorio y de vida.

A Cecy y a Aldo por ser los mejores técnicos que un laboratorio puede tener, gracias por su paciencia y todo lo que me han enseñado.

A Fausto por su inmensa empatía, por enseñarme a diseñar primers, clavarme una espinita en la biología del desarrollo y mostrarme que la evolución es una pepenadora.

A Kruskaia por todos las repeticiones que hice de tinciones, los cultivos, los chismes, los regaños y sobre todo por los consejos de bacterias y de vida.

A Faby por sus clases de mamíferos marinos, por todas las risas y compartirme su amor por el mar.

A Mony por ser una increíble docente, enseñarme a usar R e intentar hacerme amiga de la estadística.

A Vanessa y a Ana por ser mis mejores amigas y pronto hermanas colegas.

A Miguel por siempre acompañarme y leer las múltiples versiones de esta tesis.

A René y a Kira por ser los nuevos integrantes de mi familia.

Y a todas las maestras y maestros que he tenido, desde enseñarme los colores, como leer y escribir, historia, ciencias, el amor por la lectura, idiomas o células, sé que la suma de todos esos aprendizajes me han llevado hasta aquí. Millones de gracias, me inspiran a ser una increíble docente como ustedes.

Declaratoria de autoría

Declaro que el trabajo que se presenta en esta tesis fue realizado por mí, a excepción de aquellas secciones que formaron parte de colaboraciones, mismas que se indican explícitamente en el texto.

Confirmando que las ideas originales aquí presentadas son de mi autoría y que a lo largo de la tesis le he dado crédito al trabajo de otros mediante el uso adecuado de las referencias.

Esta copia se ha sometido a la Universidad Autónoma de Querétaro bajo el entendido de que constituye material con derechos de autor y que no puede citarse ningún pasaje de esta tesis sin darle el crédito adecuado.

Tabla de contenidos

Resumen	1
Abstract	2
Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Declaratoria de autoría	5
Tabla de contenidos	6
Índice de Figuras	8
Índice de Cuadros	10
Introducción	11
Hipótesis de trabajo	14
Objetivo general	15
Objetivos particulares	15
Antecedentes	16
Mecanismos de acción de los antibióticos	16
Resistencia a antibióticos	21
Emergencia y transmisión de resistencia a antibióticos en los ecosistemas	30
Las enterobacterias de la microbiota rectal	34
La resistencia a antibióticos en el contexto de la historia de vida	38
Materiales y métodos	40
Modelo de estudio	40
Sitio de estudio	43
Colecta de las muestras	44
Procesamiento de muestras	45
• Caracterización fenotípica de las enterobacterias	46
• Tinción de Gram	46

• Pruebas bioquímicas _____	47
• Elaboración de antibiogramas _____	48
Análisis estadísticos _____	50
Resultados _____	52
Caracterización de los morfotipos _____	52
Comparación de sexos y diversidad _____	55
Resistencia a antibióticos _____	55
Discusión _____	64
Conclusiones _____	76
Literatura citada _____	77

Índice de Figuras

Figura 1. Procesos y estructuras celulares que inhiben o interfieren los antibióticos.	16
Figura 2. Mecanismos de acción de resistencia a antibióticos.	22
Figura 3. Mecanismos de adquisición de genes de resistencia a antibióticos.	27
Figura 4. Elefantes marinos del norte en el archipiélago de San Benito, Baja California.	42
Figura 5. Mapa del archipiélago de San Benito.	43
Figura 6. Relación de los valores de condición corporal LT/DU y LT/DG.	45
Figura 7. Antibiograma en caja petri con multidisco de 14 antibióticos para gram -.	49
Figura 8. Morfotipos de enterobacterias aislados de muestras rectales de crías de elefante marino del Norte en 2022 y 2023.	52
Figura 9. Cantidad de morfotipos de enterobacterias identificados por muestra en 2022 y 2023.	53
Figura 10. Cantidad de morfotipos de enterobacterias identificados por muestra en 2022 y 2023.	53
Figura 11. Resultados de pruebas bioquímicas de ornitina en 2022 y 2023.	54
Figura 12. Morfotipos encontrados en machos y hembras	55
Figura 13. Gráfica de Distribución e Histograma de los halos de inhibición en presencia de antibiótico en bacterias del 2022 y 2023.	58
Figura 13 (Continuación). Gráfica de Distribución e Histograma de los halos de inhibición en presencia de antibiótico en bacterias del 2022 y 2023.	59
Figura 14. Comparación entre frecuencias de bacterias sensibles (S) a antibióticos detectadas en cachorros machos (M) y hembras (H).	60
Figura 15 . Relación de valor de condición corporal DG y sexos.	60
Figura 16. Boxplot con la relación de LT/DU y la presencia del morfotipo #10.	61
Figura 17. Boxplot con la relación de LT/DG y la presencia del morfotipo #1.	61

Figura 18. Relación de valores de condición corporal LT/DU con frecuencia de bacterias indol positivo _____ 62

Figura 19. Relación de valores de condición corporal LT/DG con frecuencia de bacterias con valores intermedios de resistencia a antibióticos. _____ 63

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Clasificación de antibióticos. Se describe la estructura, proceso que inhiben y ejemplos de antibióticos en cada grupo.	19
Continuación (Cuadro 1)	20
Cuadro 2. Enterobacterias con resistencia a antibióticos y mecanismos de resistencia.	36
Cuadro 3. Porcentaje de resultados de pruebas bioquímicas realizadas a las enterobacterias aisladas de elefante marino del norte en 2022 y en 2023.	54
Cuadro 4. Resultados de antibiogramas con frecuencia de morfotipos de enterobacterias resistentes, intermedios y sensibles en 2022 y 2023.	57
Cuadro 5. Resultados significativos de la prueba de Mann Withney-U comparando el diámetro de los halos de inhibición de bacterias del 2022 y 2023.	58

Introducción

A la comunidad de microorganismos que encontramos en el interior o exterior de otro organismo le conocemos como microbiota (Hou et al., 2022). Estudiar el microbioma de un organismo nos puede brindar información útil para comprender su estado de salud e identificar los estados de disbiosis, o desequilibrio de la microbiota, que pueden incrementar el riesgo de diversas enfermedades (Ribas et al., 2023) Caracterizar fenotípicamente a las bacterias que conforman a la microbiota puede brindar información de relevancia para el manejo y conservación de las especies silvestres (Laborda et al., 2022). Una de las aplicaciones del estudio de la microbiota es la identificación de bacterias cultivables a las que pueden realizarse desafíos *in vitro* con antibióticos. Este análisis, conocido como estudio de resistencia a antibióticos es un elemento clave para entender la exposición de estos organismos a antibióticos en los ambientes naturales (Sabtu et al., 2015).

La resistencia a antibióticos es considerada actualmente un problema serio para la salud pública a nivel mundial (Conly & Johnston, 2005). En un estudio realizado por (Murray et al., 2022) a partir de modelos estadísticos predictivos se estimó que en el 2019, 4,95 millones de muertes podrían asociarse a bacterias resistentes a antibióticos. Se han registrado bacterias Gram positivas y Gram negativas causantes de diversas infecciones, donde el tratamiento a partir de antibióticos convencionales resulta muy difícil o con resultados nulos, lo que ocasiona una alta morbilidad y mortalidad (Akova, 2016).

La resistencia a antibióticos no solamente se observa en bacterias del humano y de animales domésticos, dado que los metabolitos de los antibióticos, los antibióticos en sí mismos, y las bacterias con resistencia a antibióticos son excretados en los desechos humanos y agropecuarios, pueden llegar fácilmente a diversos ecosistemas, incluso encontrándose en especies silvestres (Laborda et al., 2022). En un estudio reciente realizado por Laborda y colaboradores (2022), se reportan diferencias en la cantidad de bacterias con resistencia a antibióticos entre animales silvestres que están en contacto con residuos humanos y animales silvestres de

zonas más conservadas. Esto lo observaron para diversas especies de reptiles, aves y mamíferos comparando poblaciones cercanas a zonas perturbadas por el ser humano y zonas conservadas, evaluando si albergan bacterias resistentes a los antibióticos y las cepas resistentes a múltiples fármacos, encontraron mayor frecuencia de resistencia en animales de los sitios más antropizados (Laborda et al., 2022). Esto sugiere que la antropización incrementa la posibilidad de transferencia de antibióticos, sus metabolitos y bacterias con resistencia a antibióticos hacia otras especies. Lamentablemente, aún se ha estudiado poco sobre la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en fauna silvestre de diversos ecosistemas. Tomando en cuenta estos resultados, es fundamental comprender y reconocer la conexión entre las fuentes de contaminación, la microbiota humana, animal y ambiental para entender el problema desde la perspectiva de One Health y dar pauta a la gestión de esta problemática de salud global. (Larsson & Flach, 2022)

Las especies centinela son aquellas que brindan información sobre la salud de los ecosistemas, a partir de conexiones entre el estado de salud humana, animal y del ambiente (Demas & Nelson, 2012). Para cumplir este papel, deben de tener una serie de características asociadas a su historia de vida, como longevidad, amplio espectro trófico y presencia en zonas de impacto antrópico. Los mamíferos marinos son especies centinelas de los ecosistemas marinos, ya que son longevos, residen a largo plazo en ecosistemas pelágicos y costeros y se alimentan en niveles tróficos elevados (Bossart, 2011). El elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*) es una especie centinela del ecosistema marino particularmente informativa. Esto es debido a su historia de vida, tanto neonatal como adulta, que permite que pueda la especie reflejar el impacto de la antropización del ecosistema en las madres al estudiar a las crías. Por otro lado, las diferencias intersexuales en su historia de vida, incluso a etapas tempranas del desarrollo, así como la inversión diferencial de recursos energéticos de las madres hacia las crías hembras y machos. (Noren et al. 2003), permite plantear su uso como especie modelo para investigar diferencias entre la diversidad fenotípica de las enterobacterias de las crías desde una perspectiva ecoevolutiva e investigar diferencias en la resistencia a antibióticos que exhiben esas bacterias (Hiltunen et al., 2017).

En esta tesis se caracterizó fenotípicamente a las enterobacterias de crías de elefante marino del Norte que fueron capturadas y muestreadas durante 2022 y 2023 en su colonia de nacimiento, en la Isla Benito del Oeste, en el Pacífico Mexicano. El objetivo de la tesis fue investigar la variación si los fenotipos de las enterobacterias cultivables y sus patrones de resistencia a antibióticos varían entre años y entre sexos, y si son influidos por la condición de las crías.

Hipótesis de trabajo

La diversidad fenotípica de enterobacterias rectales de crías de elefante marino del Norte es diferente entre sexos.

La diversidad fenotípica de enterobacterias rectales de crías de elefante marino del Norte es proporcional a la condición corporal de las crías.

La diversidad fenotípica de enterobacterias rectales de crías de elefante marino del norte es diferente entre 2022 y 2023.

Las enterobacterias rectales de crías de elefante marino del Norte presentan resistencia a antibióticos de uso humano y agropecuario.

Los patrones de resistencia a antibióticos de las bacterias rectales de crías de elefante marino del Norte difieren entre sexos.

Los patrones de resistencia a antibióticos de las bacterias rectales de crías de elefante marino del Norte varían con la condición corporal de las crías.

Los patrones de resistencia a antibióticos de las bacterias rectales de crías de elefante marino del Norte varían entre 2022 y 2023.

Objetivo general

Caracterizar las enterobacterias cultivables de muestras rectales de crías de elefante marino del Norte e investigar sus patrones de resistencia a antibióticos.

Objetivos particulares

Evaluar si la diversidad fenotípica de enterobacterias rectales de crías de elefante marino del Norte es diferente entre sexos.

Analizar si la diversidad fenotípica de enterobacterias rectales de crías de elefante marino del Norte es proporcional a la condición corporal de las crías.

Identificar si la diversidad fenotípica de enterobacterias rectales de crías de elefante marino del norte es diferente entre 2022 y 2023.

Investigar si las enterobacterias rectales de crías de elefante marino del Norte presentan resistencia a antibióticos de uso humano y agropecuario.

Evaluar si los patrones de resistencia a antibióticos de las bacterias rectales de crías de elefante marino del Norte difieren entre sexos.

Analizar si los patrones de resistencia a antibióticos de las bacterias rectales de crías de elefante marino del Norte varían con la condición corporal de las crías.

Identificar si los patrones de resistencia a antibióticos de las bacterias rectales de crías de elefante marino del Norte varían entre 2022 y 2023.

Antecedentes

Mecanismos de acción de los antibióticos

Los antibióticos son una serie de compuestos que inducen la muerte celular o inhiben el crecimiento y reproducción de microorganismos (Bentley & Bennett, 2003). También se ha definido a un antibiótico como sustancia producida por un microorganismo o de origen biológico que a bajas concentraciones puede inhibir el crecimiento o ser letal para otros microorganismos (Denyer et al., 2011) a su vez, esta definición ha sido modificada a lo largo del tiempo al incluir a los antibióticos que son formados de manera sintética o contienen compuestos sintéticos. Aquellos antibióticos que son letales para las bacterias se les nombra como bactericidas, mientras que los que se encargan de inhibir el crecimiento bacteriano son bacteriostáticos (Pankey & Sabath, 2004). Esta acción se debe a que alteran procesos asociados a la supervivencia de las bacterias, como la síntesis de componentes de la pared celular, del ADN, el ARN o de la síntesis de proteínas (Kohanski, Dwyer & Collins, 2010).

Existen numerosas formas de clasificar a los antibióticos con base en su estructura molecular, actividad antibacteriana o mecanismos de acción (Etebu, et al. 2016) Se pueden clasificar los mecanismos de acción de los antibióticos con base en los procesos y estructuras celulares que inhiben o en los que interfieren (Figura 1).

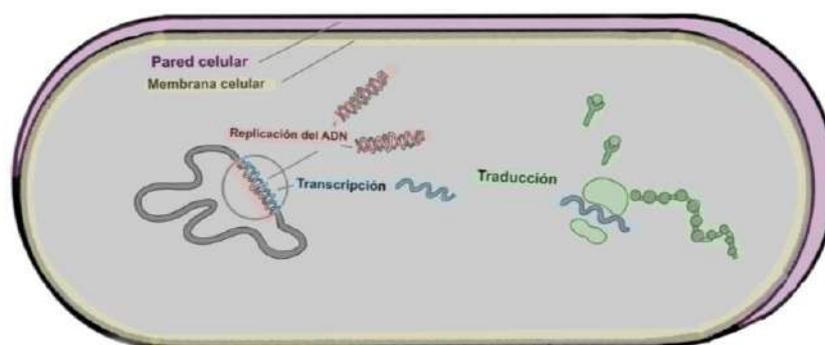


Figura 1. Procesos y estructuras celulares que inhiben o interfieren los antibióticos. Imagen creada a partir de la información revisada en (Etebu, et al. 2016).

Hay antibióticos que inhiben la síntesis de pared celular, estructura formada de un compuesto llamado peptidoglicano. La pared celular es necesaria para mantener la forma de la célula bacteriana y esencial para protegerse del entorno (Bugg & Walsh, 1992). En el proceso de síntesis de peptidoglicano están involucradas enzimas transglicosilasas y transpeptidasas que forman la pared celular añadiendo péptido sacáridos y hebras de peptidoglicano inmaduro (Bugg & Walsh, 1992). Antibióticos como la cefalosporina, penicilinas y glicopéptidos, inhiben la generación de pared celular al bloquear a las enzimas transpeptidasas o transglicosilasas y uniéndose a las unidades de peptidoglicano (Kahne et al., 2005).

Las proteínas son biomoléculas responsables de muchas funciones celulares, como la conformación de estructuras, desarrollo de procesos metabólicos y procesos fisiológicos en la célula (Alberts et al., 2015). Las proteínas se forman a partir del proceso de transcripción y traducción, en los cuales se codifica la información contenida en un gen del ADN celular en un fragmento de ARN mensajero (transcripción) y la interpretación de la información contenida en el ARN mensajero para la formación de cadenas de aminoácidos (traducción), en el proceso de traducción están involucrados los ribosomas, estructuras celulares responsables del acoplamiento del ARN mensajero y ARN de transferencia (el ARN de transferencia trae los aminoácidos correspondientes a la secuencia contenida en el ARNm a partir de la complementariedad de codones y anticodones de ambos tipos de ARN) (Alberts et al., 2015). A su vez, los ribosomas son los responsables de la formación de los enlaces peptídicos entre aminoácidos, con el fin de formar las cadenas peptídicas. Los ribosomas están formados de dos subunidades, una más grande que la otra y se han descrito a partir de los coeficientes de sedimentación que son 50S y 30S (Alberts et al., 2015). Ya que los ribosomas forman la cadena de aminoácidos, posteriormente las cadenas son plegadas y modificadas para adquirir la estructura y grupos funcionales que conforman la estructura de la proteína madura y funcional (Alberts et al., 2015).

Los antibióticos que pueden intervenir en este proceso de síntesis de proteínas, se pueden clasificar dependiendo de si inhiben 50S y 30S, partes esenciales del ribosoma y por lo tanto indispensables para la síntesis de proteínas, algunos ejemplos

de estos antibióticos son la eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol y clindamicina que inhiben 50S y tetraciclina y estreptomina inhibe el funcionamiento de la subunidad ribosomal 30S (Etebu, et al. 2016).

El proceso de síntesis de ácidos nucleicos también es un proceso esencial en el funcionamiento de la célula, la interrupción de este proceso puede impedir la supervivencia y reproducción (Alberts et al., 2015). Los antibióticos que interfieren en este proceso bloquean el proceso de replicación o transcripción, siendo la replicación el proceso que se lleva a cabo para formar copias del ADN celular y permitir que las células producto de la división celular posean una copia del ADN de la célula madre (Etebu, et al. 2016). Por su parte, la transcripción, que ya se ha mencionado anteriormente, es el proceso en que la información contenida en un gen en el ADN se copia en una molécula de ARN (Alberts et al., 2015). En la replicación están presentes numerosas enzimas, como es el caso de la helicasa que tiene como función abrir la cadena de ADN y separar las hebras, rompiendo los puentes de hidrógeno existentes entre nucleótidos complementarios (Alberts et al., 2015).

La función de la helicasa es esencial para permitir el funcionamiento de las enzimas que continúan el proceso de replicación del ADN y antibióticos como las quinolonas evitan que ocurra al interferir con la enzima helicasa (Chen et al., 1996). A su vez, las quinolonas interrumpen el proceso de transcripción, inhiben especialmente a las enzimas topoisomerasas, que en consecuencia impide el trabajo de las polimerasas, enzimas responsables de formar las cadenas de ARN mensajero a partir de las secuencias de nucleótidos presentes en el ADN celular, impidiendo así la formación del ADN, su la reproducción o la síntesis de proteínas de las bacterias (Etebu, et al. 2016).

En el caso de los antibióticos que afectan la membrana celular (estructura externa de la célula, clave para permitir una entrada y salida selectiva de sustancia), estos son específicos para cada grupo de bacterias, ya que actúan sobre los lípidos presentes en la membrana celular y estos pueden variar dependiendo del grupo de bacterias del que se trate (Falagas et al., 2010). Algunos ejemplos de esto son la daptomicina y polimixinas, que depolarizan las membranas dependientes de calcio o que

desintegran la membrana al unirse con liposacaridos de su estructura, respectivamente, dando como resultado la perturbación de su función, lo que ocasiona desequilibrio entre los contenidos celulares con respecto al exterior y la muerte de la célula (Falagas et al., 2010).

Siendo los antibióticos compuestos que pueden afectar el crecimiento, reproducción y supervivencia de las bacterias, afectando estructuras como la pared celular, membrana celular, síntesis de proteínas y síntesis de ácidos nucleicos, se han descrito como uno de las principales presiones de selección de las bacterias (Etebu, 2016). A su vez, los antibióticos también se pueden clasificar por su estructura química (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de antibióticos. Se describe la estructura, proceso que inhiben y ejemplos de antibióticos en cada grupo.

Antibióticos	Estructura química	Proceso que afecta	Ejemplos
Beta-lactámicos (Bush & Bradford, 2016)	Con estructura conformada por un anillo beta-lactámico.	Inhiben la síntesis de pared celular. Bactericidas.	Cefalosporinas, penicilinas, carbapenémicos.
Macrólidos (Etebu, 2016).	Poseen un anillo macrocíclico lactónico	Inhiben la síntesis de proteínas (Afectan a 50S del ribosoma) Bacteriostáticos.	Claritromicina, Azitromicina y eritromicina.
Tetraciclinas (Chopra & Roberts, 2001)	Las tetraciclinas presentan cuatro anillos fusionados en su núcleo, son similares a las porfirinas.	Inhiben la síntesis de proteínas. (Afectan a 30S del ribosoma) Bacteriostáticos.	Tetraciclina, doxiciclina, minociclinas.

Continuación (Cuadro 1)

<p>Quinolonas (Aldred et al., 2014)</p>	<p>Presentan estructura de quinolina.</p>	<p>Inhiben la síntesis de ácidos nucleicos. (transcripción y replicación) Bactericida.</p>	<p>Levofloxacin, moxifloxacin y ciprofloxacina.</p>
<p>Aminoglucósidos (Vakulenko & Mobashery, 2003)</p>	<p>Presentan grupos aminos y azúcares en estructura cíclica.</p>	<p>Inhiben la síntesis de proteínas (Afectan a 30S del ribosoma) Bactericida</p>	<p>Amikacina, gentamicina y estreptomycin.</p>
<p>Sulfonamidas (Reeves, 1984)</p>	<p>Presentan un grupo funcional en el núcleo de la molécula formado de amidas del ácido sulfónico (sulfonamida)</p>	<p>Inhiben la síntesis del ácido fólico, el cual funciona como un precursor en la síntesis de ácidos nucleicos. Bacteriostático.</p>	<p>Trimetoprima y sulfametoxazol.</p>
<p>Glicopéptidos (Courvalin, 2006)</p>	<p>Péptidos con estructura cíclica que contienen azúcares y aminoácidos.</p>	<p>Inhiben la síntesis de la pared celular. (Afectan especialmente a los precursores del peptidoglicano) Bactericidas.</p>	<p>Teicoplanina y vancomicina.</p>
<p>Oxazolidinonas (Böttger & Springer, 2008)</p>	<p>Estructura en forma de anillo.</p>	<p>Inhiben la síntesis de proteínas. Bacteriostáticos.</p>	<p>Linezolid.</p>

Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos se da por una serie de mecanismos que poseen los microorganismos para evitar o disminuir los efectos de antibióticos. (Martínez, 2014). Estos mecanismos de resistencia tienen bases genéticas y se pueden diferenciar en cuatro tipos principales según su desarrollo y origen (Munita & Arias, 2016). Primero, la resistencia natural, que poseen algunas bacterias de forma intrínseca, codificada en sus genes, y que les permite no ser afectadas directamente por el compuesto antibiótico desde un inicio, ya sea por su estructura o vías metabólicas. Un ejemplo de esto es cuando las bacterias carecen del sitio de unión u objetivo del antibiótico o cuando su membrana es impermeable y no permite el paso de los antibióticos al interior de la célula (Allen et al., 2010). En segundo lugar, la resistencia adquirida, que se desarrolla a partir de la modificación genética en cromosomas o plásmidos, por mutaciones aleatorias causadas por cambios en el medio extra o intracelular, por errores en la polimerasa durante la síntesis de ADN o mediante transposones o integrones, siendo la información en los plásmidos muy importante en la síntesis de enzimas que inactivan algunos compuestos antibióticos (Munita & Arias, 2016).

En tercer lugar, está la resistencia cruzada, que ocurre cuando, a partir de contar con resistencia a un antibiótico específico, si es molecularmente similar a otros antibióticos, las bacterias expuestas a ellos puedan ser resistentes por el proceso que las protegía contra el primer antibiótico (Munita & Arias, 2016). Finalmente, la resistencia puede ser de tipo multi fármacos. Este tipo de resistencia se ha descrito en bacterias patógenas que desarrollan múltiples estrategias contra más de un antibiótico de origen farmacéutico, poseen varios genes asociados a resistencia, se puede presentar un aumento en la síntesis de enzimas inactivadoras de antibióticos y cambios en las estructuras blanco (Munita & Arias, 2016). Cuando antibióticos actúan a través de los mismos mecanismos su efecto funciona de forma aditiva, creando condiciones perfectas para la resistencia cruzada o co-resistencia, dando como resultado la multi-resistencia a numerosos tipos de antibióticos. (Blackburn et al., 2010)

Para que un antibiótico tenga efecto es necesario que ingrese a la célula bacteriana, en algunos casos, los antibióticos requieren de un proceso de activación y anclarse al sitio de unión que les corresponde para tener efecto en la célula, es importante que debe de existir a una concentración suficiente del fármaco para tener el efecto antibiótico que corresponde (Vittecoq et al., 2016). Los mecanismos de resistencia a antibióticos afectan a este proceso de ingreso, activación, anclaje al sitio de unión o concentración de los ligandos, evitando que el antibiótico tenga efecto en la célula bacteriana. (Martínez, 2014) (Figura 2).

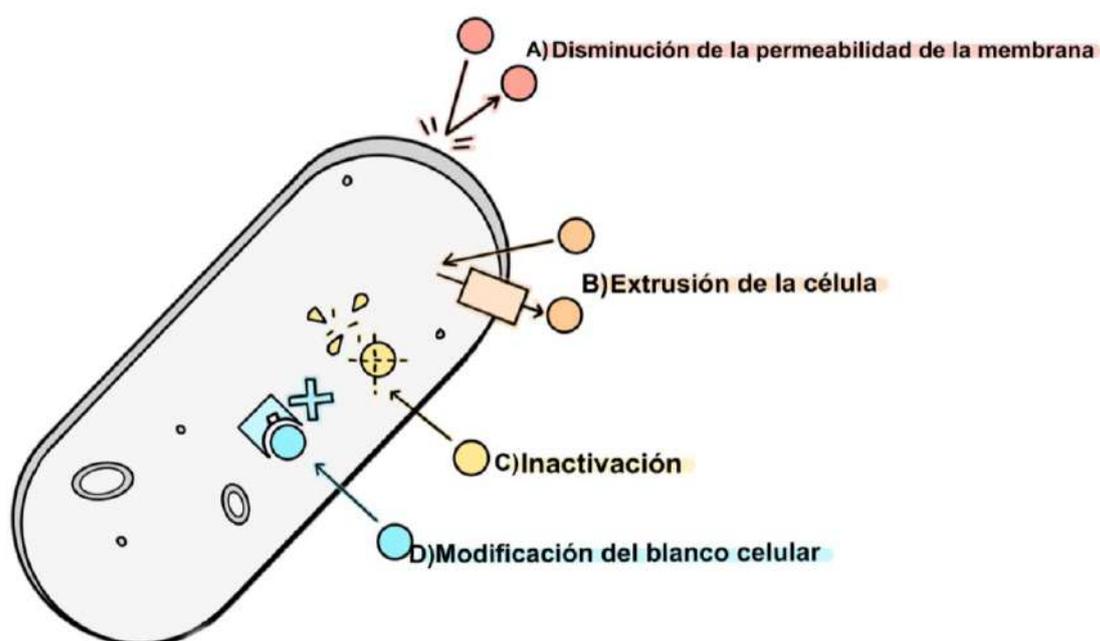


Figura 2. Mecanismos de acción de resistencia a antibióticos.

A) La disminución de la permeabilidad de la membrana impide que el antibiótico ingrese a la célula, evadiendo la acción del antibiótico sobre la estructura o función celular. B) En el mecanismo de extrusión es evacuado de la célula el compuesto antibiótico evitando que pueda continuar su proceso antibiótico. C) En el proceso de inactivación, se destruye o modifica el compuesto antibiótico ya que ingresó a la célula, evitando que llegue al blanco celular. D) En el mecanismo de modificación del blanco celular, la estructura receptora del antibiótico se modifica, impidiendo que al entrar en contacto con el antibiótico comience el mecanismo de acción de este (Modificado de Vittecoq et al., 2016).

El mecanismo de disminución de permeabilidad de la membrana implica que el antibiótico no pueda ingresar a la célula bacteriana, esto puede ocurrir al no contar con el transportador correspondiente, como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* que no presenta transportador de imipenem OprD2 ya que el antibiótico no puede ingresar a la célula, el fármaco no puede continuar con el efecto antibiótico que posee. (Martínez, 2014). En bacterias Gram negativas, la membrana externa funciona como barrera, y evita que ingresen a la célula sustancias como antibióticos. Hay varios antibióticos como las tetraciclinas y algunas fluoroquinolonas que se ven afectadas por los cambios en la permeabilidad de la membrana externa, ya que estos son dependientes de canales de difusión llenos de agua, conocidos como porinas (Hancock & Brinkman, 2002). Existen algunos antibióticos que no presentan el mismo efecto en células que tienen una menor cantidad de porinas en su membrana, por lo que entran en menor concentración a la célula. Un ejemplo de la eficacia de esta barrera es la vancomicina que no afecta a bacterias Gram negativas ya que no puede ingresar por la membrana externa (Munita & Arias, 2016).

Al alterar las porinas también se puede provocar que el antibiótico no tenga el mismo efecto en la célula, esto puede ocurrir por un cambio en las porinas normalmente expresadas, un cambio en la cantidad de porinas presentes en la membrana y el deterioro de la función de las porinas en la célula. Este es un mecanismo de resistencia de bajo nivel y normalmente está asociado con otro mecanismo para aumentar la resistencia a cierto grupo de antibióticos dependientes de la presencia de porinas (Hancock & Brinkman, 2002).

Una vez que el antibiótico entra a la célula, puede ocurrir un mecanismo de resistencia conocido como extrusión, que consiste en sacar al antibiótico de la célula mediante bombas que los secretan al exterior (Vittecoq et al., 2016). Existen transportadores que bombean antibióticos directamente fuera de la célula o hay otros que secretan a los antibióticos en el periplasma, espacio entre la membrana interna y externa de la célula presente en células Gram negativas. (Allen et al., 2010). Este mecanismo de resistencia afecta a una amplia gama de clases de antibióticos, incluidos inhibidores de la síntesis de proteínas, fluoroquinolonas, β -lactámicos y polimixinas (Vittecoq et al., 2016).

Los mecanismos antes mencionados no modifican en sí al antibiótico; sin embargo, existen varios mecanismos de acción que actúan directamente sobre la estructura o activación de antibiótico, inactivando y evitando su función (Vittecoq et al., 2016). Pueden ocurrir estos procesos de inactivación con enzimas específicas o modificando enzimas existentes que son necesarias para que ocurra el proceso de activación del antibiótico. (Martínez, 2014). Se han descrito múltiples enzimas que modifican a los antibióticos, entre las reacciones que realizan está la fosforilación (que afecta aminoglucósidos) acetilación (que afecta aminoglucósidos y cloranfenicol) y adenilación (que también afecta aminoglucósidos y lincosamidas) (Munita & Arias, 2016). Un ejemplo de modificación covalente de un antibiótico es la realizada por la acetiltransferasa que actúa en antibióticos aminoglucósidos o también las enzimas que degradan directamente al antibiótico como las betalactamasas que actúan sobre los antibióticos betalactámico (Allen et al., 2010).

Por último, en el mecanismo de modificación del sitio de unión, describe como el cambio en la estructura del sitio de unión correspondiente al antibiótico para evitar que el antibiótico pueda anclarse al mismo y así evitar su efecto. Este tipo de modificación puede adquirirse de diferentes formas, entre ellas se puede incluir la mutación, que implica que, a partir de mutaciones, se modifica a la proteína diana, desactivando el sitio de unión del antibiótico, pero se mantiene la función celular de la proteína de la célula (Allen et al., 2010). Un ejemplo de este mecanismo ocurre en las quinolonas cuyo mecanismo de resistencia asociado es la mutación de la información genética correspondiente para la formación de topoisomerasas bacterianas (Martínez, 2014). Otras modificaciones del sitio de unión pueden ser a partir del reemplazo molecular (como ejemplo podemos mencionar la adquisición de proteínas de penicilina quimérica) modificación enzimática (la resistencia a la vancomicina se debe a una reorganización de la pared celular) o la protección del sitio de unión. Algunos de los fármacos que son afectados por el mecanismo de resistencia de protección de sitios de unión son las tetraciclinas y como ejemplo la proteína QnrA que protege a las topoisomerasas al bloquear la acción de las quinolonas (Martínez, 2014).

Dependiendo del tipo de bacterias de las que se trate, el sitio en el que se encuentran y su exposición a compuestos antibióticos, pueden desarrollar alguno de los tipos de resistencia con mayor o menor medida, para poder comprender cómo es que se genera el fenómeno de resistencia cruzada o multirresistencia, se debe de describir la resistencia adquirida la cual se explica a continuación.

La adquisición de genes asociados a resistencia a antibióticos se puede explicar a partir de dos orígenes, el primero corresponde a mutaciones y el segundo a la transferencia horizontal de genes a partir de elementos genéticos móviles. (Boto & Martínez, 2011) La adquisición de genes de resistencia por mutación ocurre cuando un conjunto de células bacterianas susceptibles a cierto antibiótico, desarrollan mutaciones que afectan la actividad del fármaco, lo que tiene como resultado la supervivencia de aquellas bacterias que presentaron esta nueva mutación y la eliminación de la población que continúa siendo susceptible. Por lo tanto las bacterias resistentes predominan y esta información es adquirida a partir de la mutación continua en las siguientes generaciones (Munita & Arias, 2016).

Se describieron anteriormente las formas mediante las que las bacterias pueden adquirir resistencia a partir de mutaciones en su propio linaje. Sin embargo, también pueden adquirir esta información genética a partir de material genético con un origen distinto al del linaje propio. Esto ocurre en un proceso conocido como transferencia horizontal de genes, que puede ocurrir a partir de información genética ya presente en el ambiente o a partir de la diseminación de antibióticos por actividades humanas. En el proceso de adquisición de genes de resistencia a antibióticos a partir de información ya presente en el ambiente, se considera que muchas bacterias comparten el mismo ambiente con moléculas o microorganismos que tienen propiedades intrínsecas de resistencia, es posible que esta información genética que brinda resistencia intrínseca pueda compartirse con los integrantes de este ambiente a partir de procesos de transferencia horizontal (Keen & Montforts 2012). A este conjunto de genes y microorganismos que poseen estos mecanismos de resistencia que se encuentran en el ambiente se les conoce como resistoma y existe evidencia sólida que sugiere que tal “resistoma ambiental” es una fuente de adquisición de genes de resistencia a los antibióticos en bacterias relevantes para en el ámbito de

salud humana. Otro de los orígenes a partir de los que se pueden adquirir genes de resistencia a partir de transferencia horizontal es por la diseminación de antibióticos de uso frecuente, que se explicará más adelante como las actividades humanas han aumentado la diseminación de estos antibióticos por su uso desmedido en la industria, clínica y producción ganadera. (Munita & Arias, 2016).

La transferencia horizontal de genes puede ocurrir a partir de tres estrategias principales, la transformación que consiste en la incorporación de ADN presente en el medio extracelular, la transducción que es mediada por material genético incorporado a la célula por fagos y la conjugación, transmisión de información en elementos genético móviles como plásmidos entre bacterias. Estos mecanismos se describirán con mayor detalle más adelante (Munita & Arias, 2016) (Figura 3). Es importante comprender estos mecanismos de adquisición de resistencia ya que se ha descrito a la transferencia horizontal de genes como la más importante y de mayor preocupación para las bacterias que afectan la salud humana (Carattoli, 2013).

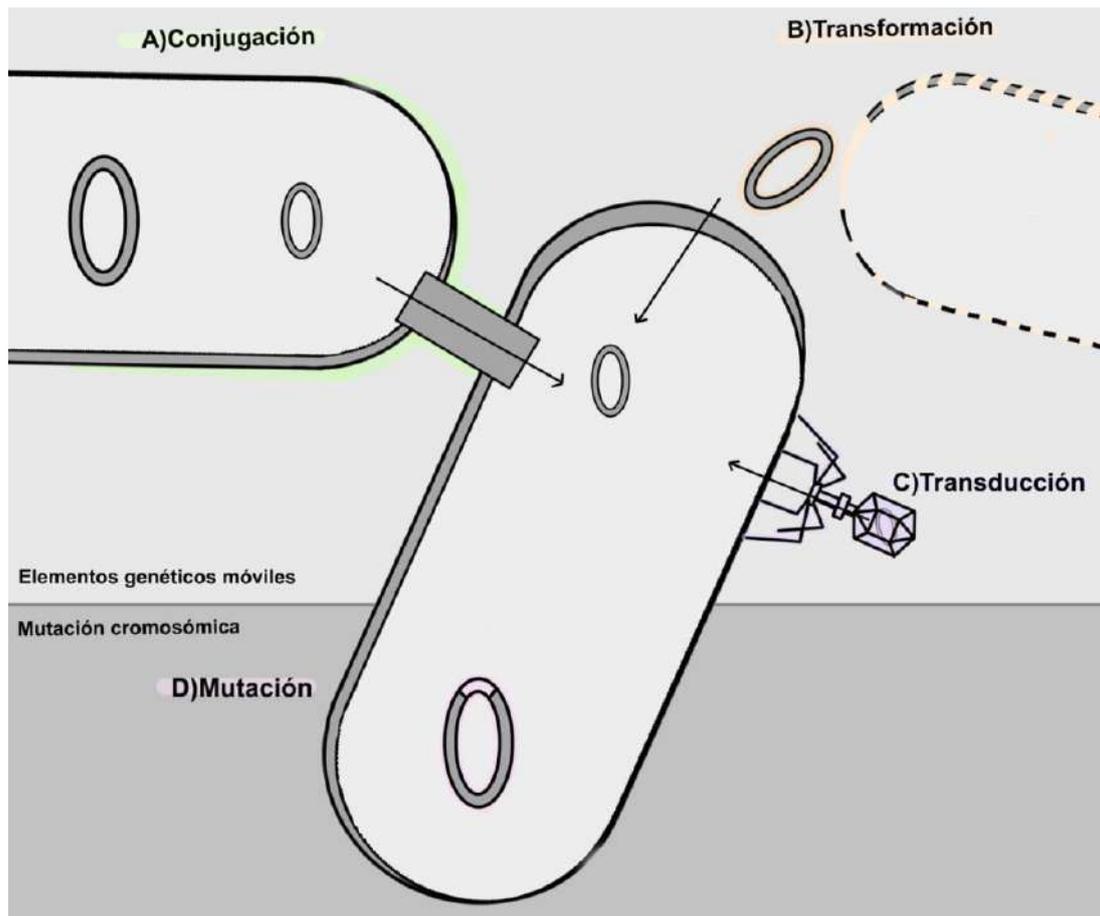


Figura 3. Mecanismos de adquisición de genes de resistencia a antibióticos.

Los elementos genéticos móviles adquiridos a partir de transferencia horizontal de genes (A) A partir de conjugación se transmite información presente en plásmidos entre células (B) La transformación que consiste en la adquisición de ADN presente en el medio extracelular (C) La transducción mediada por virus fagos que insertan material genético al interior de la célula. (D) Adquisición de genes de resistencia a partir de mutación cromosómica, aquellas bacterias que poseen estos genes originados a partir de mutación serán seleccionados en presencia de antibióticos y esta información genética que le confiere resistencia podrá heredarse a las siguientes generaciones del mismo linaje (Vittecoq et al., 2016).

En los mecanismos de transmisión horizontal de genes se han mencionado a los plásmidos. Estos son moléculas de ADN extracromosómico que tienen replicación autónoma al cromosoma celular, y entre la información que poseen contienen genes que pueden conferir resistencia a varios antibióticos como los beta-lactámicos,

aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprim, macrólidos y quinolonas (Carattoli, 2009).

Para que ocurra el proceso de conjugación se requiere que dos células tengan contacto físico y se forme un puente a partir de los pili que permite la transferencia de la información contenida en un plásmido de la célula donante hacia la célula receptora (Lerminiaux, & Cameron, 2019). Este proceso puede ocurrir entre diferentes especies bacterianas y puede ser estimulada por presencia de antibióticos, se ha descubierto que la exposición a concentración mínima inhibitoria de estreptomina, gentamicina y cloranfenicol estimula el proceso de conjugación en especies de bacterias Gram negativas (Zhang et al., 2013).

En el proceso de transducción las partículas virales transfieren genes bacterianos, esto sucede cuando secciones del ADN bacteriano son erróneamente encapsulados e incapacidades virales y posteriormente estos fagos infectan a células bacterianas y transfieren este material genético. (Lerminiaux, & Cameron, 2019). Esto suele ocurrir especialmente dentro de la misma especie bacteriana. (Lerminiaux, & Cameron, 2019). Un ejemplo es la adquisición de genes de resistencia a antibióticos como tetraciclina y penicilina que han sido observados transfiriéndose entre cepas de *Staphylococcus aureus* en entornos hospitalarios (Lerminiaux, & Cameron, 2019).

En el proceso de transformación las bacterias captan ADN que se encuentra fuera de la célula y lo integra al material genético. Algunos ejemplos de bacterias con resistencia a antibióticos por mecanismos de transformación son pertenecientes a los grupos de *Acinetobacter*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. La presencia de antibióticos también puede influir en las tasas de transformación, un ejemplo de esto son las quinolonas, que se ha comprobado estimulan la expresión de genes de competencia y aumentan la tasa de transformación en estudios realizados en laboratorio (Lerminiaux, & Cameron, 2019).

El uso de antibióticos para prevenir enfermedades se remonta hasta 2000 años en el pasado. Se sabe del uso de microbios productores de antibióticos como remedios para tratar heridas abiertas en culturas en Serbia, China, Grecia y Egipto. El primer

registro de esto es un papiro encontrado en 1550 a.C donde se menciona el uso de pan con moho y tierra para tratar heridas y evitar infecciones (Hutchings et al., 2019). Sin embargo, el uso de antibióticos como un medicamento fue realizado por primera vez por Paul Ehrlich, que desarrolló fármacos sintéticos a base de arsénico hace aproximadamente 100 años para tratar la sífilis causada por *Treponema pallidum* (Hutchings et al., 2019), Se inventó posteriormente el prontosil un fármaco de sulfonamida, desarrollado por Gerhard Domagk, que, junto con sus colegas, continuó el trabajo de Paul Ehrlich en el desarrollo de las sulfonamidas como los primeros antibióticos de uso farmacéutico eficaces y de amplio espectro en el uso clínico (Hutchings et al., 2019).

Desde su descubrimiento en 1910 por Paul Ehrlich, se han desarrollado más de 38 clases de antibióticos extraídos de actinomicetos, bacterias, hongos y formados de manera sintética (Hutchings et al., 2019). Sin embargo, es importante mencionar que la resistencia a antibióticos ha estado presente desde antes de su introducción y uso en la farmacéutica, ya que se trata de un fenómeno evolutivo de competencia entre cepas bacterianas, y entre cepas bacterianas y hongos (Larsson, 2014) y esto ha sido una presión selectiva para las bacterias a lo largo del tiempo (Larsson, 2014). Sin duda, la resistencia a antibióticos ha incrementado desde la incorporación de los antibióticos como medicamentos (Hutchings et al., 2019). De hecho, se estima que actualmente hay bacterias de relevancia en salud pública que son resistentes a todos los antibióticos comerciales disponibles (Bharadwaj et al., 2022).

En ese sentido es que el uso de antibióticos sin control ha acelerado el desarrollo y dispersión de la resistencia. Además, no solamente se utilizan en la medicina humana; el uso de antibióticos se ha extendido para la medicina veterinaria, pero también para la producción e industria de alimentos, en zonas rurales y urbanas (Allen et al., 2010). Esto ha hecho que exista la posibilidad de derrame de antibióticos, sus metabolitos y de bacterias resistentes a ellos hacia diversos ecosistemas de manera constante, en ocasiones sin ser necesaria la exposición directa (Rizzo et al., 2013). Aunque se ha estudiado esta resistencia en bacterias patógenas para humanos o de importancia médica o económica, poco se sabe sobre la presencia y los efectos que

puede tener este fenómeno en fauna silvestre y como a su vez está relacionado con consecuencias a la salud de los ecosistemas (Larsson, 2014).

Emergencia y transmisión de resistencia a antibióticos en los ecosistemas

En los últimos años se han realizado numerosos estudios donde se muestra evidencia de la presencia de antibióticos asociados a resistencia en la vida silvestre y los ambientes naturales (Allen et al. 2010). El desarrollo de la resistencia a antibióticos se da a partir de dos eventos conectados, la emergencia y la transmisión (Martínez, Baquero, 2014). El proceso de emergencia es dependiente de la presión selectiva originada por los antibióticos, por lo que se han tomado restricciones conforme a su uso, mientras que la transmisión no es dependiente de procesos de selección, si no de la distribución de los antibióticos en las actividades humanas y como se transportan a los ecosistemas (Laborda et al., 2022). Para poder entender el fenómeno de la resistencia a antibióticos en los ecosistemas y fauna silvestre es necesario comprender los procesos de emergencia y las rutas de transmisión, las cuales se explicarán más adelante.

La emergencia de bacterias con resistencia a antibióticos ocurre principalmente en hábitats en donde hay presencia humana, hábitats naturales altamente contaminados o directamente en las ciudades y territorio urbanizado (Laborda et al., 2022). Ya que es donde ocurre el proceso de selección, donde los antibióticos eliminan a las bacterias que son susceptibles y las bacterias con resistencia adquirida horizontalmente o resistencia adquirida por mutaciones propias, sobreviven y pasan esta información a las siguientes generaciones (Allen et al. 2010).

Cuando encontramos bacterias con resistencia a antibióticos en ecosistemas conservados o fauna silvestre, podemos considerar esto como un indicador de contaminación por antibióticos, genes causantes de resistencia o bacterias resistentes (Martínez, 2009). Cabe señalar que existe correlación entre la contaminación fecal humana y la abundancia de genes asociados a resistencia a antibióticos en ambientes perturbados por el ser humano (Karkman et al., 2019).

Un estudio realizado por Ahasan et al. (2017) en el que estudiaron la presencia de resistencia a antibióticos en tortugas marinas australianas, encontraron resistencia por parte de las bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, incluyendo bacterias que pueden ser comensales o patógenas para los seres humanos, como *Klebsiella*, *Citrobacter* o *Escherichia*. En el estudio también se menciona que las poblaciones de tortugas que se encuentran más cerca de asentamientos humanos y áreas urbanas presentan más bacterias con resistencia a antibióticos a comparación de poblaciones que se encuentran más alejadas de estos sitios (Ahasan et al., 2017).

En otro estudio realizado por Di Lallo et al. 2021 se realizó una investigación similar con la especie de *Iguana delicatissima* de las Antillas Menores, donde también se encontraron bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae con resistencia a antibióticos, siendo los muestreos más cercanos a los sitios más antropizados donde encontraron con mayor frecuencia cepas multirresistentes. Esto se consideró evidencia de que la adquisición de bacterias con resistencia a antibióticos por parte de fauna silvestre es consecuencia de la contaminación generada en sitios donde se encuentra población humana (Di Lallo et al., 2021).

En el caso de las aves podemos comparar estudios realizados sobre resistencia a antibióticos entre distintos tipos de aves acuáticas, en donde los patos que suelen alimentarse en sitios más perturbados y con llegada de agua contaminada de tipo residual, tienen mayor carga de bacterias con resistencia (Pärnänen et al., 2019). A comparación con otras aves como pingüinos, vuelve piedras y avocetas que suelen alimentarse en aguas menos contaminadas (Marcelino et al., 2019).

En el caso de estudios realizados con mamíferos, un ejemplo de comparación de fauna silvestre en cautiverio y de vida libre es el estudio realizado por Campbell et al. (2020). En dicho estudio se comparó la presencia de bacterias resistentes en chimpancés y gorilas de cautiverio y de vida libre, siendo los simios de cautiverio los que portan más bacterias resistentes y asociadas al humano que las poblaciones silvestres, se menciona que en este caso los simios de cautiverio y humanos pueden

intercambiar de manera bidireccional las bacterias resistentes a partir de contacto directo, suministros de agua o alimentos (Campbell et al., 2020).

En el trabajo realizado por Sun et al. (2020) se investigaron los cambios del microbioma y el resistoma en estudiantes que pasaban una temporada en una granja. Se encontró que el microbioma y el resistoma de los estudiantes varía, adquiriendo bacterias con genes de resistencia presentes en los animales de granja, dando evidencia sobre el intercambio bidireccional de bacterias resistentes entre animales domésticos y seres humanos (Sun et al., 2020).

Otro ejemplo de estudios de resistencia a antibióticos en fauna silvestre es el realizado por Atterby et al. (2017). En esta investigación se compara la presencia de *E. coli* resistente en gaviotas presentes en diferentes hábitats, como asentamientos humanos, zonas de producción ganadera y agua superficial. Dando como resultado el hallazgo de plásmidos similares entre humanos y gaviotas que presentan betalactamasas de amplio espectro como estrategia de resistencia. Se discute en el artículo como la contaminación antropogénica fue la causa de transmisión entre humanos y las gaviotas silvestres (Atterby et al., 2017).

En un trabajo realizado con peces (Jobbins & Alexander, 2015) se evaluó si existían cepas de *E. coli* con resistencia a antibióticos en el microbioma intestinal de animales silvestres africanos de Botswana. Para esto, evaluaron 150 muestras de heces y su respuesta ante 10 antibióticos de uso común. Encontraron que un 41.3% de las cepas aisladas presentaron resistencia ante uno o dos tipos de antibióticos y el 13.3% multi-resistencia, que consiste en presentar resistencia a más de 3 antibióticos diferentes a la vez. Los autores discuten sobre cómo los factores de historia de vida de los organismos evaluados y si tienen relación con la cercanía a asentamientos humanos, tipo de alimentación, hábitat y si hay distribución en zonas urbanas puede aumentar la susceptibilidad a la resistencia a antibióticos, los organismos carnívoros presentaron mayor resistencia, seguidos de los omnívoros y por último los herbívoros, mostrando que la acumulación trófica de estos fármacos afecta en mayor medida a organismos que se encuentran en un nivel trófico más alto, y como este tipo de organismos pueden funcionar como centinelas en la evaluación de la presencia de

resistencia a antibióticos en los ecosistemas. También se menciona que los organismos acuáticos fueron afectados de manera significativa y se discute cómo es que el transporte de estos residuos en ecosistemas acuáticos puede hacer aún más susceptibles a organismos que se encuentran en estos ecosistemas o están asociados a zonas cercanas (Jobbins & Alexander, 2015).

En otro trabajo realizado por Blackburn, Mark y colaboradores (2010), se describe como en peces de niveles tróficos elevados, se tomaron 134 muestras de cloaca y se realizaron antibiogramas con 13 antibióticos diferentes, los resultados indican que hay una mayor resistencia en especies de tiburones, se encontró resistencia a por lo menos un fármaco en cada uno de los seis sitios de estudio y en todas las muestras de especie de peces analizadas. (Blackburn et al., 2010) La resistencia a múltiples fármacos también se documentó en la mayoría de los sitios de estudio, se discute cómo este fenómeno ocurre en peces de diferentes taxa y con distintas distribuciones, con la capacidad de volverse un fenómeno ubicuo (Blackburn et al., 2010).

Algunos insectos como las cucarachas y las moscas, que están más presentes en territorios habitados por seres humanos, pueden actuar como vectores para la transmisión de bacterias con resistencia a antibióticos, siendo importante la consideración de la posibilidad de transmitir esta resistencia entre patógenos humanos (Onwugamba et al., 2018).

Mencionando algunos ejemplos de fauna que puede funcionar como vector de esta resistencia entre ambientes conservados y perturbados están las aves, que pueden transmitir estas bacterias durante sus movimientos migratorios estacionales (Pärnänen et al., 2019). Lo mismo ocurre con algunos animales acuáticos, como las tortugas marinas, que se proponen como posibles centinelas en la diseminación de la resistencia en ecosistemas acuáticos, dada la posibilidad de transmisión por largas distancias incluso entre países o continentes (Alduina et al., 2020).

El papel que tiene la fauna silvestre en la problemática de desarrollo de resistencia a antibióticos, radica principalmente en la transmisión, en especial al funcionar como reservorios y ser parte de la dinámica de transmisión de resistencia entre especies

vinculadas a ecosistemas perturbados y el ser humano, siendo la fauna silvestre hospedadores de bacterias con resistencia a antibióticos y eslabones en la transmisión y transporte a diferentes áreas geográficas y al humano, contribuyendo a la propagación de resistencia antimicrobiana (Sun et al., 2020).

La transmisión/dispersión de la resistencia a antibióticos en los ecosistemas aún no es clara; todavía no se conoce a profundidad cómo se pueden transmitir estos genes de resistencia entre especies, poblaciones y comunidades de organismos (Laborda et al., 2022). Conocer la dinámica de dispersión de la resistencia a antibióticos evaluando el nicho y papel ecológico que tienen organismos silvestres como centinelas en la salud de un ecosistema, nos puede brindar información útil sobre las consecuencias a pequeña o gran escala de esta problemática, su impacto en la conservación y como están relacionados los sistemas antropogénicos y naturales en la transmisión de genes de resistencia a antibióticos (Ramey & Ahlstrom, 2020).

Las enterobacterias de la microbiota rectal

Las enterobacterias son un grupo de bacterias, en su mayoría Gram negativas, que podemos encontrar en el tracto intestinal. El grupo abarca bacterias patógenas o comensales del organismo y forman parte del microbioma intestinal (Baylis et al., 2011). Se trata de una familia bacteriana, Enterobacteriaceae, que incluye a bacterias del género *Biostraticola*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Franconibacter*, *Gibbsiella*, *Izhakiella*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Kosakonia*, *Leclercia*, *Lelliottia*, *Limnobaculum*, *Mangrovibacter*, *Metakosakonia*, *Phytobacter*, *Pluralibacter*, *Proteus*, *Pseudoescherichia*, *Pseudocitrobacter*, *Raoultella*, *Rosenbergiella*, *Saccharobacter*, *Salmonella*, *Scandinavium*, *Shigella*, *Shimwellia*, *Siccibacter*, *Trabulsiella*, *Yokenella*, además de algunos otros géneros candidatos¹.

Las enterobacterias se identifican en el laboratorio mediante pruebas bioquímicas, que incluyen tinción de Gram, catalasa y oxidasa (Mehrad et al., 2015). Para una

¹ Recuperado de <https://www.bacterio.net/family#Enterobacteriaceae>

identificación certera a nivel de especie es necesario realizar análisis genético moleculares y secuenciación, existen diferentes sistemas de identificación, como los medios entubados convencionales, API-20E y los sistemas de tubos R/B, pueden identificar especies de enterobacterias con un 91,1% de acuerdo en la designación de especies (Rutherford et al., 1977).

En términos de su resistencia a antibióticos, este grupo de bacterias posee una gran diversidad de mecanismos, lo que se debe a que muchas de estas bacterias tienen la capacidad de adquirir genes de resistencia a partir de otros microorganismos de su misma especie o de otras (Navarro et al., 2010).

A la fecha, se ha descrito resistencia a diversos antibióticos en la familia Enterobacteriaceae (Cuadro 2). Más recientemente, se han detectado cepas de enterobacterias resistentes a los antibióticos carbapenémicos (Iredell et al. 2016). Esto es preocupante, ya que se considera este antibiótico una de las últimas opciones de tratamiento médico contra infecciones bacterianas multiresistentes (Fritzenwanker, et al., 2018). Incluso se han detectado genes de resistencia al carbapenem (genes de carbapenemasas blaOXA-48, blaKPC, blaNDM-1, blaVIM y blaIMP) en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Ghaith et al., 2019).

En estudios realizados para evaluar la presencia de bacterias con resistencia a antibióticos se ha visto la presencia de bacterias resistentes pertenecientes a los siguientes géneros o especies bacterianas, siendo *E. coli* (115 estudios), *Salmonella spp.* (54 estudios) y *Enterococcus spp.* (43 estudios) las que más frecuentemente demuestran resistencia (Vittecoq et al., 2016).

Una de las especies de enterobacterias con mayor relevancia en estudios relacionados con resistencia a antibióticos es *E. coli*, ya que forma parte de la microbiota intestinal normal del ser humano y de otros animales, sin embargo, puede causar infecciones de varios tipos, incluyendo infecciones del tracto urinario y del torrente sanguíneo (Kaper et al., 2004). Se han encontrado cepas de *E. coli* con resistencia a antibióticos en vida silvestre, mencionando específicamente en aves y mamíferos (Costa et al. 2006; LiteraK et al. 2010; Silva et al. 2011).

Cuadro 2. Enterobacterias con resistencia a antibióticos y mecanismos de resistencia.

(Información recopilada de Iredell et al. 2016 y Ghaith et al., 2019)

Antibiótico	Enterobacterias que se ha reportado con resistencia	Mecanismos de resistencia descritos
Cefalosporinas	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter spp.</i>	Enzimas β -lactamasas de espectro extendido, alteraciones en porinas, bombas de reflujo
Carbapenems	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter spp.</i> <i>Citrobacter spp.</i> <i>Proteus spp.</i>	Enzimas carbapenemasas, alteraciones de porinas, bombas de reflujo
Fluoroquinolonas	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter spp.</i> <i>Proteus spp.</i>	Mutaciones en genes responsables de la síntesis de girasa y la topoisomerasa IV, bombas de reflujo
Aminoglucósidos	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter spp.</i> <i>Proteus spp.</i>	Modificaciones en ribosomas, bombas de reflujo
Penicilinas	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter spp.</i>	Enzimas β -lactamasas, porinas alteradas
Sulfonamidas	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter spp.</i>	Alteraciones en las vías metabólicas del folato
Tetraciclinas	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter spp.</i> <i>Proteus spp.</i>	Bombas de eflujo, producción de proteínas de unión a tetraciclinas

Otro ejemplo de bacterias con las que se han hecho estudios de resistencia a antibióticos son las pertenecientes al género *Salmonella* (Vittecoq et al., 2016). Esta

bacteria se puede encontrar en los intestinos de animales como cerdos y aves; en humanos, pueden causar gastroenteritis o fiebre entérica y se han reportado serotipos multirresistentes, como lo es el caso de *S. typhimurium*, una especie que porta un elemento genómico que le brinda resistencia a cinco antibióticos diferentes y es capaz de transmitirse de manera horizontal (Lawson et al., 2002). Este serotipo de salmonella se ha detectado en mamíferos (Caleja et al.2011) y aves (Cizek et al. 2007) de vida silvestre.

Las bacterias que pertenecen al género *Enterococcus* están presentes en varios ecosistemas y son bacterias comensales de mamíferos, aves, reptiles e invertebrados (Holzbauer & Chiller, 2006). Se han registrado especies de este género que pueden causar infecciones nosocomiales y presentan resistencia de manera intrínseca y portan genes de resistencia a antibióticos con posibilidad de transmitirse de manera horizontal (Vittecoq et al., 2016). Su estudio es de gran relevancia ya que se ha descrito como un indicador de resistencia a antibióticos en bacterias Gram positivas (Vittecoq et al., 2016).

Debido a su ubicuidad en el tracto intestinal, y a la facilidad y baja invasividad de los métodos de colecta de heces, el uso de enterobacterias para identificar cepas con resistencia a antibióticos ofrece la posibilidad de estudiar la resistencia a antibióticos en poblaciones silvestres, y esto, a su vez, nos puede dar información sobre el origen de exposición a estos antibióticos y las consecuencias a corto y largo plazo tanto en el organismo como en el ecosistema (Allen et al., 2010). No es que la presencia de bacterias con resistencia a antibióticos vaya a ocasionar un problema en el ecosistema o en las especies animales que albergan a estas bacterias, sino que refleja el grado de antropización de un ecosistema (Laborda et al., 2022) y, por otro lado, genera reservorios de bacterias resistentes a antibióticos que pueden regresar hacia el humano, incrementando un problema de salud que ya es considerado una amenaza mundial (Allen et al., 2010).

La resistencia a antibióticos en el contexto de la historia de vida

Las especies varían en historias de vida. La teoría de la historia de vida propone que existen decisiones estratégicas a lo largo de la vida de un organismo, influenciadas por su estado fisiológico y circunstancias externas (Partridge et al., 1988). Esto da como consecuencia diferencias en las probabilidades de supervivencia, las tasas de reproducción, y la asignación del esfuerzo reproductivo, así como su evolución en respuesta a factores ambientales, lo que significa que estos varían en cuanto a aspectos ligados a su metabolismo, reproducción, estrategias de supervivencia y ciclo de vida (McNamara et al. 1996). Ninguna historia de vida es más exitosa que otra; todas las especies existentes han sido exitosas hasta el momento; sin embargo, algunas historias de vida exponen a los individuos de algunas especies a ser más dados a exponerse o encontrarse con factores exógenos. Es decir, en el contexto de la resistencia a antibióticos, algunas especies serán más dadas a exponerse a bacterias con resistencia a antibióticos, a antibióticos o a sus metabolitos (Allen et al., 2010).

El nivel trófico en el que se alimentan los individuos también puede influir en su exposición a antibióticos, sus metabolitos y bacterias resistentes a antibióticos. Esto es porque productos farmacéuticos, como los antibióticos, que se utilizan en grandes cantidades para el tratamiento de enfermedades humanas y animales, suelen llegar a ambientes naturales, donde pueden pasar por procesos de bioacumulación y biomagnificación (Zenker et al., 2014). La bioacumulación es el proceso mediante el cual sustancias exógenas, como pesticidas o productos farmacéuticos, se acumulan en los tejidos de los organismos con el tiempo (Zenker et al., 2014). Ocurre cuando los organismos están expuestos a estas sustancias en su entorno, ya sea por contacto directo o por ingestión de alimentos o agua que esté contaminada (Zenker et al., 2014). Por su parte, la biomagnificación se explica como el aumento de la concentración de una sustancia (xenobiótico), respecto a los niveles de la cadena alimentaria en la que está presente. Ocurre cuando los organismos en niveles tróficos más bajos consumen organismos en los que ya se encuentra el xenobiótico, este se acumula y pasa a los organismos en niveles tróficos más altos, de forma que entre

más arriba en la cadena trófica, más alta la concentración del xenobiótico (Zenker et al., 2014).

Existen antibióticos que no son fácilmente biodegradables y tienen potencial de bioacumulación, causando que los niveles más altos de antibióticos estén en organismos con niveles tróficos más altos (Squadrone, 2020). Un ejemplo de esto puede ser comparar la presencia de bacterias con resistencia a antibióticos en los peces y con la concentración de bacterias con resistencia a antibióticos del agua circundante. Por lo tanto, evaluar la presencia de bacterias con resistencia a antibióticos en organismos con niveles altos en la cadena trófica, como es el caso del elefante marino del norte, puede brindar información sobre la presencia de resistencia a antibióticos en niveles inferiores por procesos de bioacumulación y biomagnificación (Squadrone, 2020).

Incluso, diferencias en la historia de vida entre sexos de una misma especie podrían influir en el riesgo de incorporar bacterias con resistencia a antibióticos en su microbiota. Por ejemplo, en especies sexualmente dimórficas, muchas veces los machos se alimentan en lugares diferentes a los de las hembras, o a un nivel trófico diferente (Isaac, 2005). Esto implica que su exposición a los antibióticos, sus metabolitos y a bacterias resistentes a antibióticos sería diferencial.

Es importante mencionar que los caracteres de historia de vida que pueden influir en la exposición a antibióticos y en la susceptibilidad de que las enterobacterias de su microbiota desarrollen resistencia a antibióticos pueden ser sinérgicos y actuar de forma exponencial cuando se combinan. Es decir, aquellos organismos que están en niveles tróficos altos, en hábitats acuáticos costeros, con una distribución cercana a asentamientos humanos, tienen una mayor susceptibilidad a presentar resistencia a antibióticos (Jobbins & Alexander, 2015). Un ejemplo de una especie que cumple estas características es el elefante marino del Norte, seleccionado como organismo modelo para esta tesis.

Materiales y métodos

Modelo de estudio

El elefante marino del Norte (*Mirounga angustirostris*) es un pinnípedo de la familia Phocidae, que evolucionó a partir de un ancestro carnívoro terrestre hace aproximadamente 25 millones de años (Berta et al., 2018). Se estima que la población total se compone de entre 210,000 y 239,000 individuos (Lowry et al. 2014), que se distribuyen en las costas e islas en el Pacífico Norte, desde Alaska hasta México, Baja California, con la mayoría localizados en las costas de California (Hückstädt, 2015).

El elefante marino del Norte realiza inmersiones para alimentarse de calamares, peces de profundidad, tiburones y rayas, por lo que pasa más tiempo sumergido que en la superficie (Le Boeuf, 1994). Las hembras pueden permanecer sumergidas un promedio de 28 minutos a una profundidad de 480 metros, mientras que los machos pueden hacerlo durante 20 minutos a una profundidad de 400 metros. Alcanzan profundidades máximas de más de 1,000 metros y realizan cerca de 120 inmersiones diarias, su capa de grasa es gruesa, lo que, además de otras adaptaciones fisiológicas, les permite resistir temperaturas bajas del agua (Le Boeuf, 1994).

Los machos adultos establecen su posición como macho dominante en una zona de la costa, mediante enfrentamientos con otros machos. A este territorio reproductivo se le conoce como harén, y dentro del mismo se encuentran las hembras que ya han procreado y han criado con éxito a sus crías, a estas hembras se les denominan “hembras alfa”, mientras que las hembras primerizas o menos experimentadas se les denomina “hembras beta” y se encuentran en los márgenes del territorio del harén, por lo que pueden llegar a ser perturbadas por los machos subadultos que se mueven entre estos territorios buscando reproducirse (Le Boeuf, 1972).

La especie se caracteriza por tener un dimorfismo sexual marcado en su etapa adulta: las hembras adultas pesan alrededor de 600 kg y pueden medir entre 2 y 3 metros de longitud, mientras que los machos pueden pesar hasta 2,300 kg y medir alrededor de

4 m de largo, además de presentar una probóscide (Le Boeuf, 1994). Es marcada la diferencia conductual reproductiva. Después de la gestación de las hembras, comienza la época reproductiva, durante el invierno llegan a las costas después de sus viajes de alimentación y listas para dar a luz, pasan 28 días amamantando a sus crías, posterior a esto destetan a las crías y entran en celo, tras la cópula comienzan el viaje de alimentación post-reproductivo (Le Boeuf, 1972).

Las crías nacen pesando alrededor de 30 kilos, su pelaje es de color oscuro y va cambiando a un tono grisáceo con el destete que ocurre entre los 20 y 20 días de edad, tras el destete llegan a pesar 130 kg (Le Boeuf, 1994). Las crías reciben leche con alto contenido en grasas (de hasta 54%) y toman leche aproximadamente cuatro veces al día (Costa et al. 1986). Durante el periodo de lactancia, las crías aumentan su masa en un 10,4% de la masa corporal inicial por día, mientras que las hembras pierden alrededor de 4,19% de su masa corporal inicial por día, siendo la lactancia muy costosa energéticamente para las madres (Costa et al. 1986).

Durante la época reproductiva los machos alfa ayunan durante 80 días, lo que ocasiona la pérdida de entre 7 y 10 kg de masa corporal diaria. Utilizan la grasa que poseen como reserva para obtener energía, ya que, durante esta temporada, a pesar del ayuno, deben defender su territorio, atacar competidores y copular con las hembras (Deutsch et al., 1990). Al finalizar la temporada reproductiva los machos se alejan del harén descansan entre 10 y 20 días, y luego emprenden su primer viaje de alimentación (Deutsch et al., 1990).

En los viajes de alimentación los elefantes marinos recorren grandes distancias, se dirigen hacia el golfo de Alaska, recorriendo aproximadamente 100 km al día, donde permanecen durante dos meses para alimentarse (Deutsch et al., 1994). Cada año, en mayo, comienzan su migración de regreso al sur, hacia la colonia donde se reproducen. Sin embargo, se trata de una temporada de descanso y muda de pelaje, en la que, a diferencia de la época reproductiva, los individuos descansan sin agresiones ni enfrentamientos durante un mes antes de regresar al golfo de Alaska durante cuatro meses más para aumentar su masa y acumular energía para la siguiente época reproductiva (Deutsch et al., 1994).

Históricamente, los elefantes marinos han sido objeto de caza por su piel y grasa en las costas de California y Baja California hasta el siglo XIX, lo que redujo considerablemente su población, se consideró extinta a la especie en varias ocasiones y a partir de la década de 1920 se observó un incremento en su población gracias a medidas de protección, como la creación del Parque Nacional en Isla Guadalupe en 1922 y a su nombramiento como especies sujetas a protección especial por parte de legislación mexicana y estadounidense. Su estado de conservación evaluado por la IUCN en 2014 lo clasifica como de “preocupación menor” (Hückstädt, 2015). Actualmente se continúa el monitoreo continuo de las poblaciones, normatividad de prohibición de caza y siguen presentando problemáticas de conservación debido a la contaminación y pérdida de hábitat (Hückstädt, 2015).



Figura 4. Elefantes marinos del norte en el archipiélago de San Benito, Baja California.

De izquierda a derecha se puede observar una cría tomando leche de su madre, tres hembras adultas y un macho. Fotografía: M.F. Félix Huergo (2023).

Sitio de estudio

Las muestras de este estudio se colectaron en la isla Oeste del Archipiélago de San Benito (Figura 5). Este se encuentra a 140 km al oeste de la península de Baja California y tiene una extensión de 386 hectáreas. El Archipiélago se conforma por tres islas; la Oeste, la del medio (de 44 hectáreas) y la del Este (con 142 hectáreas de superficie). El área cuenta con una altitud máxima de 1200m sobre el nivel del mar y se encuentra dentro de la región parte de la Reserva de la Biósfera de “Islas del Pacífico de la Península de Baja California” decretada desde el 2016 (DOF: 07/12/2016).

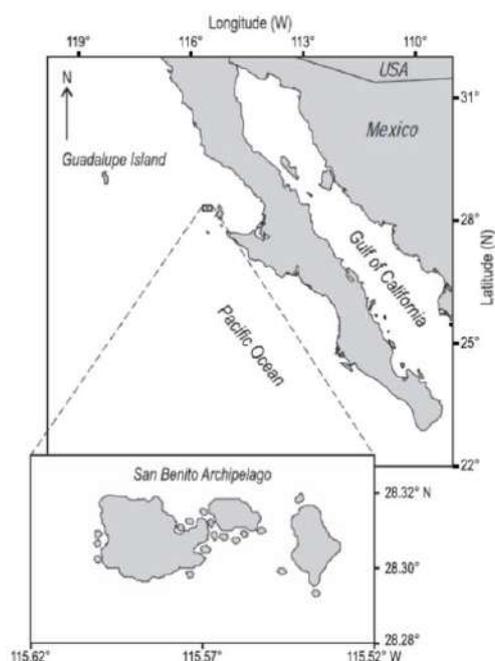


Figura 5. Mapa del archipiélago de San Benito.

Se conforma de tres islas volcánicas: San Benito Oeste, San Benito Medio y San Benito Este. Imagen tomada de Elorriaga- Verplancken (2015).

El Archipiélago de San Benito se caracteriza por tener un clima árido con lluvias en invierno, su vegetación se describe como matorral desértico y en cuestiones de fauna tiene una gran abundancia de aves marinas que anidan en la zona, una especie de reptil y cuenta con especies marinas de importancia económica como el abulón azul (*Halotis fulgens*) y la langosta roja (*Palinurus elephas*), los cuales se encuentran en concesión exclusiva de la cooperativa pesquera pescadores nacionales de abulón

desde hace más de 70 años. En esta isla coexisten cuatro especies de pinnípedos: la foca común (*Phoca vitulina*) el lobo marino de California (*Zalophus californianus*), el lobo fino de Guadalupe (*Arctocephalus philippii*) y el elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*) (Elorriaga-Verplancken, 2015).

Colecta de las muestras

Se capturaron 26 crías de elefante marino del Norte en 2022 y 23 crías en 2023. Se realizó la captura de las crías por parte de integrantes del Laboratorio de Fisiología de la Conservación de la Universidad Autónoma de Querétaro. Después de la captura, una persona inmoviliza la cabeza de la cría de forma manual, y otras dos personas inmovilizan el resto del cuerpo de forma manual. En cada muestreo se tomaron medidas de longitud estándar y diámetro a la altura del ombligo, capa de grasa lateral y se identificó el sexo de las crías. Estas eran marcadas con peróxido de hidrógeno en el pelaje con un número de identificación único, para marcarlas de forma temporal y evitar que fuera recapturado el mismo individuo durante la salida.

La condición de las crías se estima de forma indirecta tomando en cuenta tres medidas: la longitud total (LT, en cm) el diámetro umbilical (DU, en cm) y el grosor de la capa de grasa (CG, en cm) en la línea media lateral, a nivel umbilical. Esta última medida se registró mediante un vernier, por duplicado. Los dos indicadores de condición fueron: DU/LT y CG/LT. Se realizó una prueba de χ^2 para comparar el valor de LT/DU y LT/DG y demostrar la relación que tienen ambos valores de condición corporal. ($\chi^2= 4.6212$, $gl=1$, $p= 5.458 \times 10^{-14}$; Figura 6)

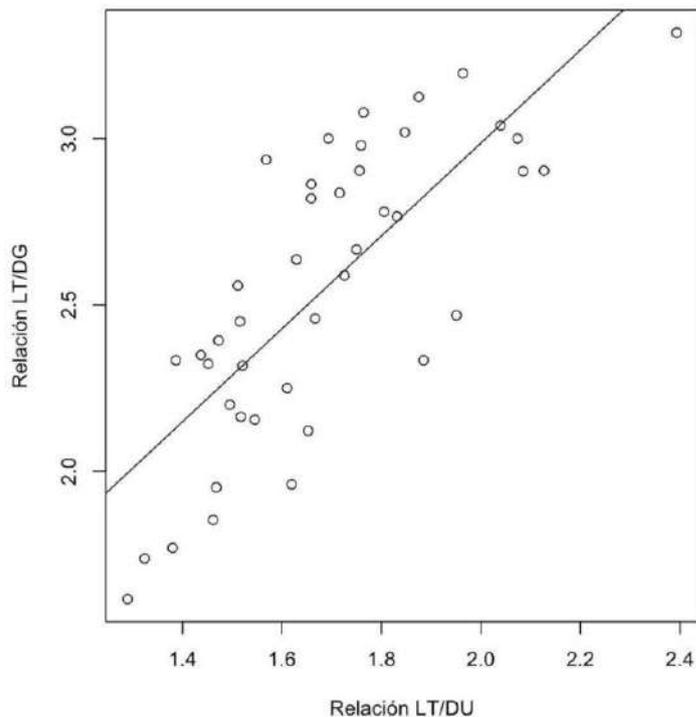


Figura 6. Relación de los valores de condición corporal LT/DU y LT/DG.

Se utilizaron hisopos estériles para recolectar muestras rectales. Para esto, se insertó un hisopo por el ano de la cría y se frotó ligeramente en las paredes del recto, al retirarlo se almacenaba en un tubo con medio Stuart y se transportó en una hielera hasta terminar el muestreo. En el campamento se mantuvieron las muestras en refrigeración y protegidas de la luz, y se transportaron al laboratorio en una hielera de transporte para ser procesadas.

Procesamiento de muestras

Se realizó un cultivo primario a partir del hisopo. Para esto, se sembraron las bacterias por estrés con descarga en medio McConkey y el cultivo fue incubado durante 18 horas a 35°C. Se evaluó el crecimiento primario y se sembró por aislamiento cada morfotipo identificado como morfológicamente distintivo en una nueva placa de medio McConkey, mediante siembra por estría. Los cultivos fueron incubados nuevamente por 18 horas a 35°C, con el fin de aislar las colonias y describir los morfotipos física y

químicamente. Las características que se tomaron en cuenta fueron: tamaño, forma, elevación, margen, color, apariencia, densidad y consistencia.

Caracterización fenotípica de las enterobacterias

Ya que fueron descritos los diferentes morfotipos identificados de cada una de las muestras, cada morfotipo fue aislado. Para esto, se utilizó un asa bacteriológica estéril para tomar una colonia única; esta se sembró en una placa de Petri con cultivo de cerebro corazón, se incubó a 35 °C durante 18 horas y se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas para caracterizar cada colonia:

Tinción de Gram

Se siguió la metodología establecida (Coico, 2005). Brevemente, con un asa bacteriológica estéril se tomó una colonia única del cultivo realizado en medio cerebro corazón, se colocó sobre un portaobjetos limpio y se agregó una gota de agua sobre la colonia. Se esparció el agua y la muestra sobre el portaobjetos y con ayuda de una lámpara de alcohol, se fijó la muestra con calor al pasar el portaobjetos sobre el fuego rápidamente para secar poco a poco la muestra sin quemarla. Una vez que el portaobjetos contenía la muestra seca, se llevó al cuarto de microbiología y tinciones, dónde se realizó la metodología de tinción de Gram. Esto requirió teñir la muestra con cristal violeta durante 30 segundos, retirar el exceso de cristal violeta con agua, escurrirla, colocarla en solución de yodo durante 1 minuto, retirar el exceso de agua por escurrimiento, colocar una solución de 1:1 de alcohol y acetona durante 5 segundos sobre la muestra y enjuagar con agua; para finalizar, se colocó solución de safranina durante 45 segundos, se enjuagó con un poco de agua y se dejó secar para observar al microscopio (Coico, 2005).

Se observó el portaobjetos con la preparación teñida bajo el microscopio y se examinaron las bacterias bajo inmersión en aceite (900× a 1000×) para distinguir entre bacterias Gram positivas (color violeta) y Gram negativas (color rosa) (Coico, 2005).

Pruebas bioquímicas

a) Prueba de catalasa

Para realizar la prueba de catalasa se tomó con una asa bacteriológica estéril una colonia única y se colocó sobre un portaobjetos limpio; se agregó una gota de peróxido de hidrógeno y se observó si había producción de burbujas. La presencia de burbujas indica un resultado positivo para la presencia de la enzima catalasa (Tille, 2015).

b) Prueba de oxidasa

La prueba oxidasa tiene como objetivo detectar y comprobar un complejo llamado citocromo-oxidasa el cual está presente en microorganismos aerobios (Bankar et al., 2009). Para la realización de esta prueba se utilizaron tiras de detección de oxidasa marca Bioser (Tiras de Oxidasa- Bioser, 2021). Con un palillo de madera estéril se tomó una colonia única y se frotó sobre la sección de la tira donde se encuentra el reactivo, después de 30 segundos se registró el cambio de coloración para registrar si hay resultado negativo (color amarillo) o positivo (color violeta oscuro) (Tille, 2015).

c) Prueba de motilidad, ornitina e indol

La prueba de motilidad, ornitina e indol se utiliza para evaluar la motilidad bacteriana, la capacidad de examinar ornitina y la producción de indol a partir del triptófano (Bergey, 1994). Se preparó el medio MIO y se colocó en tubos de ensayo de vidrio. Estos se esterilizaron y conservaron en refrigeración para el cultivo. Para la inoculación de las bacterias con una asa bacteriológica estéril se tomó una colonia única y se colocó de manera vertical en el tubo con el medio. Se colocaron los tubos de medio MIO en la incubadora durante 18 horas a 35 °C. Pasado este tiempo se realizó la interpretación de resultados (Murray et al. 2018).

Para la prueba de motilidad, se observó el medio después de la incubación y si había turbidez desde el punto de inoculación hacia otros sitios del medio la motilidad se registró como positiva, sin embargo, si el crecimiento bacteriano solo ocurrió en el sitio de la inoculación se registró como motilidad negativa (Murray et al. 2018).

Para la prueba de ornitina se observó el cambio de color en el medio. Si la colonia era productora de amonio, el pH del medio se vuelve alcalino, lo que causa que el color se torna verdoso o púrpura más brillante que el medio original. Esas variaciones de color se registraron como positivas. Se repitieron dos veces las pruebas para evitar que cambios ligeros de color dieran falsos positivos (Murray et al. 2018).

Para la prueba de indol se agregaron 2 gotas de reactivo de Kovac al tubo de medio MIO. Al agregar el reactivo de Kovac en el medio se forma un anillo de color rosa o rojo en la capa superior del medio (resultado positivo); en el caso de un resultado negativo no se forma este anillo de color. Se realizó la prueba después de haber corroborado los resultados de motilidad y ornitina para evitar el cambiar el color del medio al agregar el reactivo de Kovac (Murray et al. 2018).

Elaboración de antibiogramas

Se realizaron antibiogramas con multidiscos con 14 antibióticos: Cefuroxima, Norfloxacin, Aztreonam, Cefotaxima, Ceftriaxona, Ácido Nalidíxico, Nitrofurantoina, Gentamicina, Amikacina, Ciprofloxacina, Ofloxacina, Ceftazidima, Cefixime y Cefdinir, mediante la técnica de Kirby-Bauer (Esser, 1970).

Brevemente, los antibiogramas se realizaron de la siguiente forma: Se prepararon medios de cultivo Müller Hinton en placa Petri y tubos con solución salina estériles. Para la inoculación del cultivo bacteriano se seleccionó una colonia pura, previamente identificada como una enterobacteria, con un asa bacteriológica estéril y se colocó en el tubo con solución salina. Se midió la densidad óptica del tubo con la escala de McFarland para asegurar que se trabajaba con una suspensión homogénea de bacterias, asegurando que la solución salina estuviera a una escala de 0.5 de lo que corresponde aproximadamente a una suspensión homogénea de *Escherichia coli* de 1.5×10^8 células por mL (Sutton, 2011). Se repitió el proceso de inoculación, agregando más colonias bacterianas, hasta que se alcanzaba la densidad indicada.

Para la siembra se tomó un hisopo estéril y se introdujo en el tubo con solución salina y con la muestra bacteriana, se escurre levemente en la pared interior del tubo y se

esparció sobre la placa Petri en una línea por la mitad y de manera perpendicular, se marcar una línea por la mitad de la placa y se volvió a sembrar de manera perpendicular.

Después de la siembra de la muestra, se colocaba con una pinza estéril un multidisco con antibióticos (Combi Disc Multidisco para Gram negativos (GN1). Antibióticos: NOR, AT, CTX, CRO, NA, NI, XM, GM, AK, CI, OF, CAZ, FIX, CD. 13CD101-20. Reg. No. 0979R2011 SSA. Fabricados por Arkray Healthcare, distribuido por Accutrack) Se tenía particular cuidado de que se colocara de manera centrada en la placa Petri y que todos los discos tocaran el cultivo. Se incubaron las placas a 35°C por 18 horas. Tras el tiempo de incubación se midió con un vernier el diámetro del halo de inhibición que se formó y se comparó el diámetro registrado con los puntos de cohorte que establece el documento M100 del 2019 que es el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio CLSI establecido para enterobacterias, donde se clasifican dependiendo del diámetro del halo de inhibición en R(Resistentes), S (Sensibles) e I (Intermedias). Se realizó un solo antibiograma por morfotipo, sin duplicados y se tomaron fotografías de todas placas. En la figura 7 se puede apreciar un ejemplo de una caja de Petri con los discos con antibióticos.



Figura 7. Antibiograma en caja petri con multidisco de 14 antibióticos para gram -. Se realizaron los experimentos de acuerdo con la metodología de Kirby Bauer (Esser, 1970).

Análisis estadísticos

Los datos recopilados fueron evaluados utilizando el programa R y Python. Se realizaron pruebas de Chi² y pruebas de Fischer para desafiar las siguientes hipótesis: Esta tesis desafió las siguientes hipótesis:

- La diversidad fenotípica de enterobacterias rectales de crías de elefante marino del Norte es diferente entre machos y hembras.
- La diversidad fenotípica de enterobacterias rectales de crías de elefante marino del Norte es proporcional a la condición corporal de las crías.
- La diversidad fenotípica de enterobacterias rectales de crías de elefante marino del Norte varía entre 2022 y 2023.
- Las enterobacterias rectales de crías de elefante marino del Norte presentan resistencia a antibióticos de uso humano y agropecuario.
- Los patrones de resistencia a antibióticos de las bacterias rectales de crías de elefante marino del Norte difieren entre machos y hembras.
- Los patrones de resistencia a antibióticos de las bacterias rectales de crías de elefante marino del Norte varían con la condición corporal de las crías.
- Los patrones de resistencia a antibióticos de las bacterias rectales de crías de elefante marino del Norte varían entre 2022 y 2023.

Las variables independientes del estudio fueron: sexo (dicotómico: macho o hembra), condición corporal (continuo: grosor de la capa de grasa) y año de colecta (2022 y 2023).

Las variables dependientes fueron: diversidad de enterobacterias (variable discreta producto de conteos), diversidad de fenotipos resistentes (variable discreta producto de conteos), magnitud de la resistencia a los antibióticos (medición del halo de inhibición, en mm; variable continua), diversidad de fenotipos resistentes (variable discreta, producto de conteos).

Las variables dependientes que fueron producto de conteos no pueden analizarse como si fueran normales, por lo que se utilizaron pruebas de Chi-cuadrada para desafiar la primera, la segunda y la tercera hipótesis. La cuarta hipótesis se desafió únicamente con los resultados obtenidos, sin necesidad de realizar una prueba estadística. Para la quinta, la sexta y la séptima hipótesis había dos variables respuesta, una que era producto de conteo (para cada categoría: resistencia, resistencia parcial, susceptibilidad), y que se analizó mediante pruebas de Chi-cuadrada, y la segunda que era una variable continua (diámetro del halo de inhibición).

Para la variable de magnitud de la resistencia a los antibióticos, se construyó un histograma y se le aplicó una prueba de Shapiro-Wilk para determinar si se ajustaba a una distribución gaussiana. Posterior a esto se realizó una prueba de Mann Whitney U para comparar las medias de las variables de año. En el caso de los diámetros de resistencia con respecto a los morfotipos evaluados y los valores de sexo y condición corporal se realizó un ajuste de Bonferroni y Hochberg por la cantidad de pruebas realizadas y con el objetivo de prevenir la probabilidad de cometer un falso positivo (error tipo 1).

Todos los análisis fueron realizados con el programa estadístico de acceso libre R y Python (versiones 4.3.1 y 3.12.2 respectivamente). Se utilizaron los paquetes incluidos en ambos programas y la biblioteca Scipy.stats, Matplotlib y NumPy, en Python para las pruebas estadísticas y construcción de gráficas.

Resultados

Caracterización de los morfotipos

Se pudieron cultivar 34 morfotipos diferentes de enterobacterias de las muestras rectales de crías de elefante marino del Norte (ver Figura 8), de los cuales solo tres morfotipos (M9, M12 y M29) se repitieron en las muestras de 2022 y 2023. El resto de los morfotipos fueron únicos para cada año de muestreo. Se realizó una prueba de Chi² para comparar los morfotipos encontrados en 2022 y 2022 con resultados que indican diferencias significativas entre los morfotipos encontrados por años (Chi²=66.46, p=0.0005, gl= 33; Figura 8).

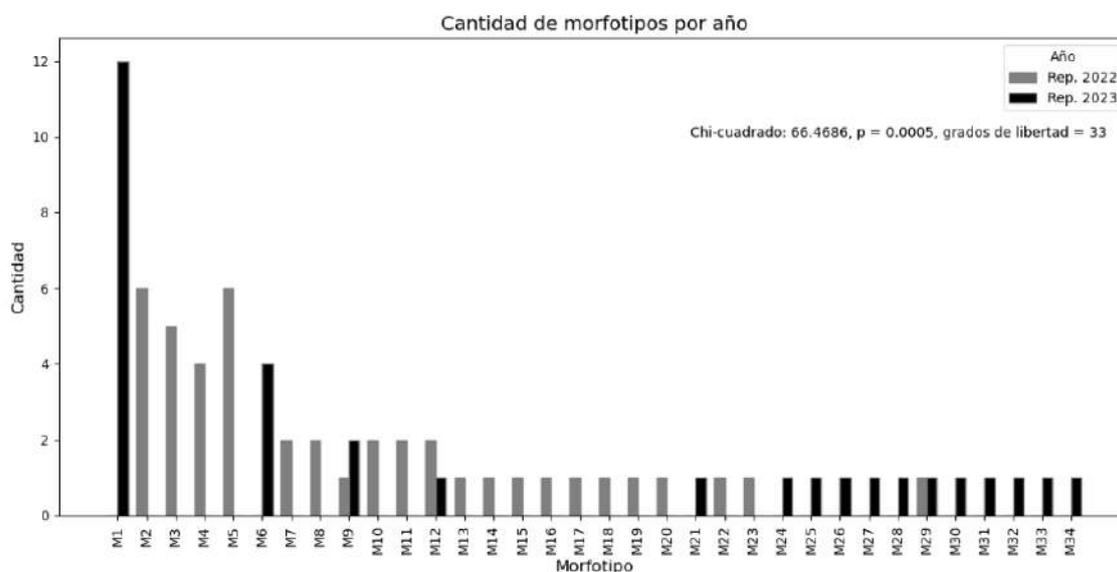


Figura 8. Morfotipos de enterobacterias aislados de muestras rectales de crías de elefante marino del Norte en 2022 y 2023.

Se contó la cantidad de morfotipos (riqueza) que fueron cultivadas y aisladas de cada muestra, siendo lo más común que cada muestra tuviera dos morfotipos diferentes, aunque algunas muestras solamente tuvieron un morfotipo y, menos frecuentemente, algunos tuvieron tres y seis morfotipos por muestra (ver Figuras 9 y 10). La cantidad de morfotipos encontrados por muestra no varió por año (Chi²=0.78, p=0.85, gl= 3; Figura 9 y 10).

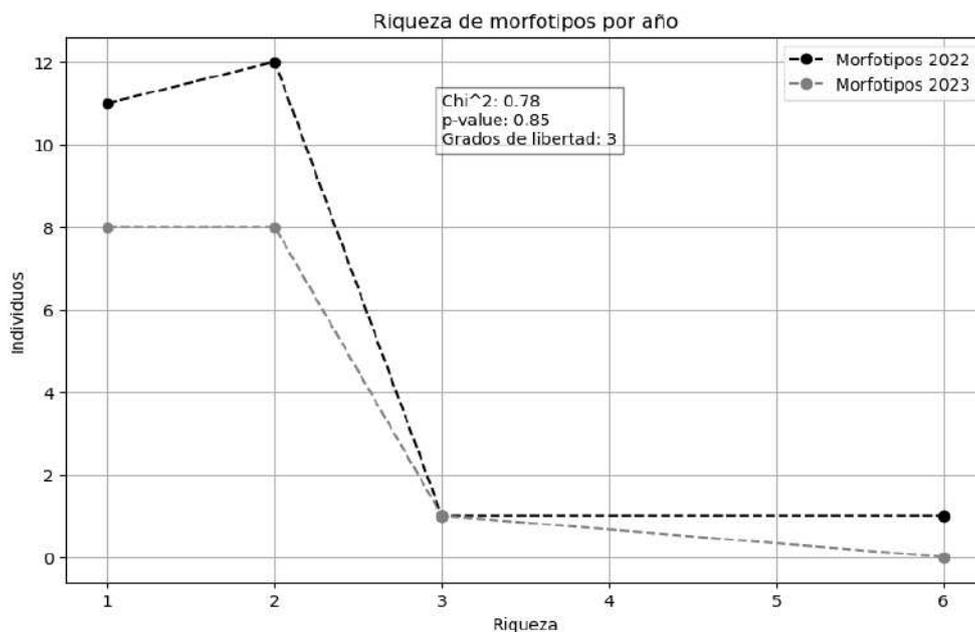


Figura 9. Cantidad de morfotipos de enterobacterias identificados por muestra en 2022 y 2023.

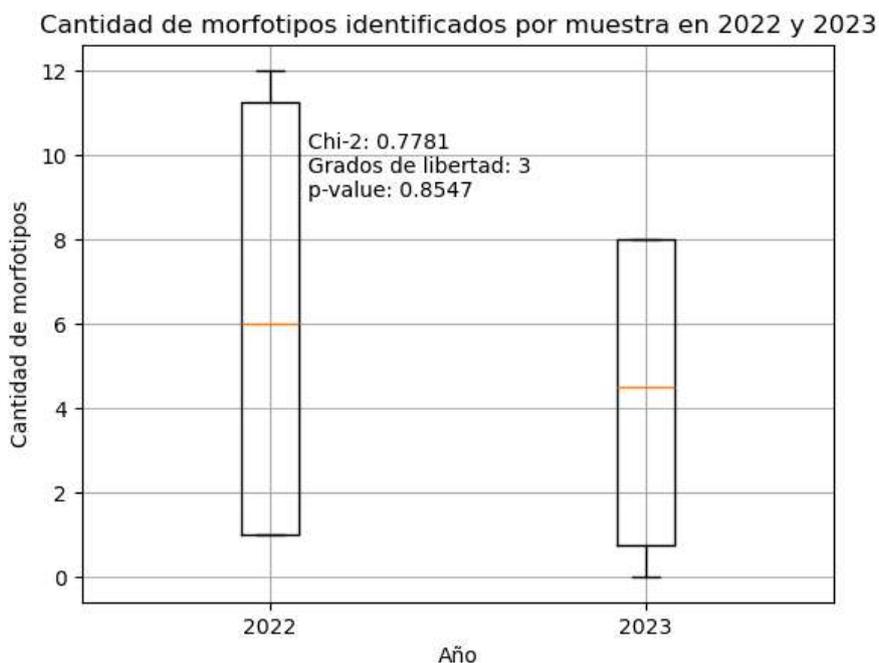


Figura 10. Cantidad de morfotipos de enterobacterias identificados por muestra en 2022 y 2023.

A partir de los resultados de las pruebas bioquímicas se realizó el siguiente cuadro donde se indican las pruebas estadísticas de Fischer y su valor de significancia (p) resultante para evaluar si hay diferencias entre los resultados bioquímicos de

morfotipos de 2022 y 2023 (Cuadro 3). La caracterización bioquímica de las cepas fue semejante entre años, con la excepción de la prueba de ornitina, ya que hubo más cepas positivas en 2023 que en 2022 ($\text{Chi}^2 = 6.71$, $\text{gl} = 1$, $p = 0.0096$; Figura 11).

Cuadro 3. Porcentaje de resultados de pruebas bioquímicas realizadas a las enterobacterias aisladas de elefante marino del Norte en 2022 y en 2023.

Prueba Bioquímica	2022		2023	
	+	-	+	-
Gram	0%	100%	0%	100%
Catalasa	100%	0%	100%	0%
Oxidasa	0%	100%	0%	100%
Motilidad	93%	7%	83%	17%
Ornitina*	32%	68%	66%	34%
Indol	85%	15%	73%	27%

* $p < 0.05$ en la prueba de Fisher.

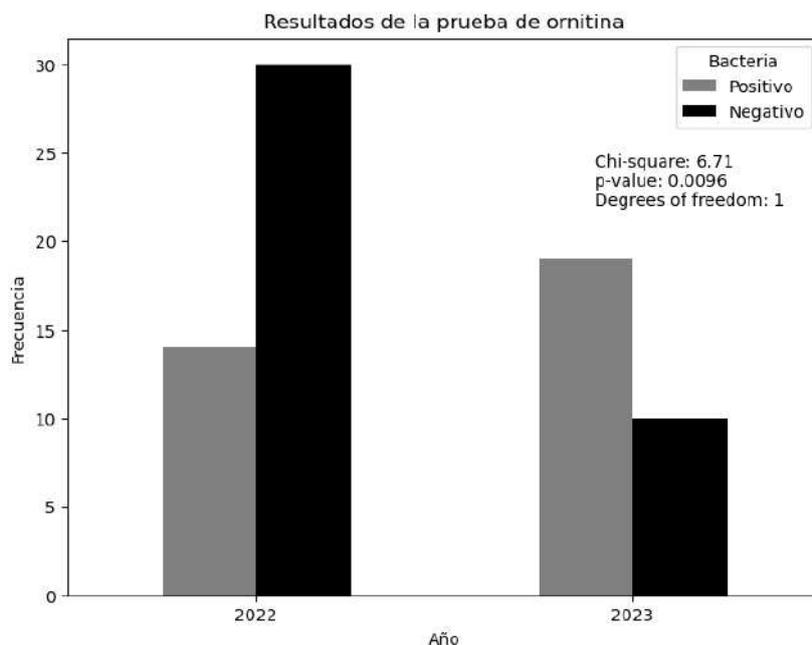


Figura 11. Resultados de pruebas bioquímicas de ornitina en 2022 y 2023.

Comparación de sexos y diversidad

No hubo una diferencia significativa entre los morfotipos encontrados en machos y hembras, al realizarse la prueba de Chi² ($p > 0.05$; Figura 12).

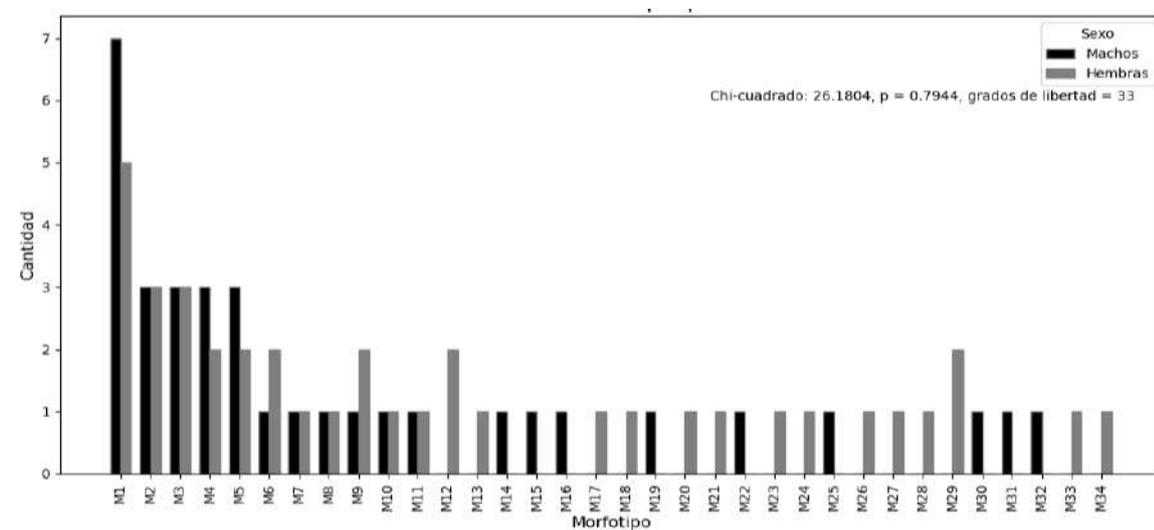


Figura 12. Morfotipos encontrados en machos y hembras

Resistencia a antibióticos

Se detectó resistencia a 11 de los 14 antibióticos analizados en las muestras de 2022, mientras que en el 2023 se encontró resistencia a 10 de los 14 antibióticos. En el caso de los resultados intermedios, en 2022 se encontró resistencia intermedia a ocho de 14 antibióticos y en 2023 a siete de 14 antibióticos. No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de morfotipos resistentes, intermedios o sensibles entre 2022 y 2023 (en los tres casos, $p > 0.05$; Cuadro 4).

Con los datos de los diámetros del halo de inhibición de cada antibiótico se realizó un histograma, una prueba de Shapiro-Wilk para evaluar si presentan una distribución normal y una prueba de Mann Withney-U para comparar las medias entre años. Para siete de 14 antibióticos si se observaron diferencias en el diámetro del halo de inhibición (Cuadro 5; Figura 13A-G). La distribución del diámetro del halo solamente fue normal en el caso de (NI) Nitrofurantoína y (GM) Gentamicina.

Cuadro 4. Resultados de antibiogramas con frecuencia de morfotipos de enterobacterias resistentes, intermedios y sensibles en 2022 y 2023. Se muestra el número de morfotipos en cada categoría y el porcentaje que representan para cada antibiótico.

Antibiótico	2022			2023		
	R	I	S	R	I	S
Cefuroxima	20 64.52%	8 25.81%	3 9.68%	12 57.14%	2 9.52%	7 33.33%
Cefdinir	17 54.84%	1 3.23%	13 41.94%	11 52.38%	0 0%	10 47.62%
Nitrofurantoína	17 54.84%	1 3.23%	13 41.94%	12 46.15%	7 26.92%	7 26.92%
Cefixima	9 29.03%	1 3.23%	21 67.74%	2 9.52%	1 4.76%	18 85.71%
Gentamicina	2 6.45%	8 25.81%	21 67.74%	0 0%	3 14.29%	18 85.71%
Ceftriaxona	3 9.68%	1 3.23%	27 87.10%	2 9.52%	0 0%	19 90.48%
Aztreonam	2 6.45%	0 0%	29 93.55%	2 9.52%	0 0%	19 90.48%
Cefotaxima	5 16.13%	0 0%	26 83.87%	2 9.52%	1 4.76%	18 85.71%
Amikacina	6 19.35%	10 32.26%	15 48.39%	3 14.29%	5 23.80%	13 61.90%
Ac. Nalidíxico	2 6.45%	12 38.71%	17 54.84%	1 4.76%	4 19.04%	16 76.19%
Ofloxacina	3 9.68%	0 0%	28 90.32%	0 0%	0 0%	21 100%
Ceftazidima	0 0%	0 0%	31 100%	1 4.76%	0 0%	20 95.24%
Ciprofloxacina	0 0%	0 0%	31 100%	0 0%	0 0%	21 100%
Norfloxacina	0 0%	1 3.23%	30 96.77%	0 0%	0 0%	21 100%

Cuadro 5. Resultados significativos de la prueba de Mann Withney-U comparando el diámetro de los halos de inhibición de bacterias del 2022 y 2023.

Antibiótico	Estadística U (Mann-Whitney)	Valor de p
Norfloxacin	585.5	1.802×10^{-08}
Aztreonam	42.0	6.638×10^{-09}
Cefotaxima	582.5	4.694×10^{-08}
Ceftriaxona	109.5	1.751×10^{-05}
Ciprofloxacina	84.5	1.974×10^{-06}
Ceftazidima	149.5	0.001
Cefixima	468.0	0.004

No se encontraron diferencias significativas entre los diámetros del halo de inhibición entre cachorros machos y hembras ($p > 0.05$ para todos los análisis). Sin embargo, al comparar las categoría de resistencia, se encontró que los morfotipos sensibles (S) eran más comunes en hembras que en machos ($\text{Chi}^2 = 508.65$, $gl = 1$, $p = 0.03176$; Figura 14).

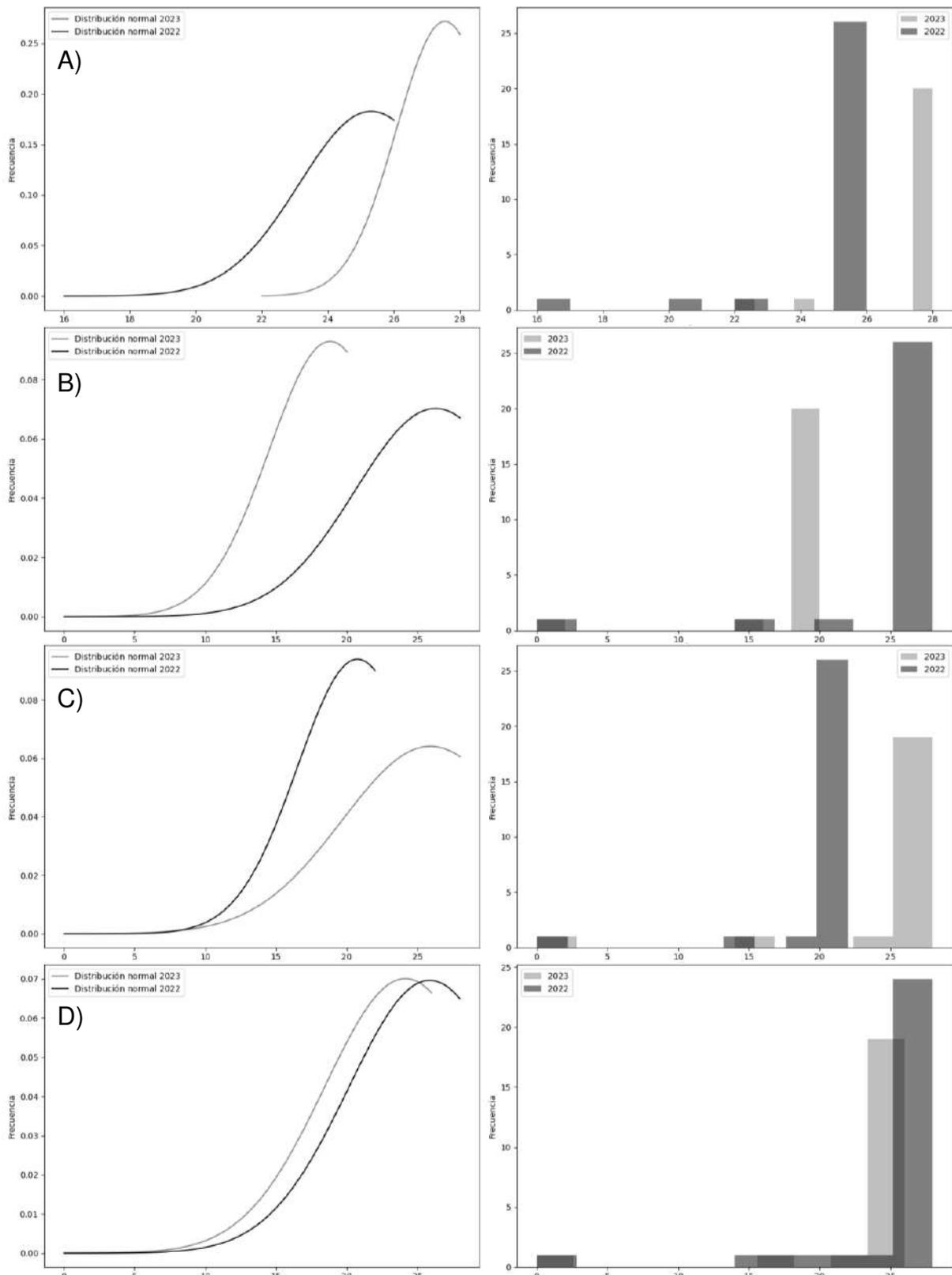


Figura 13. Gráfica de Distribución e Histograma de los halos de inhibición en presencia de antibiótico en bacterias del 2022 y 2023.

A) Norfloxacin, B) Aztreonam, C) Cefotaxima, D) Ceftriaxona.

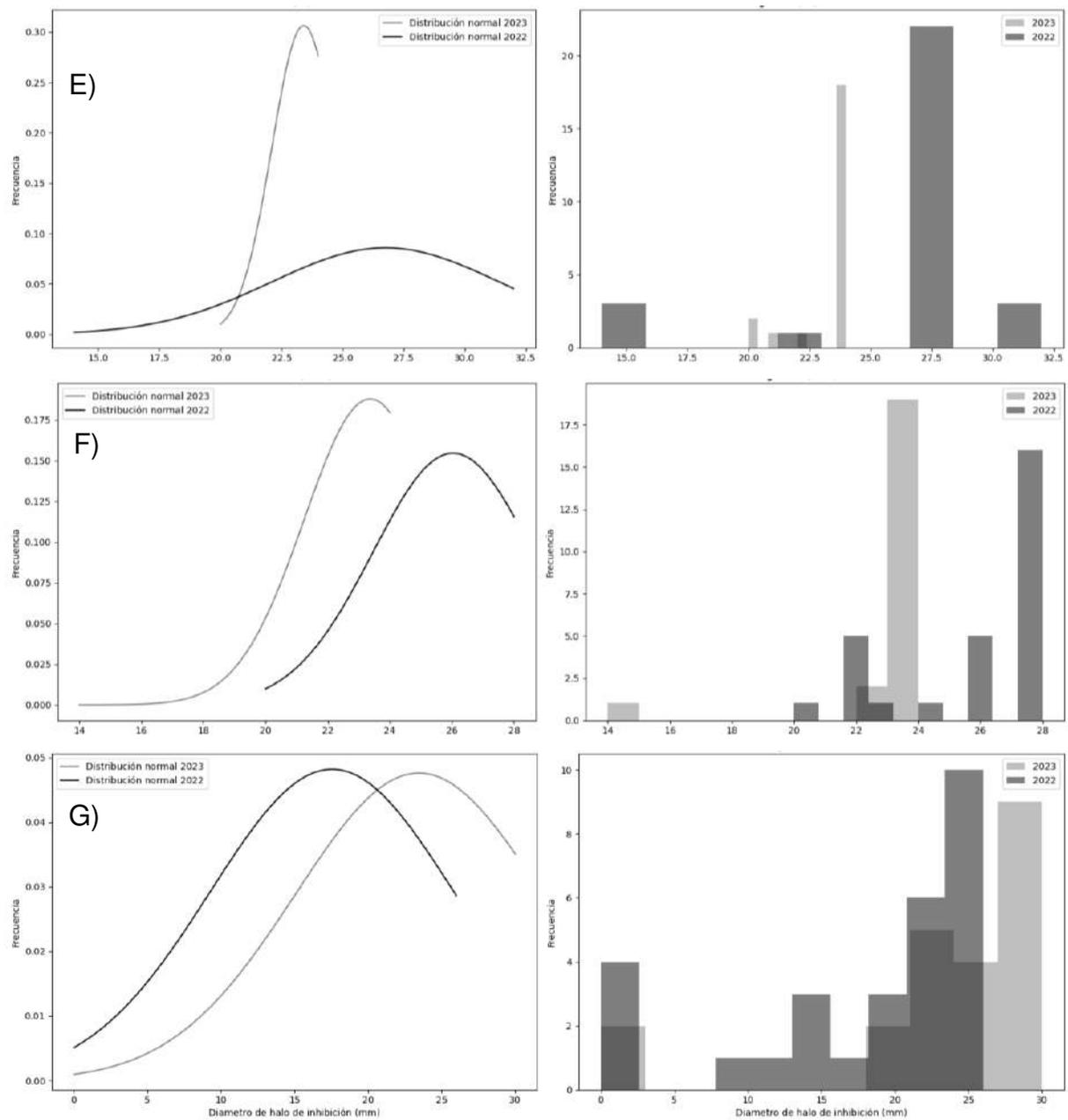


Figura 13 (Continuación). Gráfica de Distribución e Histograma de los halos de inhibición en presencia de antibiótico en bacterias del 2022 y 2023.

E) Ciprofloxacina, F) Ceftazidima, G) Cefixima.

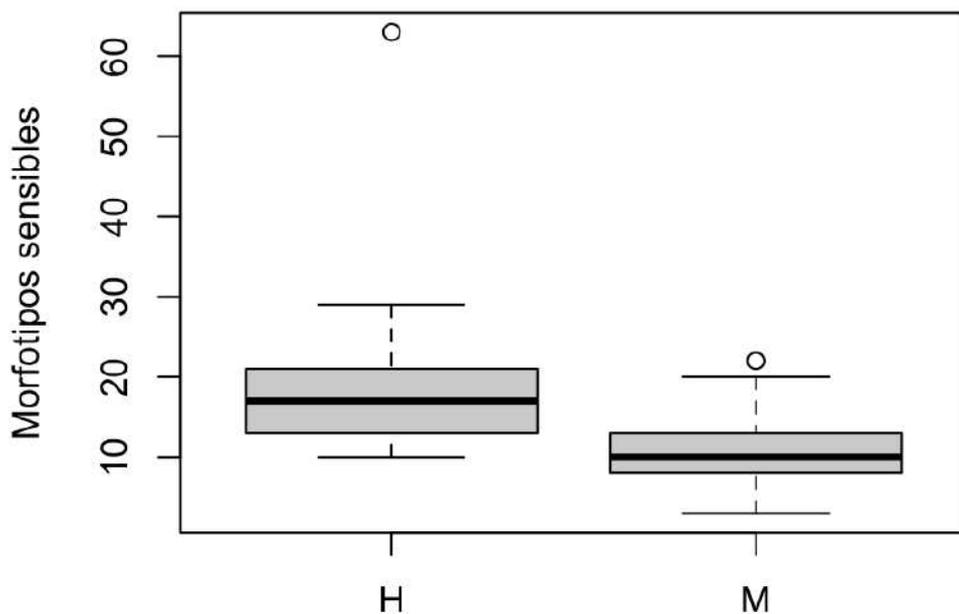


Figura 14. Comparación entre frecuencias de bacterias sensibles (S) a antibióticos detectadas en cachorros machos (M) y hembras (H).

Se realizaron pruebas de χ^2 para comparar los valores de DG para evaluar si existen diferencias significativas entre la condición corporal de crías machos y hembras, dando resultados no significativos, lo que nos indica que la condición corporal es igual entre sexos. ($\chi^2 = 269.81$, $gl=1$, $p= 0.2245$; Figura 15).

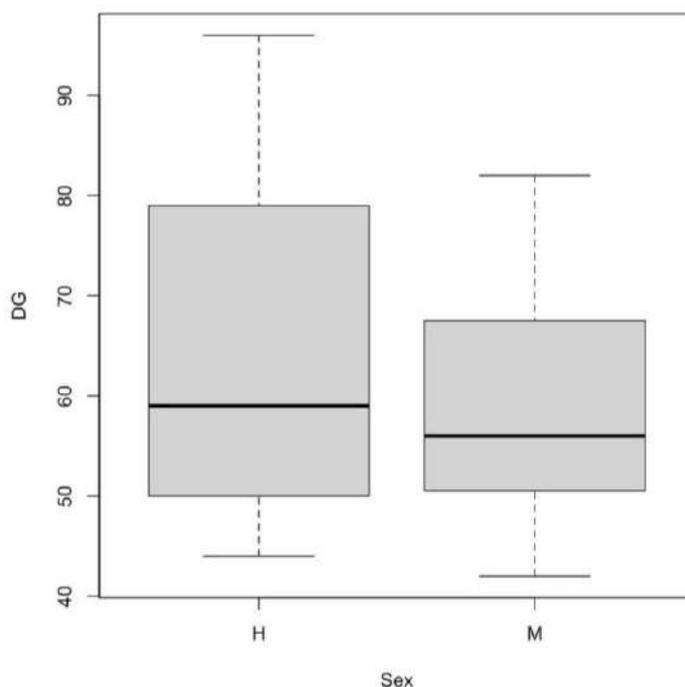


Figura 15 . Relación de valor de condición corporal DG y sexos.

En la comparación de la diversidad de morfotipos y los valores de condición corporal, se realizaron las mismas pruebas estadísticas y no se encontraron diferencias significativas entre la presencia de la mayoría de los morfotipos y los valores de condición corporal LT/DU y LT/DG, a excepción del morfotipo #10 ($\text{Chi}^2 = 11.285$, $\text{gl} = 1$, $p = 0.0007815$) y morfotipo #1 ($\text{Chi}^2 = 10.489$, $\text{gl} = 1$, $p = 0.001201$), que son más comunes en crías de elefante marino con menor condición corporal con los valores de LT/DG y LT/DU respectivamente (Figura 16 y 17).

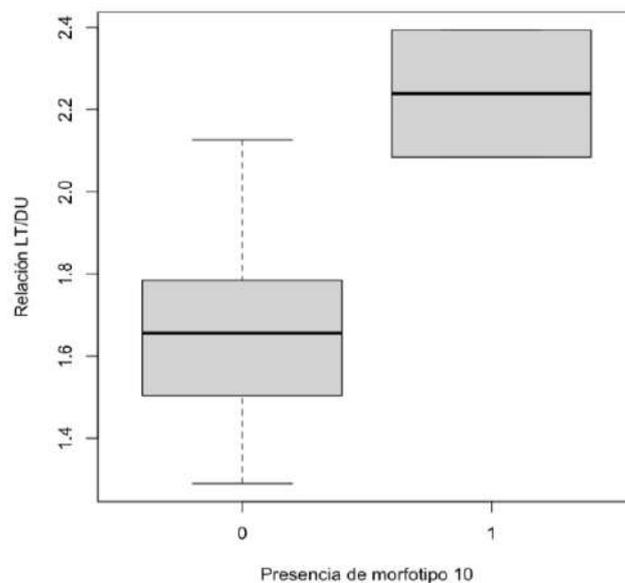


Figura 16. Boxplot con la relación de LT/DU y la presencia del morfotipo #10.

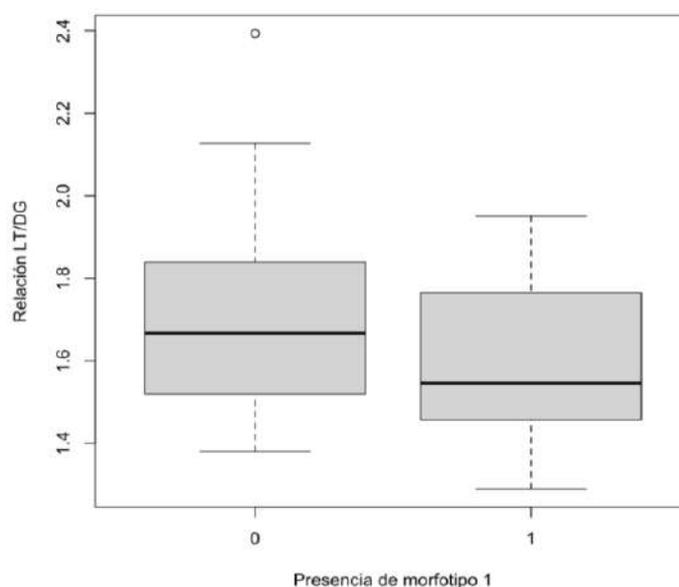


Figura 17. Boxplot con la relación de LT/DG y la presencia del morfotipo #1.

En la comparación de los resultados de pruebas bioquímicas y los valores de condición corporal, se realizaron las mismas pruebas estadísticas y no se encontraron diferencias significativas entre los valores de ornitina, motilidad y los valores de condición corporal LT/DU y LT/DG, a excepción de los resultados indol positivo ($\text{Chi}^2 = 1.3957$, $\text{gl} = 1$, $p = 0.02812$). Siendo resultados de indol positivo más comunes en elefantes con menor condición corporal LT/DU (Figura 18).

También se compararon los resultados de resistencia antibióticos y los valores de condición corporal, se realizaron las mismas pruebas estadísticas y no se encontraron diferencias significativas entre los valores de R (resistentes) y S (sensibles) y los valores de condición corporal LT/DU y LT/DG, a excepción de los resultados I (Intermedio) con respecto a LT/DG ($\text{Chi}^2 = 19.588$, $\text{gl} = 1$, $p = 0.003611$). Las bacterias con valores intermedios de resistencia fueron más comunes en elefantes con mayor condición corporal LT/DU (Figura 19).

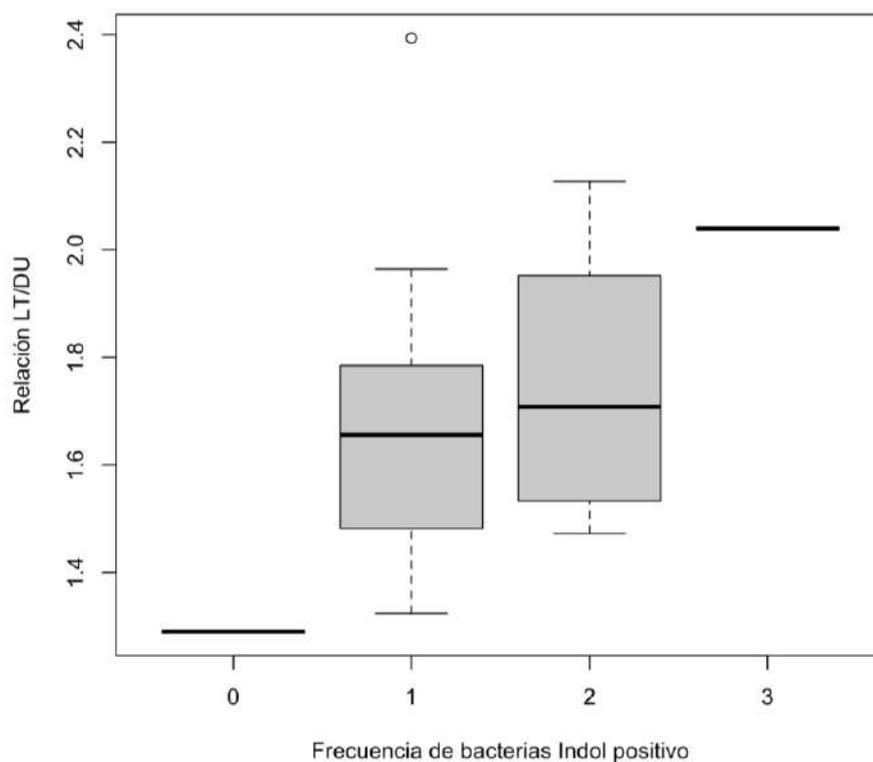


Figura 18. Relación de valores de condición corporal LT/DU con frecuencia de bacterias indol positivo

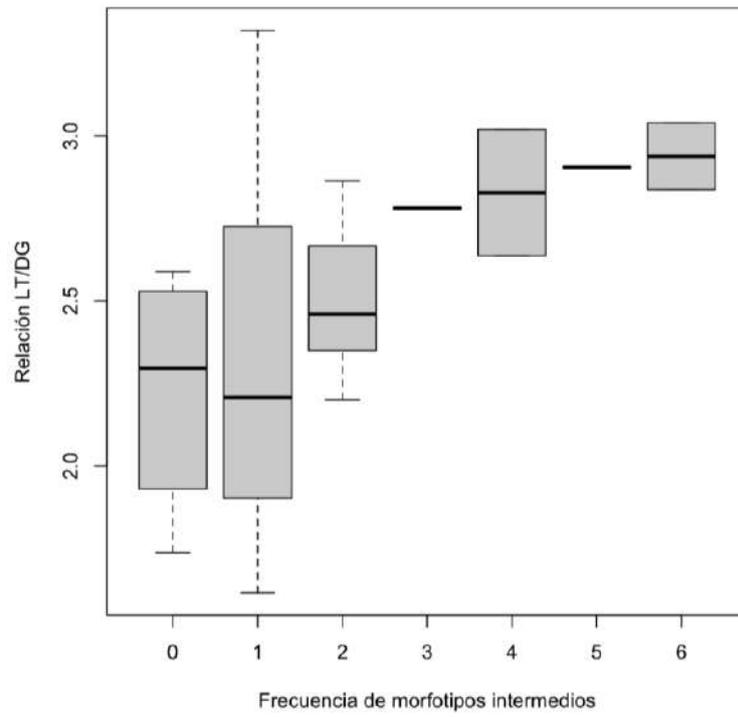


Figura 19. Relación de valores de condición corporal LT/DG con frecuencia de bacterias con valores intermedios de resistencia a antibióticos.

Discusión

Esta tesis fue una primera exploración del fenómeno de resistencia a antibióticos en bacterias entéricas aisladas de una especie silvestre que es considerada un centinela del ecosistema marino costero. A partir de las pruebas bioquímicas, se pudo confirmar que las bacterias cultivadas pertenecían a la familia Enterobacteriaceae al ser Gram negativos, catalasa positivos y oxidasa negativos (Hawkey, 2006).

El hecho que la diversidad fenotípica de enterobacterias rectales de crías de elefante marino del Norte variara entre 2022 y 2023 sugiere que la microbiota entérica depende de muchos factores que, a su vez, varían entre años. Esto pudiera reflejar cambios en el ecosistema marino al que están expuestos los animales (Trevelline, 2019). Se sabe que las actividades humanas ocasionan la perturbación de los ecosistemas, a partir de fragmentación del hábitat, pérdida de la vegetación, contaminación, especies invasoras y transmisión de patógenos, lo que, en conjunto, puede modificar factores ambientales y ecológicos de la fauna silvestre (Aguirre, 2012; Junge, 2011). El cambio en el uso de la tierra, la contaminación ambiental, el cambio climático y las enfermedades infecciosas son algunas de las amenazas que afectan a la biodiversidad en nuestro planeta (Cardinale, 2012), y los ecosistemas marinos del norte de México no son la excepción. A su vez, estos factores también afectan de manera indirecta el estado de salud de los organismos al alterar la composición de su microbiota (Trevelline, 2019). Por supuesto, también es posible que la microbiota entérica sea en su mismo un ecosistema cambiante que refleja fenómenos internos del hospedero, como variaciones en las etapas de crecimiento y diversos fenómenos fisiológicos, más que externos (Sekirov et al., 2010). Esta tesis no se enfocó en el estudio de la microbiota *per se*; y estudios posteriores en el grupo podrán abordar esta posibilidad. Sin embargo, se discutirán a continuación ambos escenarios posibles.

Se ha evaluado la capacidad de modificar la composición de la comunidad microbiana intestinal y sus genes, conocida como plasticidad metagenómica, a partir de análisis que comparan diferentes condiciones provocadas por cambios ambientales

propiciados por la actividad humana, con el objetivo de comprender la dinámica de enfermedades posiblemente emergentes en vida silvestre (Fackelmann et al., 2021). Específicamente, se comparó la composición microbiana intestinal de la rata espinosa de Tomes, *Proechimys semispinosus*, en hábitats conservados, hábitats fragmentados no alterados por las actividades humanas y hábitats fragmentados perturbados por asentamientos humanos, y se encontraron diferencias marcadas relacionados con las actividades antrópicas (Fackelmann et al., 2021). El impacto de la urbanización se ha reportado para otras clases animales, como aves (Teyssier et al., 2018). También se ha reportado que los anfibios que viven en hábitats agrícolas y en hábitats naturales varían en su composición comunitaria microbiana (Chang et al., 2016). Estos estudios ayudan a entender los efectos de las actividades humanas en la composición bacteriana intestinal de estos animales, al dar evidencia de que los animales que habitan en sitios perturbados por actividades humanas pueden tener menor diversidad alfa, o cambios en la composición de la microbiota. Es posible que en algunos casos, los efectos observados se deban al impacto de xenobióticos, como metales pesados (Cardinale, 2012), lo que se ha determinado para peces, en donde altos niveles de metales pesados se asocian a una disminución su en la diversidad y alteración en la composición comunitaria de su microbioma intestinal (Xia et al., 2018). Lo mismo ocurre con la exposición a compuestos bifenil policlorados (PCBs, por sus siglas en inglés), que alteran la composición comunitaria del microbioma intestinal de las larvas de anfibios con una persistencia hasta en la etapa adulta (Kohl et al., 2015).

Otro de los factores que puede afectar a la microbiota es el cambio en la temperatura ambiental. Esto se ha visto en el microbioma de reptiles y de anfibios (Bestion et al. 2017; Fontaine et al. 2018), donde el aumento de la temperatura resulta en pérdidas de diversidad y alteraciones en la composición comunitaria de los microbiomas intestinales de reptiles. Algo semejante se ha reportado para Cnidaria y Porifera, ya que el aumento de la temperatura del océano altera el conjunto de comunidades microbianas asociadas con especies de estos fila (Ramsby et al., 2018), además de que la acidificación del océano reduce la diversidad y altera la composición comunitaria de los microorganismos asociados al coral (Grottoli et al., 2018).

La microbiota intestinal cumple un papel fundamental en la nutrición, protección contra patógenos y en el mantenimiento de la inmunidad de mucosas, siendo, a su vez, esencial su funcionamiento para mantener la homeostasis intestinal (Hooper et al., 2012). Por lo tanto, los cambios en la diversidad de la microbiota pueden tener efectos en la salud del organismo en el que se establecen (Hooper et al., 2012). Tales cambios pueden estar dentro de un rango adaptativo, pero también pueden estar asociados a disbiosis, un desequilibrio que esté asociado a un aumento de patógenos o mal funcionamiento de la microbiota intestinal (Wilkins et al., 2019).

Si consideramos posibles estados de disbiosis como una consecuencia del cambio en la composición de la microbiota intestinal, entonces, los microorganismos con potencial patógeno pueden ser un indicador de estos cambios. Por ejemplo, las infecciones parasitarias pueden disminuir la diversidad del microbioma intestinal de las aves (Knutie, 2018) y pueden alterar la composición comunitaria de los microbiomas intestinales de mamíferos (McKenney et al., 2017; Walk et al., 2010) y anfibios (Shu et al., 2019). Incluso las infecciones virales pueden alterar la composición comunitaria del microbioma intestinal de las aves (Ganz et al., 2017) y el microbioma cutáneo de los anfibios (Campbell et al., 2018). En el elefante marino del Norte no se cuenta aún con estudios semejantes, pero se han registrado patógenos que afectan negativamente a la especie, como el nematodo *Otostrongylus circumlitus*, que puede ocasionar anorexia, deshidratación, neutrofilia y, en ocasiones, la muerte, debido a que llega a invadir el corazón y los pulmones (Gulland, 1997). También se tienen registros de infecciones por la espiroqueta *Leptospira* spp. (Colegrove, 2005) y por herpesvirus (Colegrove, 2005). No se conoce si estos patógenos pueden alterar la microbiota entérica de los cachorros de elefante marino del Norte, y en esta tesis no se contaba con datos sobre patógenos de las crías; sin embargo, todas fueron evaluadas por un médico veterinario durante el manejo, y ninguna mostraba evidencia de estar enferma. Estudios futuros podrían investigar su presencia para determinar si impactan sobre la diversidad de enterobacterias. Si se determinara que sí, sería posible considerar a la diversidad o composición de las

enterobacterias como un indicador de estado de salud de las crías, como se ha hecho para otras especies (McKenney et al., 2017; Walk et al., 2010; Shu et al., 2019).

Aunque los ecosistemas marinos no presentan fragmentación y cambios en el uso de suelo como los ecosistemas terrestres, se ven afectados por actividades humanas que pueden tener efectos similares. La presencia de rutas marítimas que restringen el paso de la fauna marina (Schoeman et al., 2020) y la presencia de puertos o zonas costeras con asentamientos humanos pueden afectar la distribución de la fauna silvestre marina (Crain et al., 2009). En el caso de elefante marino del Norte, que se distribuye en el Pacífico Norte (Hückstädt, 2015), la especie puede verse afectada por el impacto directo e indirecto de rutas marítimas utilizadas para el transporte (Schoeman et al., 2020), por el movimiento de aguas entre puertos a partir del agua de lastre, que es un factor importante en el movimiento de genes bacterianos de resistencia a antibióticos entre zonas marítimas (Lv et al., 2020), por modificaciones en su hábitat (Hückstädt, 2015) o por la ocupación de las zonas costeras por asentamientos humanos (Crain et al., 2009). Esta es otra de las posibles causas de las diferencias observadas entre morfotipos del 2022 y 2023.

Si consideramos la contaminación como otro factor que puede alterar la microbiota de fauna silvestre, debe ser considerado que el Pacífico nororiental tiene contaminantes como hidrocarburos, metales, contaminantes domésticos y contaminantes orgánicos (Macdonald et al., 2003). Es importante considerar que los efectos de estos contaminantes no se pueden analizar de manera aislada de otros factores como la sobrepesca, el cambio climático, la destrucción de hábitats acuáticos, eutrofización de las aguas y la introducción de especies exóticas, que también están presentes en el Pacífico Norte y alteran las vías de contaminación (Macdonald et al., 2003). El elefante marino del Norte se distribuye a lo largo de la costa e islas costeras del Pacífico nororiental y, en consecuencia está en contacto con contaminantes orgánicos persistentes y metales pesados (Peterson et al., 2015). Dado que es una especie de alto nivel trófico, entonces estos contaminantes se biomagnifican y bioacumulan hasta alcanzar niveles altos (Bossart, 2011). La variación en los niveles de contaminantes entre años podría ser uno de los factores que ayudaran a explicar los resultados observados en cuanto a la diversidad y riqueza

de enterobacterias cultivables de los cachorros de elefante marino del Norte evaluada en esta tesis. Si esta posibilidad se estableciera, significaría que las enterobacterias cultivables de las crías, serían buenos indicadores de procesos que afectan a las hembras adultas.

También es necesario considerar que la temperatura superficial del mar en el Pacífico Norte experimenta variaciones; se tienen registros de las fluctuaciones decenales en la temperatura del océano, y estas fluctuaciones afectan significativamente la abundancia y riqueza de especies del plancton y zooplancton, además de alterar el clima, provocando transiciones entre diferentes estados de los ecosistemas marinos. Patrones climáticos como la oscilación del Giro del Pacífico y El Niño central del Pacífico, que pueden volverse más frecuentes ante los niveles crecientes de gases de efecto invernadero en la atmósfera y desempeñar un papel cada vez más importante en la configuración del clima (Lorenzo et al., 2010), también contribuyen a las variaciones en la temperatura del Pacífico Norte.

Se ha evaluado de qué forma las alteraciones climáticas pueden impactar sobre las comunidades microbianas en ambientes marinos (Bestion et al., 2017; Fontaine et al., 2018; Ramsby et al., 2018). En ese sentido, se podría considerar como uno de los posibles factores que influyan en los cambios observados en los morfotipos de enterobacterias cultivables de las crías muestreadas en 2022 y en 2023.

También se encontró una relación entre los dos estimadores de condición corporal (LT/DU y LT/DG) de los cachorros y la presencia del morfotipo 10 y del morfotipo 1, siendo más común la presencia de morfotipo 10 en cachorros con menor condición corporal y más común la frecuencia del morfotipo 1 en cachorros con mayor condición corporal. Las enterobacterias de los cachorros con diferentes valores de condición corporal variaron en su habilidad de degradar ácido triptófano, que, si recordamos lo presentado en la sección de antecedentes, es la base de la prueba de indol (León-Rodríguez, 2016). Este sustrato funciona como una señal intracelular, es un modificador de flujo de carbono en condiciones anaerobias y se ha evaluado la producción de hidrógeno y otros metabolitos como el etanol (León-Rodríguez, 2016). La producción bacteriana de indol depende en buena medida del pH ambiental y se

ha reportado que cepas de *E. coli* en presencia de antibióticos, como la ampicilina y kanamicina, tienen un nivel más alto de producción de indol extracelular ya que el indol incrementa la supervivencia celular bajo el estrés causado por el antibiótico (Han et al., 2011).

En esta tesis se encontró una mayor frecuencia de morfotipos indol positivos de enterobacterias aisladas de crías con menor condición corporal; y que estas crías tenían más probabilidad de presentar el morfotipo #10. Una explicación plausible de este resultado es la relación de la microbiota intestinal con la nutrición de los organismos. Se sabe que la microbiota está íntimamente relacionada con la nutrición de los organismos y entre las funciones en las que está involucrada están la producción de metabolitos bioactivos, la regulación de la inmunidad, la homeostasis energética y la protección contra patógenos (Mills et al., 2019). Además, el microbioma intestinal varía significativamente de un huésped a otro y es determinada por una serie de factores, incluida la dieta y la genética del huésped, siendo importante la cantidad y calidad de la microbiota y su potencial metabólico (Mills et al., 2019).

En los mamíferos, la microbiota desempeña un papel crucial en el suministro de carbono, energía, vitaminas y componentes macromoleculares, pero su equilibrio puede verse alterado por los fármacos antibióticos y las enfermedades. (Savage, 1986) y la dieta puede determinar la configuración de las variaciones interindividuales en las comunidades microbianas de la microbiota intestinal (Carmody et al., 2015).

Sería conveniente continuar con la investigación de los resultados de la presente tesis, incluyendo la secuenciación de ambos morfotipos (#1 y #10) para identificar qué bacterias son y poder entender mejor la significancia biológica de los resultados obtenidos, además de buscar posibles relaciones entre la presencia de estos morfotipos en crías de elefante marino del Norte con diferente condición corporal.

Otro resultado inesperado fue que los morfotipos de enterobacterias de las crías muestreadas en 2022 y en 2023 varían en su metabolismo de ornitina. Para discutir qué implicaciones tienen estos resultados, primero debemos de comprender cuál es

la base bioquímica de esta prueba de identificación y qué información brinda sobre el metabolismo de la microbiota intestinal. La ornitina funciona como sustrato de detección de la enzima ornitina descarboxilasa, cuya actividad enzimática es favorable en condiciones de acidez y es responsable de la formación de putrescina y dióxido de carbono (Bergey, 1994). A su vez la putrescina es un precursor en la síntesis de poliaminas, moléculas esenciales para el crecimiento y proliferación celular (Bergey, 1994). Las bacterias que son positivas en la prueba de ornitina, presentan la enzima ornitina descarboxilasa y lo que indica que presentan esta ruta metabólica activa, por otro lado, las bacterias que dan resultado negativo pueden carecer de esta ruta metabólica o pueden utilizar rutas alternativas para metabolizar la ornitina (Romano, 2014). Se han realizado estudios donde las bacterias que cuentan con la enzima descarboxilasa, como algunas bacterias ácido lácticas, pueden tener mayor supervivencia al estrés ácido al regular el pH intracelular y producir energía metabólica mediante la generación de una fuerza motriz de protones y su conversión en ATP (Romano, 2014). La descarboxilación de ornitina es un posible mecanismo de adaptación a una condición ambiental ácida, lo que sería una característica benéfica y necesaria para cultivos probióticos y ciertamente importante para la supervivencia de bacterias presentes en el tracto gastrointestinal, en estudios realizados con humanos (Ferreira, 2015).

La investigación realizada para esta tesis no permite identificar si las enterobacterias de crías de elefante marino del Norte se enfrentaron a un ambiente más ácido en 2023, o si las crías de este año tenían un estado menos disbiótico que en 2022. Estudios posteriores sobre microbiota podrán ayudar a investigar este fenómeno. Sin embargo, no deja de ser interesante notar una variación en la huella metabólica de la microbiota entérica entre años, misma que no se hubiera podido identificar con aproximaciones basadas en secuenciación del ADN, como son la mayoría de los estudios actuales.

Uno de los resultados más relevantes de la tesis fue la evidencia de que las enterobacterias rectales de crías de elefante marino del Norte presentan resistencia a diversos antibióticos de uso común, tanto en la medicina humana como en la medicina veterinaria y la industria agropecuaria. No se encontró resistencia a ningún

antibiótico en el 100% de las cepas investigadas, en ninguno de los dos años del estudio, pero más del 50% de las cepas presentaron resistencia a cefuroxima, cefdinir y nitrofurantoína ambos años. Solamente se observó susceptibilidad completa a cuatro antibióticos (ceftazidima, ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina), tres de ellos quinolonas.

Los patrones de resistencia a antibióticos de las bacterias rectales de crías de elefante marino del Norte no variaron entre 2022 y 2023 considerando la clasificación de CLSI de R, I y S. Esto puede tomarse como indicación de que, aun cuando cambian los morfotipos de enterobacterias en 2022 y 2023, la resistencia a antibióticos se mantiene. Es posible que esto se deba a una constante y persistente contaminación con antibióticos del ecosistema marino (Zhang et al. 2009) en el área de distribución del elefante marino del Norte es persistente y que las enterobacterias cambiantes entre años ya posean con anterioridad esta resistencia. Otra posibilidad es que se estén llevando a cabo transmisiones de los genes de resistencia a antibióticos entre las bacterias presentes en el ecosistema (Dolejská et al., 2018) incluso a pesar de que pudiera ser cambiante la exposición a antibióticos. Ya se tiene evidencia de que la resistencia mediada por plásmidos a antibióticos, como las beta-lactamasas y la colistina, está emergiendo en Enterobacteriaceae procedentes de la vida silvestre (Dolejská et al., 2018). Este fenómeno de presencia de antibióticos y procesos de resistencia también puede ocurrir en donde se distribuye el elefante marino del Norte, lo que implica una contaminación en zonas más amplias del océano pacífico (Jang et al., 2022).

Cabe señalar que en solo un año se observó resistencia a la ceftazidima, pero también se observó una pérdida de resistencia para la ofloxacina, ya que de haber encontrado tres cepas resistentes en 2022, en 2023 ninguna cepa mostró resistencia a este antibiótico. Cuando se comparan los diámetros de los halos de inhibición entre bacterias del 2022 con las de 2023 si hay diferencias significativas para 7 antibióticos. Esto puede significar que aunque no haya cambiado la clasificación de la resistencia según la clasificación de la CLSI, si hay cambios en los efectos de los antibióticos entre bacterias de 2022 y 2023, ya que en algunos casos aumentan o disminuyen los halos de inhibición, lo que podría reflejar que la ganancia y pérdida de genes de

resistencia a antibióticos es dinámica y con cierto grado de estocasticidad (Wintersdorff et al., 2016). Sin embargo, también podría reflejar limitaciones del número de muestras utilizado en la tesis. En otras palabras, si se hubiera contado con más muestras, ¿se hubieran encontrado más fenotipos de resistencia en los dos años?

A pesar de las incógnitas que no pueden ser respondidas en este momento, los resultados de esta tesis concuerdan con otros estudios realizados sobre este grupo de bacterias y su adquisición de resistencia a nivel mundial (Lynch et al., 2023; Paterson, 2006). El proceso de resistencia a antibióticos está presente en diversos ecosistemas, y la fauna silvestre funge un papel de reservorios de bacterias resistentes y forma parte del sistema de transmisión de resistencia (Allen et al., 2010). En cuanto a estudios previos con el elefante marino del Norte, se han realizado investigaciones sobre resistencia a antibióticos como la realizada por (Johnson et al., 1998), en la cual se evaluó la susceptibilidad a antibióticos de bacterias aisladas de lobos marinos, focas y elefantes varados en California, obtenidas de inflamación, abscesos y ombligo. Se encontró que las enterobacterias y en general bacterias Gram negativas son las más comunes, también se encontró resistencia a múltiples medicamentos siendo las bacterias Gram negativas más susceptibles a la amikacina y menos a la clindamicina (Johnson et al., 1998). En otras investigaciones se ha determinado que el uso de medicamentos antimicrobianos aumenta la resistencia de *Escherichia coli* gastrointestinal comensal de elefantes marinos del Norte de vida libre que se encontraban en rehabilitación. A partir de muestras aisladas de *E. coli* se determinó la prevalencia de resistencia a antibióticos como amoxicilina-ácido clavulánico, cloranfenicol, enrofloxacino, ticarcilina-ácido clavulánico y trimetoprim-sulfametoxazol, al terminar la rehabilitación el 77,8% de los individuos tenían *E. coli* resistentes a estos antibióticos (Stoddard et al., 2009).

Las enterobacterias de crías de elefante marino del norte variaron en la frecuencia de resultados sensibles (S) en crías machos y hembras, estos resultados muestran que hay más bacterias sensibles a antibióticos en hembras que en machos. Esto puede deberse a diferentes causas: las hormonas sexuales son un potente impulsor de las diferencias en el microbioma de machos y de hembras, siendo importante considerar que los cambios asociados con la exposición a hormonas reproductivas pueden ser

dinámicos, pero también las diferencias hormonales sostenidas relevantes (Valeri et al., 2021).

En un estudio realizado por Sun et al. (2023) con el ciervo rojo *Cervus elaphus*, se comparó la microbiota intestinal de individuos en cautiverio e individuos de vida libre, y encontraron que el sexo de los individuos y cambios relacionados con sus hormonas influían en las diferencias de la microbiota. Atribuyen estos resultados a los niveles de hormona del crecimiento femenina, que durante la gestación, puede afectar la microbiota fecal (Sun et al., 2023). Sin embargo, en la presente tesis se trabajó con crías, no con animales adultos. No queda claro si hay variación marcada en las hormonas reproductivas de los animales en la etapa neonatal. Los estudios han mostrado que la concentración de estradiol y de testosterona incrementan conforme avanza la etapa del destete (Sherman-Cooney et al., 2005). Sin embargo, a la fecha no ha habido ningún estudio que demuestre que estas hormonas puedan impactar a la microbiota de pinnípedos. Aunque se trata de una especie filogenéticamente alejada del modelo de estudio de la presente tesis, en humanos se han realizado estudios que identifican cambios desde la gestación en machos y en hembras, los embriones de sexo masculino adaptan la función placentaria para permitir crecimiento continuo en ambientes maternos adversos, mientras que los embriones femeninos reducen su crecimiento en un intento de sobrevivir a condiciones adversas, esto se ha explicado a partir de una expresión diferencial de citocinas placentarias y la respuesta placentaria al cortisol (Clifton, 2010).

Una explicación plausible de las diferencias encontradas en las bacterias presentes en machos y hembras del elefante marino del Norte, podría relacionarse con un desarrollo diferencial entre los embriones machos y hembras durante la gestación. Un estudio realizado por el mismo grupo de investigación en el que se desarrolló esta tesis encontró que la microbiota entérica de cachorros macho y hembra variaba en su diversidad incluso desde el inicio del destete (Stoffel et al., 2020). Se especula que pudiera reflejar diferencias en las estrategias de tolerancia inmune entre sexos (Y. S. Juárez-Campusano, datos no publicados), lo que a su vez reflejaría la historia de vida de esta especie sexualmente dimórfica. Sin embargo, es improbable que eso

explicara también las diferencias en los fenotipos de resistencia bacteriana entre sexos encontrada en esta tesis.

Otra explicación plausible es una inversión diferencial de recursos energéticos por parte de las hembras preñadas en función del sexo del feto. Hay cierta evidencia de esto para otras especies de pinnípedos. Por ejemplo, los cachorros machos de lobo fino de Galápagos (*Arctocephalus galapagoensis*) siempre pesaron más que las hembras y crecieron más rápido que ellas, a pesar de tener la misma edad, debido a que las madres amamantaron más a las crías macho que a las crías hembra (Trillmich, 1986). Y en un estudio realizado con el lobo fino del norte (*Callorhinus ursinus*) se detectó que las crías macho crecen más rápido y son más grandes que las crías hembras y que el tamaño del feto está influenciado por la edad, el tamaño y la historia reproductiva de la madre, siendo las hembras mayores y más grandes, las que producen fetos progresivamente más grandes. (Reiter, 1978). La condición de la madre como factor determinante en la proporción de sexos de las crías también se ha investigado en otras especies de mamífero marino, como la ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*), y se ha visto que las hembras maduras con condición corporal superior sesgan su reproducción al sexo masculino de las crías, con mayor variación en el éxito reproductivo (Wiley et al., 1993).

Si fuera semejante la situación en el elefante marino del Norte, y las madres invirtieran más recursos cuando están preñadas de un feto machos, es plausible plantear que su búsqueda de recursos y alimentación podría ser diferente y su dieta más diversa. Las hembras adultas de elefante marino del Norte que estuvieran gestando a un feto macho se podrían alimentar en zonas diferentes a las que estuvieran gestando a un feto hembra para brindar más recursos a su cría durante la lactancia. Entonces, podrían realizar, de forma diferencial, viajes de alimentación a zonas o donde haya más bacterias resistentes a antibióticos, más antibióticos o más metabolitos de antibióticos que en las otras zonas de alimentación. Esto explicaría la mayor presencia de morfotipos sensibles a antibióticos en las crías hembras que en las crías macho.

Es importante considerar que existe la posibilidad de la transmisión de bacterias resistentes a antibióticos hacia las poblaciones humanas (transferencia bidireccional de resistencia) (Sun et al., 2020). Esto puede ser de especial importancia ya que, al ser los elefantes marinos organismos migratorios, pueden atraer resistencia de antibióticos no usados en nuestro país, como es el caso del antibiótico Aztreonam, que no suele encontrarse de manera comercial en nuestro país y que, en esta tesis se encontró resistencia de algunas enterobacterias contra este fármaco. No debe de olvidarse que la resistencia a antibióticos es considerada un gran riesgo a la salud pública y que el manejo de antibióticos sigue siendo una gran problemática en México (Dreser et al., 2008). La resistencia a los antibióticos se ve influenciada por factores naturales, desechos animales y humanos, y contaminantes (Swift, 2019; Wellington et al., 2013). En ese sentido, se requiere de acción urgente para prevenir la propagación de resistencia a antibióticos y se requieren modificaciones en el manejo y uso de estos fármacos (Wellington et al., 2013; Österblad et al., 2000; Iredell et al., 2016).

Conclusiones

Este es el primer estudio que caracterizó fenotípicamente a las enterobacterias cultivables de elefante marino del Norte, y los resultados obtenidos aportan mucha información relevante sobre la presencia de bacterias resistentes a antibióticos comunes de uso humano y veterinario, en el Pacífico Norte.

Se encontró evidencia de resistencia a la mayoría de los antibióticos de uso común en México. Cabe señalar que se trata de una especie que tiene relativamente poco contacto con el humano, por lo que la presencia de estas bacterias con resistencia a antibióticos refleja un problema mayor que una derrama directa de antibióticos, sino su acumulación en la cadena trófica por procesos agroindustriales que impactan a lo largo del ecosistema, ayudado por las corrientes marinas.

La tesis enfatiza la importancia del estudio de la especie como organismo centinela y del análisis del microbioma como indicador potencial de la salud y viabilidad ecosistémica en proyectos de conservación y manejo.

La información obtenida en esta tesis abre la posibilidad de evaluar cómo se puede complementar esta información sobre microbiota en fauna silvestre y cómo podría esta ser influida por factores como nutrición, estado de salud y contacto con contaminantes. La metodología usada fue útil como una herramienta poco invasiva con muchas más posibles aplicaciones para investigar más a los ecosistemas y los efectos de las actividades humanas.

Es necesario continuar con los estudios de resistencia a antibióticos en fauna silvestre. Sin embargo, los resultados de esta tesis dan evidencia de la problemática mundial en este tema y permiten generar más preguntas acerca de cuáles son los genes responsables de la resistencia a antibióticos en el elefante marino del Norte y, sobre todo, cuál es el origen de esos genes. Contar con esta información en el futuro sería relevante para entender el papel del elefante marino del Norte como reservorio de resistencia a antibióticos y como modelo para entender el origen de los procesos de resistencia a antibióticos en los ecosistemas marinos.

Literatura citada

Aguirre, A. A., Ostfeld, R., & Daszak, P. (2012). New directions in conservation medicine: applied cases of ecological health. *Oxford University Press USA*. ISBN: 9780199731473

Ahasan, M. S., Picard, J., Elliott, L., Kinobe, R., Owens, L., & Ariel, E. (2017). Evidence of antibiotic resistance in Enterobacteriales isolated from green sea turtles, *Chelonia mydas* on the Great Barrier Reef. *Marine Pollution Bulletin*, 120(1-2), 18-27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.046>

Akova, M. (2016). Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence*, 7(3), 252–266. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1159366>

Alberts, B., Hunt, T., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M. C., Roberts, K., Walter, P., & Wilson, J. H. (2015). *Molecular biology of the cell*. Garland Science, Taylor and Francis Group. ISBN: 9780815344643

Alduina, R., Gambino, D., Presentato, A., Gentile, A., Sucato, A., Savoca, D. (2020). Is *Caretta caretta* a Carrier of Antibiotic Resistance in the Mediterranean Sea? *Antibiotics (Basel)*, 9(3), 116. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030116>

Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565–1574. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi5000564>

Allen, H., Donato, J., Wang, H., Cloud-Hansen, K., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8(4), 251-259. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>

Aminov, R. I. (2009). The Role of Antibiotics and Antibiotic Resistance in Nature. *Environmental Microbiology*, 11, 2970–2988. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01972.x>

Atterby, C., Börjesson, S., Ny, S., Järhult, J. D., Byfors, S., and Bonnedahl, J. (2017). ESBL-Producing *Escherichia coli* in Swedish Gulls-A Case of Environmental Pollution From Humans? *PloS One*, 12, e0190380. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190380>

Bankar, S., Bule, M., Singhal, R., & Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase--an overview. *Biotechnology Advances*, 27(4), 489-501. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.003>.

Barelli, C., Albanese, D., Donati, C., Pindo, M., Dallago, C., Rovero, F., & De Filippo, C. (2015). Habitat fragmentation is associated to gut microbiota diversity of an endangered primate: implications for conservation. *Scientific Reports*, 5(1), 14862. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep14862>

Baylis, C., Uyttendaele, M., Joosten, H., & Davies, A. (2011). The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry (p. 52). *ILSI Europe*. ISBN 9789078637332

Becker, C. G., Longo, A. V., Haddad, C. F. B., & Zamudio, K. R. (2017). Land cover and forest connectivity alter the interactions among host, pathogen and skin microbiome. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1861), 20170582. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0582>

Bentley, R., & Bennett, J. W. (2003). What is an antibiotic? revisited. *Advances in Applied Microbiology*, 303–331. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(03\)01012-8](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(03)01012-8)

Bestion, E., Jacob, S., Zinger, L., Di Gesu, L., Richard, M., White, J., & Cote, J. (2017). Climate warming reduces gut microbiota diversity in a vertebrate ectotherm. *Nature Ecology & Evolution*, 1(6), 0161. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0161>

Bergey, D. H. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins. ISBN: 9780683006032

Berta, A., Churchill, M., & Boessenecker, R. (2018). The origin and evolutionary biology of pinnipeds: seals, sea lions, and walruses. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 46, 203-228. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-082517-010009>

Bharadwaj, A., Rastogi, A., Pandey, S., Gupta, S., & Sohal, J. S. (2022). Multidrug-Resistant Bacteria: Their mechanism of action and prophylaxis. *BioMed Research International*, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/5419874>

Blackburn, J., Mitchell, M., Blackburn, M., Curtis, A., & Thompson, B. (2010). Evidence of Antibiotic Resistance in Free-Swimming, Top-Level Marine Predatory Fishes. *Journal Of Zoo And Wildlife Medicine*, 41(1), 7-16. DOI: <https://doi.org/10.1638/2007-0061.1>

Bossart, G. D. (2011). Marine mammals as Sentinel species for oceans and human health. *Veterinary Pathology*, 48(3), 676–690. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985810388525>

Boto, L., & Martínez, J. L. (2011). Ecological and temporal constraints in the evolution of bacterial genomes. *Genes*, 2(4), 804-828. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes2040804>

Böttger, E. C., & Springer, B. (2008). Tuberculosis: Drug Resistance and Laboratory Diagnosis. *Medical Microbiology and Immunology*, 197(1), 89–94. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00430-007-0060-8>

Bugg, T. D., & Walsh, C. T. (1992). Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis: Enzymology, antibiotics, and antibiotic resistance. *Natural Product Reports*, 9(3), 199. DOI: <https://doi.org/10.1039/np9920900199>

Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). B-lactams and β -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8). DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>

Caleja, C., de Toro, M., Gonçalves, A., Themudo, P., Vieira-Pinto, M., Monteiro, D. & Poeta, P. (2011). Antimicrobial resistance and class I integrons in *Salmonella enterica* isolates from wild boars and Bísaro pigs. *International Microbiology*, 14(1), 19-24. DOI: <http://doi.org/10.2436/20.1501.01.131>

Campbell, L. J., Hammond, S. A., Price, S. J., Sharma, M. D., Garner, T. W., Birol, I., & Griffiths, A. G. (2018). A novel approach to wildlife transcriptomics provides evidence of disease-mediated differential expression and changes to the microbiome of amphibian populations. *Molecular Ecology*, 27(6), 1413-1427. DOI: <https://doi.org/10.1111/mec.14528>

Campbell, T. P., Sun, X., Patel, V. H., Sanz, C., Morgan, D., and Dantas, G. (2020). The Microbiome and Resistome of Chimpanzees, Gorillas, and Humans Across Host Lifestyle and Geography. *Isme J.*, 14, 1584–1599. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41396-020-0634->

Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2227-2238. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.01707-08>

Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 298-304. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>

Cardinale, B. J., Duffy, J. E., Gonzalez, A., Hooper, D. U., Perrings, C., Venail, P., & Naeem, S. (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 486(7401), 59-67. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature11148>

Carmody, R., Gerber, G., Luévano, J., Gatti, D., Somes, L., Svenson, K., & Turnbaugh, P. (2015). Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. *Cell host & microbe*, 17 1, 72-84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.010>.

Chang, C. W., Huang, B. H., Lin, S. M., Huang, C. L., & Liao, P. C. (2016). Changes of diet and dominant intestinal microbes in farmland frogs. *BMC Microbiology*, 16, 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0660-4>

Chen, C.-R., Malik, M., Snyder, M., & Drlica, K. (1996). DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: Quinolone-induced DNA cleavage. *Journal of Molecular Biology*, 258(4), 627–637. DOI: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0274>

Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232–260. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>

Cizek, A., Dolejska, M., Karpinskova, R., Dedicova, D. & Literak, I. (2007) Wild black-headed gulls (*Larus ridibundus*) as an environmental reservoir of Salmonella strains resistant to antimicrobial drugs. *European Journal of Wildlife Research*, 53, 55–60. DOI: <http://doi.org/10.1007/s10344-006-0054-2>

Clifton, V. (2010). Review: Sex and the human placenta: mediating differential strategies of fetal growth and survival. *Placenta*, 31(Suppl), S33-9 . DOI: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.11.010>

Coico, R. (2005). Gram staining. *Current Protocols in Microbiology*, 00(1). DOI: <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs00>

Colegrove, K., Lowenstine, L., & Gulland, F. (2005). Leptospirosis in Northern Elephant Seals (*Mirounga angustirostris*) stranded along the California Coast , 41, 426 - 430. DOI: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-41.2.426>

Colegrove, K., Greig, D., & Gulland, F. (2005). Causes of Live Strandings of Northern Elephant Seals (*Mirounga angustirostris*) and Pacific Harbor Seals (*Phoca vitulina*) Along the Central California Coast, 1992-2001. *Aquatic Mammals*, 31, 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1578/AM.31.1.2005.1>

Conly, J., & Johnston, B. (2005). Where are all the new antibiotics? the new antibiotic paradox. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 16(3), 159–160. DOI: <https://doi.org/10.1155/2005/892058>

Costa, D. P., Boeuf, B. L., Huntley, A. C., & Ortiz, C. L. (1986). The energetics of lactation in the Northern elephant seal, *Mirounga angustirostris*. *Journal of Zoology*, 209(1), 21-33.

Costa, D., Poeta, P., Saenz, Y., Vinue, L., Rojo-Bezares, B. & Jouini, A. (2006) Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 1311–1312. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkl415>

Crain, C., Halpern, B., Beck, M., & Kappel, C. (2009). Understanding and Managing Human Threats to the Coastal Marine Environment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1162. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04496.x>

Courvalin, P. (2006). Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clinical Infectious Diseases*, 42(Supplement_1), S25-S34. DOI: <https://doi.org/10.1086/491711>

Deutsch, C.J., Haley, M.P. & Le Boeuf, B.J. (1990) Reproductive effort of male Northern elephant seals: Estimates from mass loss. *Canadian Journal of Zoology* 68: 2580-2593. Recuperado de: <http://ark.cdlib.org/ark:/13030/ft7b69p131>

Deutsch, C.J., Crocker, D.E., Costa, D.P. & Le Boeuf, B.J. (1994.) Sex- and age-related variation in reproductive effort of northern elephant seals. In: B.J. Le Boeuf &

R M. Laws (ed.), Elephant seals: Population ecology, behavior, and physiology, pp. 169-210. *University of California Press*. DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/jj.8441712.14>

Denyer, S. P., Hodges, N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2011). Hugo and Russell's Pharmacology Microbiology (8th ed.). *Blackwell*. ISBN-13: 978-1-4443-3063-2

Demas, G. E., & Nelson, R. J. (2012). Ecoimmunology. *Oxford University Press*. ISBN: 9780199737345

Di Lallo, G., D'andrea, M. M., Sennati, S., Thaller, M. C., Migliore, L., and Gentile, G. (2021). Evidence of another anthropic impact on *Iguana delicatissima* from the Lesser Antilles: the presence of antibiotic resistant enterobacteria. *Antibiotics (Basel)* 10 (8), 885. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080885>

Dolejská, M., & Papagiannitsis, C. (2018). Plasmid-mediated resistance is going wild. *Plasmid*, 99, 99-111. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.09.010>

Dreser, A., Wirtz, V. J., Corbett, K. K., & Echániz, G. (2008). Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud pública de México*, 50, S480-S487.

Elorriaga-Verplancken, F. R., Ferretto, G., & Angell, O. C. (2015). Current status of the California Sea Lion (*Zalophus californianus*) and the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*) at the San Benito Archipelago, Mexico. *Ciencias Marinas*, 41(4), 269–281. DOI: <http://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2545>

Esser, V., & Elefson, D. (1970). Experiences with the Kirby-Bauer method of antibiotic susceptibility testing. *American Journal of Clinical Pathology*, 54(2), 193-8. DOI: <http://doi.org/10.1093/AJCP/54.2.193>.

Etebu, E., & Ariekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Microbiology. Biotechnology. Res*, 4(2016), 90-101. ISSN 2053-1818

Ewers, R., & Didham, R. (2005). Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. *Biological Reviews*, 81. DOI: <http://doi.org/10.1017/S1464793105006949>.

Fackelmann, G., Gillingham, M. A., Schmid, J., Heni, A. C., Wilhelm, K., Schwensow, N., & Sommer, S. (2021). Human encroachment into wildlife gut microbiomes. *Communications Biology*, 4(1), 800. DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02315-7>

Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., & Matthaïou, D. K. (2010). Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resistance Updates*, 13(4–5), 132–138. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.drug.2010.05.002>

Ferreira, A., Oliveira, M., Freitas, F., Paiva, A., Alfenas-Zerbini, P., Silva, D., Queiroz, M., Borges, A., & Moraes, C. (2015). Involvement of the ornithine decarboxylase gene in acid stress response in probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20. *Beneficial Microbes*, 6(5), 719-25. DOI: <http://doi.org/10.3920/BM2014.0122>.

Fontaine, S. S., Novarro, A. J., & Kohl, K. D. (2018). Environmental temperature alters the digestive performance and gut microbiota of a terrestrial amphibian. *Journal of Experimental Biology*, 221(20), jeb187559. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.187559>

Fritzenwanker, M., Imirzalioglu, C., Herold, S., Wagenlehner, F. M., Zimmer, K. P., & Chakraborty, T. (2018). Treatment options for carbapenem-resistant gram-negative infections. *Deutsches Ärzteblatt International*, 115(20-21), 345. DOI: <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0345>

Ganz, H. H., Doroud, L., Firl, A. J., Hird, S. M., Eisen, J. A., & Boyce, W. M. (2017). Community-level differences in the microbiome of healthy wild mallards and those infected by influenza A viruses. *mSystems*, 2(1), 10-1128. DOI: <https://doi.org/10.1128/msystems.00188-16>

Ghaith, D. M., Mohamed, Z. K., Farahat, M. G., Shahin, W. A., & Mohamed, H. O. (2019). Colonization of intestinal microbiota with carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in paediatric intensive care units in Cairo, Egypt. *Arab Journal of Gastroenterology*, 20(1), 19-22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajg.2019.01.002>

Grottoli, A. G., Dalcin Martins, P., Wilkins, M. J., Johnston, M. D., Warner, M. E., Cai, W. J. & Schoepf, V. (2018). Coral physiology and microbiome dynamics under combined warming and ocean acidification. *PloS one*, 13(1), e0191156. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191156>

Gulland, F., Beckmen, K., Burek, K., Lowenstine, L., Werner, L., Spraker, T., Dailey, M., & Harris, E. (1997). Nematode (*Otostrongylus circumlitus*) infestation of northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) stranded along the central California coast. *Marine Mammal Science*, 13, 446-458. DOI: <http://doi.org/10.1111/J.1748-7692.1997.TB00651.X>.

Han, T., Lee, J., Cho, M., Wood, T., & Lee, J. (2011). Environmental factors affecting indole production in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 162(2), 108-116. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.11.005>

Hancock, R. E., & Brinkman, F. S. (2002). Function of Pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 17-38. DOI: <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160310>.

Hawkey, P. M. (2006). Identification of Enterobacteriaceae. In Stephen Gillespie & Peter M. Hawkey (Eds.), *Principles and Practice of Clinical Bacteriology* (pp. 341-443). *John Wiley & Sons*. ISBN-13: 978-0-470-84976-7

Hiltunen, T., Virta, M., & Laine, A.-L. (2017). Antibiotic resistance in the wild: An eco-evolutionary perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1712), 20160039. DOI: <http://doi.org/10.1098/rstb.2016.0039>.

Holzbauer, S., & Chiller, T. (2006). Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Emerging Infectious Diseases*, 12(7), 1180. DOI: <http://doi.org/10.3201/eid1207.060503>.

Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336(6086), 1268-1273. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1223490>

Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J. B., Wei, L., Li, J., & Chen, Z.-S. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). DOI: <http://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>.

Hückstädt, L. (2015). *Mirounga angustirostris*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T13581A45227116. DOI: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T13581A45227116.en>.

Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion In Microbiology*, 51, 72-80. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.

Iredell, J., Brown, J., & Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: Mechanisms and clinical implications. *BMJ*, 352. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.h6420>

Isaac, J. (2005). Potential causes and life-history consequences of sexual size dimorphism in mammals. *Mammal Review*, 35, 101-115. DOI: <http://doi.org/10.1111/J.1365-2907.2005.00045.X>.

Jang, J., Park, J., Hwang, C. Y., Choi, J., Shin, J., Kim, Y. M. & Lee, B. Y. (2022). Abundance and diversity of antibiotic resistance genes and bacterial communities in the western Pacific and Southern Oceans. *Science of the Total Environment*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153360>

Jobbins, S., & Alexander, K. (2015). From whence they came—antibiotic-resistant *Escherichia coli* in African wildlife. *Journal Of Wildlife Diseases*, 51(4), 811-820. DOI: <https://doi.org/10.7589/2014-11-257>

Johnson, S., Nolan, S., & Gulland, F. (1998). Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from pinnipeds stranded in central and northern California. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 29(3), 288-294.

Junge, R. E., Barrett, M. A., & Yoder, A. D. (2011). Effects of anthropogenic disturbance on indri (*Indri indri*) health in Madagascar. *American Journal of Primatology*, 73(7), 632-642. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajp.20938>

Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W., & Walsh, C. (2005). Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chemical Reviews*, 105(2), 425–448. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr030103a>

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

Karkman, A., Pärnänen, K., & Larsson, D.(2019). Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nat. Commun.*, 10, 80. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07992-3>

Keen, P. L., & Montforts, M. (2012). Resistance in the environment. *Wiley Blackwell: New-Jersey, Canada*. ISBN:9780470905425

Knutie, S. A. (2018). Relationships among introduced parasites, host defenses, and gut microbiota of Galapagos birds. *Ecosphere*, 9(5), e02286. DOI: <https://doi.org/10.1002/ecs2.2286>

Kohanski, M., Dwyer, D., & Collins, J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423-435. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>

Kohl, K. D., Cary, T. L., Karasov, W. H., & Dearing, M. D. (2015). Larval exposure to polychlorinated biphenyl 126 (PCB-126) causes persistent alteration of the amphibian gut microbiota. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(5), 1113-1118. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.2905>

Kümmerer, K. (2003). Significance of antibiotics in the environment. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(2), 317-317. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg386>

Laborda, P., Sanz-García, F., Ochoa-Sánchez, L. E., Gil-Gil, T., Hernando-Amado, S., & Martínez, J. L. (2022). Wildlife and antibiotic resistance. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 873989. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.873989>

Larsson, D. (2014). Antibiotics in the environment. *Upsala Journal Of Medical Sciences*, 119(2), 108-112. DOI: <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.896438>

Larsson, J., & Flach, C. F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5). DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>

Lawson, A., Dassama, M., Ward, L., & Threlfall, E. (2002). Multiply Resistant (MR) *Salmonella enterica* Serotype typhimurium DT 12 and DT 120: A Case of MR DT 104 in Disguise? *Emerging Infectious Diseases*, 8, 434 - 436. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid0804.010348>.

Le Boeuf, B.J. (1972) Sexual behavior in the northern elephant seal *Mirounga angustirostris*. *Behavior* 41: 1-26.

Le Boeuf, B. J., & Richard M. L (1994) Elephant Seals: Population Ecology, Behavior, and Physiology. Berkeley: *University of California Press*, Recuperado de:

<http://ark.cdlib.org/ark:/13030/ft7b69p131/>

León-Rodríguez, A., Caño-Muñiz, S., Liu, J., & Summers, D. (2016). Indole modifies the central carbon flux in the anaerobic metabolism of *Escherichia coli*: application to the production of hydrogen and other metabolites. *New Biotechnology*, 33 6, 868-873. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.09.005>.

Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), 34-44. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>

Literak, I., Dolejska, M., Radimersky, T., Klimes, J., Friedman, M., Aarestrup, F. M. & Cizek, A. (2010). Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), 1702-1711. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04572.x>

Lorenzo, E., Cobb, K., Furtado, J., Schneider, N., Anderson, B., Bracco, A., Alexander, M., & Vimont, D. (2010). Central Pacific El Niño and decadal climate change in the North Pacific Ocean. *Nature Geoscience*, 3, 762-765. DOI: <https://doi.org/10.1038/NGEO984>.

Lv, B., Cui, Y., Tian, W., Wei, H., Chen, Q., Liu, B., & Xie, B. (2020). Vessel transport of antibiotic resistance genes across oceans and its implications for ballast water management. *Chemosphere*, 253, 126697. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126697>

Lynch, J. P., 3rd, Clark, N. M., & Zhanel, G. G. (2013). Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum β -lactamases and carbapenemases). *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 14(2), 199–210. DOI: <https://doi.org/10.1517/14656566.2013.763030>

Macdonald, R., Morton, B., & Johannessen, S. (2003). A review of marine environmental contaminant issues in the North Pacific: The dangers and how to identify them. *Environmental Reviews*. DOI: <https://doi.org/10.1139/A03-017>

Marcelino, V. R., Wille, M., Hurt, A. C., González-Acuña, D., Klaassen, M., Schlub, T. E. (2019). Meta-Transcriptomics Reveals a Diverse Antibiotic Resistance Gene Pool in Avian Microbiomes. *BMC Biology*. 17, 31. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0649-1>

Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution*, 157(11), 2893-2902. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.051>

Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, 33-39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>

Martínez, J. L., Baquero, F., & Andersson, D. I. (2011). Beyond serial passages: new methods for predicting the emergence of resistance to novel antibiotics. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(5), 439-445. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.07.005>

Mills, S., Stanton, C., Lane, J., Smith, G., & Ross, P. (2019). Precision Nutrition and the Microbiome, Part I: Current State of the Science. *Nutrients*, 11. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11040923>.

McKenney, E. A., Greene, L. K., Drea, C. M., & Yoder, A. D. (2017). Down for the count: *Cryptosporidium* infection depletes the gut microbiome in Coquerel's sifakas. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 28(1), 1335165. DOI: <https://doi.org/10.1080/16512235.2017.1335165>

McNamara, J., & Houston, A. (1996). State-dependent life histories. *Nature*, 380, 215-221. DOI: <https://doi.org/10.1038/380215A0>.

Mehrad, B., Clark, N., Zhanel, G., & Lynch, J. (2015). Antimicrobial resistance in hospital-acquired Gram-negative bacterial infections. *Chest*, 147 5, 1413-1421 . DOI: <https://doi.org/10.1378/chest.14-2171>.

Munita, J., & Arias, C. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A., McManigal, B., & Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0)

Navarro, F., Miró, E., & Mirelis, B. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(9), 638-645. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.05.002>

Neu, H. C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257(5073), 1064-1073. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.257.5073.1064>

Nogales, B., Lanfranconi, M. P., Piña-Villalonga, J. M., & Bosch, R. (2011). Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(2), 275-298. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00248.x>

Noren, S. R., Boness, D. J., Iverson, S. J., McMillan, J., & Bowen, W. D. (2003). Body condition at weaning affects the duration of the postweaning fast in gray seal pups (*Halichoerus grypus*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 81(3), 269–277. DOI: <https://doi.org/10.1086/528777>

Onwugamba, F. C., Fitzgerald, J. R., Rochon, K., Guardabassi, L., Alabi, A., Kühne, S. (2018). The Role of 'Filth Flies' in the Spread of Antimicrobial Resistance. *Travel Med. Infect. Dis.* 22, 8–17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2018.02.007>

Österblad, M., Hakanen, A., Manninen, R., Leistevuo, T., Peltonen, R., Meurman, O., & Kotilainen, P. (2000). A between-Species Comparison of Antimicrobial Resistance in Enterobacteria in Fecal Flora. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1479-1484. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.44.6.1479-1484.2000>.

Pankey, G. A., & Sabath, L. D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram-positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38(6), 864–870. DOI: <https://doi.org/10.1086/381972>

Pärnänen, K. M. M., Narciso-Da-Rocha, C., Kneis, D., Berendonk, T. U., Cacace, D., Do, T. (2019). Antibiotic Resistance in European Wastewater Treatment Plants Mirrors the Pattern of Clinical Antibiotic Resistance Prevalence. *Science Advances*. 5, eaau9124. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau9124>

Partridge, L., & Harvey, P. (1988). The Ecological Context of Life History Evolution. *Science*, 241, 1449 - 1455. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.241.4872.1449>.

Paterson, D. L. (2006). Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *American Journal of Infection Control*, 34(5), S20-S28. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.238>

Peterson, S., Peterson, M., Debier, C., Covaci, A., Dirtu, A., Malarvannan, G., Crocker, D., Schwarz, L., & Costa, D. (2015). Deep-ocean foraging northern elephant seals bioaccumulate persistent organic pollutants. *The Science of the total environment*, 533, 144-55 . DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.097>.

Ramey, A., & Ahlstrom, C. (2020). Antibiotic resistant bacteria in wildlife: perspectives on trends, acquisition and dissemination, data gaps, and future directions. *Journal Of Wildlife Diseases*, 56(1), 1. DOI: <https://doi.org/10.7589/2019-04-099>

Ramsby, B. D., Hoogenboom, M. O., Whalan, S., & Webster, N. S. (2018). Elevated seawater temperature disrupts the microbiome of an ecologically important bioeroding sponge. *Molecular Ecology*, 27(8), 2124–2137. DOI: <https://doi.org/10.1111/mec.14544>

Reeves, D. S. (1984). Chemistry of Sulfonamides: Antimicrobial Activity and Resistance Mechanisms. *Clinical Infectious Diseases*, 6(Supplement_3), S314-S327. DOI: https://doi.org/10.1093/clinids/6.Supplement_3.S314

Reiter, J., Stinson, N.L. & Le Boeuf, B.J. (1978). Northern elephant seal development: The transition from weaning to nutritional independence. *Behav Ecol Sociobiol* 3, 337–367, DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00303199>

Ribas, M. P., García-Ulloa, M., Espunyes, J., & Cabezón, O. (2023). Improving the assessment of ecosystem and wildlife health: Microbiome as an early indicator. *Current opinion in biotechnology*, 81, 102923. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2023.102923>

Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., & Ploy, M. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of the Total Environment*, 447, 345-360. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.032>

Romano, A., Ladero, V., Álvarez, M., & Lucas, P. (2014). Putrescine production via the ornithine decarboxylation pathway improves the acid stress survival of *Lactobacillus brevis* and is part of a horizontally transferred acid resistance locus. *International Journal Food Microbiology*, 175, 14-9 . DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.009>.

Rutherford, I., Moody, V., Gavan, T., Ayers, L., & Taylor, D. (1977). Comparative study of three methods of identification of Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 5, 458 - 464. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.5.4.458-464.1977>.

Sabtu, N., Enoch, D. A., & Brown, N. M. (2015). Antibiotic resistance: What, why, where, when and how? *British Medical Bulletin*, Idv041. DOI: <https://doi.org/10.1093/bmb/ldv041>

Savage, D. (1986). Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. *Annual review of nutrition*, 6,155-78.DOI: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NU.06.070186.001103>.

Sekirov, I., Russell, S., Antunes, L., & Finlay, B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, 90 3, 859-904 . DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>.

Sherman-Cooney, R. A., Ortiz, R. M., Noren, D. P., Pagarigan, L., Ortiz, C. L., & Talamantes, F. (2005). Estradiol and testosterone concentrations increase with fasting in weaned pups of the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(1), 55-59. DOI: <https://doi.org/10.1086/425193>

Shu, Y., Hong, P., Tang, D., Qing, H., Omondi Donde, O., Wang, H. & Wu, H. (2019). Comparison of intestinal microbes in female and male Chinese concave-eared frogs (*Odorrana tormota*) and effect of nematode infection on gut bacterial communities. *MicrobiologyOpen*, 8(6), e00749. DOI: <https://doi.org/10.1002%2Fmbo3.749>

Silva, N., Igrejas, G., Rodrigues, P., Rodrigues, T., Gonçalves, A., Felgar, A. C. & Poeta, P. (2011). Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum β -lactamase-containing *Escherichia coli* isolates in wild birds from the Azores Archipelago. *Avian Pathology*, 40(5), 473-479. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.599061>

Schilling, A. K., Mazzamuto, M. V., & Romeo, C. (2022). A Review of Non-Invasive Sampling in Wildlife Disease and Health Research: What's New?. *Animals*, 12(13), 1719. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fani12131719>

Schoeman, R. P., Patterson-Abrolat, C., & Plön, S. (2020). A global review of vessel collisions with marine animals. *Frontiers in Marine Science*, 7, 292. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00292>

Squadrone, S. (2020). Water environments: metal-tolerant and antibiotic-resistant bacteria. *Environmental monitoring and assessment*, 192(4), 238. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-020-8191-8>

Stewart, B. S., & Huber, H. R. (1993). *Mirounga angustirostris*. *Mammalian Species*, (449), 1-10. *The American Society of Mammalogists*. Recuperado de: <https://www.science.smith.edu/departments/Biology/VHAYSEN/msi/pdf/i0076-3519-449-01-0001.pdf>

Stoffel, M. A., Acevedo-Whitehouse, K., Morales-Durán, N., Grosser, S., Chakarov, N., Krüger, O., Nichols, H., Elorriaga, F. & Hoffman, J. I. (2020). Early sexual dimorphism in the developing gut microbiome of northern elephant seals. *Molecular ecology*, 29(11), 2109-2122. DOI: <https://doi.org/10.1111/mec.15385>

Sun, J., Liao, X. P., D'souza, A. W., Boolchandani, M., Li, S. H. & Cheng, K (2020). Environmental Remodeling of Human Gut Microbiota and Antibiotic Resistome in Livestock Farms. *Nat. Commun.* 11, 1427. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15222-y>

Sun, Y., Yu, Y., Guo, J., Zhong, L., & Zhang, M. (2023). Alterations in fecal microbiota linked to environment and sex in red deer (*Cervus elaphus*). *Animals*, 13(5), 929. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13050929>

Sutton, S. (2011). Determination of inoculum for microbiological testing. *Journal of GXP Compliance*, 15(3), 49. Recuperado de: http://microbiologynetwork.com/content/file/JGXP_2011_v15n3_Determination-of-Inoculum-for-Microbiological-Testing.pdf

Swift, B. M., Bennett, M., Waller, K., Dodd, C., Murray, A., Gomes, R. L., & Arnold, K. E. (2019). Anthropogenic environmental drivers of antimicrobial resistance in wildlife. *Science of the Total Environment*, 649, 12-20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.180>

Teyssier, A., Rouffaer, L. O., Hudin, N. S., Strubbe, D., Matthysen, E., Lens, L., & White, J. (2018). Inside the guts of the city: urban-induced alterations of the gut microbiota in a wild passerine. *Science of the Total Environment*, 612, 1276-1286. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.035>

Trevelline, B. K., Fontaine, S. S., Hartup, B. K., & Kohl, K. D. (2019). Conservation biology needs a microbial renaissance: a call for the consideration of host-associated microbiota in wildlife management practices. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1895), 20182448. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2448>

Trillmich, F. (1986). Maternal investment and sex-allocation in the Galapagos fur seal, *Arctocephalus galapagoensis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 19, 157-164. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00300855>.

Trites, A. (1991). Fetal growth of northern fur seals: life-history strategy and sources of variation. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 2608-2617. DOI: <https://doi.org/10.1139/Z91-367>.

Vakulenko, S. B., & Mobashery, S. (2003). Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 430–450. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.430-450.2003>

Valeri, F., & Endres, K. (2021). How biological sex of the host shapes its gut microbiota. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 61, 100912. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2021.100912>

Vittecoq, M., Godreuil, S., Prugnotte, F., Durand, P., Brazier, L., Renaud, N., Arnal, A., Aberkane, S., Jean-Pierre, H., Gauthier-Clerc, M., Thomas, F., & Renaud, F. (2016). Antimicrobial resistance in wildlife. *Journal of Applied Ecology*, 53(2), 519–529. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12596>

Walk, S. T., Blum, A. M., Ewing, S. A. S., Weinstock, J. V., & Young, V. B. (2010). Alteration of the murine gut microbiota during infection with the parasitic helminth *Heligmosomoides polygyrus*. *Inflammatory Bowel Diseases*, 16(11), 1841-1849. DOI: <https://doi.org/10.1002%2Fibd.21299>

Wellington, E. M., Boxall, A. B., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., & Williams, A. P. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(2), 155-165. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70317-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70317-1).

Wintersdorff, C., Penders, J., Niekerk, J., Mills, N., Majumder, S., Alphen, L., Savelkoul, P., & Wolfs, P. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>.

Wiley, D., & Clapham, P. (1993). Does maternal condition affect the sex ratio of offspring in humpback whales?. *Animal Behaviour*, 46, 321-324. DOI: <https://doi.org/10.1006/anbe.1993.1193>

Wilkins, L. J., Monga, M., & Miller, A. W. (2019). Defining dysbiosis for a cluster of chronic diseases. *Scientific reports*, 9(1), 12918. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49452-y>

Xia, J., Lu, L., Jin, C., Wang, S., Zhou, J., Ni & Jin, Y. (2018). Effects of short term lead exposure on gut microbiota and hepatic metabolism in adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 209, 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.03.007>

Zenker, A., Cicero, M. R., Prestinaci, F., Bottoni, P., & Carere, M. (2014). Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *Journal of Environmental Management*, 133, 378-387. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.12.017>

Zhang, P. Y., Xu, P. P., Xia, Z. J., Wang, J., Xiong, J., & Li, Y. Z. (2013). Combined treatment with the antibiotics kanamycin and streptomycin promotes the conjugation of *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 348(2), 149-156. DOI: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12282>

Zhang, X., Zhang, T., & Fang, H. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 397-414. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1829-z>.