

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Cambios temporales en la carga bacteriana entérica de crías de lobo marino de California (*Zalophus californianus*)

Tesis

Para obtener el Grado de Maestría en Recursos Bióticos

Presenta:

M.V.Z. Adriana Estefania Flores Morán

Directora:

Karina A. Acevedo Whitehouse



Querétaro, Querétaro, a 03 de octubre del 2014



Universidad Autónoma de Querétaro
 Facultad de Ciencias Naturales
 Maestría en Recursos Bióticos

Cambios temporales en la carga bacteriana entérica de crías de lobo marino de California (*Zalophus californianus*)
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestría en Recursos Bióticos

Presenta:
 Adriana Estefanía Flores Morán

Dirigido por:
 Karina A. Acevedo Whitehouse

Karina A. Acevedo Whitehouse
Presidente

Firma

Milagros González Hernández
Secretario

Firma

Rolando Tenoch Bárcenas Luna
Vocal

Firma

Andrea Margarita Olvera Ramírez
Vocal

Firma

Fausto Arellano Carbajal
Suplente

Firma

Dra. Teresa Margarita de Jesús García Gasca
 Director de la Facultad

Dr. Irineo Torres Pacheco
 Director de Investigación y Posgrado

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
DEDICATORIA.....	9
AGRADECIMIENTOS.....	10
INTRODUCCIÓN	11
I. ANTECEDENTES	13
I.1. INTERACCIONES COEVOLUTIVAS ENTRE ESPECIES.....	13
I.1.2. TIPOS DE INTERACCIONES COEVOLUTIVAS.....	16
I.2. INTERACCIÓN BACTERIAS-HOSPEDERO.....	20
I.3. TRACTO DIGESTIVO DE CARNÍVOROS.....	23
I.4. MICROBIOTA DEL TRACTO DIGESTIVO DE LOS CARNIVOROS.....	25
I.4.1 PROTOZOARIOS.....	26
I.4.2. HONGOS.....	27
I.4.3. BACTERIÓFAGOS.....	27
I.4.4. VIRUS.....	28
I.4.5. ARQUEAS.....	29
I.4.6. BACTERIAS.....	29
I.5. PRIMER CONTACTO DE LAS BACTERIAS Y PROCESO DE ADQUISICIÓN DEL HOSPEDERO.....	31
I.5. PROCESOS EN LOS QUE PARTICIPAN LAS BACTERIAS INTESTINALES.....	32
I.5.1. METABOLISMO Y NUTRICIÓN.....	32
I.5.2. EL SISTEMA INMUNE DEL TRACTO DIGESTIVO.....	34
I.6. CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.....	37
I.7. EFECTO DE LA MICROBIOTA SOBRE LA SALUD DE LOS HOSPEDEROS.....	39
I.8. DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA INMUNE ENTRE SEXOS.....	41
I.8. LA MICROBIOTA DE LOS MAMÍFEROS MARINOS.....	42
I.9. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA.....	43
I.10. EL LOBO MARINO DE CALIFORNIA (<i>Zalophus californianus</i>) COMO ORGANISMO MODELO.....	45
II. HIPÓTESIS	51

III. OBJETIVOS	51
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	52
IV.1. ÁREA DE ESTUDIO.....	52
IV.1.2. GOLFO DE CALIFORNIA.....	52
IV.2. TRABAJO DE CAMPO	53
IV.3. TRABAJO DE LABORATORIO	55
IV.3.1. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA.....	55
IV.3.2. CONFIRMACIÓN MOLECULAR	55
V. ANÁLISIS DE DATOS	57
V.1 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN BACTERIANA ENTÉRICA CULTIVABLE.....	57
VI. RESULTADOS	58
VII. 1 IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR	59
VII.2. NÚMERO DE BACTERIAS ENTÉRICAS CULTIVABLES.....	59
VII.3. BACTERIAS ENTÉRICAS CULTIVABLES Y CONDICIÓN CORPORAL.....	68
VII.4. VARIACIÓN DEL NÚMERO DE BACTERIAS ENTÉRICAS CULTIVABLES ENTRE MACHOS Y HEMBRAS	68
VII.5. EFECTO DEL ESTADO DE SALUD SOBRE EL NÚMERO DE BACTERIAS ENTÉRICAS CULTIVABLES .	69
VII.6. INTERACCIONES BACTERIANAS	73
VIII. DISCUSIÓN	74
IX. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	81
X. LITERATURA CITADA	82
XI. ANEXOS	92
XI.1. Anexo I Protocolos de pruebas bioquímicas.....	92
XI.2. Anexo II. Resultados de la identificación de colonias por medio de secuenciación.....	94

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Modelo que explica el origen de la mitocondria y cloroplastos	14
Figura 2. Interacciones simbióticas en arrecifes corales y micorrizas.	16
Figura 3. Esquema de los tipos de interacciones entre especies.	20
Cuadro 1. Ejemplo de interacciones entre bacterias y hospederos de distintos phyla, y efectos conocidos en el hospedero	21
Figura 4. Principales capas que conforman el tracto digestivo	24
Cuadro 2. Productos finales, como resultado del metabolismo de las bacterias y su efecto en el hospedero.	34
Figura 5. Desarrollo y maduración del tejido linfoide asociado a mucosas	36
Cuadro 3. Cambios en la microbiota normal del humano que han sido asociados a enfermedades no infecciosas.....	40
Cuadro 4. Técnicas moleculares para el estudio de la diversidad bacteriana.....	45
Figura 6. Mapa de distribución del lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>). Tomado de IUCN.	46
Figura 7. Características morfológicas de acuerdo a la edad	47
Cuadro 5. Tasas de mortalidad en porcentaje en el lobo marino de California en el Golfo de California de acuerdo a la edad y sexo.....	49
Figura 8. Área del Golfo de California.....	52
Figura 9. Loberas de <i>Zalophus californianus</i> en la región de las grandes islas y el alto Golfo, en el norte del Golfo de California (Tomado Google earth).....	53
Figura 10. Descripción de la toma de muestras para cada lobo marino.	54
Cuadro 6. Componentes para las reacciones de la PCR.	56
Figura 11. Condiciones para la PCR.....	56
Cuadro 7. Muestras obtenidas de crías de acuerdo al sexo y edad.	59
Cuadro 8. Características morfológicas y bioquímicas de las colonias obtenidas.....	60
Cuadro 9. Presencia-ausencia de bacterias identificadas de acuerdo a la edad.	61
Figura 12. Frecuencia de los diferentes tipos de bacterias identificados de acuerdo a la edad de las crías	62
Cuadro 10. Valores de riqueza de las bacterias para determinar la completitud del inventario de las bacterias cultivables por edad de las crías	63
.....	64
Figura 13. Histograma de frecuencias del número de bacterias entéricas cultivables.	64
.....	65
Figura 14. Histograma de frecuencias del número de bacterias entéricas cultivables para cada edad... 65	
Figura 15. Análisis de distribución de los datos de número de bacterias entéricas cultivables de crías de lobo marino de California de acuerdo a Cullen y Frey (1999).	66

Figura 16. Número de bacterias cultivables de acuerdo a la edad.....	67
Cuadro 11. Modelo lineal generalizado del efecto de la condición corporal sobre el número de bacterias entéricas cultivables.....	68
Figura 17. Número de bacterias entéricas cultivables de crías de lobo marino de California machos y hembras para cada edad muestreada	69
Cuadro 12. Modelo lineal generalizado para el efecto de los linfocitos circulantes sobre el número de total de bacterias cultivables	70
Figura 18. Presencia de <i>E. coli</i> en individuos con valores normales para estándares clínico (12-36% datos reportados por el Centro de Mamíferos Marinos –TMMC, por sus siglas en inglés) y fuera de ese intervalo.....	71
Cuadro 13. Modelo lineal generalizado para evaluar el efecto de los neutrófilos circulantes sobre el número de total de bacterias cultivables	72
Cuadro 14. Modelo lineal generalizado para evaluar el efecto de la presencia de adenovirus o de rotavirus sobre el número de bacterias cultivables.....	72
Figura 19. Asociaciones entre diferentes tipos de bacterias	73

RESUMEN

Las comunidades bacterianas están estrechamente asociadas con sus hospederos y cambios en la diversidad y abundancia de estas comunidades pueden, por un lado, reflejar la etapa de historia de vida del individuo, y por el otro influir sobre su estado de salud. Se realizó un marco ecológico para caracterizar la composición bacteriana entérica cultivable durante el desarrollo temprano de crías de lobo marino de California, *Zalophus californianus*, e investigar cambios y asociaciones relacionadas al desarrollo, comportamiento y salud de 19 crías neonatas, 23 crías de dos meses, 7 crías de cinco meses y 4 crías de 12 meses de edad. La diversidad de bacterias entéricas fue significativamente mayor para las crías de dos meses (Kruskal-Wallis_{3,75}=58.62, p=0.0001) que para el resto de las edades, y la diversidad bacteriana varió entre sexos a los dos (Chi²₁ =14.727; p=1.24X10⁻⁰⁴) y a los cinco meses (Chi²₁ =4; p=0.04), siendo mayor en las hembras. También, se encontraron diferencias en la diversidad bacteriana de las crías machos neonatos y de dos meses (Chi²₁ =6.898; p=0.008) y entre crías hembras de dos y cinco meses (Chi²₁ =5.157; p=0.02). Los valores de linfocitos influyeron sobre la presencia de *E. coli* (ANOVA, X²_{1,53}=35.906, p=0.01713). La condición corporal y la presencia de adenovirus y rotavirus no determinaron la diversidad de bacterias cultivables. Nuestros resultados sugieren que los cambios en la diversidad bacteriana entérica reflejan cambios en la historia de vida, como la alimentación, aspectos conductuales y, posiblemente, cambios en gastos energéticos y exposición a patógenos. En este sentido, el marco aquí propuesto puede ser útil como herramienta para estudiar la historia de vida temprana de los pinnípedos, además, de que se podrían monitorear e identificar periodos de vulnerabilidad en el estado de salud de las crías.

Palabras clave: bacterias cultivables, cría de lobo marino, cambios temporales

ABSTRACT

Bacterial communities are closely associated with their host and, thus, changes in diversity and abundance in the community could reflect the stage of an individual's life history, and could mirror to health condition. We used an ecology framework by characterize the culturable enteric bacterial composition during the early development of California sea lion, *Zalophus californianus*, pups, and investigated temporal changes and associations with development, behaviour, and health of 19 neonate pups, 23 two month-old pups, 7 five month-old pups, and four 12 month-old pups. The enteric bacterial diversity was significantly higher for two month-old pups (Kruskal-Wallis_{3,75}=58.62, p=0.0001), and bacterial diversity was different between sexes for pups of two ($\text{Chi}^2_1=14.727$; p=1.24X10⁻⁰⁴) and five ($\text{Chi}^2_1=4$; p=0.04) months of age, being higher in females than in males. Also, we found differences between bacterial diversity of neonate males ($\text{Chi}^2_1=6.898$; p=0.008) and females at two and five months of age ($\text{Chi}^2_1=5.157$; p=0.02). The number of circulating lymphocytes influenced the presence of *E. coli* (ANOVA, $X^2_{1,53}=35.906$, p=0.01713). Body condition, and infection by rotavirus and adenovirus did not impact pups' bacterial diversity. Our results suggest that enteric bacterial diversity reflects changes in life history, such as diet shifts, physiological intestinal changes, and variation in body condition plausibly caused by energetic trade-offs and pathogen exposure. In this sense, this framework could be useful as a tool for investigating early life history of pinnipeds.

Keywords: culture bacteria, sea lions pups, temporal changes

DEDICATORIA

A mis papás por su amor, enseñanzas y todo su apoyo.

A lo que más quiero en este mundo... Alí y José Luis.

A Karina por su paciencia y por contagiarme de su disciplina y amor por la ciencia y por ser un gran ejemplo a seguir. Gracias

AGRADECIMIENTOS

Agradecer al financiamiento del proyecto por parte de CONACYT

Al apoyo de la CONANP en las salidas de campo.

A mis papás y a mis hermanos por todo el apoyo que me han brindado siempre.

A mi familia Bertha, Raúl, Yasir, Cesar e Ivette, porque ustedes también han sido parte de todo esto.

A mis asesores Fausto, Rolando, Mila y Andrea, por todos sus consejos y apoyo en la realización de este proyecto.

A mis compañeros del GMEE por escucharme siempre, por sus consejos y hacer todo esto más ameno.

A Lucy, eres una pieza clave en todo esto, gracias por ser un gran apoyo durante estos dos años, por todos tus consejos y todo lo que me enseñaste!!! Thank you!!!.

Al D-15 por hacerme sentir siempre parte del grupo.

A José Luis porque desde que nos encontramos hemos planeado una vida juntos llena, no de errores sino de aprendizajes. Gracias por ser parte de todo lo que involucra seguir y lograr nuestros sueños. TE AMO.

A mi changuito Alisin, que me ha enseñado el valor de una familia unida, porque nunca imagine amar de la forma en que te amo. Más que ser mi motor para seguir adelante, eres quién me motiva a querer ser cada día mejor.

A Karina, por todo el apoyo que me has brindado y por creer siempre en mí durante estos tres años, por todos tus consejos, por dejarme ser parte del gran equipo de trabajo.

A mis amigos Karla, Alexis, Lety y Héctor, porque gracias a ustedes todo esto fue más divertido, por todo el apoyo que me han brindado y por dejarme ser parte de sus vidas... de verdad los estimo mucho.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia evolutiva han surgido diversos tipos de interacciones entre especies, las cuales les han permitido sobrevivir y permanecer dentro de la carrera evolutiva. La microbiota normal de los hospederos está compuesta por bacterias, protozoarios, hongos y virus, y constituye un ejemplo de interacciones simbióticas entre especies. Actualmente sabemos que la microbiota participa en diversas funciones dependiendo de la región que colonizan del hospedero (Guarner and Malagelada, 2003; Konstantinov et al., 2004). Tal es el caso del tracto digestivo, en el cual las bacterias, los microorganismos más abundantes de la microbiota participan activamente en procesos metabólicos y aspectos relacionados con el sistema inmune. Sin embargo, cuando la composición de la microbiota es alterada, los cambios pueden impactar la salud del hospedero o permitir el asentamiento de patógenos oportunistas (Bell et al., 2008; Konstantinov et al., 2004).

Si bien varios aspectos de la microbiota bacteriana, como su composición, impacto y función están bien descritos para animales domésticos y para el humano (Greetham et al., 2002; Janeczko et al., 2008; Konstantinov et al., 2004; Mcfarland, 2000; Simpson et al., 2002), se sabe muy poco acerca de la dinámica de las simbiosis en organismos silvestres. Los estudios en fauna silvestre han sido principalmente descriptivos y para algunos grupos, como los mamíferos marinos, han sido realizados principalmente en animales varados o muertos, que no representan a la población normal (Smith et al., 2009).

Debido a que la mayoría de las bacterias simbiotes que residen en el organismo se encuentran en el intestino (Hooper and Gordon, 2001), el sistema digestivo resulta un buen modelo para investigar la ontogenia y ecología de la microbiota bacteriana en poblaciones naturales de animales silvestres. En este sentido, tomando en cuenta su estilo de vida anfibio, su facilidad de acceso, sus etapas de desarrollo bien caracterizadas durante las etapas tempranas de vida y su dimorfismo sexual, el lobo marino de California

(Zalophus californianus) es un excelente modelo para realizar estudios sobre la microbiota bacteriana de carnívoros silvestres.

Además del valor científico que tiene un estudio de esta naturaleza, desde el punto de vista de la conservación y el manejo de los recursos naturales, es relevante señalar que la mayoría de las enfermedades cursan con una sucesión de eventos que pueden ocasionar cambios en la microbiota bacteriana (Hilty et al., 2010; Tremaroli and Bäckhed, 2012). El estudio temporal de la estabilidad de la composición bacteriana del lobo marino durante su desarrollo temprano podría ser de utilidad para detectar periodos críticos en los que sus poblaciones pueden estar más susceptibles al desafío de patógenos. Esta tesis busca investigar asociaciones entre la composición bacteriana entérica y aspectos biológicos y clínicos en crías de lobo marino de California. Se predice que la edad, el sexo, la condición corporal y estado general de salud afectarán la composición y abundancia de las bacterias del tracto digestivo.

I. ANTECEDENTES

I.1. INTERACCIONES COEVOLUTIVAS ENTRE ESPECIES

Las comunidades bióticas reflejan la historia coevolutiva de sus interacciones, por las cuales las especies han experimentado cambios recíprocos a través de la selección natural (Thompson, 2001). Algunas de estas interacciones han marcado etapas importantes a lo largo de la historia evolutiva, como lo fue el origen de la mitocondria, cuya función es proporcionar la mayoría de la energía derivada del rompimiento de los carbohidratos y ácidos grasos, que son convertidos en ATP mediante procesos de fosforilación oxidativa (Cooper, 2000). Se han propuesto dos hipótesis para explicar el origen de la mitocondria; la primera propone que una célula anaerobia nucleada fue capaz de fagocitar al mitocondrion, un aerobio obligado que tuvo la habilidad de eliminar el oxígeno de la célula anaerobia hospedera (Martin, 2010; Figura 1). La segunda propone que el hospedero del mitocondrion fue un procarionte, una arqueobacteria (Boxma et al., 2005; Cox et al., 2008). El mitocondrion probablemente fue un organismo anaerobio facultativo, quizá similar en fisiología y estilo de vida a las Rhodobacteriales modernas (Timmis et al., 2004). El beneficio inicial de esta simbiosis pudo haber sido la producción de hidrógeno (H_2) por el mitocondrion como un recurso de energía y electrones para la célula hospedera, la cual debió haber sido dependiente de H_2 (Martin, 2010). Este tipo de interacciones estrechas es frecuente en las comunidades bacterianas.

El origen de los cloroplastos es otro ejemplo de interacciones coevolutivas que han marcado una etapa crucial de la historia de vida. Los cloroplastos son organelos que permiten a las plantas captar la energía solar y usarla para producir moléculas ricas en energía (Moreira et al., 2000). De acuerdo con algunos análisis de la estructura y genoma de los cloroplastos, se sugiere que al igual que la mitocondria, los cloroplastos se originaron a partir de una interacción simbiótica entre una célula hospedera y un

procarionte fotosintético; interacción que dio como resultado que la célula hospedera fuera capaz de fagocitar al procarionte fotosintético (McFadden, 2001; Kutschera and Niklas, 2005). No obstante, la fotosíntesis apareció más tarde, cuando los procariontes fotosintéticos desarrollaron la habilidad de capturar la energía solar y usarla para producir moléculas ricas en energía. Una vez que estos organismos lograron romper moléculas de agua y usar los electrones de estas moléculas, las células fotosintéticas lograron generar oxígeno (Chan and Bhattacharya, 2010; Douglas, 1998) (Figura 1).

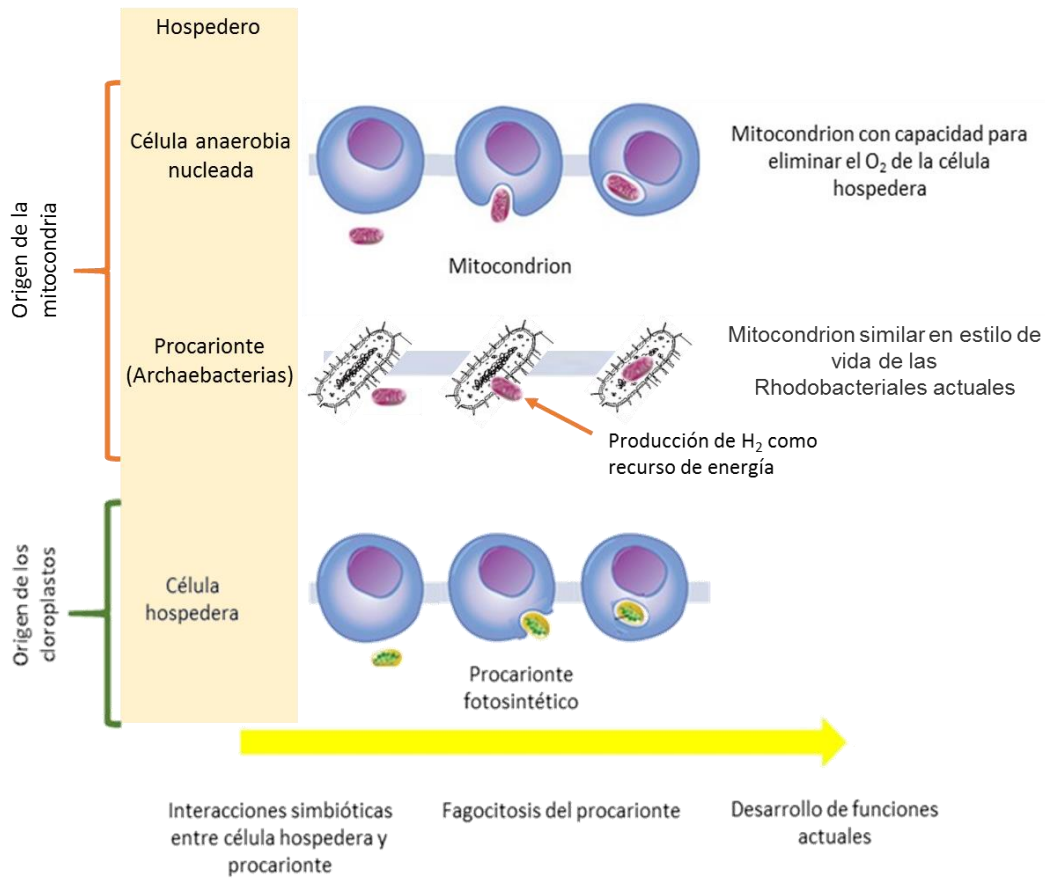


Figura 1. Modelo que explica el origen de la mitocondria y cloroplastos. Modificado de Nature Education, 2010.

Algunas de las interacciones entre microorganismos forman la base de las comunidades marinas. Un ejemplo de estas interacciones son los arrecifes coralinos, formados por la interacción entre corales vivos (Scleractinia), algas dinoflageladas y otros organismos calcificantes que extraen el carbonato de calcio (CaCO_3) del agua de mar (Stanley, 2006). El CaCO_3 se deposita y forma al esqueleto conocido de manera colectiva como arrecife sobre el que los dinoflagelados pueden sobrevivir. A su vez, los dinoflagelados suplementan casi el 90% de la energía necesaria para la nutrición del coral mediante la fotosíntesis (Hallock and Schlanger, 1986 citado en Stanley, 2006). Los arrecifes coralinos participan en diversas funciones ecosistémicas, entre ellos la regulación de la bioquímica del océano y también participan como barreras físicas de corrientes oceánicas y olas, creando un ambiente adecuado para el desarrollo de manglares y praderas marinas (Moberg and Folke, 1999).

En el ambiente terrestre otra de las interacciones que representa la base de las comunidades son las micorrizas. Estas se forman por interacciones entre, al menos, una especie de hongo y las raíces de una o más plantas (Andrade-torres, 2010; Smith et al., 2011). La distribución de las micorrizas está relacionada a la localización de las plantas, el clima y las condiciones del suelo (Dighton, 2009). Las micorrizas incrementan la habilidad de adquirir nutrientes y agua además de ofrecer protección contra patógenos (Dighton, 2009). Incluso se considera que las micorrizas tienen un papel multifuncional al interactuar con bacterias (Frey-Klett et al., 2007; Johansson et al., 2004), en procesos que incluyen la meteorización de minerales (Landeweert et al., 2001; van Hees et al., 2006), regulación del carbón (Stackebrandt et al., 2006), influencia sobre las comunidades de plantas (van der Heijden et al., 1998), síntesis tripartita con micoheterótrofos (Bidartondo, 2005; Leake, 2004) y la capacidad para modular las respuestas de la planta frente a condiciones de estrés (Finlay, 2008) (Figura 2).

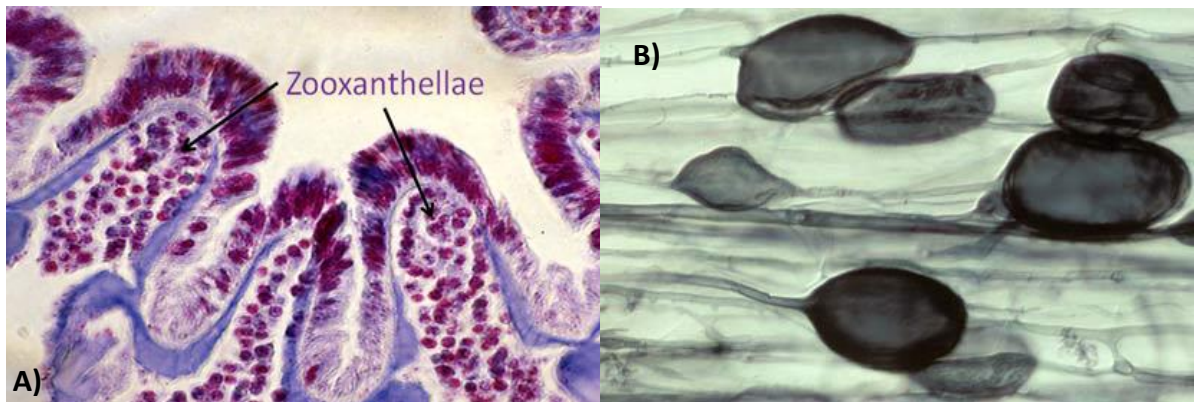


Figura 2. Interacciones simbióticas en arrecifes corales y micorrizas. A) Corte sagital de un arrecife coral, que muestra la interacción entre el alga zooxanthellae y un coral (tomado de Monteiro, 2012). B) Vesículas de un hongo de la especie *Glomus* en una raíz de puerro (tomada de Brundrett, 2008).

I.1.2. TIPOS DE INTERACCIONES COEVOLUTIVAS

Las especies interactúan entre sí de diversas maneras, que en general pueden ser definidas como *intra-específicas*, que son aquellas que se dan entre los individuos de una misma especie, y como *inter-específicas*, que ocurren entre individuos de dos o más especies (Holland, 2012; Lang and Benbow, 2013). Las especies también interactúan a través de la simbiosis que engloba interacciones como competencia, depredación, amensalismo, neutralismo y protocooperación (Lang and Benbow, 2013).

El término **simbiosis** fue usado por primera vez por Heinrich Anton de Bary, un botánico alemán que en 1879 la describió como la interacción entre un hongo y un alga que daba origen a los líquenes. De manera más amplia la interacción se definió como dos organismos que viven juntos, usualmente en íntima asociación y donde al menos una de

las partes es beneficiada (Margulis and Sagan, 2008). Más recientemente la definición de simbiosis se amplió para incluir interacciones antagónicas y neutrales que además pueden cambiar a lo largo del tiempo (Ellison et al., 1996).

El **mutualismo** es una relación simbiótica en la cual ambas partes se benefician de la interacción (Krebs, 2001). Puede ser **facultativa** cuando las especies pueden sobrevivir de manera independiente aunque no con la misma ventaja que cuando se encuentra en simbiosis, u **obligado** cuando las especies involucradas no pueden sobrevivir fuera de la simbiosis (Landry, 2012; Lang and Benbow, 2013).

El **amensalismo** ocurre cuando una especie inhibe el crecimiento (reproducción) de otra especie, la especie que inhibe el crecimiento no resulta afectada de manera negativa como resultado de esta interacción (Moon et al., 2010). Mientras que la **cooperación o protocooperación** es una interacción no obligatoria en la cual ambas partes se benefician, sin embargo ambas partes pueden sobrevivir sin esta interacción (Hiller, 1991; Semion, 1997).

En el caso **neutralismo**, dos poblaciones pueden ser capaces de interactuar sin tener ningún efecto sobre aspectos de eficacia biológica, sin embargo debido a que en los ecosistemas todos los organismos están conectados o relacionado de alguna forma, una interacción de verdadero neutralismo es difícil de demostrar (Moon et al., 2010).

El **comensalismo** es una interacción en la cual una de las partes es beneficiada, mientras que la otra parte no es ni beneficiada ni perjudicada (Hooper and Gordon, 2001). Un ejemplo clásico de este tipo de interacción se observa en las orquídeas (epífitas) que se encuentran en los bosques tropicales y crecen sobre las ramas de los árboles para tener un mayor acceso a la luz. El árbol no tiene ningún tipo de efecto provocado por esta interacción. El comensalismo puede ser difícil de identificar debido a que los beneficios pueden ser directos o indirectos y no siempre son detectables.

La **competencia** es una interacción en la que dos o más organismos tratan de tener ventaja sobre algún recurso limitado en común (p.ej. presa, apareamiento, territorio,

sitios de anidación) (Krebs, 2001) y de manera general se define como una interacción directa o indirecta entre los organismos que lleva a un cambio sobre la eficacia biológica ("*fitness*") cuando se comparte un mismo recurso. La competencia usualmente tiene efectos negativos sobre aquellos organismos que no sean tan eficientes en la depredación (Moon et al., 2010).

Además de la competencia por la comida o el espacio, las especies pueden interactuar a través de la **depredación** que de manera general ocurre cuando una especie se alimenta de otra (Abrams, 1987). La depredación se define como la acción de un organismo (depredador) que se alimenta de otro (presa) (Moon et al., 2010). Este tipo de interacción provee de energía al depredador, incrementando su tiempo de vida y su probabilidad de reproducirse, mientras que la presa queda fuera de la carrera evolutiva. A nivel poblacional, el número de presas es reducido por el depredador (Colinvaux, 1993; Krebs, 2001). Los ejemplos mejores conocidos de depredación son lo que incluyen a los carnívoros a los herbívoros; sin embargo también se sabe que la depredación se da a distintos niveles como los protozoarios depredadores de bacterias y de otros protozoarios, y algunas plantas que atrapan y se alimentan de algunos insectos (Lang and Benbow, 2013). También existen situaciones en las cuales la disponibilidad de alimento es escasa, lo que da como resultado otro tipo de interacciones como el canibalismo en donde los individuos de una especie se alimentan de individuos de su misma especie, como un mecanismo de supervivencia bajo condiciones adversas (Huss et al., 2010). La depredación ha sido considerada como una "carrera evolutiva armamentista" en donde tanto la presa como el depredador desarrollan estrategias para permanecer dentro de la carrera evolutiva (Lang and Benbow, 2013), ya que ejerce una fuerza de selección simultánea sobre presa y depredador (Krebs, 2001).

La depredación también puede estar relacionada con la competencia cuando diferentes especies se alimentan de la misma presa y este tipo de interacción tiene efectos sobre la distribución de especies, la abundancia de presas, y la organización y estructura de comunidades (Lang and Benbow, 2013).

En el **parasitismo**, el parásito y el hospedero viven en estrecha comunicación (Krebs, 2001), y el parásito se beneficia a costa del hospedero, causando efectos detrimentales de severidad variable (Stevens, 2012; Lang and Benbow, 2013).

El parasitismo juega un papel importante en los ecosistemas, aunque – al igual que lo que ocurre con las otras interacciones simbióticas - aún se conoce relativamente poco sobre la forma en la que estas han evolucionado (Nechaev and Severinov, 2008). Sin embargo, se sabe que en las simbiosis parasitarias los parásitos típicamente evolucionan más rápido que los hospederos debido a una asimetría en el tiempo generacional, tasa de mutación o incluso a la importancia de la interacción (Moran et al. 1995; Bergstrom and Lachmann 2003). En un intento por entender cómo es que estos procesos han evolucionado se propuso la hipótesis de la Reina Roja, que describe a las interacciones entre especies como una carrera armamentista para obtener ventaja y así favorecer una tasa rápida de evolución (Damore and Gore, 2012).

La hipótesis de la Reina Roja (Van Valen, 1974), es una metáfora del cuento de “Alicia en el país de la maravillas”, de Lewis Carroll, que explica aspectos de evolución y cambios genéticos adaptativos de manera recíproca a través de las interacciones entre especies dentro de una población. La hipótesis plantea que interacciones entre especies conducen a una constante selección, observada como procesos de adaptación y contra-adaptación. El éxito evolutivo desproporcionado de los parásitos sobre ciertos genotipos del hospedero, ha conducido a la selección por la reproducción sexual en los hospederos y a una consecuente adaptación por parte de los patógenos (Van Valen, 1974). Este marco predictivo ha sido ampliamente utilizado para explicar diversos aspectos biológicos, tales como el surgimiento del sexo, evolución de la virulencia y el mantenimiento de polimorfismo genético (Woolhouse and Webster, 2000).

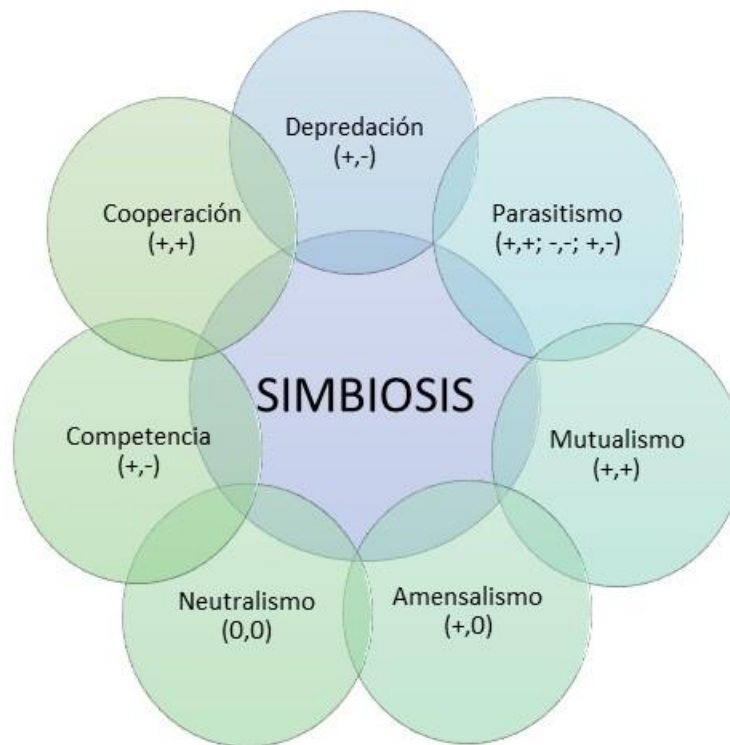


Figura 3. Esquema de los tipos de interacciones entre especies. Dichas interacciones podrían en general alguna ventaja y permanecer dentro de la carrera evolutiva, algunas podrían no dar ninguna ventaja y se separarían o ambas podrían tener efectos negativos y quedar fuera de la carrera evolutiva. (+) beneficio, (-) daño, (0) efecto neutral (Krebs, 2001; Lang and Benbow, 2013).

I.2. INTERACCIÓN BACTERIAS-HOSPEDERO

Las bacterias forman asociaciones íntimas y usualmente benéficas con una gran variedad de organismos (Cuadro 1) (Ochman and Moran, 2001), tal como la interacción del protozooario *Amoeba proteus* con la X-bacteria tipo *Legionella* cuya interacción parece haber iniciado de manera espontánea y ahora es indispensable para la supervivencia del

protozooario hospedero (Jeon and Jeon, 2004). Otro ejemplo se aprecia en los artrópodos, organismos en los que las bacterias comensales participan en procesos de digestión y provisión de aminoácidos esenciales para la supervivencia (Steinert et al., 2000), y en los rumiantes, quienes obtienen casi el 70% de su energía metabólica a través de la interacción con bacterias ruminales (Niwińska, 2012).

Cuadro 1. Ejemplo de interacciones entre bacterias y hospederos de distintos phyla, y de sus efectos conocidos en el hospedero.

Phylum	Hospederos eucariontes	Procariontes	Tipo de interacción	Efecto
Protozoa	<i>Amoeba</i>	X-bacteria	Parasitismo	Desconocido
	<i>Proteus</i>	<i>Holospira</i> spp.	Parasitismo	Muerte celular
	<i>Paramecium</i>	<i>Legionella</i> spp.		Muerte celular
	<i>Acanthamoeba</i>			
Porifera	<i>Aplysina</i>	Desconocido	Mutualismo	Defensa química
	<i>Ceratoporella</i>			
Cnidaria	Corales	<i>Symbiodinium</i> spp.	Mutualismo	Provisión de nutrientes
Mollusca	Teredinidae	Molusco simbiote Chemoautotrophic	Mutualismo Mutualismo	Degradación de celulosa
	Lucinidae			Provisión de carbono y nitrógeno
Artrópoda	Aphidae	<i>Buchnera</i> spp.	Parasitismo	Muerte del insecto
	Pulgas, piojos, garrapatas	<i>Rickettsia</i> spp.		
Vertebrados	Vacas, ovejas, cabra	<i>Bacteroides</i> spp. <i>Ruminococcus</i> spp.	Comensalismo Comensalismo	Digestión de celulosa Enfermedad de los legionarios
	Humanos	<i>Legionella pneumophila</i>	Parasitismo	
		<i>Vibrio Cholerae</i> <i>Bordetella pertussis</i>	Parasitismo	Cólera Tosferina
Plantas	Plantas Leguminosas	<i>Rhizobium</i> spp. <i>Bradyrhizobium</i> spp.	Mutualismo	Fijación de nitrógeno

Steinert et al., 2000

La mayoría de las interacciones simbióticas están basadas en la transferencia de nutrientes de los organismos simbioses a sus hospederos por medio de la translocación de componentes moleculares de bajo peso y/o mediante productos de digestión bacteriana (Steinert et al., 2000). Incluso, algunas estimaciones de diversidad bacteriana de diversos ambientes, incluyendo la superficie epitelial del tracto digestivo, muestran que los agentes patógenos representan solo una pequeña porción de las especies bacterianas identificadas (Ranon et al., 1999; Kroes et al., 1999).

Previo a establecer cualquier tipo de interacción con el hospedero, la bacteria debe superar barreras físicas, celulares y moleculares propias del hospedero (Ochman and Moran, 2001). La bacteria debe lograr penetrar, crecer y replicarse haciendo uso de los nutrientes del hospedero, así como evitar mecanismos de defensa, persistir dentro del hospedero e infectar nuevos hospederos (Ochman et al., 2000). La selección favorece a las bacterias que superan cada uno de los pasos anteriores independientemente de que el resultado de interacción sea perjudicial, o benéfico para el hospedero (Ochman and Moran, 2001).

Algunos de los mecanismos que se han descubierto para explicar cómo es que las bacterias inician y mantienen la interacción con el hospedero ha sido a través de una homología genética entre los organismos (Ochman and Moran, 2001). En el genoma bacteriano se han descritos dos procesos que promueven un amplio espectro de interacciones con el hospedero.

Estos son la pérdida y la adquisición de genes (Ochman and Moran, 2001), mecanismos que parecen ser las fuerzas primarias por las cuales las bacterias se adaptan genéticamente a nuevos ambientes y por los cuales las poblaciones bacterianas divergen y se separan, dando lugar a especies nuevas (Schmidt and Hensel, 2004). La adquisición de genes va acompañada por un proceso de pérdida de genes debido a que el crecimiento del genoma es limitado (Ochman and Moran, 2001). Los mecanismos de transferencia horizontal de genes incluyen elementos móviles genéticos tales como los plásmidos, bacteriófagos, transposones, elementos de inserción e islas genómicas, así como un

mecanismo de recombinación de DNA foráneo dentro del DNA del hospedero (Hacker et al., 2001; Milkman, 1999).

La pérdida de genes es explicada de manera similar a la Reina Roja pero bajo la hipótesis de la Reina Negra (Black Queen Hypothesis), la cual es una analogía de la reina de espadas en un juego de cartas en el cual el objetivo es acumular los menos puntos posibles (Morris et al., 2012). La reina de espadas es considerada como una carta negativa ya que con esta el jugador acumula demasiados puntos y por lo tanto el objetivo del jugador es no terminar con esta carta. En el contexto evolutivo la hipótesis de la Reina Negra propone que ciertos genes, o en términos más generales ciertas funciones biológicas, son una analogía de la Reina Negra, debido a que estas pueden llegar a ser indeseables y costosas, y por lo tanto los organismos que no las tienen cuentan con una ventaja selectiva (Morris et al., 2012).

Otros aspectos como la variabilidad genética, mutación, selección a través de la explotación de nichos y la coevolución de patógenos con mecanismos de resistencia del hospedero han permitido que las bacterias continúen interactuando con su hospedero, e incluso que su relación simbiótica llegue a ser tan estrecha como es el caso de las bacterias que conforman a la microbiota no patogénica del hospedero (Steinert et al., 2000).

I.3. TRACTO DIGESTIVO DE CARNÍVOROS

El aparato digestivo es un conducto tubular musculomembranoso, que se extiende de la boca al ano (Frandsen, 1995). El sistema digestivo está conformado por la boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado, ciego, intestino grueso y colon y las principales glándulas que son las salivales, páncreas e hígado (Dyce, Sack and Wensing, 1999). Estos órganos tienen su origen en el endodermo, mientras que los tejidos muscular y conectivo que sustentan al epitelio son de origen mesodérmico (Dyce, Sack and Wensing, 1999).

De manera general el tracto digestivo está formado por cuatro capas principales. Estas son la mucosa, la submucosa, la capa muscular externa y la capa serosa o adventicia (Patt and Patt, 1969; Dyce, Sack and Wensing, 1999, Sisson and Grossman, 2005, Figura 4). La mucosa se forma por una membrana epitelial, una capa media de tejido conectivo (lámina propia) y una capa externa de musculo liso (Frandsen, 1995).

Circundante a la mucosa, la segunda capa, la submucosa consiste de tejido conectivo fibroelástico, porta grandes vasos sanguíneos de los cuales las ramas vascularizan a la mucosa. La tercera capa es la muscular externa, la cual determina el tono de la pared intestinal y es la responsable de los movimientos peristálticos y de las contracciones del intestino (Patt and Patt, 1969; Sisson and Grossman, 2005). En regiones del intestino que descansan dentro de cavidades y que están suspendidas por el mesenterio, la cuarta capa es denominada serosa la cual se compone de tejido conectivo areolar con mesotelio escamoso o cuboidal. En porciones donde el tracto digestivo no se encuentra dentro de cavidades tales como la faringe y parte del esófago, esta capa se denomina adventicia la cual se compone de tejido conectivo areolar que se gradualmente se mezcla con tejido conectivo de estructuras cercanas (Dyce, Sack and Wensing, 1999).

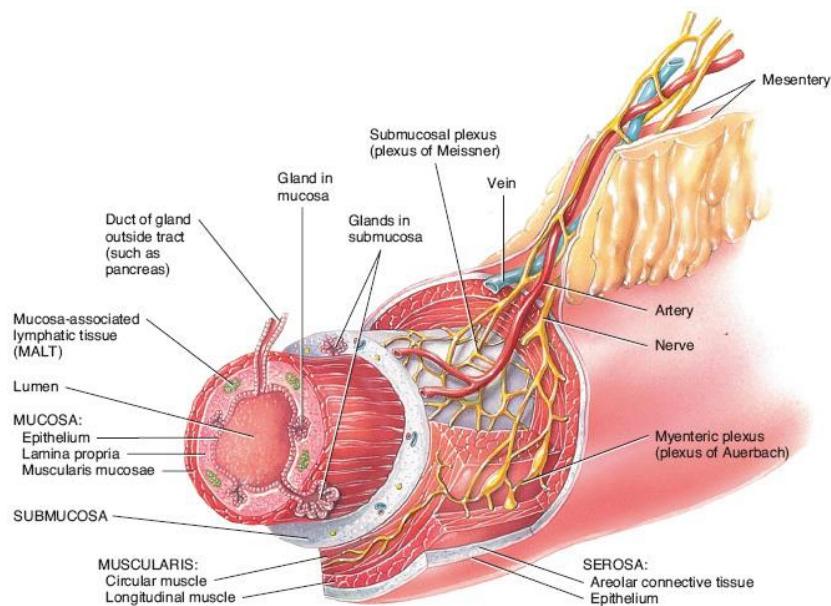


Figura 4. Principales capas que conforman el tracto digestivo (Wiley, 2011).

La boca tiene como funciones principales, la prensión, masticación e insalivación de los alimentos y formación del bolo alimenticio (Frandsen, 1995). Posteriormente los alimentos pasan por la faringe y por medio de contracciones de los músculos de la faringe son llevados al esófago (Dyce, Sack and Wensing, 1999), que es un conducto formado de musculo liso, que se encuentra dispuesto en sentido antero-posterior, comprendido por las porciones cervical, torácica y abdominal; la cervical que va de la faringe al tórax, donde el esófago está dispuesto en sentido dorsal a la tráquea y recargado hacia el lado izquierdo y por la porción torácica que va del manubrio del esternón hasta el cartílago xifoides el cual se prolonga para formar el estómago (Sisson and Grossman, 2005).

El estómago de los carnívoros es monocavitario, el cual es un saco con una curvatura mayor y una menor que se extiende desde el cardias hasta el píloro (Rojo and González, 2013). El estómago, además de recibir el bolo alimenticio a través del cardias y almacenarlo, también secreta pepsinógeno, que junto con el ácido clorhídrico participan en la digestión de las proteínas (Reece, 2009; Segarra, 2006). El estómago se continua con el intestino delgado a través del esfínter pilórico, que en la mayoría de las especies es el órgano principal de la digestión y de la absorción, y el intestino grueso que generalmente es más corto y está relacionado con la deshidratación de los residuos alimenticios (Dyce, Sack and Wensing, 1999).

I.4. MICROBIOTA DEL TRACTO DIGESTIVO DE LOS CARNIVOROS

La microbiota normal se define como el conjunto de microorganismos comúnmente encontrados en las superficies mucosas y cutáneas de los hospederos sanos (Romero, 1999, Hooper et al., 2002) tales como la piel y los tractos genital, urinario y digestivo, así como la conjuntiva. Dependiendo de su ubicación, la microbiota normal está compuesta por hongos, protozoarios, bacterias, bacteriófagos, virus y arqueas y sus funciones

dependen del sitio que colonizan (Guarner and Malagelada, 2003; Konstantinov et al., 2004).

I.4.1 PROTOZOARIOS

Los protozoarios forman parte de la microbiota gastrointestinal de los vertebrados. Sobre este grupo de microorganismos, es en rumiantes donde se ha obtenido gran parte de la información. En ellos, los protozoarios son altamente especializados, ya que solo pueden vivir en el rumen o bajo condiciones similares (Dehority, 2003).

La información sobre protozoarios en el tracto digestivo en perros y gatos está relacionada principalmente a sus efectos sobre el estado clínico de estas especies (Thompson et al., 2000) y a las zoonosis (Fayer et al., 2001). En estos carnívoros, protozoarios reportados son *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* sp., y *Entamoeba* sp., (Gracenea et al., 2009). Sin embargo, su papel como parte de la microbiota normal de los carnívoros aún no ha sido esclarecido.

El género *Giardia* también se ha encontrado en el lobo marino de California (*Z. californianus*), en la foca anillada (*Pusa hispida*), la foca de harp (*Phoca groelandica*), la foca gris (*Halichoerus grypus*) y la foca de puerto (*Phoca vitulina*) (Measures and Olson, 1999), así como en ballena de Groenlandia (*Balaena mysticetus*) (Heckman et al., 1987) y en el delfín nariz de botella (*Turpsiops truncatus*) (Fayer et al., 2008). Los protozoarios *Chilomastix*, *Hexamita* y *Entamoeba* sp., fueron reportados en el colon de ballenas (*Balaena mysticetus*). Para este grupo de hospederos aún no queda claro cuál es el efecto de estos protozoarios, o si forman o no parte de la microbiota normal de estos organismos.

También se han reportado efectos reguladores del sistema inmune por parte de los parásitos (Fumagalli et al., 2009), así como interacciones entre nematodos y bacterias

intestinales, los cuales pudieran estar jugando un papel importante en la dinámica de la microbiota (Hayes et al., 2010).

I.4.2. HONGOS

Los hongos presentan una menor abundancia con respecto a otros microorganismos del tracto digestivo de carnívoros. En el perro, mediante estudios de metagenómica, se identificaron tres filotipos *Gibberella, zae* PH-1, *Neurospora crassa* y *Saccharomyces cerevisiae*, los cuales representaron el 0.3% del total de la biomasa (Swanson et al., 2011). Con el uso de técnicas moleculares, mediante la amplificación de una región altamente conservada del gen 28S ribosomal se identificaron 51 phylotipos de hongos en 135 perros, sin embargo la riqueza de las especies de hongos estuvo reducida en la mayoría de los casos a un filotipo por perro (Suchodolski et al., 2008). También se reportó una mayor cantidad de DNA fúngico en la mucosa que en el contenido luminal (Suchodolski et al., 2008).

La función de los hongos intestinales aún no ha sido bien estudiada en perros ni otros carnívoros, mientras que en rumiantes se sabe que representan aproximadamente el 8% de la biomasa ruminal, son anaerobios estrictos, obtienen energía de la fermentación de los carbohidratos (Orpin and Joblin, 1997), además participan de forma muy activa en la degradación de la pared celular de las plantas (Akin and Borneman, 1990).

I.4.3. BACTERIÓFAGOS

Si bien, han sido identificados una gran cantidad de bacteriófagos – es decir, virus de bacterias – en el líquido ruminal, (Paynter et al., 1969; Klieve and Bauchop, 1988), que conducen a una lisis bacteriana (Swain et al., 1996) y así participan en el reciclaje de las proteínas en el rumen (Firkins et al., 1992) y en el mantenimiento de la diversidad y

composición bacteriana ruminal (Swain et al., 1996), en otras especies no ha sido bien descrita la diversidad y composición de los bacteriófagos. En humanos, se identificaron fagos y profagos pertenecientes principalmente al Orden de los Caudovirales (Reyes et al., 2010), pero esta información no está disponible aun para carnívoros.

El papel de los bacteriófagos dentro del microbioma no se conoce aún en carnívoros, pero en rumiantes se se ha sugerido que mantienen la diversidad y abundancia de las bacterias (Swain et al., 1996), incluso se ha sugerido que las principales bacterias hospederas son aquellas que están mejor adaptadas al ambiente y que tienen una mayor abundancia (Rodríguez-Valera et al., 2009). En ratones se demostró que bacteriófagos ϕ V1/7 de la cepa V583 de *Enterococcus faecalis* le confieren a la bacteria una ventaja sobre el establecimiento y dominancia a diferencia de otras cepas de *E. faecalis* (Duerkop et al., 2012).

I.4.4. VIRUS

En humanos se han reportado una gran diversidad de virus en las heces –la mayoría no considerada parte de la microbiota normal, sino asociados con problemas de salud-. La diversidad vírica del tracto digestivo humano se ha estimado en alrededor de 1200 genotipos (Breitbart et al., 2003). En contraste, los virus del tracto digestivo identificados en perros y gatos representaron menos del 1% de la biomasa y pertenecen a los órdenes Caudovirales e Iridoviridae. De los Caudovirales se han identificado a las familias Myoviridae, Poviridae y Siphoviridae (Swanson et al., 2011). Además de estos virus, en el caso de los perros y gatos los reportes de virus se han centrado en los pertenecientes a las familias de rotavirus, coronavirus, parvovirus (Kempf et al., 2010), morbilivirus, adenovirus, rhabdovirus, parainfluenza, herpesvirus, virus de la leucemia felina y el virus de la inmunodeficiencia felina (Ettinger and Feldman, 2007). Estos virus han sido reportados principalmente debido a los efectos en la salud de los hospederos.

I.4.5. ARQUEAS

Las arqueas, o también llamadas metanógenos, han sido bien descritas en rumiantes. Son anaerobios obligados que mantienen bajas concentraciones de hidrógeno en el rumen lo que permite un mejor crecimiento de otras bacterias (Stewart et al., 1997). El hidrógeno y el dióxido de carbono son los principales sustratos que producen metano como producto catabólico (Hungate, 1967).

Si bien, su función en el rumen es conocida se sabe muy poco acerca del papel que desempeñan las arqueas en el intestino. En humanos clínicamente sanos se ha reportado la presencia de *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Termogymnomonas*, *Thermoplasma* y arqueas pertenecientes a la clase *Nitrososphaera* en el intestino (Hoffmann et al., 2013). Se ha observado que la abundancia de las arqueas se ve afectada en individuos con obesidad (Zhang et al., 2009) y con enfermedad periodontal (Li et al., 2009) en los cuales el número de arqueas aumenta. En perros se identificaron los órdenes Desulfurococcales, Archaeoglobales, Halobacteriales, Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales, Methanopyrales, Thermococcales y Thermoplasmatales; la presencia de este grupo representó aproximadamente el 1% de la biomasa (Swanson et al., 2011). Sin embargo, en carnívoros aún no está claro cuál es la función que desempeñan en el intestino.

I.4.6. BACTERIAS

Las bacterias son los microorganismos con una mayor abundancia en el tracto digestivo (Hooper and Gordon, 2001). El estómago representa un menor número de bacterias facultativas debido a los bajos niveles de pH, que oscilan entre 10^1 y 10^2 para los carnívoros (Gamino et al., 2005; Rastall, 2004; Aas et al., 2005). En contraste, el intestino delgado presenta una gran diversidad e intensidad bacteriana, principalmente de bacterias anaerobias facultativas; y el colon es una de las porciones con mayor diversidad

y número de bacterias, aunque estas son principalmente anaerobios estrictos (Gibson and Macfarlane, 1995).

La microbiota intestinal representa un ecosistema complejo con una gran diversidad (Backhed et al., 2005; Eckburg et al., 2005). En carnívoros terrestres, existen reportes de bacterias entéricas por medio de aproximaciones microbiológicas y de biología molecular (Greetham et al., 2002; Rustrian-Fernández et al., 2013; Suchodolski, 2011a). En perros, las bacterias fecales identificadas a través de cultivos son *Escherichia coli*, *Streptococcus mitis*, Enterococci y *Streptococcus lactis*, *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus* sp., *Paracolobactrum* sp., *Proteus mirabilis*, *Escherichia freundii*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y *Proteus* (Clapper and Meade, 1963; Greetham et al., 2002). Las aproximaciones moleculares, generalmente mencionan que la microbiota fecal en perros está compuesta por las familias Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Fusobacteria y Actinobacteria (Suchodolski, 2011b). En coyotes (*Canis latrans*) estudios dependientes del cultivo de organismos reportan 22 géneros que incluyen *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* (Rustrian-Fernández et al., 2013), en lobos (*Canis lupus*) se reportaron los géneros de *Escherichia*, *Enterobacter*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Enterococcus*, y *Lactobacillus* (Zhang et al., 2012). En contraste, estudios basados en análisis moleculares, en lobos (*Canis lupus*) reportan cinco familias como Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria y Actinobacteria (Zhang and Chen, 2010).

En gatos, se ha reportado que la mayor carga bacteriana y diversidad se encuentra en el intestino delgado, y que es conformada por grupos de *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Eubacterium* (Suchodolski, 2011b). En heces de chitas sanos mantenidos en cautiverio las bacterias que se identificaron pertenecen a las familias de *Fusobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Micobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Peptococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Clostridiaceae*, *Eubacteriaceae*, *Peptostreptococcaceae* (Becker et al., 2014). En el oso polar (*Ursus maritimus*) la mayoría

de las secuencias obtenidas de muestras de heces estuvieron muy relacionadas al género *Clostridium* (Glad et al., 2010a)

Por otro lado, en humanos los géneros predominantes en el intestino son *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*, *Bifidobacterium* y *Fusobacterium* (Suau et al., 1999). Estudios de metagenómica han identificado cuatro principales Phyla en el tracto digestivo en humanos que son *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (Tlaskalová-Hogenová et al., 2011).

En gorilas (*Gorilla beringei*) las bacterias identificadas fueron clasificadas dentro de los grupos de *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Lentisphaerae*, *Bacteroidetes*, *Spirochetes* y *Planctomyces* (Frey et al., 2006). En otras especies de primates, uno de los grupos más abundantes fue el de las *Firmicutes*, seguido por *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Lentisphaerae*, *Tenericutes*, *Planctomycetes*, *Fibrobacteres* y TM7 (Yildirim et al., 2010).

I.5. PRIMER CONTACTO DE LAS BACTERIAS Y PROCESO DE ADQUISICIÓN DEL HOSPEDERO

Es posible que la primera exposición con microorganismos ocurra cuando el feto pasa a través del canal vaginal y entra en contacto con bacterias del tracto genital de la madre (Conway, 1997), ya que el ambiente uterino podría no ser totalmente estéril (DiGuilio, 2012).

En humanos, además de este primer contacto con las bacterias, durante la lactancia los neonatos también son expuestos a nuevos microorganismos de diversos géneros que entran en su sistema digestivo. Los grupos más comúnmente encontrados son: *Staphylococci*, *Streptococci*, *Corynebacteria*, *Lactobacilli*, *Micrococci*, *Propionibacteria* y

Bifidobacteria, los cuales provienen de la piel de la madre y de la leche materna (Asquith and Harrod, 1979; West et al., 1979).

Se ha propuesto que los diversos grupos de bacterias se van adquiriendo los primeros días posteriores al nacimiento y que el grupo de las bacterias coliformes y *Streptococci* serán los más abundantes en este periodo (Mackie et al., 1999). Tiempo después las bacterias anaerobias comenzarán a establecerse y géneros como *Clostridia* y *Lactobacilli* pueden colonizar el tracto digestivo dentro de un corto periodo de tiempo (Moughan et al., 1992; Grutte et al., 1965; Smith, 1967). No obstante, los procesos de colonización de las poblaciones bacterianas en el tracto digestivo son muy complejos e involucran aspectos como la exposición a microorganismos ambientales y asociados al alimento, así como interacciones *inter-específicas* que resultan en el establecimiento de poblaciones en regiones específicas del tracto digestivo (Mackie et al., 1999).

I.5. PROCESOS EN LOS QUE PARTICIPAN LAS BACTERIAS INTESTINALES

Dependiendo de la superficie que colonizan, la microbiota bacteriana participa en distintas funciones en el organismo del hospedero (Guarner and Malagelada, 2003; Konstantinov et al., 2004). Sin embargo, de manera general, la microbiota influye sobre las funciones metabólicas del hospedero, las cuales, a su vez, están relacionadas con la morfología y con el mantenimiento de la integridad de la mucosa y microvellosidades (Neish, 2002), que son necesarias para el intercambio y absorción de nutrientes (Cebra et al., 2005; Montalto et al., 2009) y para algunas respuestas inmunes (Maynard et al., 2012).

I.5.1. METABOLISMO Y NUTRICIÓN

El metabolismo de las bacterias intestinales es parte importante de la actividad bioquímica del hospedero, y sus funciones no se limitan solo a efectos directos sobre los

componentes de la dieta, sino que influyen sobre la capacidad de inducir en el hospedero la expresión de genes del hospedero que participan en el metabolismo de nutrientes (Hooper et al., 2002). En los carnívoros la digestión comienza cuando el alimento entra en el estómago, en donde las proteínas se hidrolizan por pepsinas y por el ácido clorhídrico (Maynard et al., 1981). En el intestino delgado las enzimas secretadas por la mucosa y por el páncreas, como la tripsina y las carboxipeptidasas continúan con la degradación de proteínas, sales biliares y las lipasas que degradan las grasas y las amilasas degradan a los almidones (McDonald et al., 2002). En el intestino grueso, los microorganismos participan en dos procesos bioquímicos digestivos, la fermentación y la putrefacción. En la fermentación se desdoblan principalmente polisacáridos (McDonald et al., 2002) para formar ácidos grasos volátiles, metano y CO₂ (Shimada, 2009). La putrefacción se debe principalmente a la presencia de clostridios, los cuales desdoblan aminoácidos y forman histamina, putrescina, cadaverina y escatol, también se libera amonio, ácido sulfhídrico, nitrógeno, hidrógeno y algunos otros que le proporcionan el olor y el color a las heces. Las heces contienen porciones de alimentos no digeridos, enzimas, mucinas, células de descamación y microorganismos (Shimada, 2009).

En los carnívoros, las bacterias intestinales también juegan un papel importante en la síntesis de vitaminas en las que participan los géneros de *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* y *Fusobacterium* (Albert et al., 1980; Hill, 1997) y en la absorción del calcio, magnesio y hierro (Teitelbaum and Walker, 2002). Así mismo, la microbiota bacteriana reduce la cantidad de compuestos que pueden tener efectos nocivos, como el colesterol y los fitatos, los cuales son reducidos a través de la asimilación, degradación o inhibición de la síntesis endógena (Sanz et al., 2004; Cuadro 2).

Cuadro 2. Productos finales, como resultado del metabolismo de las bacterias y su efecto en el hospedero.

Producto final	Actividad metabólica de la microbiota intestinal	Efecto sobre el hospedero
Propionato, acetato, butirato	Fermentación de carbohidratos	Antiinflamatorio, recurso de energía para Enterocitos, regulación de la motilidad intestinal, mejora la permeabilidad intestinal
Ácido retinoico	Síntesis de vitaminas	Generación periférica de células T
Vitamina K2, B12, biotina, folato	Síntesis de vitaminas	Importante co-factor de diversas vías metabólicas
Ceramide	Induce la degradación de esfingomielina	Importante participación en apoptosis y en la prevención tumorigenesis
Indol	Degradación del triptofano	Incrementa la resistencia en la unión celular
Ácido biliares secundarios (Cholate/deoxycholate) y taurina	Metabolismo de los acidos biliares	Favorece la absorción de las grasas
D-lactato	Fermentación de los carbohidratos	Incremento asociado con encefalopatía.

Suchodolski and Simpson, 2013

I.5.2. EL SISTEMA INMUNE DEL TRACTO DIGESTIVO

La comunicación entre el hospedero y las bacterias gastrointestinales parecen jugar un papel importante en el desarrollo del sistema inmune (Guarner and Marlagelada, 2003). Esto se ha visto principalmente en ratones recién nacidos, quienes bajo condiciones libres de microbiota bacteriana intestinal, muestran una disminución en la densidad de linfocitos en la mucosa intestinal, una atrofia de las estructuras foliculares y una menor

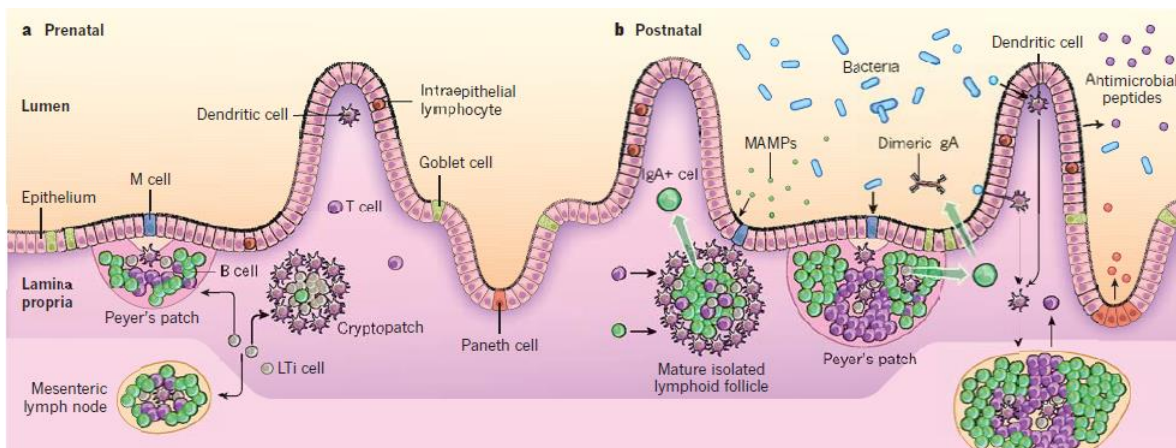
concentración de inmunoglobulinas circulantes (Hammer et al., 1990). Sin embargo, una vez que el organismo es expuesto a bacterias intestinales, el número de linfocitos aumenta de manera exponencial (Umesaki et al., 1993), surgen centros germinales con producción de linfocitos B en los folículos y en la lámina propia (Cebra et al., 1998), y la concentración de inmunoglobulinas séricas incrementa (Butler et al., 2000).

Como se mencionó anteriormente, el primer contacto del hospedero con las bacterias que colonizarán el tracto digestivo ocurre en el canal del parto. Durante esta primera exposición el sistema inmune es modulado para evitar que elimine a las bacterias, pero a su vez asegurar que no permitirá su proliferación y potencial daño al hospedero (Cebra, 1999; Maynard et al., 2012; Mazmanian et al., 2005). Las respuestas por parte del sistema inmune innato, tales como la producción epitelial de α -defensinas y mucinas, son esenciales para evitar que las bacterias crucen las barreras epiteliales y tengan una colonización atípica (Wilson et al., 1999; Ayabe et al., 2000). Además, la secreción de inmunoglobulina A (IgA) ayuda también a evitar el cruce de las barreras epiteliales que responde solo a la presencia de epítopes de las bacterias comensales (Macpherson et al., 2000).

A su vez, las respuestas inmunes en el epitelio intestinal pueden estar influenciadas por la presencia de las bacterias, como es el caso de cepas avirulentas de *Salmonella*, las cuales derogan la producción de citoquinas proinflamatorias en cultivos de tejido humano (Neist et al., 2000). Estos mecanismos incluyen a I κ B el cual bloquea al factor nuclear κ B (NF- κ B), impidiendo de manera directa la activación de genes que codifican para mediadores proinflamatorios (Neish et al., 2000).

Incluso antes del primer contacto con las bacterias, el sistema inmune se prepara durante la etapa prenatal a través del tejido linfoide asociado a mucosas (GALT, por sus siglas en inglés) como lo son las placas de Peyer, los folículos linfoides aislados (ILFs, por sus siglas en inglés) y los nódulos linfáticos mesentéricos (MNL, por sus siglas en inglés) (Forchielli and Walker, 2005; Maynard et al., 2012). Durante el desarrollo fetal un subgrupo de células linfoides (ILCs por sus siglas en inglés) denominadas células inductoras de tejido

linfoide (LTi por sus siglas en inglés), son las primeras células hematopoyéticas reclutadas en los sitios de organogénesis de los tejidos linfoides (Mebius et al., 1997; Cherrier and Eberl, 2012), las cuales se desarrollan en el hígado fetal a partir de una célula precursora linfoide; se diseminan y estimulan el desarrollo de los nódulos linfáticos mesentéricos y las placas de Peyer. También son reclutadas y diseminadas células B y T en el tejido linfoide asociado a mucosas (van de Pavert et al., 2010; Cherrier and Eberl, 2012). Posteriormente la maduración de las placas de Peyer, los folículos linfoides aislados y los nódulos linfáticos mesentéricos (Cherrier and Eberl, 2012) se inicia y depende de la colonización intestinal. El desarrollo de los ILF también depende de las células LTi, pero es iniciado después del nacimiento cuando este grupo de células se sitúan por debajo de las criptas de la lámina propia formando los criptoparches (Kanamori et al, 1996)



Maynard et al., 2012

Figura 5. Desarrollo y maduración del tejido linfoide asociado a mucosas. **a)** Preparación del sistema inmune durante la etapa prenatal, **b)** Primera exposición a bacterias y maduración del tejido linfoide. Tomado de Maynard et al., 2012.

Las células inmunes del tracto digestivo y las células epiteliales intestinales llevan a cabo una función de monitoreo de las bacterias a través de receptores de patrones de reconocimiento (PRRs) (Jones and Dangl, 2006) codificados en un rango diverso de línea

germinal. Estos receptores incluyen a los receptores tipo Toll (TLRs), receptores de lectina tipo C, que se encuentran en las superficies celulares, receptores tipo NOD (Bouskra et al., 2008), los cuales utilizan las células de la mucosa intestinal para detectar patrones moleculares asociados a mucosas (MAMPs) (Mackey and Mcfall, 2006) que son expresados de manera constitutiva por las bacterias intestinales y las bacterias patógenos. Aunque aún no se conoce a detalle el proceso mediante el cual los MAMPs son reconocidos, se sabe que el reconocimiento es llevado a cabo por las células intestinales neonatales, lo que estimula el desarrollo de los ILF y genera una estructura linfoide que es capaz de soportar la maduración de las células B que producen IgA; proceso que es inducido por el peptidoglicano derivado de las bacterias Gram negativas (Maynard et al., 2012).

I.6. CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

Existen diversos factores que pueden cambiar la composición de la microbiota bacteriana, esto ha sido demostrado en estudios realizados en el ser humano y en animales domésticos; una de ellas son las condiciones intrínsecas bajo las cuales las bacterias son susceptibles a cualquier cambio en temperatura, pH, concentración de oxígeno, recambio epitelial y textura del recubrimiento mucoide (Savage, 1977).

Cambios en la microbiota relacionados con la edad se han asociado procesos fisiológicos y de historia de vida de los individuos. Durante las primeras etapas de vida de la cría el intestino es rico en oxígeno, lo que promueve el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias facultativas, principalmente (Adlerberth, 2008). Posteriormente los niveles de oxígeno entérico disminuyen y aumentan los niveles de dióxido de carbono, dando paso al crecimiento de bacterias anaerobias facultativas y anaerobias estrictas (Palmer et al., 2007).

En perros se ha encontrado que los cambios más notables en las poblaciones bacterianas ocurren en el estómago y en el intestino delgado en un periodo de 1 a 21 días postnatal

(Buddington, 2003), tiempo durante el cual incrementa la secreción de pepsina en el estómago y las enzimas digestivas del páncreas de los perros (Buddington, 2003). Cambios durante el periodo postnatal, como la habilidad del intestino de absorber nutrientes (Buddington and Malo, 2003), reciclar ácidos biliares (Shneider, 2001) y el desarrollo de un sistema inmune local (Nelson et al., 1998, citado en Buddington, 2002) también ocasionan un cambio en las poblaciones bacterianas.

Sin embargo, un estudio realizado en perros Beagle reportó que solo hubo cambios en la diversidad de la microbiota en el intestino grueso, donde los niveles de *Bacteroides*, *Eubacteria*, *Peptostreptococci*, *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* y *Staphylococci* fueron mayores en perros de menos de un año de edad, mientras que una alta incidencia de *Clostridium* fue observada en perros de aproximadamente doce años de edad (Benno et al., 1992).

La alimentación juega un papel importante en la composición de la diversidad bacteriana (Turnbaugh et al., 2009). Cambios en la dieta parecen desencadenar enfermedades inflamatorias intestinales asociadas a un desequilibrio de las poblaciones bacterianas (Turnbaugh et al., 2009; De Filippo et al., 2010). En ratones, por ejemplo, se ha observado que una dieta alta en polisacáridos de plantas y baja en grasas, tiene un efecto de manera inmediata, que resulta en un incremento en bacterias *Firmicutes* y un descenso en el grupo de las *Bacteroidetes* (Turnbaugh et al., 2008). De manera paralela un cambio en las poblaciones microbianas puede tener un efecto sobre el estado nutricional del hospedero, en parte debido a que las bacterias a través de sus procesos metabólicos le dan un valor nutritivo a los alimentos, y un cambio en la microbiota tendrá un efecto negativo sobre valor nutritivo (Turnbaugh et al., 2009).

Cuadros clínicos relacionados con enfermedades crónicas y aquellas que afectan directamente al tracto digestivo (Janeckzko et al., 2008), también afectan las composición y diversidad de las bacterias, debido a una pérdida de gran parte de la microbiota bacteriana o al sobrecrecimiento y traslocación bacteriana en individuos en estado crítico de salud (Van der Waaij, 1989). En el caso del síndrome de sobre crecimiento bacteriano en el intestino delgado (SIBO, por sus siglas en inglés), este se caracteriza por una

alteración de la arquitectura y permeabilidad epitelial (Batt et al., 1992; Morris et al., 1994); que se genera debido a un cambio en la expresión de genes de los enterocitos, lo cual repercute en aspectos de salud y de nutrición del hospedero.

Además de que tanto interacciones *intra-específicas* como *inter-específicas* entre las bacterias como la producción de agentes antimicrobianos (Gibson and Wang, 1994; McGowan et al., 1997; Thompson et al., 2000), comunicación entre bacterias como el *quorum sensing* (Lazazzera, 2000) y la formación de *biofilm* (Costerton et al., 1995) pueden tener un efecto sobre el número de bacterias de diversos grupos (Gibson and Wang, 1994).

I.7. EFECTO DE LA MICROBIOTA SOBRE LA SALUD DE LOS HOSPEDEROS

Las relaciones entre las bacterias intestinales y sus hospederos pueden pasar del comensalismo o mutualismo a interacciones simbióticas antagónicas que pueden comprometer la salud del hospedero o favorecer el crecimiento de agentes patógenos (Salminen et al., 1995; Hooper and Gordon, 2011). Por ello, el entendimiento de la estabilidad de las poblaciones bacterianas en un individuo a través del tiempo es un paso importante para llegar a ser capaces de predecir la ocurrencia de enfermedad y para corregir el desequilibrio de la población microbiana (Clemente et al., 2012) (Cuadro 3).

En humanos, los síndromes como la enfermedad intestinal inflamatoria (IBD, por sus siglas en inglés) el cual incluye la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, son afecciones inflamatorias crónicas cuya etiología, si bien no ha sido determinada, parece estar relacionada con activaciones inadecuadas del sistema inmune de las mucosas, en particular a la pérdida de tolerancia hacia bacterias intestinales (Duchmann, 1995; MacPherson et al., 1996). Se ha descrito una hiperreactividad de los linfocitos T y una alteración en la producción de citoquinas proinflamatorias (Berg et al., 1995) contra

microorganismos de la microbiota normal y un aumento de niveles de IgG en la colitis ulcerativa que reaccionan contra la microbiota en pacientes con enfermedad de Crohn (Guarner and Malagelada, 2003).

Cuadro 3. Cambios en la microbiota normal del humano que han sido asociados a enfermedades no infecciosas.

Patología	Bacteria implicada	Cambio en abundancia
Alergias	<i>Lactobacillus</i> spp	Disminuye
	<i>Bifidobacterium adolescentes</i>	Disminuye
	<i>Clostridium difficile</i>	Disminuye
	<i>Helicobacter pylori</i>	Disminuye
Cáncer gástrico	<i>Helicobacter pylori</i>	Aumenta
Autismo	<i>Bacteroidetes</i>	Aumenta
	<i>Proteobacteria</i>	Aumenta
	<i>Actinobacteria</i>	Disminuye
	<i>Firmicutes</i>	Disminuye
Obesidad	<i>Bacteroidetes</i>	Disminuye
	<i>Lactobacillus</i>	Aumenta
	Relacion <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i>	Disminuye
	<i>Methanobreviribacter smithii</i>	Disminuye
Diabetes tipo II	<i>Firmicutes</i>	Disminuye
	<i>Clostridia</i>	Disminuye
	<i>Bacteroides-Prevotella</i>	Aumenta
	<i>Clostridia coccoides-Eubacterium rectale</i>	Disminuye
	<i>Betaproteobacteria</i>	Aumenta
	Relación <i>Bacteroidetes/Firmicutes</i>	Aumenta
	<i>Bacteroidetes</i>	Disminuye
Enfermedad de Crohn	<i>Lachnospiraceae</i>	Disminuye
	<i>Actinobacteria</i>	Aumenta
	<i>Proteobacteria</i>	Aumenta
	<i>Clostridium leptum</i>	Disminuye
	<i>Clostridium coccoides</i>	Disminuye
	<i>Faecalibacterium prasnitzii</i>	Disminuye
	Relación <i>Firmicutes/Bacteroides</i>	Disminuye
	<i>Bifidobacteria</i>	Disminuye

Modificado de Clemente et al., 2012

Una relación estable entre las poblaciones bacterianas entéricas y el sistema inmune del hospedero permiten un mutuo beneficio (Hornerf et al., 2012). Esta simbiosis también incrementa la robustez del sistema inmune contra perturbaciones ambientales, por medio de la estimulación y la maduración del sistema inmune, efectos sobre la biosíntesis y procesamiento de nutrientes, así como una resistencia a patógenos (Kitano and Oda, 2006). Además, la coevolución entre la microbiota y el sistema inmune del hospedero ha permitido que diversos simbioses habiten dentro del hospedero sin comprometer su capacidad de responder ante microorganismos patógenos (Kitano and Oda, 2006).

I.8. DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA INMUNE ENTRE SEXOS

Existen diferencias entre sexos en la forma en la que los individuos responden ante algún desafío inmune, asociadas a historia de vida y a la disponibilidad de recursos energéticos al momento del desafío (Viney et al., 2005; French et al., 2007). Se sabe que, debido a que los recursos energéticos en el organismo no son ilimitados, se da un balance para realizar canjes energéticos (“*trade-offs*”) (Norris and Evans, 2000) entre aspectos de reproducción (Bonneaud et al., 2003; Ardia 2005), crecimiento (Soler et al., 2003; Chin et al., 2005) o sistema inmune (Ricklefs and Wikelski, 2002; Viney et al., 2005). De manera particular las variaciones de acuerdo al sexo se han observado en animales con dimorfismo sexual, en los cuales parte de los recursos energéticos son destinados hacia el desarrollo de caracteres sexuales secundarios de los machos, en detrimento de su respuesta inmune (Chi et al., 2005). Una de las hormonas que participan en el desarrollo de caracteres secundarios es la testosterona para la cual se han reportado efectos inmunosupresores directamente sobre expansión clonal, fagocitosis, apoptosis, presentación de antígenos y respuesta fisiológicas a citoquinas (Morales-Montor et al., 2004). Esta relación entre el sistema inmune y el desarrollo de caracteres secundarios garantiza que solo aquellos individuos que estos últimos reflejen el estado de inmuno competencias del macho, y así facilitar a la hembra la elección de pareja.

De manera general, se ha reportado que las hembras son capaces de implementar respuesta inmunes de mayor magnitud que los machos, a nivel de efectores celulares y humorales (Marriot and Huet-Hudson, 2006). Diferencias de acuerdo al sexo en interacciones sociales, de dieta y/o el uso del hábitat parecen estar relacionadas a la exposición con diferentes microorganismos (Meade, 1984 citado en Nunn and Altizer, 2004), como los parásitos para los cuales se ha reportado una mayor infección en machos con respecto a las hembras (Zuk and McKean, 1996; Klein, 2004).

I.8. LA MICROBIOTA DE LOS MAMÍFEROS MARINOS

Los estudios realizados sobre la microbiota normal de mamíferos marinos han sido mínimos en comparación con los estudios de microorganismos patógenos en estas especies; ello debido a que la mayoría de las muestras obtenidas han sido de animales varados muertos o enfermos o de animales mantenidos en cautiverio. Si bien, estos reportes no son representativos de las poblaciones naturales (Acevedo-Whitehouse et al., 2009), sí proporcionan información clínico-biológica importante.

Son recientes los estudios realizados en mamíferos marinos de vida libre para caracterizar la flora normal, uno de ellos realizado por Acevedo-Whitehouse et al. (2009), colectó muestras de soplo de siete especies de cetáceos misticetos y odontocetos de vida libre, aparentemente sanos, en el Golfo de California, y mediante técnicas moleculares identificaron tres géneros bacterianos principales (*Haemophilus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*). En el elefante marino (*Mirounga leonina*) y en la foca leopardo (*Hydrurga leptonyx*) la comunidad bacteriana estuvo mayormente representada por los phyla *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* (Nelson et al., 2013). En la foca de casco (*Cystophora cristata*), foca común (*Phoca vitulina*) y la foca gris (*Halichoerus grypus*) se reportó una mayor abundancia de *Bacteroidetes* seguido por *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Fusobacteria* (Glad et al., 2010b). En el lobo fino (*Arctocephalus pusillus*

doriferus) también se encontró que los phyla predominantes son *Firmicutes*, seguido de *Bacteroidetes* y *Proteobacterias* (Smith et al., 2013). En el lobo marino de Australia (*Neophoca cinerea*) *Firmicutes*, fue el grupo más dominante, seguido por *Proteobacteria* y *Actinobacteria* (Lavery et al., 2012). Por otro lado, en el lobo marino de California se han identificado bacterias de los géneros *Micrococcus*, *Arcanobacterium*, *Corynebacterium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Escherichia*, *Kurthia*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Brevibacillus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* y *Aeromonas* provenientes de muestras de la cavidad nasal (Hernández-Castro et al., 2005), y algunas especies como *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Streptococcus* no hemolítico, *Escherichia coli* y *Corynebacterium* sp., en muestras de vagina y prepucio de lobo marino de California. Así como también se identificó la especie de *Streptococcus* beta hemolítico asociado fuertemente con el carcinoma urogenital, solo en hembras en ésta especie Johnson et al., (2006).

I.9. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Las bacterias pueden ser clasificadas por su aspecto macroscópico y microscópico, por sus características de crecimiento y propiedades metabólicas, por su antigenicidad y por su genotipo (Murray et al., 2009). De acuerdo con su crecimiento, la identificación se realiza con base en las características de las colonias, como el color, tamaño, forma y olor. A nivel macroscópico se toma en cuenta el tamaño, forma, tipo de organismos (cocos, bacilos, espiroquetas), agregación (aislados, en cadena o racimos) y su diferenciación de acuerdo con la tinción de Gram (Hucker, 1920).

Su clasificación bioquímica se basa en la habilidad de las bacterias de producir enzimas fácilmente detectables, en las características metabólicas específicas de cada microorganismo (condiciones aerobias y anaerobias) (Alonso-Urmeneta et al., 2000), requerimientos de nutrientes específicos (habilidad de fermentar carbohidratos específicos o el uso de diferentes componentes como un recurso de carbón para su

crecimiento) y la producción de productos metabólicos característicos y enzimas específicas (Murray et al., 2009).

Las pruebas serológicas pueden ser útiles para la identificación de organismos que resultan difíciles en su crecimiento en el laboratorio, son riesgosos o que necesitan ser identificados de manera rápida (Murray et al., 2009). Estas pruebas se basan en la habilidad de los anticuerpos para reaccionar con su antígeno específico y en el uso de un sistema indicador para manifestar tales reacciones (Cottral, 1986). Estas reacciones también pueden utilizarse para titular o cuantificar la cantidad de antígeno presente en una preparación o cultivo de microorganismos y la cantidad de anticuerpos presentes en una muestra de suero (Cottral, 1986). Sin embargo, éstos métodos convencionales no siempre son aptos para determinar la presencia de antígenos (Ag) en la superficie de células, bacterias y parásitos o para la detección de microorganismos en materiales infectados, por lo cual se prefiere el uso de técnicas inmunohistoquímicas (IHQ). Estas técnicas se basan en las reacciones Ag-anticuerpo (Ac) únicas o secuenciales, altamente sensibles y específicas (Stanchi et al., 2007).

Las técnicas de identificación de microorganismo que se basan en la biología molecular se sustentan en el conocimiento de la estructura de los ácidos nucleicos, sobre todo el DNA, y las enzimas que intervienen en su replicación, así como en la posibilidad de modificarlo y construir moléculas nuevas; la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) permite la amplificación directa de fragmentos de DNA específicos, sin necesidad de clonación y hace posible obtener un gran número de copias de fragmentos (Stanchi et al., 2007). Las ventajas y desventajas de los distintos métodos de identificación molecular de los organismos que integran un microbioma se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Técnicas moleculares para el estudio de la diversidad bacteriana

Método	Principio	Desventajas
DGGE/TGGE/TTGE	Permite separar mezclas de productos de PCR de un mismo peso, pero con diferencias de pares de bases	Es posible que diferentes especies generen una misma banda
T-RFLP	El método se basa en la variación en la posición de sitios de restricción entre secuencias y en la determinación de la longitud de fragmentos terminales marcados con fluorescencia por medio de electroforesis	Baja resolución, es posible que varios filotipos se encuentren representados por un solo tamaño de fragmento y representen un solo pico en la distribución
ARDRA	Amplificación del 16S, clonación y digestión para identificar diferencias en los patrones de bandeo, que permite identificar grupos bacterianos.	Dificultad en la visualización de las bandas
FISH	Permite la identificación y cuantificación directa de grupos taxonómicos generales o específicos dentro de su ambiente natural.	Errores en la técnica no permiten la visualización de los organismos de interés.
MÉTODOS DE SECUENCIACIÓN	Una vez amplificado el 16S, el fragmento es marcado con nucleótidos fluorescentes,	Elevado costo

Eguiarte, Souza and Aguirre, 2007

I.10. EL LOBO MARINO DE CALIFORNIA (*Zalophus californianus*) COMO ORGANISMO MODELO

El lobo marino de California, *Zalophus californianus*, pertenece al Orden Carnívora, Suborden Pinnipedia, Familia Otariidae (King, 1983). Algunos hallazgos sugieren que los pinnípedos pudieron surgir de un mamífero relacionado a los carnívoros (Rybczynski et al., 2009). Al tratarse de un carnívoro su tracto digestivo está formado por un estómago monocavitario (Dierauf and Gulland, 2001). Su ámbito de distribución se extiende desde la

Columbia Británica (Canadá) al norte, hasta las islas Marías (México) al sur incluyendo el Golfo de California (King, 1983; Zavala, 1990) (Figura 6).



Figura 6. Mapa de distribución del lobo marino de California (*Zalophus californianus*). Tomado de IUCN.

Su población se estima entre 24,062-31,159 individuos, distribuidos en más de 30 islas e islotes en el Golfo de California (Szteren et al., 2006, citado en Szteren and Auriolles-Gamboa, 2011) y entre 75,000 y 87,000 lobos en la costa occidental de la península de Baja California (Lowry and Maravilla-Chávez 2005 citado en Szteren and Auriolles-Gamboa, 2011), mientras que la población que se encuentra en el océano Pacífico se estima en alrededor de 296, 750 individuos (NOAA, 2011).



Figura 7. Características morfológicas de acuerdo a la edad. A) individuos juveniles (Tomado de Colla en Oceanlight.com, B) Hembra adulta con su cría (Tomado de visual phtos.com) y C) Macho adulto que exhibe una prominente cresta sagital (Tomado de Colla en Oceanlight.com).

Los individuos presentan un marcado dimorfismo sexual (Odell, 1975), los machos miden hasta 2.4 m y pesan aproximadamente 300 kg, mientras que las hembras miden hasta 1.8 m y alcanzan un peso de 150 kg (Peterson and Bartholomew, 1976). Las crías al nacer pesan aproximadamente entre 5.5 kg y 6.5 kg y miden alrededor de 70 cm. Su pelaje es de tono café oscuro, el cual es más claro en las hembras y en los juveniles. Los machos adultos exhiben una cresta sagital externa y unos músculos del cuello muy desarrollados (King, 1983) (Figura 7).

Las hembras y los machos alcanzan la madurez sexual entre los 4 y 5 años de edad, mientras que la madurez física se presenta entre los 8 y 9 años (Peterson and Bartholomew, 1967; Morales, 1999). La especie es poligínica y lleva a cabo su reproducción en agua, tierra y pozas de marea periféricas a la colonia reproductiva. La duración de la estación reproductiva es aproximadamente de 10 semanas (Odell, 1975;

García-Aguilar and Aurióles-Gamboa, 2003). Los machos establecen y defienden territorios y luego arriban las hembras, para parir una cría por año (Peterson and Bartholomew, 1967; Heath, 1989). Las hembras presentan un mecanismo llamado retraso de la implantación, que permite regular sus ciclos reproductivos de tal forma que puedan tener un parto por año, así como permitir que las crías nazcan durante las condiciones ambientales más favorables. Después del apareamiento, el ovulo es fertilizado, posteriormente cuando llega a la etapa de blastocito su desarrollo se detiene por aproximadamente tres meses, y se vuelve a reactivar el desarrollo (Riedman, 1990). Aún no se conoce muy bien cuál es el mecanismo que detiene y reactiva el desarrollo embrionario, pero en algunas especies como reptiles (Shanbhag et al., 2003), murciélagos (Mead, 1993) y algunos carnívoros (Canivenc and Bonnin, 1979, citado en López et al., 2004) se han asociado a los cambios de temperatura. También se ha planteado que aspectos de estrés metabólico, nutrición y la participación de la glándula pineal, actividad ovárica y uterina y la lactancia también influye sobre la interrupción y la reactivación en el desarrollo del embrión (ver en López et al., 2004).

Los nacimientos comienzan a fines de mayo y se extienden hasta fines de junio y las cópulas ocurren entre 15 y 21 días después. Unos 5 días después del parto las hembras comienzan sus viajes de alimentación, los cuales tienen una duración de 1.7 a 2 días para alimentar a sus crías (Heath, 1989; García-Aguilar and Aurióles-Gamboa, 2003). Las crías comienzan a comer pescado aproximadamente a los 5 meses de edad, al mismo tiempo que continúan alimentándose con leche materna y son destetados a los 10 o 12 meses de edad, aunque puede prolongarse aún más (Aguayo-Lobo, 1991).

El periodo de vida para las hembras es de 20 a 22 años, y de 17 años para los machos. Las tasas de fecundidad para individuos del Golfo de California se estima en 55.8%. La tasa de natalidad estimada en el periodo 1979-1985, se estimó en 22.5% es decir 23, 256 individuos. Las tasas de mortalidad diferencian de acuerdo al sexo y a la edad (Aurióles-Gamboa and Zavala-González, 1994; Hernández and Aurióles-Gamboa, 1997) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tasas de mortalidad en porcentaje en el lobo marino de California en el Golfo de California de acuerdo a la edad y sexo.

Edad	Tasas de mortalidad %	
	Machos	Hembras
Crias	38.44	20.59
Juvenil	13.32	11.42
Subadulto	8.6	-
Adulto	14.9	2.65

Aurioles y Zavala, 1994; Hernández y Aurioles, 1997

En dos loberas del Pacífico mexicano para las cuales se tiene información sobre la alimentación del lobo marino, se registraron diferencias entre las zonas de alimentación y presas consumidas; ya que para las Islas Coronados se distinguen elementos ícticos de California, como la anchoveta del norte (*Engraulis mordax*), mientras que en Isla Cedros sobresalen la langostilla (*Pleurocodes planipes*) (De Anda, 1985; Salazar, 1989; Aurioles, 1995).

Para el Golfo de California las zonas de alimentación parecen también ser distintas. Las principales presas en Los Islotes, Baja California Sur son especies bentónicas (Balart et al., 1995; García and Aurioles, 1997). En la región de las Grandes Islas en San Pedro Mártir, San Esteban y El Rasito la alimentación estuvo representada principalmente por los mictófidios, mientras que en Los Machos las principales presas estuvieron representadas por la sardina Monterrey (*Sardinops sagax*), la macarela (*Scomber japonicus*), el pez sable y la anchoveta (*Engraulis mordax*) y en Los Cantiles y El Coloradito por el pez sapo (*Porichthys sp.*) y el pez sable (*Trichiurus lepturus*) (INE, 2000).

La alimentación del lobo marino de California varía estacionalmente y los cambios que se presentan son atribuidos principalmente a las fluctuaciones temporales de la abundancia de los recursos (Aurioles et al., 1984; Lowry et al., 1991; García 1995). Uno de estos eventos se ha asociado a El Niño-Oscilación del Sur (ENSO, por sus siglas en inglés); un inusual evento oceanográfico en el cual la temperatura del océano incrementa en zonas habitadas por muchos pinnípedos, lo que trae como resultado una disminución y un cambio en la disponibilidad de presas (Riedman, 1990). En las hembras lactantes, un

descenso en la disponibilidad de alimento resulta en una menor tasa de crecimiento y una alta mortalidad durante los primeros dos meses de vida de las crías (Ono et al., 1985, citado en Riedman, 1990). Durante el evento de ENSO también se ha observado que las hembras inician de antes los viajes de alimentación, y éstos viajes tienen una duración mayor, por lo que el tiempo en el cuidan a sus crías también se ve reducido (Boness et al., 1985, citado en Riedman, 1990).

Si bien existe información sobre la alimentación en el lobo marino, ésta sigue siendo aún escasa, debido a que los datos que existen, de manera general, se toman a partir de muestras de heces en donde se colectan algunas estructuras como los otolitos que son concreciones calcáreas, que se encuentran en el sistema vestibular de los organismos (Martínez et al., 2011). Debido a que la morfología de los otolitos varía con las diferentes presiones selectivas relacionadas con aspectos funcionales del sistema auditivo de cada taxón, han sido utilizados como una herramienta para la identificación de peces (Popper, 1976, citado en Martínez et al., 2011).

De acuerdo con la distribución del lobo marino de California se identifican tres áreas de reproducción de la especie. La primera en Estados Unidos que se extiende desde Canadá hasta los límites de Estados Unidos y México, el segundo en el oeste de Baja California, que se extiende desde los límites de Estados Unidos y México hasta el extremo sur de la Península de Baja California y el tercero en el Golfo de California (Carretta et al, 2003). En el Golfo de California la población de *Z. californianus* está repartida en 13 colonias reproductivas (Cosang, San Jorge, Isla Lobos, Granito, Los Cantiles, Los Machos, El Partido, El Rasito, San Esteban, San Pedro Mártir, San Pedro Nolasco, Farallón de San Ignacio, Los Islotes) (Szteren, 2006).

Después de la temporada reproductiva los machos de las colonias del Pacífico migran hacia el norte, a lo largo de la costa de California y probablemente hasta Oregon, Washington y la Columbia Británica (Aurioles, 1988; Aurioles et al., 1983; King, 1983).

II. HIPÓTESIS

Se plantean hipótesis centradas en el desarrollo, comportamiento y salud de las crías:

- 1) Debido a los cambios marcados en la dieta del lobo marino de California y en los costos fisiológicos de su desarrollo temprano, la composición de las bacterias entéricas cultivables de las crías estará determinada por la edad y la condición corporal.
- 2) Si existen diferencias en el comportamiento de alimentación entre crías hembras y machos, se esperaría que la composición de las bacterias entéricas cultivables variará entre sexos.
- 3) El estado de salud influirá sobre la composición de las bacterias entéricas cultivables de las crías. Si existen diferencias intersexo en la inversión de recursos energéticos para implementar respuestas inmunes, se esperaría que la presencia de bacterias potencialmente patógenas variará entre sexos, y que la relación entre los indicadores de salud y la presencia de estas bacterias será diferente entre sexos.

III. OBJETIVOS

Caracterizar la composición bacteriana entérica cultivable de las crías de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) durante su desarrollo temprano.

Investigar la asociación de las bacterias cultivables con variables biológicas relacionadas con el desarrollo y aspectos de salud.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1. ÁREA DE ESTUDIO

IV.1.2. GOLFO DE CALIFORNIA

El Golfo de California contiene al Mar de Cortés o Mar Bermejo. Se ubica en el noroeste de México, entre los 20 y 30° N y los 112 y 118° W. El área está delimitada por los estados de Baja California y Baja California Sur hacia el oeste; Sonora, Sinaloa, Nayarit y parte de Jalisco hacia el este (Bourillón et al., 1988). Su longitud aproximada es de 1500 km y en su parte más ancha es de 150 km y cuenta con un área de 177,000 km². Topográficamente se divide en una serie de cuencas y trincheras; su profundidad varía latitudinalmente siendo de más de 3000 m, y más al norte del golfo la profundidad es de menos de 200 m (Santamaría-del-Ángel et al., 1994) y su circulación es ciclónica durante el verano y anticiclónica en invierno (Carrillo et al., 2002; Marinone, 2003). Se divide en cuatro áreas oceanográficas; Alto Golfo, Región Central, Boca del Golfo y Región de las Grandes Islas (Maluf, 1983) (Figura 8).



Figura 8. Área del Golfo de California. Tomado de Godínes-Reyes et al., 2007, Instituto Nacional de Ecología.

La lobera en donde se realizó el estudio se llama isla Granito ($29^{\circ}34'N$, $113^{\circ}32'W$) la cual es una de las colonias reproductivas del lobo marino de California, ubicada en la región del alto Golfo de California, al norte de la Isla Ángel de la Guarda. Se ha propuesto que Granito es la colonia fundadora de todo el Golfo de California con base en estudios de genética (Bowen et al., 2006), por lo cual resulta ideal como colonia de estudio.

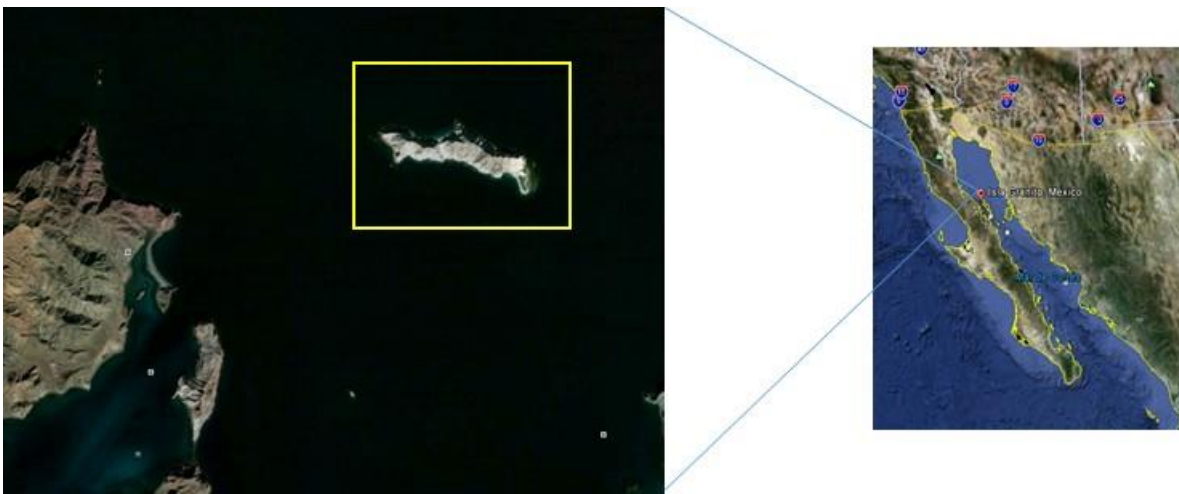


Figura 9. Loberas de *Zalophus californianus* en la región de las grandes islas y el alto Golfo, en el norte del Golfo de California (Tomado Google earth).

IV.2. TRABAJO DE CAMPO

La toma de muestras se llevó a cabo en la lobera Granito en las temporadas de julio 2012, octubre 2012 y junio 2013. Debido a que este trabajo forma parte de un proyecto mayor sobre la ontogenia temprana del sistema inmune del lobo marino de California, para cada individuo, además de los hisopos anales se tomaron muestras de sangre en tubos con heparina, EDTA y sin anticoagulante; también se registraron medidas morfométricas, peso, talla, edad, sexo y se les realizó un examen físico superficial. Para esta tesis, de cada

individuo se tomaron tres hisopados rectales y se analizaron de acuerdo con los métodos de preservación (Figura 10).

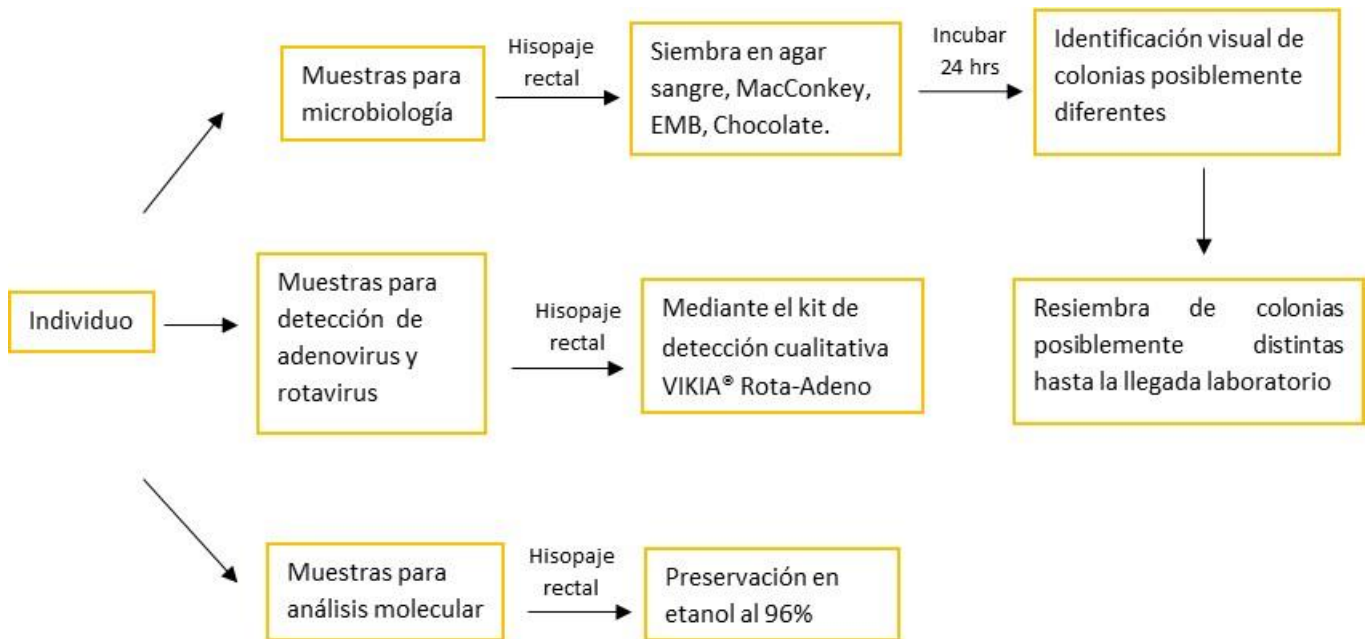


Figura 10. Descripción de la toma de muestras para cada lobo marino.

El primer hisopo se sembró en placas con diferentes medios de cultivo y se dejaron incubando 24 horas, una vez pasado este tiempo, se revisó que en las placas hubiera crecimiento y se identificaron las colonias con morfologías distintas; estas fueron sembradas en placas de cultivo para mantenerlas separadas hasta su traslado al laboratorio (Clapper and Meade, 1963). El segundo hisopo fue preservado en etanol al 96% para la realización de una parte de biología molecular y finalmente el tercer hisopo se tomó para la detección cualitativa de adenovirus y rotavirus mediante el kit VIKIA® Rota-Adeno.

IV.3. TRABAJO DE LABORATORIO

IV.3.1. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

Una vez en el laboratorio, para cada colonia obtenida se realizaron frotis y tinción de Gram y se realizó una descripción sobre la morfología de las bacterias. Posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas de catalasa (Koneman et al., 2008), oxidasa (Gordon and McLeod, 1928), y KOH (Halebian et al., 1981; ANEXO 1); una vez obtenido los resultados las colonias se preservaron en glicerol al 70% con una proporción de 60% de bacteria y 40% de glicerol y fueron colocadas a una temperatura de -7°C . Durante la evaluación de las colonias se observó la presencia de diferentes tipos de bacterias en una sola colonia. A estas colonias se les realizaron una serie de diluciones seriadas (Ramírez-Gama et al., 2006) en medio Infusión Cerebro Corazón (BHI por sus siglas en inglés), las cuales se cultivaron por agitación entre 16 y 18 h a 37°C . Pasado el tiempo se volvieron a sembrar en estría las colonias en medio sólido (Olivas y Alarcón, 2004) y se incubaron durante 24 h a 37°C antes de realizar nuevamente el frotis y tinción de Gram de cada una. Una vez que se observó homogeneidad en el frotis, se volvieron a realizar las pruebas bioquímicas y las colonias fueron preservadas de manera individual en glicerol al 70% y congeladas a -80°C . Con los datos de la morfología de las colonias, de las bacterias y de los resultados de la tinción y las pruebas bioquímicas, se realizó una identificación preliminar de las colonias obtenidas.

IV.3.2. CONFIRMACIÓN MOLECULAR

Una vez que se realizó la identificación preliminar se seleccionaron de 1 a 2 muestras de cada tipo bacteriano identificado para confirmar la identidad preliminar mediante métodos moleculares. Para ello las muestras fueron cultivadas en medio líquido durante

24 h a 37°C. Pasado este tiempo se tomaron 5 µl de cultivo bacteriano, se colocaron en 95µl de H₂O estéril y se llevaron a una temperatura de -5°C.

Se realizó una PCR de un fragmento de cerca de 1400 pb de la subunidad pequeña del ribosoma (16s) con los primers universales (Sigma-Aldrich) 27F (GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1492R (CGGCTACCTTGTTACGAC) (Lane et al., 1985). En el Cuadro 6 y en la Figura 11 se observan las especificaciones de la PCR.

Cuadro 6. Componentes para las reacciones de la PCR.

Reactivos	Volumen (1X)
10X PCR Buffer –Mg	1 µL
10mM dNTP mixture	0.2 µL
50mM MgCl ₂	0.3 µL
10mM Primer 27F	0.25 µL
10mM Primer 1492R	0.25 µL
Template DNA	1 µL
Taq polimerasa	0.2 µL
H ₂ O	6.8 µL
Volumen final	10 µL

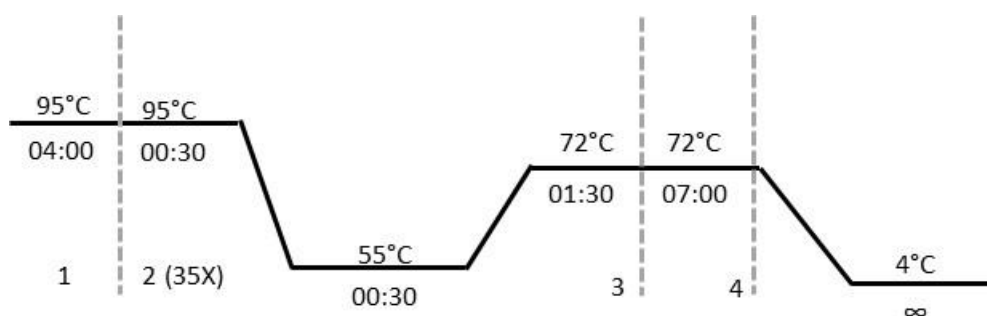


Figura 11. Condiciones para la PCR

Posteriormente los fragmentos amplificados se cortaron del gel, purificaron mediante precipitaciones de isopropanol y se mandaron a secuenciar bidireccionalmente de manera comercial en MACROGEN KOREA.

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas en el programa ChromasPro 1.7.6. Una vez evaluadas, su identidad fue determinada con base en la información contenida en las bases de datos de GenBank (ncbi.nih.nlm.gov) mediante el programa BLAST.

V. ANÁLISIS DE DATOS

V.1 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN BACTERIANA ENTÉRICA CULTIVABLE.

Para esta tesis, se utilizó la información proveniente del aislamiento e identificación de las colonias bacterianas cultivables que fueron a su vez confirmadas vía secuenciación. No se incluyen datos sobre colonias cuya identidad no pudo ser confirmada. Se determinó la **composición bacteriana cultivable** para cada cría. Debido a la metodología utilizada, no se contó con indicadores propios de diversidad y de abundancia de las bacterias cultivables. Sin embargo, se determinó el **número de bacterias entéricas cultivables** de la composición como el número de diferentes tipos de bacterias plenamente identificadas por individuo. Para cada edad muestreada, se determinó la **frecuencia** de cada bacteria identificada.

Para cada individuo se contaba con información sobre su edad, sexo, medidas morfométricas, temperatura, condición corporal, conteo celular leucocitario total y diferencial y la presencia de adenovirus y rotavirus, como parte de un proyecto de investigación más amplio. Estos datos fueron utilizados para probar las hipótesis planteadas en la presente tesis.

Inicialmente se observaron gráficamente los datos sobre la composición y el número de bacterias entéricas mediante la construcción de histogramas de frecuencia y se realizaron

pruebas de normalidad Shapiro-Wilks. Se realizó un análisis Cullen Fray para determinar el tipo de distribución de los datos.

Para determinar si en el número de bacterias entéricas cambia de acuerdo a la etapa del desarrollo temprano, primero se determinó si la base de datos contaba con un registro completo de tipos de bacterias identificados a partir de los estimadores Chao2 e ICE por medio del programa ESTIMATES 9.1.0. Posteriormente se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Para conocer si existen diferencias en el número de bacterias entéricas entre machos y hembras, se utilizaron las pruebas de Chi-cuadrada y Fisher-exacta. Para investigar potenciales asociaciones entre el número de bacterias entéricas y los conteos diferenciales leucocitarios, presencia de adenovirus y rotavirus y la condición corporal se realizaron ANOVAs y una serie de modelos lineales generalizados en el paquete estadístico R i386.15.1.

VI. RESULTADOS

Durante tres visitas a la Isla Granito, se capturaron y obtuvieron hisopos rectales de 53 individuos, siendo estos de 23 crías de dos meses de julio del 2012, 7 crías de cinco meses de octubre del 2012, 19 neonatos y de 4 individuos de 12 meses en junio del 2013 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Muestras obtenidas de crías de acuerdo al sexo y edad.

Edad	Hembras	Machos	Total
Neonatos	10	9	19
2 meses	17	6	23
5 meses	2	5	7
12 meses	3	1	4

VII. 1 IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR

Se detectaron diversos tipos de bacterias de acuerdo a las características microbiológicas (Cuadro 8).

VII.2. NÚMERO DE BACTERIAS ENTÉRICAS CULTIVABLES

Se obtuvieron un total de 86 colonias bacterianas a partir de las 53 muestras. Del total de 15 tipos de bacterias identificadas, por medio de la corroboración molecular se confirmaron un total de 12 diferentes tipos de bacterias (Cuadro 9; ver las secuencias genéticas en el Anexo II).

Cuadro 8. Características morfológicas y bioquímicas de las colonias obtenidas.

Descripción de la colonia	Forma/Tinción Gram	Oxidasa	Catalasa	KOH	Identificación
Colonias con brillo metálico (agar EMB)	Bacilo, Gram-negativo	-	+	+	Escherichia
Colonias de color púrpura-uva, de consistencia mucoide, confluentes (agar EMB)	Bacilo, Gram-negativo	-	+	+	Klebsiella
Colonias rosa fuerte, brillantes, mucoide	Bacilo, Gram-negativo	-	+	+	Shigella
Colonias amarillentas, hemólisis a las 48 horas de incubación (agar sangre)	Bacilo, Gram-negativo	+	+	+	Pasteurella
Hemólisis en agar sangre	Bacilo, Gram-negativo	+	+	+	Pseudomona
Colonias moradas, con un borde de color más tenue y discontinuo.	Bacilo, Gram-negativo	-	+	+	Enterobacter
Hemolisis en agar sangre	Cocobacilo Gram-negativo	-	+	+	Listeria
Colonias blancas, bordes continuos, cóncavas, lisas, brillantes	Coco Gram-negativo	-	+	+	Morganella
Olor fétido, crecimiento masivo, blancas (Agar Chocolate).	Bacilo, Gram-negativo	-	+	+	Proteus
Colonias redondas, lisas, brillantes y puntiformes (agar Chocolate)	Cocobacilo, Gram-variable	-	+	-	Enterococcus
Colonias pálidas, bordes continuos, lisas (Agar MacConkey)	Bacilo, Gram-negativo	-	+	+	Salmonella
Colonias puntiformes de color grisáceo, brillantes, lisas (Agar Chocolate), ligera hemólisis en agar sangre	Cocobacilo, Gram-negativo	-	+	+	Yersinia
Colonias blancas, lisas, de bordes continuos, ligera hemólisis (Agar sangre)	Cocobacilo, Gram-negativo	-	+	+	Moraxella
Colonias blancas, consistencia viscosa-aceitosa	Bacilo, Gram-negativo	-	+	+	Aeromonas
Hemolisis, colonias difusas, cóncavas, blancas	Bacilo, Gram-positivo	+	-	-	Bacillus

Cuadro 9. Presencia-ausencia de bacterias identificadas de acuerdo a la edad.

Tipo de bacteria	Neonatos (n=19)	2 meses (n=23)	5 meses (n=10)	12 meses (n=4)
<i>Escherichia coli</i>	*	*	*	*
	N=6	N=22	N=1	N=4
<i>Proteus sp.</i>	*	*	*	
	N=4	N=12	N=5	
<i>Klebsiella sp.</i>	*	*	*	
	N=15	N=6	N=1	
<i>Acinetobacter iwoffii</i>			*	
			N=1	
<i>Pseudomonas aeruginosis</i>	*			
	N=1			
<i>Sporosarcina sp.</i>				*
				N=1
<i>Bacillus nealsoni</i>	*			
	N=2			
<i>Bacillus subtilis</i>	*			
	N=1			
<i>Bacillus cereus</i>	*			
	N=1			
<i>Escherichia fergusonii</i>		*		
		N=1		
<i>Enterococcus faecalis</i>	*			
	N=1			

Las bacterias observadas con mayor frecuencia fueron *E. coli*, *Klebsiella sp.* y *Proteus sp.* *Escherichia coli* y *Proteus sp.* fueron más prevalentes en las crías de dos meses ($p < 0.00$ y 0.05 respectivamente), mientras que *Klebsiella sp.* fue más prevalente en los neonatos ($p < 0.005$). Solo *E. coli* fue identificado en todas las edades (Figura 12).

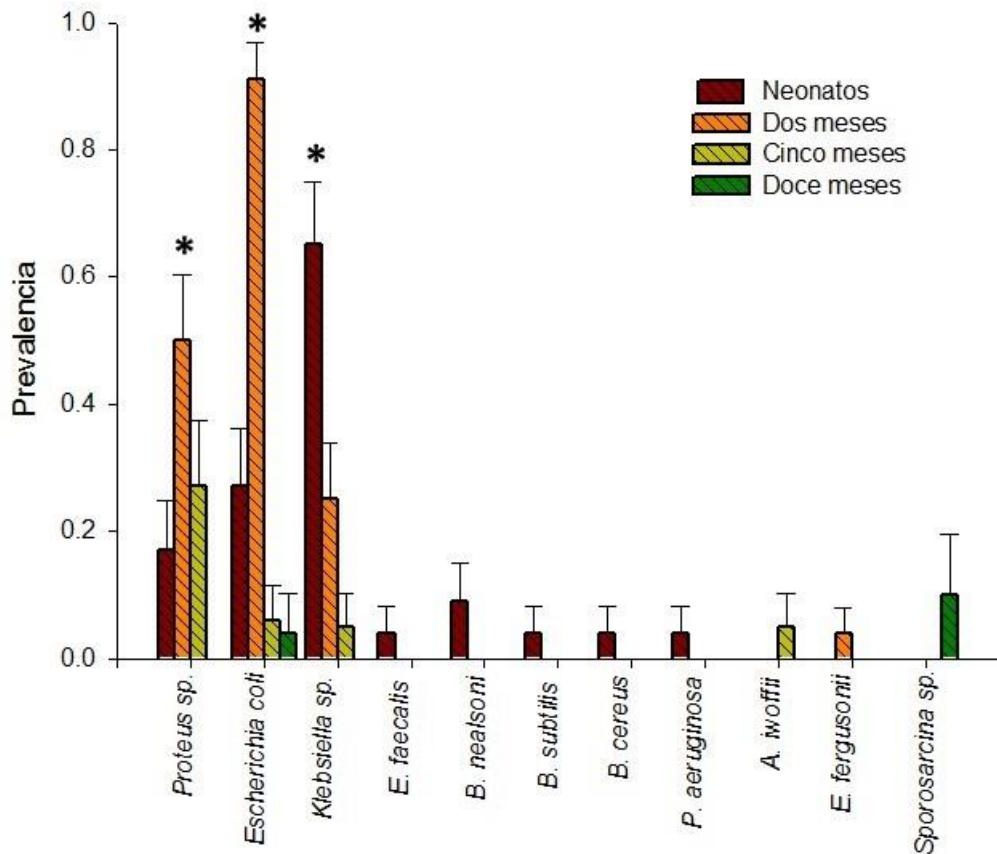


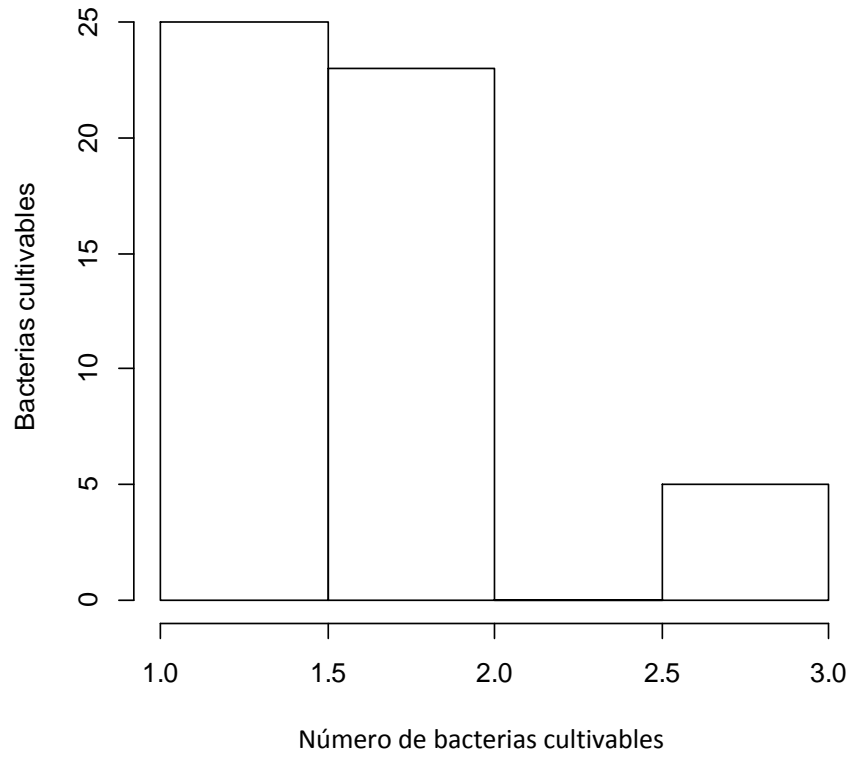
Figura 12. Frecuencia de los diferentes tipos de bacterias identificados de acuerdo a la edad de las crías (Chi², Fisher exact *p<0.05, **p<0.005 y ***p<0.0001).

Previo a utilizar estimadores de diversidad bacteriana en los análisis, se determinó con el programa ESTIMATES 9.1.0 primero si el inventario estaba completo, por medio de los estimadores ICE y Chao2, sin embargo los valores obtenidos indican que el inventario no está completo, ya que no alcanza el mínimo del 70% de completitud requerido (Cuadro 11), y con estos datos no es posible estimar índices de diversidad verdaderos. Por lo tanto, en lugar de utilizar los estimadores de diversidad se calculó el número de bacterias entéricas cultivables por individuo (ver sección V.1.).

Cuadro 10. Valores de riqueza de las bacterias para determinar la completitud del inventario de las bacterias cultivables por edad de las crías. **Obs.** Valores observados en porcentaje de la riqueza y abundancia de las bacterias. **Esp.** Número de las especies de bacterias que se esperaría obtener para cada edad de las crías.

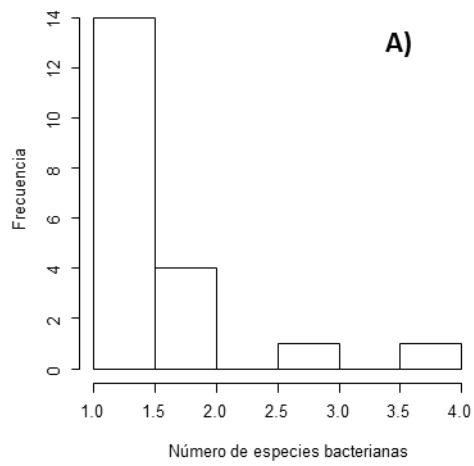
	N° total de bacterias identificadas	Chao2		ICE	
Edad	Número de especies observadas	Obs	Esp	Obs	Esp
		%	N	%	N
Neonatos	8	56.61	10.84	58.99	13.55
2 meses	4	78.27	5.11	81.13	4.92
5 meses	4	60.88	6.57	31.25	12.8
12 meses	2	63.89	3.13	61.53	3.25

El número de bacterias entéricas cultivables no se distribuyó normalmente (Shapiro-Wilks $W=0.7576$; $p= 5.599 \times 10^{-08}$; Figuras 13 y 14). De acuerdo con el análisis de la distribución de los datos de Cullen y Frey se determinó que la distribución de los datos era de tipo Beta (Figura 15).

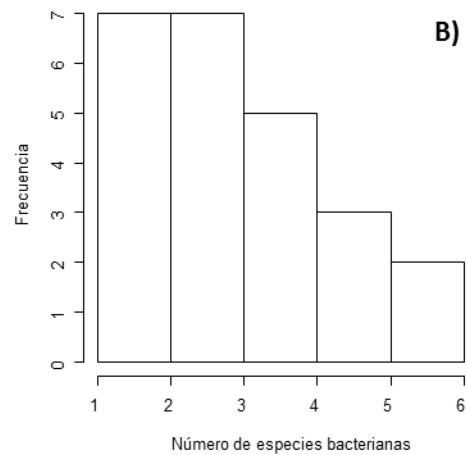


Prueba de normalidad de Shapiro Wilks
W=0.7576 p=5.599X10⁻⁰⁸

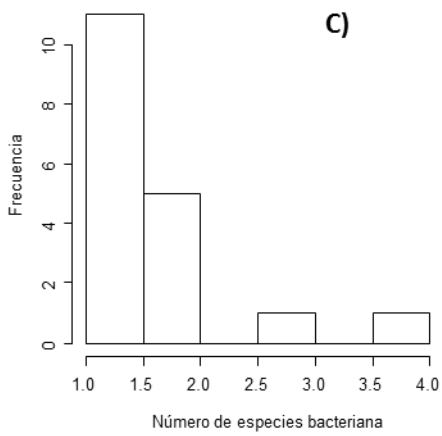
Figura 13. Histograma de frecuencias del número de bacterias entéricas cultivables.



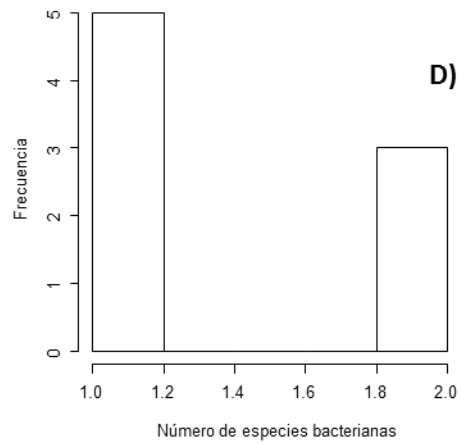
Prueba de normalidad de Shapiro Wilks
 W=0.7446 p=5.627X10⁻⁰⁵



Prueba de normalidad de Shapiro Wilks
 W=0.453 p=4.136X10⁻⁰⁶



Prueba de normalidad de Shapiro Wilks
 W=0.6298 p=0.001



Prueba de normalidad de Shapiro Wilks
 W=0.7533 p=0.000

Figura 14. Histograma de frecuencias del número de bacterias entéricas cultivables para cada edad. **A)** Neonatos, **B)** Dos meses, **C)** Cinco meses, **D)** Doce meses.

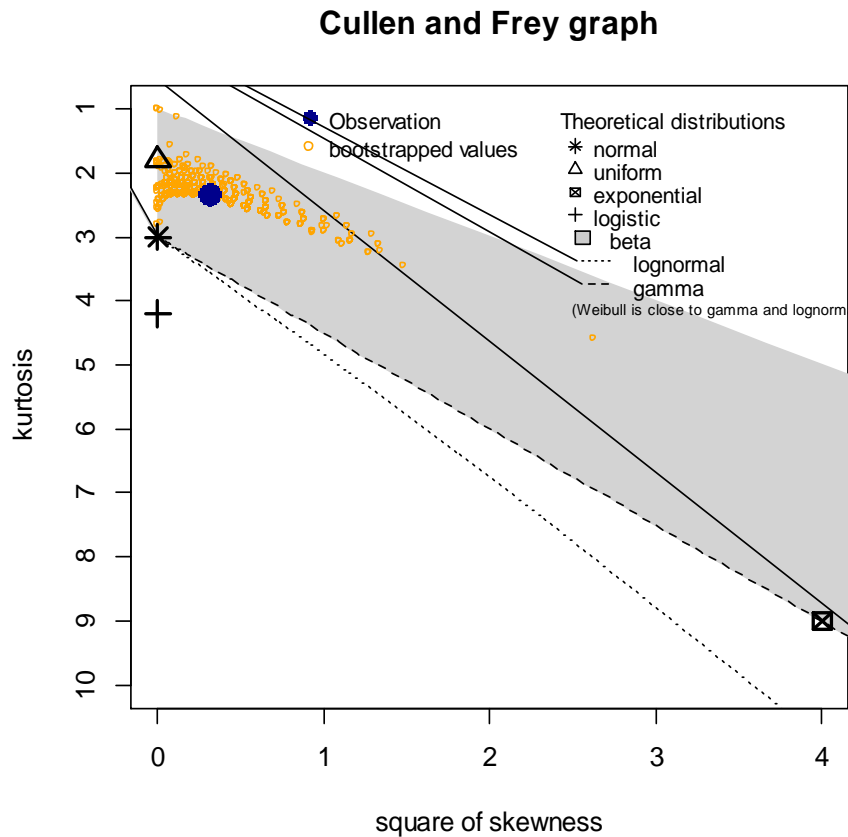


Figura 15. Análisis de distribución de los datos de número de bacterias entéricas cultivables de crías de lobo marino de California de acuerdo a Cullen y Frey (1999). En azul se muestran los valores observados, mientras que en naranja se muestran los valores predichos por el método de *bootstrap* (1000). En el panel de la derecha se muestran las diferentes distribuciones teóricas y la franja gris corresponde a la distribución de tipo beta.

Las crías de dos y cinco meses variaron significativamente en el número de bacterias entéricas cultivables (Kruskal-Wallis, $H_3=58.62$; $p<0.0001$), siendo mayor para las crías de dos meses (Figura 15).

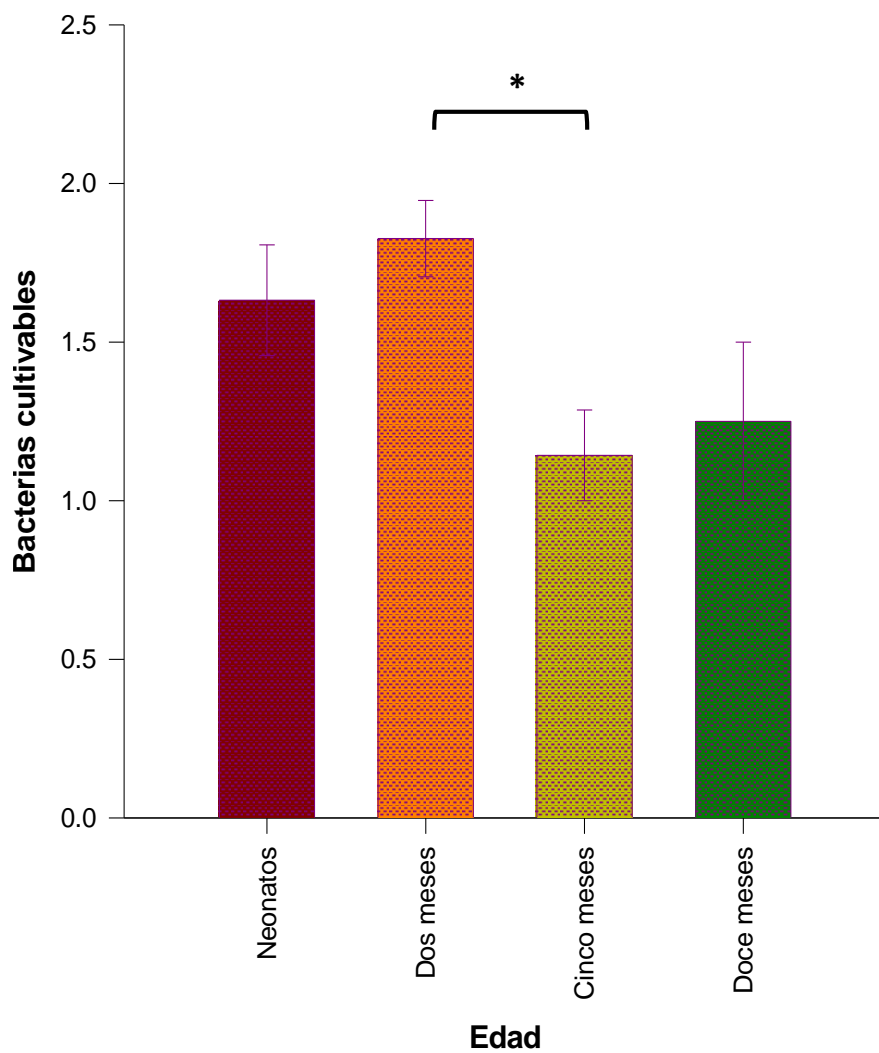


Figura 16. Número de bacterias cultivables de acuerdo a la edad (Kruskal-Wallis test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.0001$).

VII.3. BACTERIAS ENTÉRICAS CULTIVABLES Y CONDICIÓN CORPORAL

La condición corporal de las crías no influyó sobre el número de bacterias entéricas para cada etapa del desarrollo de las crías (Cuadro 11).

Cuadro 11. Modelo lineal generalizado del efecto de la condición corporal sobre el número de bacterias entéricas cultivables.

GLM (Diversidad bacteriana~Condición corporal*Edad)

Variables	gl	F	p
Edad	51	0.7854	0.3798
Condición	50	0.1145	0.7366
Condición:Edad	49	0.0048	0.9449

VII.4. VARIACIÓN DEL NÚMERO DE BACTERIAS ENTÉRICAS CULTIVABLES ENTRE MACHOS Y HEMBRAS

El número de bacterias entéricas cultivables varió entre sexos (Figura 16), siendo mayor en las hembras de dos meses de edad ($\text{Chi}^2_1 = 14.727$; $p = 1.24 \times 10^{-04}$) y en los machos a los cinco meses ($\text{Chi}^2_1 = 4$; $p = 0.04$). También se encontraron diferencias entre machos neonatos y de dos meses ($\text{Chi}^2_1 = 6.898$; $p = 0.008$) y entre hembras de dos y cinco meses ($\text{Chi}^2_1 = 5.157$; $p = 0.02$).

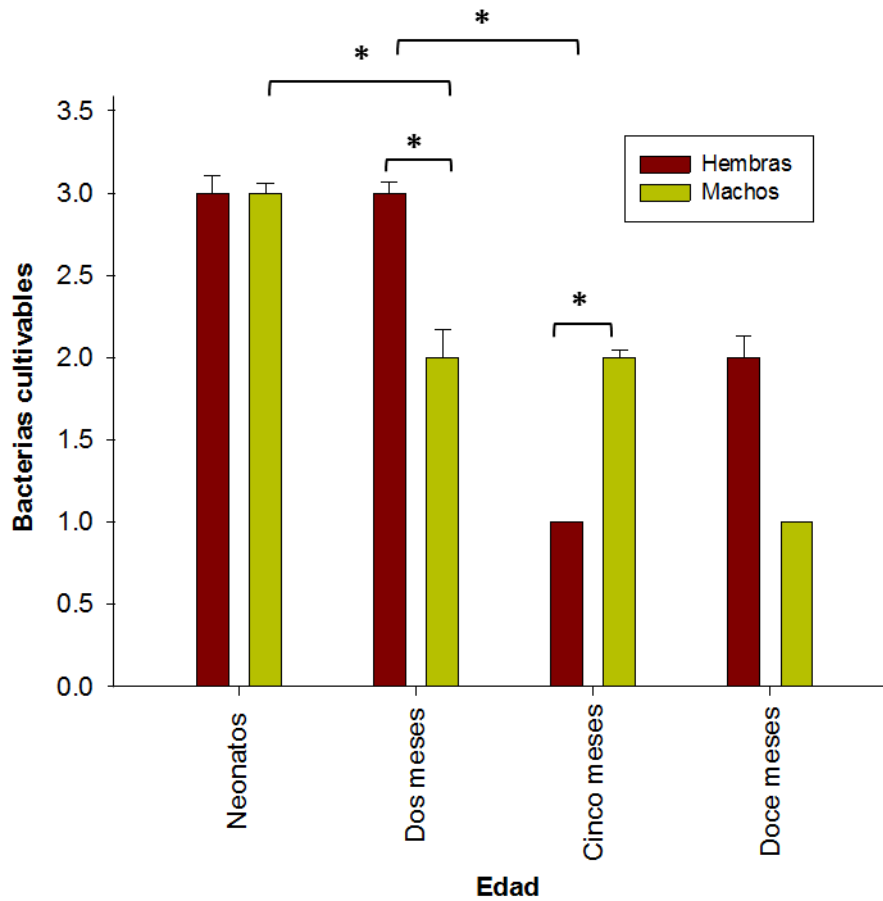


Figura 17. Número de bacterias entéricas cultivables de crías de lobo marino de California machos y hembras para cada edad muestreada (Chi², *p<0.05, **p<0.005 y ***p<0.0001).

VII.5. EFECTO DEL ESTADO DE SALUD SOBRE EL NÚMERO DE BACTERIAS ENTÉRICAS CULTIVABLES

El número total de leucocitos y neutrófilos no influyó sobre el número de bacterias entéricas cultivables (Cuadros 12 y 13). Sin embargo, las crías que presentaban más de 30% de linfocitos circulantes tenían menor probabilidad de tener *E. coli* en el recto (ANOVA, X²_{1,53}=35.906, p=0.01713; Figura 17). Este efecto no se observó con ninguna otra bacteria.

Cuadro 12. Modelo lineal generalizado para el efecto de los linfocitos circulantes sobre el número de total de bacterias cultivables

GLM (Bacteria~Linfocitos,binomial)

Variable	gl	F	p
<i>E. coli</i>	1	35.906	0.0171*
<i>Klebsiella</i> sp.	1	40.381	0.299
<i>Proteus</i> sp.	1	39.138	0.589
<i>E. faecalis</i>	1	6.501	0.132
<i>B. cereus</i>	1	4.7X10 ⁻¹⁰	1
<i>B. subtilis</i>	1	7.940	0.362
<i>B. nealsoni</i>	1	14.442	0.614
<i>P. aeruginosa</i>	1	4.731X10 ⁻¹⁰	1
<i>A. iwoffii</i>	1	6.501	0.132
<i>S. flexneri</i>	1	4.573 X10 ⁻¹⁰	1
<i>E. fergusonii</i>	1	7.940	0.362
<i>Sporosarcina</i> sp.	1	4.731X10 ⁻¹⁰	1

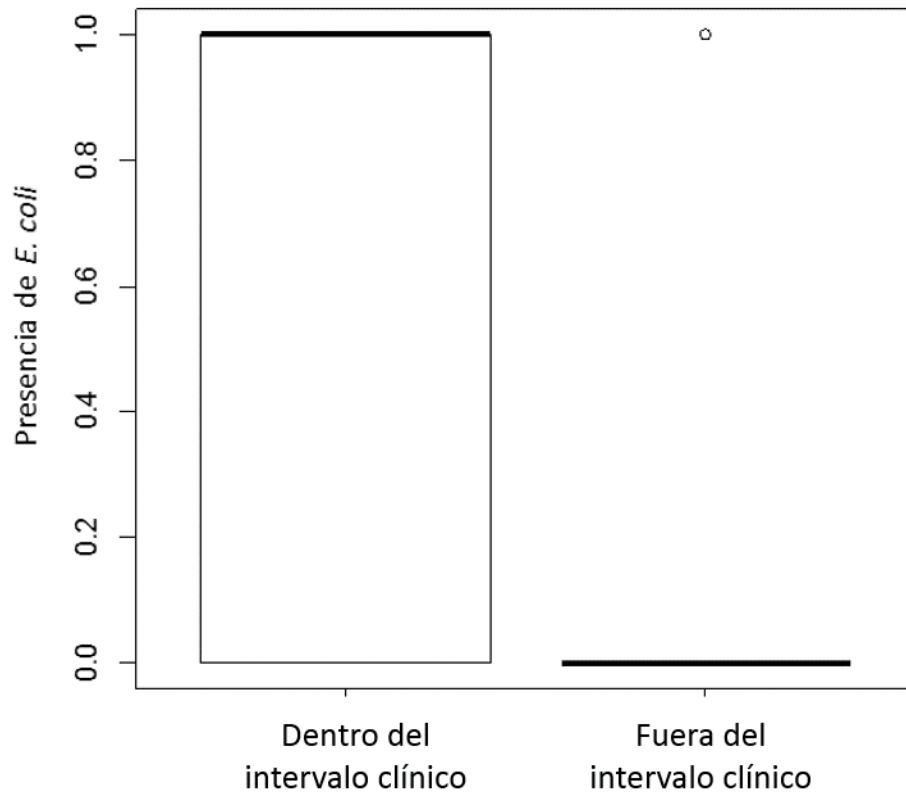


Figura 18. Presencia de *E. coli* en individuos con valores normales para estándares clínico (12-36% datos reportados por el Centro de Mamíferos Marinos –TMMC, por sus siglas en inglés) y fuera de ese intervalo.

Cuadro 13. Modelo lineal generalizado para evaluar el efecto de los neutrófilos circulantes sobre el número de total de bacterias cultivables

GLM (Bacteria~neutrófilos,binomial)

Variable	gl	F	p
<i>E. coli</i>	1	36.455	0.0539
<i>Klebsiella</i> sp.	1	38.983	0.276
<i>Proteus</i> sp.	1	37.355	0.930
<i>E. faecalis</i>	1	7.940	0.383
<i>B. cereus</i>	1	4.573X10 ⁻¹⁰	1
<i>B. subtilis</i>	1	7.940	0.383
<i>B. nealsoni</i>	1	13.003	0.212
<i>P. aeruginosa</i>	1	4.573X10 ⁻¹⁰	1
<i>A. iwoffii</i>	1	7.940	0.383
<i>E. fergusonii</i>	1	6.279	0.119
<i>Sporosarcina</i> sp.	1	4.573X10 ⁻¹⁰	1

La presencia de rotavirus y adenovirus no afectaron el número de bacterias entéricas cultivables (Cuadro 14).

Cuadro 14. Modelo lineal generalizado para evaluar el efecto de la presencia de adenovirus o de rotavirus sobre el número de bacterias cultivables.

GLM (Número total de bacterias~Adenovirus*Rotavirus*Edad)

Variables	gl	F	p
Adenovirus	22	0.0372	0.8490
Rotavirus	23	0.4862	0.4936
Edad	24	2.8684	0.1045
Edad:RTV	21	0.0225	0.8822
Edad:ADV	20	0.0571	0.8135

VII.6. INTERACCIONES BACTERIANAS

Durante el análisis de las colonias, se observaron algunas colonias con diferentes tipos de bacterias asociadas que no pudieron ser separadas, a pesar de haber realizado diversas diluciones y resiembras.

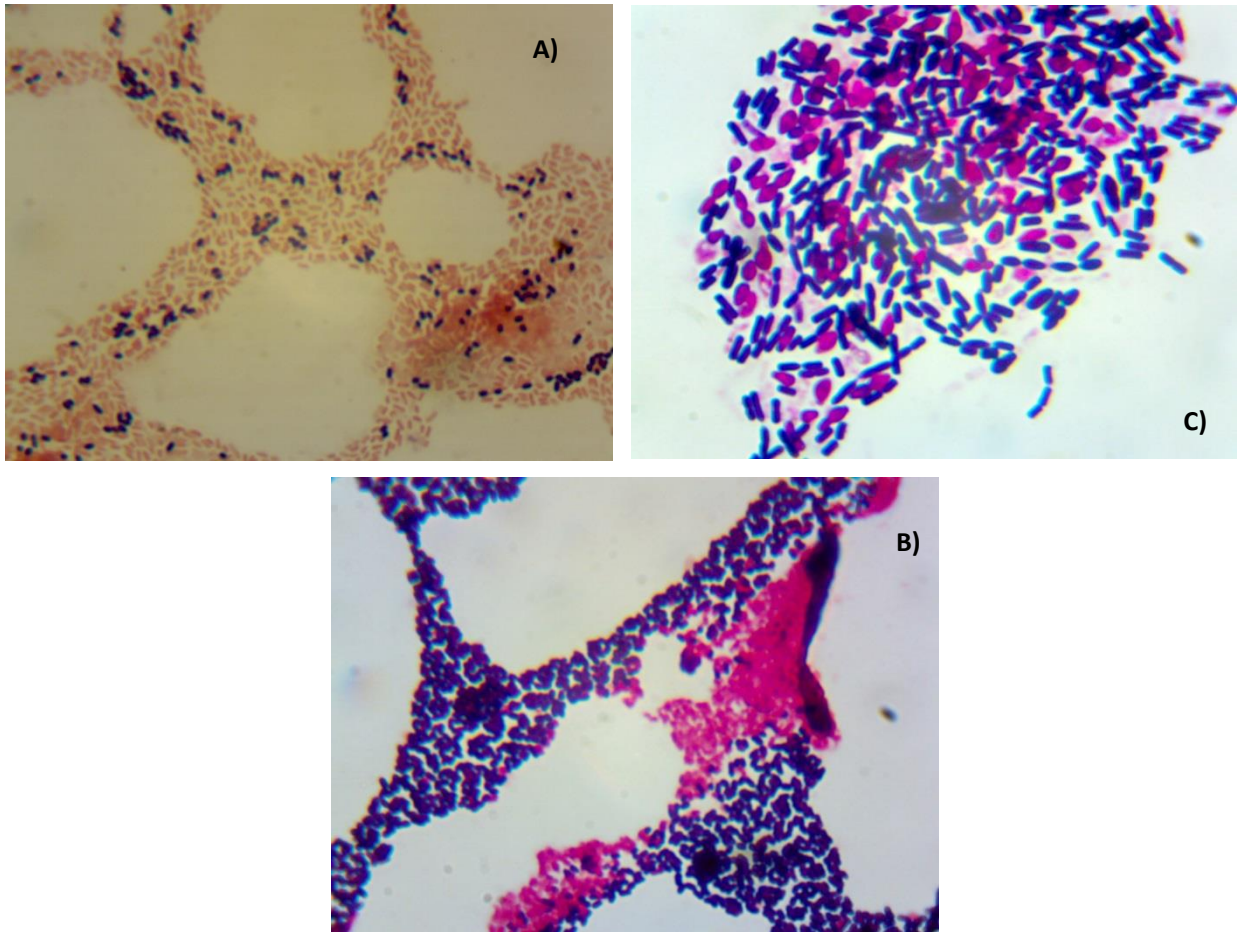


Figura 19. Asociaciones entre diferentes tipos de bacterias. A) bacterias asociadas en crías de dos meses, B) bacterias asociadas en crías de cinco y C) bacterias asociadas en crías de doce meses.

VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo se buscó identificar la microbiota bacteriana cultivable del tracto intestinal de crías de lobo marino de California durante diferentes etapas de su desarrollo temprano. Se probaron las hipótesis de que se verían cambios en la composición de la microbiota bacteriana cultivable debido a diferencias conductuales, ambientales y del desarrollo asociadas a cada etapa. Los resultados mostraron que al igual que en otras especies de carnívoros (Macki, 2005; Holzapfel and Naughton, 2005) las enterobacterias forman parte de la microbiota del colon desde la etapa neonatal.

En general, las bacterias más frecuentemente identificadas en las crías de lobo marino de California fueron *Proteus*, *Klebsiella* y *E. coli*. En diversas especies de mamíferos terrestres *Proteus*, *Klebsiella* y *E. coli* forman parte de la primeras bacterias que entran en contacto con el hospedero, su permanencia dentro del hospedero podría estar relacionada a sus mecanismos de colonización, adhesión y su relación con el sistema inmune del hospedero (Forchielli y Walker, 2005; Maynard et al., 2012). En el caso de *E. coli* se sabe que está muy bien adaptada al ambiente intestinal y se encuentra restringida al espacio luminal, alejada del moco intestinal (Fanaro, 2003, citado en Pereira and Giugliano, 2013); sin embargo, algunas cepas patógenas poseen en su superficie adhesinas, las cuales le confieren una mayor capacidad de colonizar al hospedero, mientras que otras se adhieren a través de los pili (Isaacson et al., 1977). *Klebsiella* permanece en la superficie de la mucosa del tracto digestivo (Lau et al., 2009) y en algunas cepas la cápsula que posee esta bacteria inhibe el contacto con factores del complemento y reduce la fagocitosis que es llevada a cabo por los macrófagos (Favre-Bonte et al., 1999; Cortes et al., 2002). En el caso de *Proteus*, una de las principales características es su movilidad incluso en ambientes acuosos, ya que es capaz de diferenciarse en una célula elongada, multinucleada y con una mayor densidad flagelar para una mayor movilidad y lo cual le permite permanecer dentro del hospedero (Tuson et al., 2013). Además, la mayor frecuencia de estas bacterias en los lobos marinos de California podría estar relacionada con sus efectos sobre el sistema inmune, principalmente hacia la maduración del tejido linfoide asociado a mucosas, así como para

evitar el asentamiento de bacterias patógenas, mantener una comunidad bacteriana ecológica estable y un efecto sobre la modulación de las respuestas inmunes (Maynard et al., 2012).

Las bacterias observadas como las más comunes en estos animales podrían además reflejar la habilidad de estos microorganismos de permanecer a lo largo del desarrollo del hospedero, lo que implicaría una historia de coevolución con el hospedero. Se supondría que estas bacterias son adquiridas durante la gestación (DiGuilio, 2012), durante el parto, o, posteriormente, con la transferencia de la leche materna (Martín et al., 2009, 2012) o del ambiente (Palmer et al., 2007).

A pesar de las bacterias comunes que arriba se mencionan, algunas bacterias solo fueron identificadas en los neonatos y no en otras etapas del desarrollo de las crías, como fue el caso de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus nealsoni*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Esto podría deberse a cambios postnatales en el ambiente intestinal que podrían disminuir la densidad de estas bacterias a tal grado que en etapas posteriores no puedan ser aisladas. Es posible que los cambios que se dan durante el periodo postnatal como la habilidad de absorber nutrientes (Buddington and Malo, 2003), reciclar ácidos biliares (Shneider, 2001) y el desarrollo de un sistema inmune (Nelson et al., 1998, citado en Buddington, 2002) puedan generar un ambiente desfavorable para estas bacterias, las cuales podrían pasar a un estado viable pero no cultivable (Oliver, 2005), lo que podría dificultar su cultivo en etapas posteriores del desarrollo de las crías. Esto también sugiere que al no encontrar estas bacterias en etapas posteriores, los cambios postnatales en el lobo marino de California continúen incluso después de los doce meses de edad de las crías.

Por otra parte, sería importante considerar que la ausencia de estas bacterias en etapas posteriores podría estar relacionada con aspectos de sistema inmune, es decir, determinar si estas bacterias son cepas patógenas (Bottone, 2010; Drobniowski, 1993), para las cuales el hospedero pudo haber montado una respuesta inmune para eliminarlas, o las bacterias

comensales a través de la competencia y secreción de antimicrobianos no permitieron que se asentarán (Tlaskalová-Hogenová et al., 2011).

La presencia de *Acinetobacter iwoffii* en una cría de cinco meses y de *Sporosarcina* en otra cría de doce meses fue inesperada debido a que estos géneros no han sido reportados en el tracto digestivo de carnívoros. *A. iwoffii* es considerada como parte de la microbiota de la piel, orofaringe y perineo del humano (Ku et al., 2000), también se han reportado especies de *Acinetobacter* en la superficie del mar (Baumann, Doudoroff and Stainer, 1968), lodo y heces (Dijkshoorn et al., 2005), así como en pulgas y garrapatas de ganado ovino, caprino, perros y gatos (Kumsa et al., 2012). En mamíferos marinos solamente se tiene un reporte de la presencia de *A. iwoffii*, *A. calcoaceticus* y *A. anitratus* en la cavidad nasal de crías de lobo marino de California en el Golfo de California (Hernández-Castro et al., 2005). Mientras que para *Sporosarcina* los reportes que se tienen no incluyen el tracto digestivo, pero se sabe que tiene una amplia distribución y que su presencia está relacionada con actividades antropogénicas (Pregerson, 1973). Sin embargo, la característica de aerobiosis estricta de las bacterias no concuerda con las bacterias anaerobias facultativas que se encuentran principalmente en el colon. Algunas bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, un anaerobio facultativo, utiliza el oxígeno para su metabolismo y crecimiento por medio de la formación de *biofilms*, los cuales le permiten crear un microambiente dentro del *biofilm* gracias a la matriz extracelular que impide la difusión de gases como el oxígeno (Werner et al., 2004). Si este resultado refleja un hallazgo genuino de una bacteria que coloniza el tracto entérico, valdría la pena investigar la presencia, función biológica y mecanismo de adhesión y colonización en el intestino del lobo marino de California.

Para *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Sporosarcina* su presencia en poco individuos podrían reflejar diferencias en la composición de la microbiota entre individuos, como ha sido reportado en cerdos, en los cuales se encontraron diferencias significativas en la diversidad de la microbiota inter-individuo (Schierack et al., 2007).

Los resultados obtenidos de la diversidad bacteriana de acuerdo a la edad apoya la hipótesis planteada sobre los cambios temporales de las bacterias intestinales. La disminución en el número de bacterias cultivables en crías de cinco meses podría reflejar aspectos de historia de vida de las crías tales como la alimentación, esto podría sugerir que al igual que lo reportado anteriormente las crías podrían estar introduciendo otro tipo de alimento en su dieta además de la leche materna a los cinco meses aproximadamente (Aguayo-Lobo, 1991; Langer, 2008; Vaishampayan et al., 2010). Sin embargo, analizando este resultado en conjunto con las diferencias observadas en la diversidad de bacterias entre sexos, es muy interesante observar que en el caso de las hembras durante la etapa neonata y los dos meses la diversidad se mantiene, mientras que en los machos la diversidad disminuye desde los dos meses de edad, lo cual podría sugerir que los machos están explorando otras fuentes de alimentación a edad temprana en comparación con las hembras. Las diferencias en aspectos de la historia de vida de hembras y machos con dimorfismo sexual se basan en aspectos hormonales y de desarrollo de caracteres sexuales secundarios; no obstante, a esta edad las crías del lobo marino de California no presentan un dimorfismo sexual, e incluso en el lobo marino de Galápagos los niveles de testosterona a esta edad son imperceptibles (Brock, 2012).

En algunas crías de pinnípedos se ha demostrado que los machos presentan un mayor peso al nacer que las hembras (Ono and Boness, 1996; Osman et al., 2010), e incluso se ha propuesto que los machos pasan mayor tiempo alimentándose de las madre (Cappozzo et al., 1991), sin embargo una vez que nacen las crías, no se observan diferencias en peso y talla entre hembras y machos (Ono and Boness, 1996). Estas diferencias en la tasa de crecimiento entre sexos se observan posteriormente al desarrollo temprano, donde los machos tienen una mayor tasa de crecimiento con respecto a las hembras (Guinet et al., 1999). De manera general se sabe que mientras los machos parecen invertir más en crecimiento, las hembras invierten más en su respuesta inmune (Folstad et al., 1992; McKean et al., 1996). Los resultados obtenidos en este trabajo con respecto a las diferencias en los patrones de alimentación podrían sugerir que los machos comienzan a

alimentarse antes por la necesidad de otro tipo de proteína que posteriormente le ayudaran en su crecimiento.

Esta tesis no encontró evidencia de que la condición corporal juegue un papel importante en la diversidad bacteriana de las crías, posiblemente debido a que el tipo de bacterias que se identificaron no representan una amenaza para el hospedero y a que la cantidad de recursos destinados para las funciones en las que participa el sistema inmune en esta etapa no compromete otros aspectos biológicos de las crías, por lo tanto no se observa una distribución diferencial de recursos energéticos para esta etapa del desarrollo temprano.

De acuerdo con la hipótesis planteada sobre el efecto de los parámetros inmunes circulantes en las bacterias entéricas cultivables, los resultados mostraron un efecto de los linfocitos sobre la presencia/ausencia *E. coli*. Los linfocitos son parte del sistema inmune adaptativo y son capaces de regular esta respuesta inmune y de producir anticuerpo (Tizard, 2009). En el tracto digestivo existe una compleja comunicación entre las células epiteliales intestinales como las células goblet, células Paneth, células M, el tejido linfoide asociado a mucosas, linfocitos intra-epiteliales y la microbiota intestinal y se sabe que ante cambios de la microbiota o presencia de agentes patógenos puede incrementar la proliferación de linfocitos (Zhang et al., 2004), los cuales son capaces de estimular la producción de péptidos antimicrobianos por parte de las células Paneth (Walker et al., 2013). El efecto de los linfocitos sobre *E. coli* podría asociarse a una modificación en sus poblaciones o de cepas patógenas que pudieron desencadenar un efecto sobre los linfocitos.

Desde un punto de vista clínico, los valores fuera del rango de los niveles normales de los perros se asocian con linfangiectasia, hiperadrenocorticismos, con enfermedades virales como el distemper y con estrés (Núñez and Bouda, 2008). Esto también, podría indicarnos que el efecto de los linfocitos sobre *E. coli* podría no ser directo, sino asociado a la presencia de algún virus, que además podría tener un efecto sobre las poblaciones de *E. coli*. Interacciones entre virus y bacterias se han reportado en el tracto respiratorio (el

virus de la influenza y *S. pneumoniae*) (Bosch et al., 2013) y tracto digestivo (el virus de la polio y la microbiota intestinal) (Kuss et al., 2011), en las que se observó un incremento en la replicación del virus y efectos detrimentales sobre el hospedero.

La presencia de rotavirus y adenovirus no pareció impactar la microbiota intestinal cultivable. Esto puede indicar que, si bien, estos virus son conocidos por sus efectos patológicos en el tracto digestivo, también podrían formar parte de los microorganismos que se encuentran colonizando el intestino (Reyes et al., 2010). En posteriores estudios sería interesante conocer si estos virus podrían estar interactuando con otras bacterias y determinar si efectivamente estos virus podrían formar parte de la microbiota del recto, y que sus efectos sobre la salud del hospedero se relacione con cambios en el ambiente entérico.

De las interacciones estrechas entre bacterias que se observaron, no se pudo determinar la identidad de cada una de las bacterias. Sin embargo este tipo de asociaciones han sido reportadas previamente. En el buitre negro americano (*Coragyps atratus*), se observaron dos interacciones entre diferentes tipos de bacterias del tracto digestivo, una de las interacciones estaba formada por *Actinomyces bovis* y *Neisseria sicca* y en el segundo caso, la interacción se dio entre *Actinomyces bovis* y un bacilo Gram-negativo que no pudo ser identificado (Rodrigues et al., 2003). Al igual que lo observado en este trabajo, esas interacciones parecían ser muy estables y resistieron a diversos intentos de aislarlas. En este sentido, resulta interesante conocer de qué tipo de bacterias se trata y determinar qué es lo que las mantiene en estas fuertes interacciones, si estas son estables a lo largo del desarrollo de la cría y si les confieren alguna ventaja en aspectos de supervivencia y mantenimiento dentro del ambiente intestinal.

Para la gran mayoría de las bacterias identificadas en este trabajo se tiene información sobre sus efectos en los hospederos, las cuales forman parte de la microbiota intestinal, pero también se sabe que bajo ciertas circunstancias podrían ser potencialmente patógenos y que podrían generar cuadros patológicos en los hospederos, por esta razón resulta interesante conocer qué pasa con la parte de las bacterias que no son cultivables y

conocer si existe una respuesta por parte de las bacterias no cultivables ante la presencia y abundancia de las bacterias cultivables. Estudios posteriores podrían incluir otros tipos de medios de cultivos como el agar Wilkins-Chalgren para el total de anaerobios (Wilkins and Chalgren, 1976), agar rogosa para *Lactobacilli* (Rasic, 1984), agar reforzado para clostridia (Fujisawa et al., 1995), agar Beerens para bifidobacterias (Beerens, 1990). También debieran incluirse condiciones anaerobias para cultivar a las bacterias e identificar las colonias aisladas por medio de la amplificación molecular de la unidad ribosomal pequeña 16S. Otra aproximación para el estudio de la diversidad bacteriana podría ser a través de las herramientas moleculares como el ARDRA, DGGE, ARISA y secuenciación masiva (Muyzer et al., 1993; Swanson et al., 2011; Tun et al., 2012). También es importante tomar en cuenta que dentro del ambiente intestinal también existen otros tipos de microorganismos, como hongos, virus, y parásitos eucariontes, los cuales resultaría interesante incluir en trabajos futuros ya que cambios observados en la frecuencia y diversidad bacteriana podrían estar asociados a interacciones con otros microorganismos.

IX. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Esta tesis constituye un primer esfuerzo para describir la diversidad y composición de la microbiota entérica cultivable en vertebrados marinos de vida de libre a lo largo de su desarrollo temprano. Se encontró que la diversidad puede reflejar aspectos de historia de vida, tales como la alimentación, como se observó en los patrones de diversidad entre hembras y machos. También se identificaron bacterias que no han sido reportadas hasta el momento como parte de la microbiota intestinal de carnívoros. Se encontró que la diversidad de la microbiota no representa un costo energético en los hospederos. También se observó que los linfocitos circulantes predecían la presencia de *E. coli*. Finalmente, se observaron diversas asociaciones entre diferentes bacterias las cuales resistieron diversos intentos de separación.

Algunas de las perspectivas de este trabajo son:

- La implementación de herramientas moleculares para evaluar la parte no cultivable del microbioma bacteriano. Además de determinar cuáles son los tipos de bacterias que se encuentran en el recto de los lobos marinos de California, es importante conocer cómo estas poblaciones cambian y si existen especies clave para el mantenimiento de la microbiota. Sin embargo, debido a que el microbioma no solo está constituido por bacterias, resultaría interesante conocer si la diversidad del resto de los microorganismos cambia entre las etapas del resto de los microorganismos.
- Determinar si existen similitudes en la microbiota entre individuos más cercanamente emparentados, esto podría evaluarse también a nivel de las colonias.
- De acuerdo con las diferencias de la diversidad entre sexos es importante corroborar los patrones de alimentación en entre crías hembras y machos y si esto está relacionado con aspectos de historia de vida como crecimiento, desarrollo y sistema inmune.

X. LITERATURA CITADA

- Akin, D.E., Borneman, W.S., 1990. Role of rumen fungi in fiber degradation. *J. Dairy Sci.* 73, 3023–3032.
- Andrade-torres, A., 2010. antigua interacción entre plantas y hongos. *Ciencia* 84–90.
- Auriol-Gamboa, D., Zavala-González, A., 1994. Algunos factores ecológicos que determinan la distribución y abundancia del lobo marino *Zalophus californianus*, en el golfo de California. *Ciencias Mar.* 20.
- Becker, A. a M.J., Hesta, M., Hollants, J., Janssens, G.P.J., Huys, G., 2014. Phylogenetic analysis of faecal microbiota from captive cheetahs reveals underrepresentation of Bacteroidetes and Bifidobacteriaceae. *BMC Microbiol.* 14, 43.
- Bell, J.A., Kopper, J.J., Turnbull, J. a, Barbu, N.I., Murphy, A.J., Mansfield, L.S., 2008. Ecological characterization of the colonic microbiota of normal and diarrheic dogs. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2008, 149694.
- Bidartondo, M.I., 2005. The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. *New Phytol.* 167, 335–352.
- Bosch, A. a T.M., Biesbroek, G., Trzcinski, K., Sanders, E. a M., Bogaert, D., 2013. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathog.* 9, e1003057.
- Bottone, E.J., 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 382–98.
- Bowen, L., Aldridge, B.M., DeLong, R., Melin, S., Godinez, C., Zavala, a, Gulland, F., Lowenstine, L., Stott, J.L., Johnson, M.L., 2006. MHC gene configuration variation in geographically disparate populations of California sea lions (*Zalophus californianus*). *Mol. Ecol.* 15, 529–33.
- Boxma, B., De Graaf, R.M., van der Staay, G.W.M., van Alen, T.A., Ricard, G., Gabaldón, T., van Hoek, A.H.A.M., Moon-van der Staay, S.Y., Koopman, W.J.H., van Hellemond, J.J., Tielens, A.G.M., Friedrich, T., Veenhuis, M., Huynen, M.A., Hackstein, J.H.P., 2005. An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* 434, 74–79.
- Breitbart, M., Hewson, I., Felts, B., Mahaffy, J.M., Nulton, J., Salamon, P., Rohwer, F., 2003. Metagenomic Analyses of an Uncultured Viral Community from Human Feces 185, 6220–6223.

- Buddington, R.K., 2003. in the gastrointestinal tract of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 64, 646–651.
- Cebra, J.J., 1999. Influences of microbiota on intestinal immune system. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 1046–1051.
- Chan, C.X., Bhattacharya, D., 2010. The Origin of Plastids. *Nat. Educ.* 3, 84.
- Clapper, W.E., Meade, G.H., 1963. Normal Flora of the Nose, Throat, and Lower Intestine of Dogs. *J. Bacteriol.* 85, 643–8.
- Clemente, J.C., Ursell, L.K., Parfrey, L.W., Knight, R., 2012. Review The Impact of the Gut Microbiota on Human Health : An Integrative View. *Cell* 148, 1258–1270.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Sn, S., Lappin-scott, H.M., 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–45.
- Cox, C.J., Foster, P.G., Hirt, R.P., Harris, S.R., Embley, T.M., 2008. The archaeobacterial origin of eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20356–61.
- Damore, J.A., Gore, J., 2012. A slowly evolving host moves first in symbiotic interactions. *Natl. Institutes Heal.* 65, 2391–2398.
- Douglas, S.E., 1998. Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 655–61.
- Drobniewski, F.A., 1993. and Related Species. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 324–338.
- Duerkop, B. a, Clements, C. V, Rollins, D., Rodrigues, J.L.M., Hooper, L. V, 2012. A composite bacteriophage alters colonization by an intestinal commensal bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 17621–6.
- Ellison, A.M., Farnsworth, E.J., Twilley, R.R., 1996. Facultative mutualism between red mangroves and root-fouling sponges in belizean mangal. *Ecology* 77, 2431–2444.
- Ettinger, S.J., Feldman, E.C., 2007. *Tratado de Medicina Interna Veterinaria*, Sexta. ed. Elsevier-Health Sciences Division, Madrid, España.
- Fayer, R., Fair, P.A., Bossart, G.D., Santi, M., 2008. Examination of naturally exposed bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) for Microsporidia, *Cryptosporidium*, and *Giardia*. *J. Parasitol.* 94, 143–147.
- Fayer, R., Trout, J.M., Xiao, L., Morgant, U.M., Lal, A.A., Dubey, J.P., 2001. *Cryptosporidium canis* N. sp. from domestics dogs. *J. Parasitol.* 87, 1415–1422.

- Finlay, R.D., 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis : with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *J. Exp. Bot.* 59, 1115–1126.
- Frandsen, R.D., 1995. Anatomía y fisiología de los animales domésticos, Quinta. ed. INTERAMERICANA MCGRAW-HILL, México, D.F.
- Frey, J.C., Rothman, J.M., Pell, A.N., Nizeyi, B., Cranfield, M.R., Angert, E.R., Nizeyi, J.B., 2006. Fecal Bacterial Diversity in a Wild Gorilla Fecal Bacterial Diversity in a Wild Gorilla. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3788–3792.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J., Tarkka, M., 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.* 176, 22–36.
- Fumagalli, M., Pozzoli, U., Cagliani, R., Comi, G.P., Riva, S., Clerici, M., Bresolin, N., Sironi, M., 2009. Parasites represent a major selective force for interleukin genes and shape the genetic predisposition to autoimmune conditions. *J. Exp. Med.* 206, 1395–408.
- Glad, T., Bernhardsen, P., Nielsen, K.M., Brusetti, L., Andersen, M., Aars, J., Sundset, M. a, 2010a. Bacterial diversity in faeces from polar bear (*Ursus maritimus*) in Arctic Svalbard. *BMC Microbiol.* 10, 10.
- Glad, T., Kristiansen, V.F., Nielsen, K.M., Brusetti, L., Wright, A.-D.G., Sundset, M. a, 2010b. Ecological characterisation of the colonic microbiota in arctic and sub-arctic seals. *Microb. Ecol.* 60, 320–30.
- Greetham, H.L., Giffard, C., Hutson, R. a, Collins, M.D., Gibson, G.R., 2002. Bacteriology of the Labrador dog gut: a cultural and genotypic approach. *J. Appl. Microbiol.* 93, 640–6.
- Guarner, F., Malagelada, J.-R., 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet* 360, 512–519.
- Hayes, K.S., Bancroft, A.J., Goldrick, M., Portsmouth, C., Roberts, I.S., Grenis, R.K., 2010. Exploitation of intestinal microflora by the parasitic nematode *Trichuris muris*. *Science* (80-). 328, 1391–1394.
- Hernández, C.J.C., Aurióles-Gamboa, D., 1997. Fecundidad tardía en hembras marcadas de lobo marino de California, *Zalophus c. californianus*, de Los Islotes, Bahía de La Paz, México. In: XXII Reunión Internacional Para El Estudio de Los Mamíferos Marinos.
- Hernández-Castro, R., Martínez-Chavarría, L., Díaz-Avelar, A., Romero-Osorio, A., Godínez-Reyes, C., Zavala-González, A., Verdugo-Rodríguez, A., 2005. Aerobic bacterial flora of the nasal cavity in Gulf of California sea lion (*Zalophus californianus*) pups. *Vet. J.* 170, 359–63.

- Hilty, M., Burke, C., Pedro, H., Cardenas, P., Bush, A., Bossley, C., Davies, J., Ervine, A., Poulter, L., Pachter, L., Moffatt, M.F., Cookson, W.O.C., 2010. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One* 5, e8578.
- Hoffmann, C., Dollive, S., Grunberg, S., Chen, J., Li, H., Wu, G.D., Lewis, J.D., Bushman, F.D., 2013. Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS One* 8, e66019.
- Hooper, L. V, Gordon, J.I., 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* (80-.). 292, 1115–1118.
- Hooper, L. V, Midtvedt, T., Gordon, J.I., 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 283–307.
- Hucker, G.J., 1920. A new modification and application of the Gram stain. *New York Agric. Exp. Stn.* 395–397.
- Huss, M., van Kooten, T., Persson, L., 2010. Intra-cohort cannibalism and size bimodality: a balance between hatching synchrony and resource feedbacks. *Oikos Synth. Ecol.* 119, 2000–2011.
- Isaacson, R.E., Nagy, B., Moon, H.W., 1977. Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: colonization and adhesion factors of pig enteropathogens that lack K88. *J. Infect. Dis.* 135, 531–9.
- Janeczko, S., Atwater, D., Bogel, E., Greiter-Wilke, a, Gerold, a, Baumgart, M., Bender, H., McDonough, P.L., McDonough, S.P., Goldstein, R.E., Simpson, K.W., 2008. The relationship of mucosal bacteria to duodenal histopathology, cytokine mRNA, and clinical disease activity in cats with inflammatory bowel disease. *Vet. Microbiol.* 128, 178–93.
- Jeon, T.J., Jeon, K.W., 2004. Gene switching in *Amoeba proteus* caused by endosymbiotic bacteria. *J. Cell Sci.* 117, 535–43.
- Johansson, J.F., Paul, L.R., Finlay, R.D., 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 1–13.
- Konstantinov, S.R., Favier, C.F., Zhu, W.Y., Williams, B. a, Kl, J., Souffrant, W.-B., De Vos, W.M., Akkermans, A.D.L., Smidt, H., 2004. Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. *Anim. Res.* 53, 317–324.
- Landeweert, R., Hoffland, E., Finlay, R.D., Kuyper, T.W., van Breemen, N., 2001. Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecol. Evol.* 16, 248–254.

- Landry, C.L., 2012. Mighty Mutualisms: The Nature of Plant-pollinator Interactions [WWW Document]. Nat. Educ. Knowl.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D. a, Sogin, M.L., Pace, N.R., 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 6955–9.
- Lang, J.M., Benbow, M.E., 2013. Species interactions and competition [WWW Document]. Nat. Educ. Knowl.
- Lau, H., Huffnagle, G., Moore, T., 2009. Host and microbiota factors that control klebsiella pneumoniae mucosal colonization in mice. *Microbes Infect.* 10, 1283–1290.
- Lavery, T.J., Roudnew, B., Seymour, J., Mitchell, J.G., Jeffries, T., 2012. High nutrient transport and cycling potential revealed in the microbial metagenome of Australian sea lion (*Neophoca cinerea*) faeces. *PLoS One* 7, e36478.
- Lazazzera, B. a, 2000. Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 177–82.
- Leake, J.R., 2004. Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 422–8.
- Mackie, R.I., Sghir, a, Gaskins, H.R., 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 1035S–1045S.
- Margulis, L., Sagan, D., 2008. *Microcosmos. Cuatro mil millones de años de evolución desde nuestros ancestros microbianos.*, Tercera. ed. Metatemas Tusquets Editores, Barcelona, España.
- Martín, R., Jiménez, E., Heilig, H., Fernández, L., Marín, M.L., Zoetendal, E.G., Rodríguez, J.M., 2009. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 965–9.
- Martín, V., Maldonado-Barragán, A., Moles, L., Rodríguez-Baños, M., Campo, R. Del, Fernández, L., Rodríguez, J.M., Jiménez, E., 2012. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J. Hum. Lact.* 28, 36–44.
- Maynard, C.L., Elson, C.O., Hatton, R.D., Weaver, C.T., 2012. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489, 231–241.
- Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O., Kasper, D.L., 2005. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122, 107–18.

- Mcfarland, L. V, 2000. Normal ora : diversity and functions. *Microb. Ecol. Health Dis.* 12, 193–207.
- Measures, L., Olson, M., 1999. Giardiasis in canadian phocid seals. In: IAAAM 30th Annual Conference Proceedings , Boston, Massachusetts. p. 182.
- Moberg, F., Folke, C., 1999. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecol. Econ.* 29, 215–233.
- Moon, D., Moon, J., Keagy, A., 2010. Direct and Indirect Interactions. *Nat. Educ. Knowl.* 3, 1–6.
- Moreira, D., Guyader, H. Le, Philippe, H., 2000. The origin of red algae and the evolution of chloroplasts 405, 69–72.
- Morris, J.J., Lenski, R.E., Zinser, E.R., Loss, A.G., 2012. Evolution of Dependencies through The Black Queen Hypothesis : Evolution of Dependencies through.
- Muyzer, G., Waal, E.C.D.E., Uitierlinden, A.G., 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA 59, 695–700.
- Nelson, T.M., Rogers, T.L., Carlini, A.R., Brown, M. V, 2013. Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic seals: a comparison of wild and captive animals. *Environ. Microbiol.* 15, 1132–45.
- Niwińska, B., 2012. Digestion in Ruminants. In: Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology. pp. 245–258.
- Núñez, L., Bouda, J., 2008. Hematología-Leucocitos. In: Patología Clínica Veterinaria. p. 55.
- Ochman, H., Lawrence, J.G., Groisman, E.A., 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405, 299–304.
- Ochman, H., Moran, N.A., 2001. Genes Lost and Genes Found : Evolution of Bacterial Pathogenesis and Symbiosis 1096, 1095–1098.
- Oliver, J.D., 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43, 93–100.
- Ono, K. a., Boness, D.J., 1996. Sexual dimorphism in sea lion pups: differential maternal investment, or sex-specific differences in energy allocation? *Behav. Ecol. Sociobiol.* 38, 31–41.
- Orpin, C.G., Joblin, K.N., 1997. Rumen microbial ecosystem, Second. ed. Blackie Academic & Professional.

- Osman, L.P., Moreno, C.A., Trites, A.W., 2010. Growth rates and differential investment in male and female Juan Fernández fur seal pups Growth rates and differential investment in male and female Juan Fernández fur seal pups. *J. Mammal.* 91, 1188–1196.
- Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D. a, Brown, P.O., 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 5, e177.
- Patt, D.I., Patt, G.R., 1969. *Comparative Vertebrate Histology*, First. ed. HARPER & ROW, United States of America.
- Reyes, A., Haynes, M., Hanson, N., Angly, F.E., Heath, A.C., Rohwer, F., Gordon, J.I., 2010. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 466, 334–338.
- Rodrigues, L., Farias, L.M., Nicoli, J.R., Fernandes Silva, M.C., Meira, A.T., César, P., de Lima, L.A., Fernandes Redondo, R., Ferreira, P., Bernardes, M., 2003. Dominant culturable bacterial microbiota in the digestive tract of the American Black vulture (*Coragyps atratus* Bechstein 1793) and search for antagonistic substances. *Brazilian J. Microbiol.* 34, 218–224.
- Rojo, C., González, E., 2013. *Anatomía Veterinaria. Estomago monocavitario. Anatomías externa e interna. Posición y relaciones anatómicas. Sujeciones. Anatomía comparada.* 5, 16–27.
- Rustrian-Fernández, E., Ramírez-Hernández, D., Solano-García, G., Anda-Hernández, M.A. De, 2013. Estudio preliminar de identificación bioquímica de Entero- bacterias en heces de Coyote (*Canis latrans*) en vida salvaje y cautiverio. *Investig. Univ. Multidiscip.* 121–132.
- Savage, D.C., 1977. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annu. Rev. Microbiol.* 31, 107–133.
- Schierack, P., Walk, N., Reiter, K., Weyrauch, K.D., Wieler, L.H., 2007. Composition of intestinal Enterobacteriaceae populations of healthy domestic pigs. *Microbiology* 153, 3830–7.
- Schmidt, H., Hensel, M., 2004. Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 14–56.
- Simpson, J.M., Martineau, B., Jones, W.E., Ballam, J.M., Mackie, R.I., 2002. Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microb. Ecol.* 44, 186–97.
- Sisson, S., Grossman, J.D., 2005. *Anatomía de los animales domésticos*, Quinta. ed. MASSON, S.A., Barcelona, España.

- Smith, K.F., Acevedo-Whitehouse, K., Pedersen, a. B., 2009. The role of infectious diseases in biological conservation. *Anim. Conserv.* 12, 1–12.
- Smith, S.C., Chalker, A., Dewar, M.L., Arnould, J.P.Y., 2013. Age-related differences revealed in Australian fur seal *Arctocephalus pusillus doriferus* gut microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86, 246–55.
- Smith, S.E., Jakobsen, I., Grønlund, M., Smith, F.A., 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiol.* 156, 1050–7.
- Stackebrandt, E., Cummins, C.S., Johnson, J.L., 2006. Family Propionibacteriaceae: The Genus *Propionibacterium*. In: *Prokaryotes*. pp. 400–418.
- Stanley, G.D., 2006. Photosymbiosis and the Evolution of Modern Coral Reefs. *Science* (80-.). 312, 857–858.
- Steinert, M., Hentschel, U., Hacker, J.Y., 2000. Symbiosis and Pathogenesis : Evolution of the Microbe-Host Interaction 11, 1–11.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Gibson, G.R., Collins, M.D., Doré, J., Bonnet, G.I.S., Dore, J., 1999. Direct Analysis of Genes Encoding 16S rRNA from Complex Communities Reveals Many Novel Molecular Species within the Human Gut Direct Analysis of Genes Encoding 16S rRNA from Complex Communities Reveals Many Novel Molecular Species within the Human Gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4799–4807.
- Suchodolski, J.S., 2011a. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 41, 261–72.
- Suchodolski, J.S., 2011b. Companion animals symposium: microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *J. Anim. Sci.* 89, 1520–30.
- Swanson, K.S., Dowd, S.E., Suchodolski, J.S., Middelbos, I.S., Vester, B.M., Barry, K. a, Nelson, K.E., Torralba, M., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Cann, I.K.O., White, B. a, Fahey, G.C., 2011. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME J.* 5, 639–49.
- Thompson, J.N., 2001. Coevolution. *Encycl. Life Sci.*
- Timmis, J.N., Ayliffe, M. a, Huang, C.Y., Martin, W., 2004. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat. Rev. Genet.* 5, 123–35.
- Tizard, I.R., 2009. Los linfocitos. In: *Introducción a La Inmunología Veterinaria*. p. 128.

- Tlaskalová-Hogenová, H., Stěpánková, R., Kozáková, H., Hudcovic, T., Vannucci, L., Tučková, L., Rossmann, P., Hrnčíř, T., Kverka, M., Zákostelská, Z., Klimešová, K., Příbylová, J., Bártová, J., Sanchez, D., Fundová, P., Borovská, D., Srůtková, D., Zídek, Z., Schwarzer, M., Drastich, P., Funda, D.P., 2011. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell. Mol. Immunol.* 8, 110–20.
- Tremaroli, V., Bäckhed, F., 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489, 242–9.
- Tun, H.M., Brar, M.S., Khin, N., Jun, L., Hui, R.K.-H., Dowd, S.E., Leung, F.C.-C., 2012. Gene-centric metagenomics analysis of feline intestinal microbiome using 454 junior pyrosequencing. *J. Microbiol. Methods* 88, 369–76.
- Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Knight, R., Gordon, J.I., 2009. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* 1, 6ra14.
- Van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I.R., 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396, 69–72.
- Van Hees, P. a. W., Rosling, A., Lundström, U.S., Finlay, R.D., 2006. The biogeochemical impact of ectomycorrhizal conifers on major soil elements (Al, Fe, K and Si). *Geoderma* 136, 364–377.
- Van Valen, L., 1974. Molecular evolution as predicted by natural selection. *J. Mol. Evol.* 3, 89–101.
- Walker, C.R., Hautefort, I., Dalton, J.E., Overweg, K., Egan, C.E., Bongaerts, R.J., Newton, D.J., Cruickshank, S.M., Andrew, E.M., Carding, S.R., 2013. Intestinal intraepithelial lymphocyte-enterocyte crosstalk regulates production of bactericidal angiogenin 4 by Paneth cells upon microbial challenge. *PLoS One* 8, e84553.
- Yildirim, S., Yeoman, C.J., Sipos, M., Torralba, M., Wilson, B. a, Goldberg, T.L., Stumpf, R.M., Leigh, S.R., White, B. a, Nelson, K.E., 2010. Characterization of the fecal microbiome from non-human wild primates reveals species specific microbial communities. *PLoS One* 5, e13963.
- Zhang, G.-B., Chen, Y.-J., Shi, Q., Ma, H.-B., Ge, Y., Wang, Q., Jiang, Z., Xu, Y., Zhang, X.-G., 2004. Human recombinant B7-H3 expressed in *E. coli* enhances T lymphocyte proliferation and IL-10 secretion in vitro. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 36, 430–6.

Zhang, H., Chen, L., 2010. Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences reveals distal gut bacterial diversity in wild wolves (*Canis lupus*). *Mol. Biol. Rep.* 37, 4013–22.

XI. ANEXOS

XI.1. Anexo I Protocolos de pruebas bioquímicas

Tinción Gram

Reactivos:

- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol etílico/Acetona
- Fuscina

Procedimiento

1. Colocar una colonia en una gota de agua estéril sobre el portaobjetos y extender el material sobre la superficie del portaobjetos.
2. Fijar el frotis con el mechero.
3. Cubrir el frotis con cristal violeta durante 30 segundos y enjuagar con agua.
4. Colocar el lugol por 1 minuto y enjuagar con agua.
5. Decolorar con la mezcla de alcohol etílico/acetona y escurrir.
6. Cubrir con fuscina durante 1 minuto, lavar, escurrir y dejar secar a temperatura ambiente.
7. Observar al microscopio.

Prueba de catalasa

La catalasa es una enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas.

Reactivos:

- Peroxidasa al 3%

Procedimiento

1. Colocar una gota de peroxidasa 3% en un portaobjetos
2. Suspender una colonia de bacterias
3. Observar la presencia de burbujas, esto da un resultado positivo

Prueba de oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidadas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido

por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa solo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y excepcionalmente, en algunas microaerófilas, pero las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica.

Reactivos:

- Reactivo de Kovac (Para-dimetil-amino-Benzaldehído/Alcohol amílico/ácido clorhídrico químicamente puro).

Procedimiento

1. Colocar un trozo de papel filtro sobre la caja de Petri y añadir una gota del reactivo de Kovac.
2. Depositar sobre el papel con el reactivo una colonia de bacterias
3. Observar si dentro de los primeros 10 segundos aparece un color azul-violeta, esto da un resultado positivo.

Prueba de KOH

Esta prueba es útil para confirmar los resultados de la tinción Gram. Las bacterias Gram-positivas poseen una pared celular gruesa y al entrar en contacto con el hidróxido de potasio las bacterias no se lisan, mientras que en bacterias Gram-negativas que poseen una pared celular delgada las bacterias son lisadas con el peróxido de potasio y las bacterias toman una consistencia viscosa.

Reactivos

- Hidróxido de potasio al 3% (KOH)

Procedimiento

1. Colocar una gota de KOH 3% en un portaobjetos
2. Suspender una colonia de bacterias
3. Un resultado positivo se observa cuando las colonias tienen una consistencia viscosa

XI.2. Anexo II. Resultados de la identificación de colonias por medio de secuenciación

		RESULTADOS BLAST			
ID MICROIOLÓGICA	BLAST	Max Score	Total Score	Query cover	Ident
<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	2392	2392	100%	99%
<i>Aeromonas</i>	<i>Proteus sp.</i>	2427	2427	100%	100%
<i>Pseudomonas</i>	<i>Proteus sp.</i>	2473	2473	100%	100%
<i>Listeria</i>	<i>Bacillus cereus</i>	2405	2405	100%	100%
<i>Moraxella</i>	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	2398	2398	100%	100%
<i>Pseudomonas</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	2357	2357	100%	100%
<i>Pseudomonas</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	2455	2455	100%	100%
<i>Listeria</i>	<i>Proteus sp</i>	2355	2355	100%	99%
<i>Yersinia</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	1692	1692	100%	100%
<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella</i>	2309	2309	100%	99%
	<i>Acinetobacter</i>				
<i>Aeromonas</i>	<i>calcoaceticus</i>	2407	2407	100%	100%
<i>Enterobacter</i>	<i>Proteus sp</i>	2420	2420	100%	100%
<i>Proteus</i>	<i>Bacterium</i>	2519	2519	100%	99%
<i>Klebsiella</i>	<i>Uncultures Klebsiella</i>	2233	2233	100%	100%
<i>Pseudomonas</i>	<i>Proteus sp</i>	2418	2418	100%	100%
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	2017	2017	100%	100%
<i>Proteus</i>	<i>Proteus sp.</i>	2357	2357	100%	100%
<i>Salmonella</i>	<i>Proteus sp</i>	2357	2357	100%	100%
<i>Shigella</i>	<i>Proteus sp</i>	2429	2429	100%	100%
<i>Pasteurela</i>	<i>Proteus sp</i>	2357	2357	100%	100%
<i>Vibrio</i>	<i>Proteus sp</i>	2420	2420	100%	99%
<i>Salmonella</i>	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	1430	1430	100%	100%
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	822	822	85%	91%
<i>Morganella</i>	<i>Sporosarcina</i>	935	935	99%	100%
<i>Shigella</i>	<i>Escherichia sp</i>	1943	1943	100%	100%
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus nealsonii</i>	2420	2420	100%	100%