



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales

MICROBIOMA BACTERIANO DEL TRACTO RESPIRATORIO DE LA BALLENA  
AZUL (*Balaenoptera musculus*) EN EL GOLFO DE CALIFORNIA

Tesis

Que como parte de los requisitos para  
obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta

Carlos Andrés Domínguez Sánchez

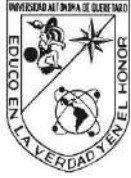
Dirigida por:

Dra. Karina A. Acevedo Whitehouse

Co-directora:

Dra. Diane Gendron Laniel

Querétaro, Qro. a Noviembre, 2020



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Doctorado en Ciencias Biológicas

MICROBIOMA BACTERIANO DEL TRACTO RESPIRATORIO DE LA BALLENA  
AZUL (*Balaenoptera musculus*) EN EL GOLFO DE CALIFORNIA

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta

Carlos Andrés Domínguez Sánchez

Dirigida por:

Dra. Karina A. Acevedo Whitehouse

Co-directora:

Dra. Diane Gendron Laniel

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse

Presidente

Dra. Diane Gendron Laniel

Secretaria

Dr. Roberto Carlos Álvarez Martínez

Vocal

Dra. Olga Patricia García Obregón

Suplente

Dra. Etzel Garrido Espinosa

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Noviembre, 2020

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

“El mar es la patria de todos los soñadores, en todas las vidas en pugna con lo cotidiano, hay un golpe de mareas y es en el surco abierto por los barcos, donde fructifican las semillas de los mejores sueños”

Salvador Reyes Figueroa

## **DEDICATORIA**

A mi familia.

A Mar, Al mar.

A las ballenas.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que hicieron posible este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por apoyar a sus estudiantes y contribuir con el desarrollo científico del país.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada, la cual me dio la posibilidad de estudiar el doctorado como estudiante de tiempo completo.

Gracias ENORMES a Karina Acevedo, por ser mi directora de tesis, y creer en mí y en este proyecto durante cuatro años.

A mis sinodales por el apoyo y todos los consejos que me dieron para que este proyecto de tesis saliera adelante.

Especial agradecimiento a Diane Gendron y a Antonio Zamarrón, por los increíbles días que pasamos en el mar buscando ballenas azules.

## **DECLARATORIA DE AUTORIA**

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

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

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

## ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS .....	II
ÍNDICE DE IMÁGENES.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT .....	V
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
II.1 Microbioma.....	4
II.2 Microbiomas del ecosistema marino .....	5
II.3 La relevancia del estudio del microbioma del soplo.....	7
II.4 Sistema respiratorio de los misticetos.....	9
II.5 Aire exhalado condensado, una herramienta de relevancia ecológica.....	11
II.6 Técnicas de biología molecular de última generación para la determinación del microbioma.....	13
II.7 Identificación de comunidades bacterianas: Gen 16S rRNA .....	14
II.8 Análisis de biodiversidad microbiana.....	15
II.9 Principales índices para determinar la biodiversidad .....	17
II.9.1. Medición de la diversidad alfa.....	17
II.9.2. Análisis de entropia .....	20
II.9.3. Medición de la diversidad beta.....	21
II.9.4. Medición de la diversidad gamma.....	23
II.10 Bienestar animal.....	24
II.10.1.Principio de las tres R.....	24

II.10.2. Técnicas de muestreo no invasivas: Uso de drones.....	24
II.11 Modelo biológico de estudio: Ballena azul ( <i>Balaenoptera musculus</i> ) del Pacífico Noreste	26
II.11.1. Descripción de la especie .....	26
II.11.2. Alimentación .....	26
II.11.3. Distribución .....	27
II.11.4. Abundancia en el Pacífico Noreste.....	28
II.11.5. Protección legal de la ballena azul en México .....	28
II.11.6. Principales amenazas para la conservación de la ballena azul .....	29
III. METODOLOGÍA GENERAL.....	30
III.1 Área de estudio .....	30
III.2 Permisos de muestreo .....	31
III.3 Búsqueda y ubicación de las ballenas.....	31
III.4 Foto-identificación de los individuos .....	31
III.5 Seguimiento focal .....	32
III.6 Recolección de aire exhalado condensado (soplo) .....	33
IV. Efecto del uso de drones para el muestreo de soplos sobre el comportamiento de la ballena azul ( <i>Balaenoptera musculus</i> ).....	35
IV.1 Introducción.....	35
IV.2 Métodos .....	36
IV.2.1. Recolección de los datos para el análisis de comportamiento.....	36
IV.2.2. Obtención de datos de vuelo del dron.....	37
IV.3 Análisis estadísticos.....	38
IV.4 Resultados.....	38
IV.5 Discusión .....	39
IV.6 Conclusiones.....	41



V.	Caracterización del microbioma bacteriano del sistema respiratorio de ballena azul ( <i>Balaenoptera musculus</i> ) en el Golfo de California.....	43
V.1	Introducción .....	43
V.2	Métodos .....	45
V.2.1.	Trabajo de campo .....	45
V.2.2.	Trabajo de laboratorio .....	45
V.2.2.1	Extracción de DNA de las muestras de soplo .....	45
V.2.2.2	Amplificación de las regiones variables V3-V4 del gen 16S rRNA... ..	45
V.2.2.3	Análisis bioinformático de las secuencias.....	46
V.3	Resultados.....	47
V.4	Discusión .....	52
V.5	Conclusiones.....	58
VI.	Diferencias del microbioma bacteriano del sistema respiratorio de ballena azul ( <i>Balaenoptera musculus</i> ): un reflejo de su historia de vida .....	59
VI.1	Introducción.....	59
VI.2	Métodos .....	61
VI.2.1.	Trabajo de campo .....	61
VI.2.2.	Estimación de la edad de las ballenas.....	61
VI.2.3.	Trabajo de laboratorio .....	61
VI.2.3.1	Procesamiento de las secuencias del gen 16S rRNA.....	61
VI.2.3.2	Visualización de datos y análisis estadísticos .....	62
VI.3	Resultados.....	63
VI.3.1.	Análisis general de lecturas de secuenciación V3-V4.....	63
VI.3.2.	Muestras de soplo vs. Controles técnicos .....	66
VI.3.3.	Análisis del microbioma central común .....	68
VI.3.4.	Análisis basado en sexo: hembras vs. machos.....	71

VI.3.5. Análisis basado en la edad.....	73
VI.3.6. Análisis de la dinámica del microbioma bacteriano en diferentes temporadas de muestreo	74
VI.3.7. Análisis de la dinámica del microbioma bacteriano en la misma temporada de muestreo	75
VI.3.8. Análisis dinámico individual (ID 144).....	77
VI.3.9. Análisis de redes de intermediación.....	78
VI.4 Discusión.....	79
VI.4.1. Análisis general de lecturas de secuenciación V3-V4.....	79
VI.4.2. Muestras de soplo vs. controles técnicos.....	81
VI.4.3. Análisis del microbioma central.....	83
VI.4.4. Análisis basado en sexo: hembras vs. machos.....	84
VI.4.5. Análisis basado en la edad.....	87
VI.4.6. Análisis de la dinámica del microbioma bacteriano.....	87
VI.4.7. Análisis de redes de intermediación.....	90
VI.5 Conclusiones.....	92
CONCLUSIONES GENERALES.....	94
BIBLIOGRAFIA.....	96

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## ÍNDICE DE CUADROS

Tabla V.1. Clasificación taxonómica de los dieciocho ASVs que hacen parte del bacterioma central común del tracto respiratorio de la ballena azul en el Golfo de California .....	50
Tabla VI.1. Abundancias relativas por filo y clase identificadas en las muestras de soplo y en los diferentes controles técnicos .....	66
Tabla VI.2. Clasificación taxonómica de los 36 ASVs que hacen parte del bacterioma central común del tracto respiratorio de la ballena azul en el Golfo de California .....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura IV.1. Tiempos de buceo después del vuelo con el drone.....	40
Figura V.1. Medidas de diversidad alfa para las 20 muestras secuenciadas .....	48
Figura V.2. Análisis filogenético de todas las muestras analizadas .....	49
Figura V.3. Abundancia relativa de clases bacterianas que forman el microbioma respiratorio central de la ballena azul. ....	51
Figura VI.1. Medidas de diversidad alfa para las 54 muestras secuenciadas.....	64
Figura VI.2. Análisis filogenético de todas las muestras analizadas.....	65
Figura VI.3. Análisis filogenético del soplo (muestras de soplo agrupadas) y los diferentes controles técnicos.....	67
Figura VI.4. Porcentaje de filos bacterianos que conforman el bacterioma central común del tracto respiratorio de la ballena azul en el Golfo de California. ....	68
Figura VI.5. Abundancia relativa de clases bacterianas que forman el microbioma respiratorio central de 47 muestras de soplo de ballena azul. ....	69
Figura VI.6. Modelo exponencial de la tendencia del microbioma central del sistema respiratorio de la ballena azul en el Golfo de California. ....	71
Figura VI.7. Análisis filogenético de los soplos de hembras y machos. ....	72
Figura VI.8. El heat-tree muestra la variación en los filotipos significativamente diferentes en abundancia relativa, en las muestras de soplo entre hembras y machos de ballena azul. ....	73
Figura VI.9. Modelo logarítmico. Se observa la riqueza de especies en función de la edad de los individuos muestreados. ....	74
Figura VI.10. Análisis filogenético de los soplos en las tres temporadas de muestreo (2016, 2017 y 2018). ....	75
Figura VI.11. Índice de Simpson y riqueza de especies, en función del tiempo y la hora de muestreo (superior) de cada soplo (inferior).....	76
Figura VI.12. Abundancia relativa de las clases bacterianas presentes en los soplos recolectados durante los diferentes tiempos (AM, M y PM) de muestreo .....	77
Figura VI.13. Red de intermediación realizada con el algoritmo Girvan-Newman....	79

## ÍNDICE DE IMÁGENES

Imágen II.1. Fosas nasales de la ballena azul. a) abiertas en superficie durante la inhalación y exhalación. b) cerradas durante la inmersión (Foto: Carlos Domínguez). ....	10
Imagen II.2. Esquema del sistema respiratorio superior de la ballena azul. El tracto respiratorio se observa en azul claro. (Modificado de Dziak <i>et al.</i> , 2017).....	11
Imágen II.3. Soplo de ballena azul en el Parque Nacional Bahía de Loreto, BCS, México. (Foto: Carlos Domínguez).....	12
Imágen III.1. Mapa de Bahía de Loreto. El área delimitada con líneas verdes corresponde al área natural protegida. Los puntos rojos indican las principales zonas de obtención de soplos de ballena azul. (Modificado de Mexbound.com).....	30
Imágen III.2. Fotografías para la identificación de ballena azul. Izquierda: Dorso y la aleta dorsal. Derecha: Aleta caudal. (Fotos: Carlos Domínguez).....	32
Imágen III.3. Equipo para la recolección de soplo. Izquierda: Drone quadraoptero Phantom 3®. Derecha: Lamina portaobjetos y caja Petri sujetas al drone. (Fotos: Carlos Domínguez) .....	34
Imágen IV.1. Recolección de soplo en una ballena azul. El círculo rojo muestra la posición del drone con respecto a la ballena. (Foto: Carlos Domínguez) .....	37

## RESUMEN

Conocer la composición del microbioma de los animales sanos es importante, especialmente para las especies de interés para la conservación y para las que es difícil obtener datos sobre parámetros clínicos de salud. Esto se debe a que el microbioma juega un papel vital en la salud animal y se ha determinado que las alteraciones en su composición pueden reflejar procesos patológicos. Es por esto que el conocimiento de la estructura del microbioma bacteriano y cómo varía entre animales podría ser una herramienta importante para identificar el estado de salud de las poblaciones de grandes cetáceos. El objetivo de esta investigación fue caracterizar el microbioma bacteriano del tracto respiratorio de la ballena azul (*Balaenoptera musculus*), determinar el microbioma central común, identificar diferencias entre sexo y edad, así como la temporalidad de las comunidades bacterianas. Este estudio se realizó durante los meses de febrero a abril de 2016 a 2018; en el Parque Nacional Bahía de Loreto, ubicado en el Golfo de California, México. En el capítulo IV puntualiza la efectividad del drone, como una herramienta no invasiva, para la recolección de soplos. Se evaluaron 194 eventos de comportamiento de las ballenas azules por medio de siete variables cuantificables y no se encontró evidencia de que el drone modifique los comportamientos de superficie ni de buceo normales en los individuos muestreados. En capítulo V se describe la caracterización del microbioma bacteriano por medio de la secuenciación masiva del gen 16S rRNA. Se secuenciaron 20 muestras (17 muestras de soplo y tres controles técnicos: agua de mar, estornudo humano y blanco de PCR). Los resultados de diversidad filogenética mostraron dieciséis clases bacterianas en las 20 muestras secuenciadas y se identificaron dieciocho taxones bacterianas las cuales fueron consideradas como el microbioma central común en el tracto respiratorio de las ballenas azules del Golfo de California. Los análisis del capítulo VI incluyeron 47 muestras de soplo y siete controles técnicos. Las medidas de diversidad alfa revelaron una riqueza media de 710 especies y el índice de Simpson demostró una diversidad media de 0.96. Los análisis de diversidad beta entre los soplos de hembras y machos, no identificaron diferencias ni en riqueza de especies ni en abundancia relativa. Adicionalmente, se determinó que la riqueza de especies era mayor conforme aumentaba la edad. Con respecto a la dinámica bacteriana, se determinó que las diferencias encontradas se deben a diferencias en los animales muestreados y no a la hora de muestreo. Finalmente, se identificaron bacterias potencialmente patógenas como *Mycoplasma*, *Leptospira* y *Prevotella*, únicamente en hembras adultas, y las consecuencias de salud en estos individuos. Mostramos que la composición del microbioma respiratorio de la ballena azul puede ser un marcador predictivo de la progresión de una enfermedad, ya que la presencia de bacterias típicamente patógenas modifica la composición del microbioma bacteriano normal.

Palabras clave: Microbioma, ballena azul, tracto respiratorio, mysticeto

## ABSTRACT

Knowing the composition of the microbiome of healthy animals is essential, especially for species of interest for conservation and for which it is difficult to obtain data on clinical health parameters. This is because the microbiome plays a vital role in animal health, and it has been determined that alterations in its composition can reflect pathological processes. This is why knowledge of the bacterial microbiome structure and how it varies between animals could be an important tool to identify the health status of large cetacean populations. The objective of this research was to characterize the bacterial microbiome of the respiratory tract of the blue whale (*Balaenoptera musculus*), determine the common central microbiome, identify differences between sex and age, as well as the temporality of the bacterial communities. This study was carried out from February to April 2016 to 2018; in the Bahía de Loreto National Park, located in the Gulf of California, Mexico. The first chapter will determine the effectiveness of the drone as a non-invasive tool for collecting puffs. One hundred ninety-four blue whale behaviour events were evaluated using seven quantifiable variables, and no evidence was found that the drone modifies normal surface or diving behaviours in the individuals sampled. The second chapter describes the characterization of the bacterial microbiome through massive sequencing of the 16S rRNA gene. Twenty samples were sequenced (17 blow samples and three technical controls: seawater, human sneeze, and PCR blank). The phylogenetic diversity results showed sixteen bacterial classes in the 20 sequenced samples, and eighteen bacterial taxa were considered the common core microbiome of the blue whales' respiratory tract in the Gulf of California. The analyzes in chapter three included 47 blow samples and seven technical controls. The alpha diversity measures revealed a mean richness of 710 species, and the Simpson index showed a mean diversity of 0.96. Beta diversity analyzes between female and male blows did not identify differences in species richness or relative abundance. Furthermore, it was determined that species richness was higher as age increased. Concerning bacterial dynamics, it was determined that the differences found are due to differences in the animals sampled and not at the time of sampling. Finally, potentially pathogenic bacteria such as *Mycoplasma*, *Leptospira* and *Prevotella* were identified only in adult females and the health consequences in these individuals. We show that the composition of the blue whale's respiratory microbiome can be a predictive marker of disease progression since the presence of typically pathogenic bacteria modifies the composition of the normal bacterial microbiome.

Key words: Microbiome, blue whale, respiratory tract, Mysticeti

## I. INTRODUCCIÓN

Los mamíferos marinos forman un grupo diverso de 129 especies, de las cuales 28 están amenazadas o en peligro de extinción (Nelson *et al.*, 2015) y dentro de este gran grupo de animales, las diferentes especies de ballenas son las que se encuentran más amenazadas (Ilangakoon, 2012), esto en gran medida a las perturbación antrópicas que afectan la salud de las poblaciones de vida silvestre (Guerrini *et al.*, 2019). Las enfermedades infecciosas contribuyen directa e indirectamente a la mortalidad de estos animales e vida libre. Por ejemplo, se han reportado mortalidades en masa relacionadas a infecciones por bacterias, principalmente cuando el sistema inmune del huésped está comprometido (Nelson *et al.*, 2015; Waltzek *et al.*, 2012). Dicho compromiso del sistema inmune puede ser particularmente elevada en mamíferos marinos debido al nivel trófico que ocupan, que lleva a fenómenos de bioacumulación y biomagnificación de contaminantes, además de que están expuestos a estresores antropogénicos como depleción de las fuentes de alimento, degradación del hábitat y contaminación acústica (Lima *et al.*, 2012; Mouton & Botha, 2012).

El sistema respiratorio es el principal sistema fisiológico que se ha visto afectado en los últimos años debido a los cambios en los ecosistemas marinos (Brat & Pathak, 2020); sin embargo, a pesar de la relevancia de las enfermedades infecciosas y los patógenos que las ocasionan, son poco los casos que se diagnostican en la naturaleza debido a la dificultad para obtener muestras biológicas (Hunt *et al.*, 2013), esto debido a su gran tamaño y dificultad de coleccionar muestras de relevancia clínica (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2010). Por este motivo se han propuesto métodos indirectos para evaluar diversos parámetros fisiológicos que pudieran reflejar la salud de los individuos y que se basan en muestras no invasivas, como el soplo o condensado respiratorio. Estos parámetros incluyen hormonas (Hogg, 2005) y microorganismos respiratorios (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2010; Apprill *et al.*, 2017; Raverty *et al.*, 2017). Se ha encontrado, por ejemplo, que las ballenas grises, *Eschrichtius robustus*, presentan *Staphylococcus aureus* en el soplo, lo que sugiere transmisión de estas bacterias entre el humano y estos cetáceos (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2010). En ballenas jorobadas, *Megaptera novaeangliea*, fue posible identificar que las poblaciones de estas ballenas albergan



comunidades bacterianas compartidas por un gran número de individuos, lo que sugiere que existen microorganismos que hacen parte de un microbioma central que pueden ser indicativos de un sistema respiratorio sano.(Apprill *et al.*, 2017).

Esto hallazgos ponen en evidencia la necesidad de implementar nuevas herramientas que permitan el muestreo del sistema respiratorio de grandes cetáceos para monitorear el estado de salud de cetáceos en general. Adicionalmente, es importante la implementación de métodos de obtención de muestras biológicas no invasivos, los cuales no modifiquen el comportamiento de los animales (Domínguez-Sánchez *et al.*, 2018). Los vehículos aéreos no tripulados como los drones están mejorando la forma en que se realizan los estudios de vida silvestre, en particular en cetáceos (Domínguez-Sánchez *et al.*, 2018). Esta nueva tecnología representa una herramienta de bajo costo y bajo impacto que puede complementar muchos programas de conservación en curso (Centelleghé *et al.*, 2020). Sin embargo, los drones podrían tener efectos negativos en la vida silvestre, de cuyo riesgo actualmente tenemos un conocimiento limitado y del impacto negativo que pudieran tener en las especies estudiadas (Jiménez & Mulero-Pázmány, 2019; Vas *et al.*, 2015). En ballena azul se evaluó es uso de drones para el muestreo de soplo y no se encontró evidencia que sugiera algún disturbio en el comportamiento normal de estos cetáceos (Domínguez-Sánchez *et al.*, 2018). Lo cual los hace una herramienta adecuada para su uso en diversos estudios.

En la última década las tecnologías de secuenciación genómica han permitido conocer y caracterizar las comunidades microbianas de diversos hábitats (Nelson *et al.*, 2015), incluyendo las asociadas a epitelios de organismos vivos (ver Apprill *et al.*, 2017; Guass *et al.*, 2016; Raverty *et al.*, 2017; Vendl, Slavich, *et al.*, 2020). Estos microorganismos, conocidos colectivamente como microbioma, colonizan la piel, los intestinos y la mucosa de todos los animales; sin embargo, a pesar de estos avances en el conocimiento del microbioma, aún es escaso el conocimiento que se tiene acerca de las comunidades de microorganismos presentes en la mayoría de cetáceos (Johnson *et al.*, 2009). Esta información sería relevante para establecer cuáles son los microorganismos comunes asociados a individuos aparentemente sanos, identificar microorganismos poco frecuentes, y determinar si cambia la conformación de la comunidad del microbioma con el tiempo o conforme a la historia de vida de las ballenas. La

implementación de técnicas de biología molecular son una potencial herramienta para identificar los posibles daños ecológicos para la ballena azul; y con esto los esfuerzos de conservación en mamíferos marinos podrían beneficiarse. Esto sería un primer paso para proponer evaluaciones de la salud de poblaciones silvestres de cetáceos a partir de la conformación de sus microorganismos asociados.

El estudio del microbioma bacteriano de la ballena azul es de particular relevancia, ya que esta especie ha sido estudiada en el Golfo de California desde hace 30 años, y se cuenta con una base de datos y registros fotográficos de más de 650 individuos identificados (Gendron & Ugalde de la Cruz, 2012), por lo que es un modelo único para poder responder preguntas con relevancia ecológica. Esta tesis caracterizó el microbioma bacteriano del tracto respiratorio de la ballena azul, *Balaneoptera musculus* mediante una técnica de muestreo no invasivo y se abordaron las siguientes preguntas de investigación: 1) ¿El uso del drone para la obtención no invasiva de muestras de soplo como material biológico para estudiar el microbioma respiratorio ocasiona cambios conductuales observables y cuantificables en las ballenas azules?, 2) ¿Cuál es la composición del microbioma central respiratorio de la ballena azul?, 3) ¿El microbioma respiratorio es diferente entre sexos, temporadas y hora del día? El desarrollo de cada pregunta de investigación constituye un capítulo de resultados en la presente tesis.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Microbioma

El término microbiota ha sido usado históricamente para definir “microorganismos vivientes en un ecosistema” y el término microbioma define “la comunidad ecológica de microorganismos simbióticos, comensales, y patógenos que conviven con un hospedero (Risely, 2020; The human Microbiome Project Consortium, 2012a), y que han sido ignorados como factores determinantes de salud o enfermedad” (Russell *et al.*, 2014). Sin embargo, recientemente se ha propuesto definir microbiota como la clasificación taxonómica de los microbios y microbioma como el catálogo de estos microorganismos y sus genes (Eloe-fadrosh & Rasko, 2013; Ursell *et al.*, 2012). Ambos términos pueden usarse para describir las comunidades microbianas, pero el sufijo “-oma” también hace alusión a su información genética (Bleich & Fox, 2015).

En general, el microbioma bacteriano (de aquí en adelante referido como ‘bacterioma’) de los mamíferos puede ser considerado como residente y como transitorio, donde las poblaciones residentes están constantemente en una región anatómica y a una edad específica en el huésped (Hernández-Castro *et al.*, 2005). El bacterioma transitorio comprende los microorganismos del ambiente que colonizan un área del hospedero durante cortos periodos de tiempo (SØrum & Sunde, 2001). Cuando existe una alteración en la abundancia relativa o en la función de alguno de bacterias transitorias se causa un desbalance orgánico, generalmente teniendo como consecuencia el detrimento de la salud del hospedero; y a este desbalance se le conoce como disbiosis (Eloe-Fadrosh & Rasko, 2013).

El bacterioma tiene una complejidad espacial y temporal que difiere entre individuos, nicho del cuerpo, edad, localización geográfica, estado de salud, dieta y tipo de huésped (Marlène Chiarello *et al.*, 2015; Eloe-fadrosh & Rasko, 2013; Lima *et al.*, 2020; Mcfarland, 2000; Risely, 2020; SØrum & Sunde, 2001). Incluso en el mismo individuo, la composición del bacterioma puede variar debido a cambio en la dieta, estrés, comportamiento sexual, medicaciones, cambios hormonales y otros factores relacionados con el hospedero (Bancroft *et*

*al.*, 2012; Bleich & Fox, 2015; Raverty *et al.*, 2017; Risely, 2020; Ursell *et al.*, 2012; Vendl, Slavich, *et al.*, 2020)

El cuerpo de los animales no tiene una hábitat bacteriano uniforme pues este difiere en cada sistema de órganos debido a que sus diferentes componentes los hacen específicos para determinado tipo de bacteria (Mcfarland, 2000). La temperatura, humedad y pH de la piel, cavidad oral, el tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio y el tracto genitourinario poseen favorecen la multiplicación de ciertos tipos de microorganismos (Aprill *et al.*, 2014; Bierlich *et al.*, 2018; SØrum & Sunde, 2001; Suzuki *et al.*, 2019). En conjunto con las levaduras y hongos, las bacterias conforman el microbioma normal de los mamíferos marinos. Muchos de ellos provienen del ambiente marino, pero a la fecha, su importancia clínica e impacto sobre la salud de estos animales es aún desconocida (Johnson *et al.*, 2009; Nelson *et al.*, 2015). Se ha observado que el microbioma es especie-específico en los vertebrados (Nelson *et al.*, 2013; Yildirim *et al.*, 2010, 2014) y es influenciado por la filogenia del huésped, como resultado de millones de años de co-evolución, proceso temporal de cambio adaptativo y recíproco entre dos o más especies que co-existen (Ley *et al.*, 2008). Sin embargo, son escasos los estudios de ecología y conservación que consideran la importancia relativa del microbioma como un factor de impacto y regulación de las poblaciones naturales (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2010; Robles-Malagamba *et al.*, 2020; Russo *et al.*, 2018). La co-evolución provoca un fenómeno de flexibilidad ecológica, el cual permite que los patógenos se establezcan y dispersen velozmente en la población hospedera, siempre y cuando las condiciones medioambientales permitan el desarrollo completo de su ciclo de vida (Little *et al.*, 2008). La presencia de los patógenos en las poblaciones naturales ayuda a regular la biodiversidad y contribuye a la generación de diversidad genética de las especies; además, las interacciones patógeno-huésped son de gran importancia evolutiva ya que tienen efectos sobre la eficacia biológicas del hospedador y de los patógenos (Kouyos *et al.*, 2007).

## **II.2 Microbiomas del ecosistema marino**

Los ecosistemas, tiene una variedad de funciones ecosistémicas importantes, incluidos provisiones de hábitat y ciclo de nutrientes (Trevathan-Tackett *et al.*, 2019). La salud y los

servicios que brinden estos ecosistemas a las diversas poblaciones de vertebrados e invertebrados, están estrechamente relacionados con los microorganismos que residen en los ecosistemas (Alvarez-Yela *et al.*, 2019; Robertson *et al.*, 2016). Esto es de particular importancia en los ecosistemas marinos, principalmente los costeros, donde los microorganismos constituyen la mayor parte de la biomasa y participan en la mayoría de ciclos bioquímicos incluyendo los que involucran el mantenimiento de la temperatura de la tierra (Burge *et al.*, 2014; Pachiadaki *et al.*, 2019). Se ha revelado una enorme diversidad microbiana, en los ecosistemas marinos, a través de análisis filogenéticos del gen del 16S rRNA (ver Chiarello *et al.*, 2017; Chu & Vollmer, 2016; Lima *et al.*, 2020). Esta aproximación metagenómica, junto con la transcriptómica son las mejores opciones para caracterizar los componentes y comprender la función de todo el microbioma (Ingala *et al.*, 2018; Russell *et al.*, 2014; Tremblay & Yergeau, 2019; Zhicheng & Yan, 2013). El primer acercamiento para entender la dinámica de los microorganismos en un ecosistema y vincular la diversidad con la función es identificar el 'microbioma central común' los cuales sean determinantes para el bienestar del hospedador y, por lo tanto, del funcionamiento y la salud general de un ecosistema (Risely, 2020).

Durante las últimas décadas, el ecosistema marino ha sido afectado por diversos factores, muchos de ellos de origen antrópico (Thomas *et al.*, 2015), lo que ha ocasionado estrés e inmunosupresión en muchos organismos superiores, con la consecuente susceptibilidad de diversas especies a patógenos (McCallum *et al.*, 2003; Rocha Gosselin, 2009). Esto a su vez, ha generado un incremento en brotes de enfermedades y mortalidades en masa de cetáceos (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2011). Esto es importante, ya que en los océanos, los cetáceos tienen una alta importancia ecológica debido a su sensibilidad a los cambios ambientales, su longevidad, su alta posición trófica y a sus grandes reservas lipídicas lo que los lleva a menudo a ser considerados como centinelas del ecosistema (Nelson *et al.*, 2015). Además, su estado de conservación, que para muchas especies de cetáceos es precaria o de preocupación, es un factor adicional para intentar comprender su estado de salud de las poblaciones silvestres.

Los animales marinos representan un hábitat dinámico y complejo para diversas comunidades microbianas (Robles-Malagamba *et al.*, 2020). Además, considerando que los

cetáceos representan un linaje único de co-evolución con sus microorganismos asociados desde su regreso al mar hace cerca de 55 millones de años (Bertha *et al.* 2009), estudiar a las comunidades que conforman a su microbioma podría acercarnos más al entendimiento profundo de su ecología y evolución (Nelson *et al.*, 2015). Estudios recientes han resaltado la capacidad del microbioma para actuar significativamente en la salud animal, con un papel vital en la manifestación de enfermedades y en la respuesta inmune (ver Apprill *et al.*, 2014; Nelson *et al.*, 2015). A partir de estudios en humanos se sabe que los miembros del microbioma pueden influir directamente en la progresión de una enfermedad a través de su proceso de infección o por inducir respuestas inmunes que contribuyen a la patogenia (Maynard *et al.*, 2012; Watson *et al.*, 2019; Wypych *et al.*, 2019).

### **II.3 La relevancia del estudio del microbioma del sople**

El desarrollo del microbioma del tracto respiratorio inicia al nacimiento cuando el neonato es expuesto a numerosos microorganismos, de los cuales aquellos capaces de adaptarse colonizarán principalmente las mucosas (Hernández-Castro *et al.*, 2005). Se ha demostrado que las comunidades asociadas al sistema respiratorio tienen interacciones complejas con su organismo huésped y tienen un papel importante en la salud del animal (Apprill *et al.*, 2011; Chaban *et al.*, 2013; Vendl, Slavich, *et al.*, 2020).

En los últimos años ha aumentado el número de eventos de mortalidad inusuales que involucran a los cetáceos (Kemper *et al.*, 2016) y las enfermedades respiratorias son una causa importante de mortalidad en estos animales (Venn-Watson *et al.*, 2012). Sin embargo, el entendimiento de los microorganismos asociados con estos animales es limitado (Morris *et al.*, 2011). Las patologías respiratorias pueden ser causadas por patógenos oportunistas que son parte de la microbiota normal de un tracto respiratorio sano (Apprill *et al.*, 2017; Hilty *et al.*, 2010; Raverty *et al.*, 2017); después de una infección inicial, la sucesión de eventos puede desencadenar desórdenes en las comunidades microbianas, cambiando su diversidad y composición taxonómica (Lima *et al.*, 2012); lo cual sugiere que la composición de la comunidad bacteriana puede ser un mejor predictor de la progresión de las enfermedades que solo la presencia de un agente patógeno específico. Es por esto que el conocimiento del

microbioma y el grado de variación natural entre individuos sanos es importante para identificar el estado inmune de los animales (Aprill *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2012; Russo *et al.*, 2018; Suzuki *et al.*, 2019).

El muestreo del soplo puede ofrecer una aproximación única dentro de la microbiología y, potencialmente, permitir conocer algunos aspectos sobre el estado inmune de los cetáceos (Hunt *et al.*, 2013; Raverty *et al.*, 2017). El tracto respiratorio de los mamíferos tiene un microbioma diverso, y debido a esto representa un sitio potencial para la invasión de patógenos, por lo cual está constantemente vigilada por el sistema inmune haciendo uso de efectores de la inmunidad innata y la adquirida (Hooper *et al.*, 2012; Invernizzi *et al.*, 2020; Lira-lucio *et al.*, 2020). Los esfuerzos para caracterizar el microbioma respiratorio de cetáceos apenas están comenzando; sin embargo, ya existen estudios de estos primeros pasos. Se han identificado diversas especies de bacterias (*Cardiobacterium*, *Suttonella*, *Psychrobacter*, *Tenacibaculum*, *Fluviicola* y *Flavobacterium Micrococcus*, *Arcanobacterium*, *Corynebacterium*, *Moraxella*, *Escherichia*, *Kurthia*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Brevibacillus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Oligella*, *Vibrio* y *Edwardsiella*) como parte del microbioma respiratorio de delfines nariz de botella (Centelleghé *et al.*, 2020; Hernández-Castro *et al.*, 2005; Robles-Malagamba *et al.*, 2020; Vendl, Nelson, *et al.*, 2020) y orcas (*Orcinus orca*). Muchas de estas bacterias son resistentes a antibióticos (Raverty *et al.*, 2017; Schroeder *et al.*, 2008). Esto podría indicar que existe filtración hacia el océano de fármacos o microorganismos resistentes a los antibióticos; lo cual es de preocupación clínica, pues entre las bacterias identificadas, están *Pseudomona* y *Staphylococcus*, conocidas por su alta transmisión de genes de resistencia antimicrobiana (Freschi *et al.*, 2019; Haaber *et al.*, 2017); las cuales podrían expandirse potencialmente en el ecosistema marino y colonizar diferentes sistemas fisiológicos de los mamíferos marinos aumentando el riesgo de enfermedades en dichos animales (Raverty *et al.*, 2017).

También han sido estudiadas algunas especies de cetáceos en vida libre, identificando bacterias del género *Haemophilus* spp. en ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*), cachalote (*Physeter macrocephalus*), ballena jorobada y ballena gris, así como *Staphylococcus aureus* y

*Streptococcus* spp. ( $\beta$ -hemolítico) en ballena azul y ballena gris del Pacífico norte mexicano y Golfo de California (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2010), y *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptococcus* y *Candida* spp. en poblaciones de ballena gris del Pacífico Noroeste (Deninseko *et al.*, 2012).

Todavía no está claro cuál de las especies de bacterias mencionadas anteriormente forman parte del bacterioma residente del sistema respiratorio de las diferentes especies de mamíferos marinos (Apprill *et al.*, 2017; Nelson *et al.*, 2015; Vendl, Nelson, *et al.*, 2020). Los datos en orcas sugieren que las comunidades bacterianas varían entre individuos y regiones geográficas (Raverty *et al.*, 2017; Schroeder *et al.*, 2008) y en ballenas jorobadas se ha reportado variación del microbioma a nivel poblacional y no individual (Apprill *et al.*, 2014); por el contrario, en delfines nariz de botella se ha demostrado que la variación del microbioma respiratorio se da más a nivel individual que poblacional (Vendl, Nelson, *et al.*, 2020). Con las tecnologías de secuenciación masiva y el estudio del gen 16S rRNA es posible caracterizar el microbioma respiratorio y determinar los microbiomas centrales comunes, temporales, funcionales, ecológicos, y de eficacia biológica (Risely, 2020); lo cual permitirá tener un entendimiento mucho más amplio del microbioma respiratorio en los mamíferos marinos.

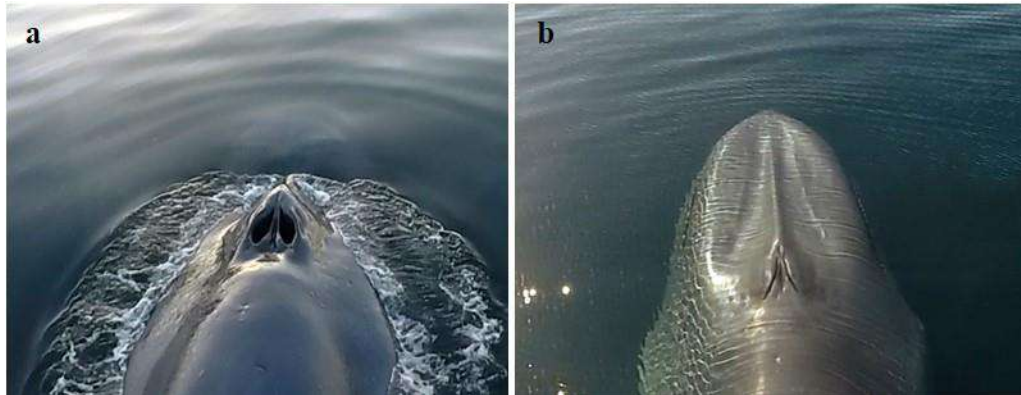
#### **II.4 Sistema respiratorio de los misticetos**

La vida en ambientes acuáticos posee muchos retos, particularmente para los mamíferos que respiran aire cuyos ancestros estaban originalmente adaptados a la vida en la tierra (Reidenberg, 2007; Reidenberg & Laitman, 2008). El sistema respiratorio es el sistema fisiológico que ha presentado mayores modificaciones evolutivas en respuesta a la necesidad de adaptarse a una vida en el mar, con repetitivas y largas inmersiones en apnea (Piscitelli *et al.*, 2013; Snyder, 1983; Uhen, 2007).

En los cetáceos el sistema respiratorio superior termina en las fosas nasales; estas estructuras de tejido blando son selladas por válvulas llamadas tapones nasales, las cuales permite que las vías respiratorias se cierren de manera efectiva impidiendo la entrada de agua (Imágen II.1; Kooyman, 1973; Nelson *et al.*, 2015). Las fosas nasales migraron de la parte rostral



a la parte dorsal de la cabeza; esta posición hace que las fosas nasales salgan del agua sin la necesidad de que los animales hagan el gasto energético de levantar la cabeza para respirar (Reidenberg & Laitman, 2008)

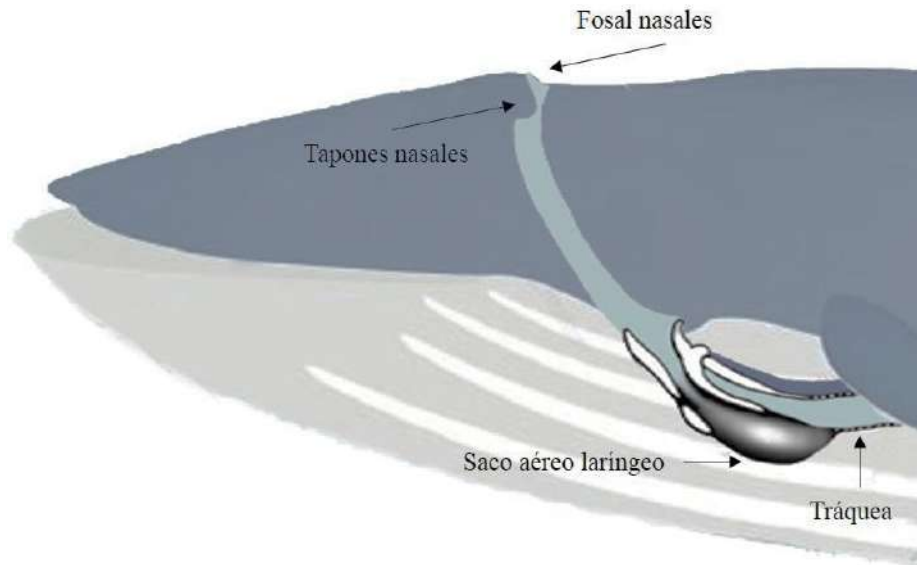


**Imágen II.1.** Fosas nasales de la ballena azul. a) abiertas en superficie durante la inhalación y exhalación. b) cerradas durante la inmersión (Foto: Carlos Domínguez).

Los mysticetos poseen un único y largo divertículo llamado saco aéreo laríngeo, localizado ventralmente en la línea media de la laringe y que puede ser ampliado con el aire del lumen de esta (Imágen II.2; Reidenberg, 2007; Reidenberg & Laitman, 1987, 2008). Se ha propuesto que esta estructura anatómica regula las concentraciones de gases del tracto respiratorio inferior. Al parecer los mysticetos usan este saco aéreo como una bomba y/o reservorio para movilizar el aire e incrementar la movilización de oxígeno a los pulmones durante las largas inmersiones, lo que asegura que se extraiga mayor oxígeno de cada inhalación (Kooyman, 1973; Reidenberg, 2007). Los cetáceos, al igual que las aves, han cambiado el flujo de aire en el sistema respiratorio para reducir el espacio respiratorio muerto utilizando un par de pulmones y los sacos aéreos (Bretz & Schmidt-nielsen, 1971).

Los músculos respiratorios de los cetáceos (incluyendo los ubicados transversalmente en el saco aéreo laríngeo) actúan como fuelles, sacando y empujando aire entre los pulmones y el saco aéreo laríngeo, lo que crea turbulencia que mezcla el aire con poco oxígeno de los pulmones con el aire rico en oxígeno que está atrapado en los espacios muertos del tracto

respiratorio superior, la tráquea y los bronquios (Reidenberg & Laitman, 2008). Esta actividad podría permitir contar con mayor oxígeno disponible para los pulmones durante los buceos.



**Imagen II.2.** Esquema del sistema respiratorio superior de la ballena azul. El tracto respiratorio se observa en azul claro. (Modificado de Dziak *et al.*, 2017)

## II.5 Aire exhalado condensado, una herramienta de relevancia ecológica

La recolección de muestras biológicas (hisopados del espiráculo, sangre, piel o heces) ha sido realizada en pequeñas y medianas especies de cetáceos (Caut *et al.*, 2011; Ohishi *et al.*, 2020; Parsons *et al.*, 2003; Russo *et al.*, 2018; Suzuki *et al.*, 2019); sin embargo, estos procedimientos requieren la captura, inmovilización o entrenamiento de los animales, lo cual hace que sea prácticamente imposible realizarse en grandes cetáceos en vida libre (Hunt *et al.*, 2013).

En la superficie, los cetáceos exhalan con fuerza y en el proceso expulsan aire exhalado condensado, también llamado, vapor respiratorio condensado o soplo (Imágen II.3; Frère *et al.*, 2010). El potencial de muestrear el soplo y detectar bacterias del sistema respiratorio se ha

demostrado para varias especies de cetáceos (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2010) y éste representa una herramienta valiosa y no invasiva en la cual se pueden determinar moléculas de relevancia biológica, como hormonas y metabolitos, además de, microorganismos (Hunt *et al.*, 2013). Además, existe la posibilidad de detectar componentes asociados al sistema inmune en el soplo, ya que en estudios realizados en humanos se han detectado cientos de componentes en el aire exhalado (Bean *et al.*, 2012). Algunos de estos componentes han demostrado ser buenos indicadores de salud y enfermedad, como los biomarcadores específicos de enfermedades respiratorias bacterianas, fúngicas y virales (Phillips *et al.*, 2010; Watts *et al.*, 2019) y se ha visto que cambios en los biomarcadores preceden a eventos inmunológicos y eventos estresantes con relevancia clínica (Turner, 2013).



**Imágen II.3. Soplo de ballena azul en el Parque Nacional Bahía de Loreto, BCS, México. (Foto: Carlos Domínguez)**

El primer muestreo de soplo fue realizado para examinar el estado reproductivo y hormonal de cetáceos en cautiverio (Hogg & Rogers, 2009) y hasta el momento ha sido utilizado para el análisis de hormonas reproductivas, y para caracterizar la composición del microbioma respiratorio (Apprill *et al.*, 2017; Centelleghé *et al.*, 2020; Domínguez-Sánchez *et al.*, 2018;

Raverty *et al.*, 2017). El soplo de los cetáceos es una sustancia biológica relativamente inexplorada, y su composición y potencial como muestra de relevancia clínica se mantiene incierta (Frère *et al.*, 2010). Se sabe que el surfactante pulmonar es el principal fluido en el soplo de los cetáceos (Berta *et al.*, 2006), por lo cual la composición química del soplo debe ser similar a la del surfactante pulmonar de los cetáceos (i.e. 97% lípidos, 2.3% proteínas y menos de 1% de carbohidratos; Foot *et al.*, 2006; Miller, 2005). También debe contener secreciones de las vías aéreas y macromoléculas no volátiles, así como diversos tipos de bacterias (Rocha Gosselin, 2009). Es por esto que puede ser usado para caracterizar el microbioma normal asociado al tracto respiratorio en las ballenas (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2010). Debido a esta mezcla de fluidos y materiales biológicos, el estudio del soplo de los cetáceos es de gran importancia para responder numerosas cuestiones biológicas relacionadas con estas especies (Frère *et al.*, 2010).

## **II.6 Técnicas de biología molecular de última generación para la determinación del microbioma**

En la última década ha habido un aumento exponencial de estudios relacionados con el microbioma en diversos ámbitos científicos (Fricker *et al.*, 2019). El rápido desarrollo de métodos de secuenciación y técnicas analíticas están mejorando nuestra capacidad para comprender el microbioma, y de como éste y sus componentes se definen (Ursell *et al.*, 2012); para lograr esto, se han desarrollado dos principales métodos de secuenciación masiva para su análisis: secuenciación de amplicones y secuenciación shotgun (Fricker *et al.*, 2019).

La determinación de los microbiomas bacterianos se basa generalmente en la secuenciación directa de los amplicones de genes 16S rRNA de muestras biológicas (Russell *et al.*, 2014), esta estrategia está prácticamente limitada por el número de muestras y secuencias que necesitan ser procesadas simultáneamente para responder a las preguntas ecológicas de mediana a gran escala (Ramette, 2009). Sin embargo, con la implementación de técnicas de alto rendimiento y de herramientas bioinformáticas para su análisis, han surgido nuevos métodos para la caracterización del microbioma (Jami *et al.*, 2014), siendo la secuenciación de amplicones el método más utilizado (Caruso *et al.*, 2019). Este método utiliza nucleótidos terminales marcados con moléculas fluorescentes (Shuikan *et al.*, 2019). Es una nueva

tecnología que permite realizar la secuencia en paralelo, pudiendo obtener hasta  $6 \times 10^{12}$  en una sola corrida. Las principales plataformas para la secuenciación de ADN son: 454 pirosecuenciación, Illumina (secuenciación por síntesis), Ion Torrent y Pacific Biosciences causan variación en las evaluaciones de la comunidad bacteriana (Xue *et al.*, 2018). Hoy en día, Illumina (Illumina Inc, USA) es quizá la plataforma líder para la secuenciación masiva del gen 16S rRNA, ya que proporciona una gran cantidad de datos, es de bajo costo y tiene baja tasas de error (Widder *et al.*, 2016). Este método tiene un gran potencial para generar bases de datos de alta calidad con el análisis de los fragmentos del gen 16S rRNA, lo que facilita el análisis de las comunidades microbianas a mayor resolución (Burke & Darling, 2016).

El segundo método más utilizado para secuenciar ADN es la secuenciación masiva por shotgun, en la cual no se utilizan primers que delimiten el fragmento del gen que se desea analizar (Poretsky *et al.*, 2014), por lo cual es posible hacer la secuenciación de todo el ADN presente en una muestras biológica (Fricker *et al.*, 2019; Regalado *et al.*, 2020); esto permite obtener información sobre virus, bacterias, fagos, hongos, plasmidos, arqueas, así como del hospedador (Chen & Pachter, 2005). Comparado con la secuenciación de amplicones, este método genera mayor volumen de información por lo cual es mucho más costoso y el análisis informático requiere equipos informáticos de gran capacidad y de costos muy elevados (Lima *et al.*, 2020). Una de las ventajas con el uso de la secuenciación shotgun es que se elimina el sesgo inicial debido a posibles errores durante la PCR. Adicionalmente; al secuenciar todo el ADN presente en la muestra es posible realizar estudios tanto de genómica funcional como análisis del gen ribosomal 16S rRNA con el mismo conjunto de datos (Poretsky *et al.*, 2014; Prodan *et al.*, 2020).

## **II.7 Identificación de comunidades bacterianas: Gen 16S rRNA**

Con el objetivo de tener una herramienta estándar para la identificación de microorganismos existentes en diferentes ecosistemas, en 1986 se propuso el uso del gen 16S rRNA (Pace *et al.*, 1986). Este gen, al estar presente en todos los procariotas, poseer variabilidad y divergencia genética a nivel de especie, sitios conservados adyacentes y una longitud adecuada

para su secuenciación se ha convertido en la principal herramienta para la caracterización de microbiomas bacterianos en la comunidad científica (Valenzuela-González *et al.*, 2015).

La amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA, utilizando diferentes plataformas, se ha convertido en la técnica estándar para identificar y analizar las diferentes comunidades de microorganismos a nivel temporal y espacial (Burke & Darling, 2016; Hauffe & Barelli, 2019; Ross *et al.*, 2019). El gen 16S rRNA, se encuentra en todos los procariontes y posee nueve regiones hipervariables que se utilizan para identificar distintos taxones bacterianos (Antwis *et al.*, 2018; Grahn *et al.*, 2003). Estas regiones están rodeadas por secuencias altamente conservadas y son importantes ya que se usan para el diseño de los primers para la amplificación por PCR del gen 16S rRNA (Caruso *et al.*, 2019).

Uno de los métodos más modernos y que está teniendo mucho auge en el campo científico para el análisis de microbiomas bacterianos es el desarrollado mediante el Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA2; Callahan *et al.* 2016; Prodan *et al.* 2020), que identifica las variantes de secuencias de amplicones (ASV, por sus siglas en inglés) y construye un modelo basado en la calidad, en el cual se filtran los errores durante la PCR y se identifican las variantes en las secuencias del gen 16S rRNA (Callahan *et al.*, 2017). Este método controla los errores lo suficiente como para que los ASV puedan determinarse de manera exacta, donde se pueden identificar diferencias de un solo nucleótido sobre la región del gen secuenciado (Callahan *et al.*, 2017; Xue *et al.*, 2018). Diversos estudios han comparado ambos métodos de inferencia concluyendo que el método por ASVs proporciona una identificación y eliminación de los contaminantes (productos de la amplificación por PCR y la secuenciación masiva) lo cual proporciona una caracterización más precisa de las comunidades microbianas (Callahan *et al.*, 2016, 2017; Caruso *et al.*, 2019; Porter & Hajibabaei, 2018).

## **II.8 Análisis de biodiversidad microbiana**

El análisis de la diversidad bacteriana en muestras ambientales siempre ha sido un desafío para los microbiólogos (Jami *et al.*, 2014). A pesar de la dificultad para establecerla, se busca determinar la distribución y abundancia de los microorganismos, comparar la estructura

de sus comunidades y explicar sus patrones de presentación (Ramette, 2009). Este campo ha sido explorado durante décadas, desde la invención de la microscopia y los primeros métodos de cultivo, pero esto no ha generado buenos resultados debido a la imposibilidad de cultivar diversos tipos de bacterias medioambientales (Lozupone *et al.*, 2012). Estos métodos dependientes del cultivo han sido la elección principal para estudiar la diversidad bacteriana en los ecosistemas (Kim *et al.*, 2017). Sin embargo, con el advenimiento de la secuenciación masiva de los genes 16S rRNA, se han facilitado los estudios que exploran las composiciones microbianas y la dinámica asociada con la salud y las enfermedades (Ramette, 2009; Thukral, 2017). No obstante, aún no está claro el uso de índices de diversidad con el objetivo de analizar la composición de las comunidades bacterianas (Gregorius, 2020).

La diversidad biológica (biodiversidad) es la suma total de todas las variaciones bióticas desde el nivel genético hasta un ecosistema (Purvis & Hector, 2000; Tepper, 2010). La biodiversidad, una propiedad multidimensional de los sistemas naturales, es difícil de cuantificar debido al gran número de índices propuestos para este propósito (Stirling & Wilsey, 2001; Tuomisto, 2010). Estos índices pretenden describir las propiedades generales de las comunidades y permiten comparar diferentes regiones, clasificaciones taxonómicas y niveles tróficos. Típicamente, se basa en la diversidad de especies, pero otras formas de diversidad, como diversidad genética y química, las cuales también dan información importante (Marrugan, 2004; Morris *et al.*, 2014). Numerosos índices de diversidad se han vuelto muy populares en ecología, pero se le ha dado muy poca atención a las diferencias conceptuales entre estos índices (Kim *et al.*, 2017; Tuomisto, 2010) Incluso después de decidir el tipo de diversidad medir, cuantificarla continua siendo un problema debido a la inexistencia de un único índice que resuma el concepto de diversidad (Fortuna, 2017; Moreno *et al.*, 2018; Purvis & Hector, 2000).

Para comprender los cambios de la biodiversidad con relación a un entorno, se puede separar por sus componentes alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ) (Gregorius, 2020; Whittaker, 1972), pudiendo estos tres componentes relacionarse a través de un modelo matemático multiplicativo ( $\gamma = \alpha \times \beta$ ; Pereyra y Moreno 2013). Adicionalmente, este método de análisis es de gran utilidad principalmente para medir y monitorear los efectos de determinado ambiente en una comunidad (Moreno, 2001; Moreno *et al.*, 2018). A grandes rasgos, la diversidad alfa es la riqueza de

especies de una comunidad local homogénea (Iknayan *et al.*, 2014), la diversidad beta es la diferencia en composición de especies entre comunidades (Moreno & Rodriguez, 2010; Tuomisto, 2010) y la diversidad gamma es el número de especies a nivel regional, resultante de las diversidades alfa como de las diversidades beta (Socolar *et al.*, 2016; Thukral, 2017). En ocasiones se puede confundir la diversidad alfa con la diversidad gamma, pero el proceso para obtener estos valores son diferentes (Moreno & Rodriguez, 2010). La diversidad alfa depende de la localidad, de fenómenos ecológicos, como selección de hábitat e interacciones biológicas, que tienen variaciones en corto tiempo; mientras que la diversidad gamma resulta de proceso regionales, como la historia biogeográfica (Jost, 2007).

El valor más importante a la hora de evaluar la diversidad biológica de una comunidad es la riqueza (S), o el número de especies o atributos presentes, ya que es el método métrico más simple para representarla (Whittaker, 1972), y continua siendo el más aplicado (Cui *et al.*, 2014; Magurran & Dornelas, 2010). También es necesario determinar la abundancia relativa de cada especie ya que facilita la identificación de especies que debido a su escasa representatividad en la comunidad son más susceptibles a modificaciones en el ecosistema (Moreno, 2001). Han habido numerosos intentos para crear índices que combinen las mediciones de riqueza y abundancia (Morris *et al.*, 2014). Sin embargo, los más utilizados son los índices de diversidad de Shannon ( $H'$ ) y el de la diversidad de Simpson ( $D1$ ), los cuales difieren en su fundamento teórico y en su interpretación (Haegeman *et al.*, 2013; Hill *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2017; Magurran, 2004).

## **II.9 Principales índices para determinar la biodiversidad**

### **II.9.1. Medición de la diversidad alfa**

Se entiende la diversidad alfa como el resultado de un proceso evolutivo que en el que se manifiestan diferentes especies dentro de un mismo hábitat (Cardoso *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017; Moreno *et al.*, 2018). Entonces sería suficiente determinarla con un conteo del número de especies de un lugar (índice de riqueza específica), sin la necesidad de un análisis de la importancia de cada especie en el lugar de estudio (Magurran & Dornelas, 2010; Moreno, 2001;



Yeom & Kim, 2011). Sin embargo, en conjunto es importante obtener parámetros completos de la diversidad de las especies en un ecosistema, por eso es necesario cuantificar el número de especies y su representatividad (Carvalho *et al.*, 2012; Fortuna, 2017; Gregorius, 2020). Es por esto, que para poder hacer un análisis más preciso de la estructura de una comunidad, es importante utilizar la riqueza de especies (riqueza específica) acompañado de algún índice de la estructura de la comunidad (Índice de Simpson y/o índice de Shannon-Wiener), de tal forma que estos parámetros se complementen y se pueda describir adecuadamente la diversidad de un hábitat (Moreno, 2001).

La riqueza específica (S) es la forma más sencilla de medir la biodiversidad, ya que solo tiene en cuenta el número de especies obtenido por el censo de una comunidad (Boynton & Greig, 2016; Yeom & Kim, 2011), sin tomar el valor de importancia de cada uno (Moreno, 2001). Su ventaja es que es un índice que se obtiene de forma fácil y rápida (Moreno & Rodríguez, 2010); no obstante, la riqueza específica no contempla la importancia de cada especie en la comunidad (Molina-Ferriol & Merle-Farinós, 2012). Otro problema para poder estimar la riqueza de especies es el esfuerzo de muestreo ya que este es rara vez documentado (Hill *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2014), lo cual constituye un problema si se desea conocer la riqueza absoluta de una especie en un área específica (Marrugan, 2004).

El índice de Simpson fue el primer índice de diversidad utilizado en ecología. Este es un índice de abundancia que toma en cuenta la representatividad de las especies más importantes sin tener en cuenta la contribución de especies de menor importancia (Haegeman *et al.*, 2014). Este índice manifiesta la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie (Golicher, 2010; Purvis & Hector, 2000). Es decir, entre más cercano sea el valor a 1, existe una mayor posibilidad de dominancia de una especie en la población, pero si este valor es cercano a cero, mayor es la biodiversidad de un hábitat (Simpson, 1949).

Como el índice de Simpson determina la probabilidad de identificar dos individuos de la misma especie en dos extracciones consecutivas y sin reposición (Haegeman *et al.*, 2013; Hill *et al.*, 2003; Marrugan, 2004); se puede decir en principio esto constituye una propiedad opuesta a la diversidad, por lo cual se ha planteado una transformación apropiada para obtener una cifra

correlacionada positivamente con la diversidad (Kim *et al.*, 2017; Morris *et al.*, 2014). Como se mencionó anteriormente, una de las desventajas de este índice es que está fuertemente influenciado por la importancia de las dos o tres especies más dominantes en una comunidad, dándole poca importancia a las especies raras (Haegeman *et al.*, 2014; Marrugan, 2004; Somerfield *et al.*, 2008; Yeom & Kim, 2011). El índice de Simpson es uno de los índices ampliamente utilizados y de fácil cálculo (Kim *et al.*, 2017; Stirling & Wilsey, 2001). Sin embargo, tiene prioridad hacia las especies más abundantes en la muestra (Moreno *et al.*, 2018). Por lo tanto, se podría subestimar la diversidad de una comunidad que está dominada por un par de especies (Thukral, 2017).

El índice de diversidad de Shannon-Wiener (Shannon, 1948), es un índice que refleja la heterogeneidad de una comunidad en base al número de especies y la abundancia relativa de ellas (Kim *et al.*, 2017; Moreno, 2001); asumiendo que todas las extracciones de individuos serán al azar y que todas las especies tienen una representación en una comunidad (Magurran & Dornelas, 2010) a la cual se le conoce su riqueza específica (Jost, 2007; Marrugan, 2004). Este índice se representa como  $H'$  y tiene como resultado un número positivo entre 0 y 5, aunque su valor normal en la mayoría de ecosistemas naturales está entre 2 y 3; los valores inferiores a 2 reflejan baja diversidad de la muestra y los valores superiores a 5 son indicativos de alta biodiversidad (Campo & Duval, 2014; Moreno, 2001).

El índice de Shannon-Wiener es influenciado más por la riqueza y menos por la igualdad que el índice de Simpson, es decir, era una medida insensible del carácter de la distribución de la abundancia de las especies (Yeom & Kim, 2011). Así, este índice sería útil para la comunidad que dos o tres especies son dominantes (Moreno & Rodríguez, 2010). Sin embargo, debe ser utilizado con precaución, ya que presenta ciertos inconvenientes que pueden llevar a una mala interpretación de sus resultados. Esto debido a que: a) No tienen en cuenta el número de muestras, b) la ecuación asume que la distribución de las especies es aleatoria, c) sus resultados se expresan en valores logarítmicos, lo cual impide comparaciones con otras mediciones hechas con diferentes logaritmos, d) su escala de referencia se presta a confusión, y e) no tienen en cuenta la identidad de las especies; por lo tanto, es incapaz de evaluar la importancia de una especie dentro de la comunidad (Marrugan, 2004; Moreno, 2001).

## II.9.2. Análisis de entropía

Como se mencionó en la sección anterior, existen varios índices de diversidad ecológica para cuantificar diversidad de una comunidad; estos son principalmente: la riqueza específica, el índice de Shannon y el índice de diversidad de Simpson (Pereyra & Moreno, 2013). En términos de aplicación a los estudios ecológicos, cada uno de estos índices se obtuvo originalmente o se adaptó de los estudios realizados en macroecología (Moreno *et al.*, 2018). Es por esto que individualmente pueden desempeñarse bien al calcular la diversidad microbiana de los taxones comunes; sin embargo, cada uno puede fallar como una medida completa al examinar los numerosos organismos de baja abundancia que dominan la composición de muchas comunidades microbianas (Li *et al.*, 2012; Moreno & Rodríguez, 2010; Yeom & Kim, 2011). Con el objetivo de eliminar este sesgo durante el análisis, se propuso el uso de una medida que relacionara estos tres índices, la entropía de Rényi (Renyi, 1961),

Rényi unificó las principales medidas de diversidad alfa como entropías con un parámetro  $\alpha$ , el poder al que se eleva la contribución de las abundancias taxonómicas (Chao & Jost, 2015; Renyi, 1961). Los  $\alpha$  de 2, 1 y 0 están asociados con el índice de Simpson, el índice de Shannon y la riqueza específica, respectivamente (Hill, 1973; Ricotta, 2005). Es posible utilizar  $\alpha$  fraccionarios, por ejemplo. 0.25, para aumentar la contribución de las unidades taxonómicas poco abundantes al impacto deseado, pero si su especificación es arbitraria, los valores de índice resultantes pueden no tener interpretaciones probabilísticas (Li *et al.*, 2012).

Las entropías (representadas como logaritmos de las medidas de diversidad alfa), son equivalentes, pero son menos fáciles de visualizar y, en consecuencia, menos adecuadas para un uso general (Hill, 1973). Adicionalmente, la entropía de Rényi no satisface el principio de replicación, y esto puede causar resultados contradictorios (Ma, 2018). Por esta razón, aunque la entropía de Rényi tiene amplias aplicaciones en otros campos (ej. en la física (Dong, 2016), la astronomía (Hosseini *et al.*, 2019) y la termodinámica (Lenzi *et al.*, 2000)), las medidas de diversidad alfa se consideran más útiles para medir la diversidad verdadera de especies y la complejidad ecológica (Ma, 2018). Además sus resultados pueden ser utilizados para la toma de decisiones en ecología de la conservación (Pereyra & Moreno, 2013).

### II.9.3. Medición de la diversidad beta

El análisis de los cambios de la diversidad y distribución de los microorganismos en una comunidad es un tema de gran importancia en la microbiología ambiental (Lozupone *et al.*, 2007). La diversidad beta o recambio de especies (Marlène Chiarello *et al.*, 2015), es una medida de la variabilidad en la composición de especies entre las unidades de muestreo para un área de interés (Anderson *et al.*, 2006; Legendre *et al.*, 2005). Esta puede interpretarse en términos de la tasa de cambio de la composición de especies a lo largo de un gradiente de estudio (Koleff *et al.*, 2003; Socolar *et al.*, 2016), y puede ser medida con una amplia variedad de medidas, divididas en dos principales características: medidas cuantitativas, basadas en la abundancia relativa de cada microorganismos (proporciones o conteos); y medidas cualitativas, las cuales usan la presencia/ausencia de microorganismos (Lozupone *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2016).

Existen más de 20 medidas de distancias que se pueden usar para cuantificar la variación en la composición entre muestras de microbioma bacteriano (Tang *et al.*, 2016). Sin embargo, para seleccionar alguna de estas medidas es importante comprender qué la diferencia entre los microbiomas bacterianos está determinado por el cambio de la riqueza de especies, la abundancia relativa o una combinación de ambas. (Anderson *et al.*, 2006). Las medidas ecológicas para evaluar las diferencias de riqueza específica (medida cuantitativa) más utilizadas son: la distancia de Jaccard y el coeficiente de Sorensen (Moreno *et al.*, 2018); ambas son medidas de disimilitud que no utilizan el árbol filogenético, por lo cual son eficientes para detectar asociaciones en especies arbitrarias y no en linajes filogenéticos (Tang *et al.*, 2016).

El coeficiente de Sorensen se define como las especies compartidas entre las dos muestras, dividido por el número de especies en ambas muestras (Marlène Chiarello *et al.*, 2015; Marrugan, 2004); y la distancia de Jaccard se define como el número de especies únicas presente en cualquiera de las muestras, dividido por el número de especies presentes en cualquiera de las muestras a analizar (Real & Vargas, 1996). Adicionalmente, se ha utilizado la distancia Unifrac no ponderada para evaluar diferencias en las comunidades microbianas teniendo en cuenta la presencia/ausencia de microorganismos (Tang *et al.*, 2016). A diferencia de la distancia de Jaccard y el coeficiente de Sorensen, la distancia Unifrac no ponderada si considera el árbol

filogenético, usando la fracción de longitud de las ramas para realizar la diferenciación de microorganismos (Lozupone *et al.*, 2012). Aunque existen varias medidas basadas en presencia/ausencia de datos, la distancia de Jaccard es la más usada en ecología debido a que excluye las ausencias conjuntas de especies en ambas muestras y puede interpretarse desde un punto de vista probabilístico (Anderson *et al.*, 2006).

Con respecto a las diferencias en abundancia relativa, la distancia UniFrac ponderada (Chen *et al.*, 2012) y la distancia de Bray-Curtis (Ricotta & Podani, 2017) son las más utilizadas, para identificar cambios cualitativos en las comunidades microbianas. La distancia UniFrac ponderada utiliza la información de la abundancia de especies y, usando el árbol filogenético, pondera la longitud de la rama entre las especies con diferente abundancia (Lozupone *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2016). La distancia de Bray-Curtis determina la diferencia de la abundancia dividida por la abundancia total aportada por las muestras que se desean comparar. Adicionalmente, la distancia Bray-Curtis es sensible a las diferencias de abundancia entre especies, dándole mayor importancia a las especies abundantes en comparación con las especies raras (Ricotta & Podani, 2017); mientras que la distancia UniFrac ponderada es más eficiente para detectar cambios de abundancia en linajes raros y es más sensible para detectar un cambio en linajes abundantes, ya que utiliza la diferencia de abundancia absoluta en su definición (Chen *et al.*, 2012); razón por la cual para el análisis cualitativo de los microbiomas bacterianos, la distancia UniFrac ponderada es la más indicada (Chen *et al.*, 2012; Kelly *et al.*, 2015).

Cada una de estas medidas presentadas anteriormente aborda un aspecto diferente de la ecología comunitaria; por lo tanto, al realizar el análisis del microbioma usando diversas medidas, es posible tener una imagen mucho más amplia y detallada de la estructura de una comunidad microbiana (Tang *et al.*, 2016). Aunque cada distancia puede rendir mejor en ciertos escenarios, ninguna tiene un rendimiento óptimo en todas las condiciones. Sin embargo, los análisis basados en las distancias generalizadas de UniFrac se muestran más robustos y en general tienen los mejores rendimientos en una gama de posibles análisis (Chen *et al.*, 2012).

Para poder identificar los cambios en las diferentes comunidades bacterianas a analizar, es necesario realizar un análisis de permutaciones sobre las matrices de distancia, esto se logra

mediante estudios de simulación de Monte Carlo utilizando un análisis permutacional multivariado de la varianza; (PERMANOVA; Chen et al. 2012). Esta prueba es un método no paramétrico que extiende el análisis tradicional de varianza a una matriz cuadrada de distancias por pares con pruebas de significación realizadas por permutación (Tang *et al.*, 2016). La efectividad del PERMANOVA, depende del número de exposición o grupos de intervención (i.e. grados de libertad), el número de sujetos por grupo (i.e. grados residuales de libertad), las distancias dentro del grupo (i.e. suma de cuadrados dentro del grupo) y el tamaño del efecto (i.e. la diferencia entre la suma de cuadrados entre grupos y la suma de cuadrados dentro del grupo) (Kelly *et al.*, 2015). El PERMANOVA es el método basado en la distancia más utilizado para probar la relación en la composición microbiana con diferentes variables de interés. Esta prueba es especialmente adecuada para el análisis de datos de composición de estudios de ecología con un tamaño de muestra pequeño y una gran cantidad de características (Tang *et al.*, 2016).

#### **II.9.4. Medición de la diversidad gamma**

La mayoría de estudios realizados para medir la diversidad gamma en áreas que incluyen más de un tipo de comunidad se limitan a describir las especies presentes en lugares específicos (diversidad alfa), describiendo la diversidad de un ecosistema únicamente en termino de número de especies (Moreno, 2001). Para medir la diversidad gamma de una forma correcta, se propone hacerlo en base a los componentes alfa, beta y la dimensión espacial (Coyte *et al.*, 2015). El valor que se obtiene de este índice esta expresado en número de especies, sólo que está relacionando tanto la diversidad alfa y beta, y las comunidades que están tenidas en cuenta en cada análisis (Magurran, 2004). Esta medida no permite conocer si la diversidad de un hábitat se debe a la presencia de comunidades poco distintas entre sí (Molina-Ferriol & Merle-Farinós, 2012)

## **II.10 Bienestar animal**

### **II.10.1. Principio de las tres R**

Las investigaciones con animales siempre han sido objeto de debate público debido al uso inadecuado y al poco bienestar animal que puede existir durante el desarrollo de diversos experimentos científicos (de Boo *et al.*, 2005; Tannenbaum & Bennett, 2015). Se sabe que el bienestar animal favorece a que la ciencia que se basa en experimentación animal se desarrolle adecuadamente, mientras que las investigaciones donde los animales experimentales son mantenidos en altos niveles de estrés y/o dolor, pueden generar resultados inconsistentes y poco fiables (Guhad, 2005). En las últimas décadas, la presión ejercida por el público en general para que se mejoren las medidas de bienestar con los animales de experimentación, ha hecho que los gobiernos recurran a la formación de comités de éticas que regulen el uso de ser vivos en las investigaciones (Curzer *et al.*, 2015), lo cual explica la popularidad creciente del principio de las tres Rs (Guhad, 2005).

El principio de las tres Rs fue propuesto en 1959 por William Russel y Rex Burch, en su libro: “The Principles of Human Experimental Technique” (Balls, 2010; Tannenbaum & Bennett, 2015). En esta publicación se proponen tres principios para la investigación con animales: Reemplazo (buscar alternativas al uso de animales para experimentación científica [invertebrados o animales con sistema nerviosos poco desarrollado]), reducción (disminuir el número de animales usados al mínimo) y refinamiento (modificar los experimentos para causar el menor estrés y dolor de los animales). Al seguir estos principios se busca el bienestar animal durante las investigaciones científicas (Balls, 2010; Curzer *et al.*, 2015; Flecknell, 2002).

### **II.10.2. Técnicas de muestreo no invasivas: Uso de drones**

Los drones son vehículos aéreos no tripulados (Joyce *et al.*, 2018; Sandbrook, 2015) que son capaces de volar de forma autónoma siguiendo planes de vuelo basados en coordenadas GPS (Marris, 2013; Van Gemert *et al.*, 2015) o controladas a distancia por un operador usando un control remoto (Sandbrook, 2015). Los drones fueron diseñados para uso militar, pero con

las mejoras tecnológicas, la reducción de tamaño de sus componentes y a la reducción en los precios, el uso de drones para fines científicos ha incrementado rápidamente en las últimas décadas (Olivares-Mendez *et al.*, 2015), lo que representa un posible aumento del estrés en animales salvajes debido al uso de estos nuevos equipos en programas de conservación (Mulero-Pázmány *et al.*, 2017).

El uso de drones en programas de conservación en animales de vida silvestre aún está en sus inicios (Ivoševi *et al.*, 2015; Jiménez & Mulero-Pázmány, 2019) y sus efectos negativos sobre los animales aún no está muy estudiado (Ditmer *et al.*, 2015; Rümmler *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2018; Weimerskirch *et al.*, 2017). Los animales salvajes pueden tener respuestas negativas e impredecibles a los drones, y esto va a depender de la naturaleza propia de cada especie, el tipo de dron, la proximidad a los animales, velocidad de vuelo, ángulo de aproximación y las habilidades del operador para manejar la aeronave (Jiménez & Mulero-Pázmány, 2019; Mulero-Pázmány *et al.*, 2017; Tablado & Jenni, 2015). Ciertas especies presentan respuestas de huida y lucha, otras forman grandes agregaciones de individuos y algunas especies no muestran una respuesta observable a pesar de estar presentando signos de estrés fisiológico (Ditmer *et al.*, 2015, 2018; Penny *et al.*, 2019).

El uso de esta tecnología para el monitoreo y muestreo de mamíferos marinos ha ganado popularidad desde que fue propuesto su uso por primera vez, para la obtención de soplo (aire exhalado condensado) en cetáceos (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2010). Este primer estudio generó un boom en el uso de esta herramienta para el monitoreo en diversas especies marinas, como la ballena jorobada (Apprill *et al.*, 2017), el oso polar, *Ursus maritimus* (Barnas *et al.*, 2018), la ballena gris (Pirota *et al.*, 2017); el pingüino de Adelia, *Pygoscelis adeliae* (Rümmler *et al.*, 2016); la orca, *Orcinus orca* (Durban *et al.*, 2015; Raverty *et al.*, 2017); la foca gris, *Halichoerus grypus*, la foca de puerto, *Phoca vitulina* (Pomeroy *et al.*, 2015) y el lobo marino de California, *Zalophus californianus* (Adame *et al.*, 2017).

Es poco probable que se deje de utilizar el dron para investigación de animales silvestres, pues ha demostrado ser una herramienta muy versátil, económica y de fácil uso (Torres *et al.*, 2018). Además, recientemente el uso de esta tecnología también se está



implementando en el campo turístico para el avistamientos de mamíferos marinos (SEMARNAT, 2018). Por lo tanto, es necesario establecer manuales o guías para que esta tecnología sea usada de forma responsable y sin perturbar la fauna silvestre (Jiménez & Mulero-Pázmány, 2019; Smith *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2018), además de determinar, para cada especie a estudiar, cuál es el comportamiento de los individuos ante la presencia del dron.

## **II.11 Modelo biológico de estudio: Ballena azul (*Balaenoptera musculus*) del Pacífico Noreste**

### **II.11.1. Descripción de la especie**

Este es el animal más grande que existe y ha existido en la historia del planeta (Attard *et al.*, 2016; Costa-Urrutia *et al.*, 2013). Llega a medir de 14.4 a 26.6 metros de longitud y pesar entre 120 y 190 toneladas, siendo las hembras más grandes y pesadas que los machos (Durban *et al.*, 2016; Ortega-Ortiz *et al.*, 2018). La madurez sexual es alcanzada por las hembras cuando llegan a medir 21-23 metros, mientras que los machos lo hacen al medir 20-21 metros, lo cual sucede entre los 5 y 10 años (Nishiwaki, 1952). Después de alcanzar la madurez sexual, las hembras paren una cría cada dos o tres años, después de un periodo de gestación de 10-12 meses (Lockyer, 1984).

Usualmente las ballenas azules son observadas solas o en pares, pero concentraciones de hasta 50 individuos pueden ocurrir en zonas de alta productividad (Sears & Calambokidis, 2002). Su soplo es el más alto (hasta 9 m) y denso de los cetáceos, por lo que ha servido como herramienta de identificación de la especie junto con la forma de la aleta dorsal y el patrón de pigmentación de los costados corporales de cada individuo (Sears *et al.*, 1990).

### **II.11.2. Alimentación**

En el Golfo de California la abundancia y biomasa del zooplancton es dominada por copépodos y en menor cantidad por eufáusidos (Brinton & Townsend, 1980; Gendron, 1992). *Nyctiphanes simplex* es un eufáusido más abundante y ampliamente distribuido en el. Esta

especie presenta un tamaño corporal de aproximadamente 19 mm y se produce durante todo el año con un pico entre Marzo y Abril, cuando alcanza una densidad promedio de 715 ind./1000 m<sup>3</sup> con una máximo de 5000 ind./1000 m<sup>3</sup> (Brinton *et al.*, 1986; Brinton & Townsend, 1980). Cuando se alimentan en las profundidades, las ballenas azules generalmente bucean durante 8 a 15 minutos (Croll *et al.*, 2001; Owen *et al.*, 2016).

### **II.11.3. Distribución**

La ballena azul es una especie cosmopolita, su distribución abarca desde los océanos Ártico y Antártico hasta el ecuador (Costa-Urrutia *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2015). En base en la distribución y el número de ballenas capturadas en las zonas costeras de ambos continentes del Pacífico Norte, se sugirió que *B. m. musculus* exhibía un patrón migratorio (Reilly & Thayer, 1990; Rice, 1974). En el Pacífico norte las ballenas se distribuyen muy ampliamente desde Kamchatka en Rusia, hasta el sur de Japón, en el occidente, y desde el Golfo de Alaska y California hacia el sur, al menos hasta Costa Rica en el oriente (Rice, 1974; Thomas *et al.*, 2015). Su distribución comprende ambientes pelágicos de aguas profundas y costeros sobre la plataforma continental (Calambokidis *et al.*, 2009; Costa-Urrutia *et al.*, 2013). La ballena azul realiza migraciones entre las áreas de alimentación en zonas altamente productivas en altas latitudes, periodo primavera-verano; y las áreas de producción y cría en latitudes medias y bajas (aguas subtropicales y tropicales) durante el invierno (Paniagua-Mendoza *et al.*, 2017; Valenzuela-Molina *et al.*, 2018). El movimiento de la ballena azul desde el Golfo de California hacia la costa occidental sigue el cambio estacional de la productividad planctónica alrededor de la península (Gendron, 2002)

En la costa occidental de la Península de Baja California, las ballenas azules se distribuyen lejos de la costa y por lo tanto su hábitat se encuentra relativamente poco alterado por actividades humanas (Guerrero *et al.*, 2006). En contraste, en el Golfo de California, la distribución de las ballenas azules es costera, y por lo tanto su hábitat presenta mayores alteraciones debido principalmente al tráfico de embarcaciones pesqueras y turísticas de diferentes tamaños (SEMARNAT, 2018). Esta diferencia en el impacto antrópico es importante, porque es en el Golfo de California donde ocurre la crianza de las ballenas del Pacífico Noreste

(Gendron, 2002), y en esta zona se encuentran hembras lactantes con crías, jóvenes y adultos, tanto machos como hembras. Se ha observado que las hembras con cría prefieren zonas más costeras donde aparentemente se alimentan de eufáusidos más grandes (Rueda-Flores, 2007).

#### **II.11.4. Abundancia en el Pacífico Noreste**

Las ballenas azules del Pacífico Noreste, incluyendo aquellas que se distribuyen en la costa de los estados de Oregón, California y Baja California, representan el remanente poblacional más grande a nivel mundial (2000-3000 individuos, con un coeficiente de variación de 0.14; (Calambokidis *et al.*, 2009; Calambokidis & Barlow, 2004)y, de acuerdo con las estimaciones actuales esta población, es la más saludable en comparación con la del Océano Atlántico y Antártico (Thomas *et al.*, 2015). Se estima que alrededor de 300 individuos llegan anualmente al Golfo de California ( Gendron, 2002), principalmente a Bahía de Loreto, donde se concentran de manera particular (Gendron, 1990).

#### **II.11.5. Protección legal de la ballena azul en México**

Actualmente, la especie está catalogada como “en peligro” dentro de la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN; Reilly *et al.*, 2008). Adicionalmente, esta especie está incluida en el Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (Cites).

En México la ballena azul se incluyó en el Programa de Acción para la Conservación de las Especies (PACE) de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP), por lo que es necesario vigilar cambios y variaciones que puedan ocurrir en su población. Los esfuerzos de cooperación en la investigación y la divulgación del conocimiento de esta especie se han incrementado, entre el sector académico, gubernamental y productivo respecto a las acciones para su conservación (SEMARNAT, 2018).

## II.11.6. Principales amenazas para la conservación de la ballena azul

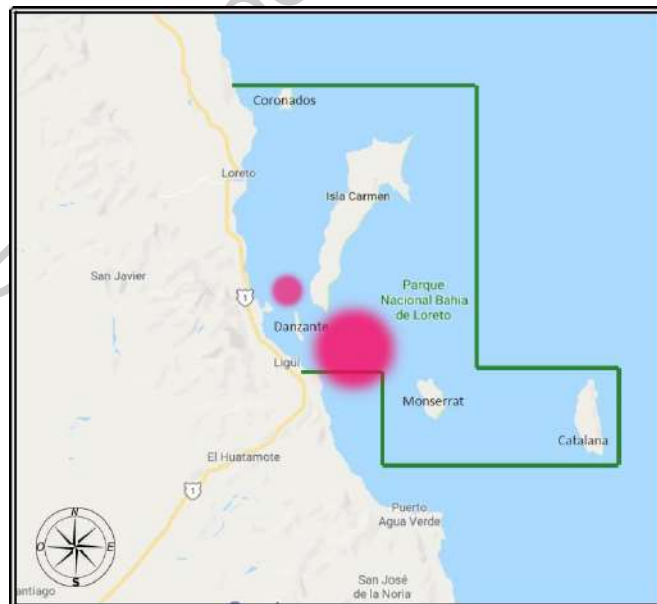
Quizás ningún otro grupo de animales haya llegado a simbolizar mejor el deterioro del ambiente a nivel global que los cetáceos (Clapham, 2016). Los seres humanos han reducido la abundancia de muchos vertebrados marinos grandes, incluidas ballenas; tan solo durante el siglo XX se mataron aproximadamente tres millones de ballenas, y se estima que algunas poblaciones se redujeron al 1% de la población original previa a la explotación (Pershing *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2016). Hoy en día, la degradación de los hábitats debido a los efectos del hombre es cada vez mayor; lo cual genera efectos negativos en las poblaciones de vida silvestre, causando una disminución en el número de individuos (Attard *et al.*, 2016; Melcón *et al.*, 2012; Mouton & Botha, 2012). Particularmente, en el caso de los grandes cetáceos, la reducción de las poblaciones afecta significativamente los ecosistemas donde desempeñan un papel importante como consumidores y, a través de su transporte y reciclaje de nutrientes, se incrementaba la productividad primaria de los ecosistemas marinos (Ratnarajah *et al.*, 2016).

Las principales amenazas para estos gigantes del mar están bien documentados e incluyen problemas como colisiones con barcos (Leaper, 2019; Peltier *et al.*, 2019), enredos en artes de pesca (Sharp *et al.*, 2019), así como contaminación acústica (Melcón *et al.*, 2012), exposición a contaminantes orgánicos (Tartu *et al.*, 2020) y enfermedades emergentes (Burge *et al.*, 2014; Domiciano *et al.*, 2016; Hunt *et al.*, 2013; Van Bressemer *et al.*, 2014). A medida que las poblaciones se recuperan, el efecto de su reintegración en el medio marino representa un tema fascinante en la dinámica del ecosistema (Attard *et al.*, 2016). En general, las poblaciones de ballenas se están recuperando (SEMARNAT, 2018); sin embargo, este crecimiento poblacional podría verse afectado debido a las anomalías climáticas inesperadas debido al calentamiento climático global (Banuet-Martínez *et al.*, 2017; Burge *et al.*, 2014), lo que produciría cambios en los ecosistemas oceánicos a gran escala (Sanderson & Alexander, 2020). En un futuro tan incierto y cambiante es importante que los organismos se adapten para que los ecosistemas puedan seguir funcionando adecuadamente (Attard *et al.*, 2016).

### III. METODOLOGÍA GENERAL

#### III.1 Área de estudio

El Parque Nacional Bahía de Loreto ( $25^{\circ}51'51''N$ ,  $111^{\circ}07'18''O$ ) es un área natural protegida que tiene una superficie de 206.581 hectáreas y está ubicado en el municipio de Loreto, Baja California Sur, México (SEMARNAT, 2018). Este parque nacional incluye las islas Danzante, del Carmen, Monserrat, Catalana y Coronados donde predominan ecosistemas únicos de manglares, matorrales xerófilos y dunas costeras (Carabias *et al.*, 2000). Es de gran importancia ya que es el área natural protegida (ANP) que presenta mayor cantidad de mamíferos marinos (30 especies) a nivel nacional (CONANP, 2016). Durante los meses de enero a abril, la ballena azul llega de su migración, desde Alaska, para alimentarse y reproducirse (Gendron, 2002; Valenzuela-Molina *et al.*, 2018). Aunque las ballenas están distribuidas en todo este parque nacional, existen áreas donde se pueden observar mayor número de individuos y es en estos lugares donde se realizan los muestreos de soplo (Imágen III.1).



**Imágen III.1.** Mapa de Bahía de Loreto. El área delimitada con líneas verdes corresponde al área natural protegida. Los puntos rojos indican las principales zonas de obtención de soplos de ballena azul. (Modificado de Mexbound.com)

### **III.2 Permisos de muestreo**

Los muestreos se realizaron con los permisos SGPA/DG de muestreo 2016, 2017 y 2018, respectivamente. Dichos permisos fueron otorgados por parte de la Dirección General de Vida Silvestre (DGVS) de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). La movilización de muestras se realizó bajo el permiso SAI/291/2016 otorgado por la Subdirección Académica y de Investigación del Centro interdisciplinario de Ciencias Marinas perteneciente al Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN).

### **III.3 Búsqueda y ubicación de las ballenas**

Se realizó un seguimiento focal de ballenas azules en 2016, 2017 y 2018, durante los meses de Febrero a Abril. El lugar de muestreo fue el Parque Nacional Bahía de Loreto ubicado en el Golfo de California, Baja California Sur, México. Las salidas al mar siempre estuvieron determinadas por las condiciones medio ambientales, principalmente la velocidad del viento (menos de ocho nudos, representa condiciones favorables para la navegación). Las salidas se realizaron a las 6:00 am desde la Marina de Puerto Escondido y se navegó aproximadamente una hora hasta el lugar donde estaban las ballenas. Estando ahí, se hizo una parada inicial de observación para realizar el avistamiento de algún individuo.

La observación de las ballenas se realizó siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-131-SEMARNAT-2010, que establece lineamientos y especificaciones para el desarrollo de actividades de observación de ballenas – relativas a su protección y la conservación de su hábitat (SEMARNAT, 2011). Adicionalmente, el avistamiento de ballena azul se realizó con el método de observación pasiva del Programa de Acción para la Conservación de las Especies (ver sección 6.7. Seguimiento focal pasivo).

### **III.4 Foto-identificación de los individuos**

La identificación de cada ballena se realizó mediante la técnica de foto-identificación. Este método permite separar las ballenas azules en 48 grupos (combinaciones de forma de aleta

dorsal y pigmentación), lo cual reduce el tiempo de clasificación de cada individuo (Gendron & Ugalde de la Cruz, 2012). Las fotografías fueron tomadas con una cámara DSLR Canon 30D (Canon Inc®, Japón) y un teleobjetivo Sigma 100-300mm f/4 (Sigma®, Japón). Se obtuvieron fotografías del lado izquierdo y derecho del dorso de la ballena (incluyendo la aleta dorsal), también se tomaron fotos de la aleta caudal de algunas ballenas (Imágen III.2).



**Imágen III.2.** Fotografías para la identificación de ballena azul. Izquierda: Dorso y la aleta dorsal. Derecha: Aleta caudal. (Fotos: Carlos Domínguez)

### III.5 Seguimiento focal

El seguimiento focal consiste en seguir un animal, el cual se foto-identifica y se le registra el comportamiento y su movimientos. Durante este seguimiento también se realiza la toma de diferentes muestras biológicas (ver Valenzuela-Molina *et al.*, 2018). En el Parque Nacional Bahía de Loreto, el avistamiento de ballena azul debe realizarse siguiendo los lineamientos de el “Programa de Acción para la Conservación de las Especies (PACE): Observación pasiva de Ballena Azul” el cual establece: 1) mantener una distancia mayor a 100 metros de la ballena, 2) apagar el motor y observar a los animales para establecer su comportamiento, 3) encender el motor solamente cuando la ballena está navegando y después de que esta se sumerja para bucear y 4) nunca acercarse por su cabeza, perseguirla o seguir a una madre con cría (CONANP-SEMARNAT, 2018; SEMARNAT, 2018). En cada avistamiento se realizaron registros del comportamiento de cada ballena (tiempo de buceo, tiempo en

superficie, número de soplos, interacción con otros animales y los movimientos de desplazamiento) durante aproximadamente 3-4 horas. Todos estos datos fueron registrados en una computadora portátil HP 95LX (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) y un GPS 12X (Garmin International, Olathe, KA) que se usó para conocer la localización de cada individuo.

### **III.6 Recolección de aire exhalado condensado (soplo)**

Se obtuvieron muestras de aire exhalado condensado (soplo) de forma no invasiva con el drone quadracóptero Phantom 3® Standard (DJI, China) siguiendo la siguiente metodología:

a. Con los datos de comportamiento obtenidos durante el seguimiento focal se pudo predecir el lugar y la hora a la que el animal iba a salir a superficie. Sabiendo estos datos, el drone se preparó para tenerlo encendido 1 minuto antes de la siguiente salida a superficie (los vuelos se realizaron una hora después de haber empezado el seguimiento focal de cada individuo). En este paso se limpió el drone, se rociaron los circuitos eléctricos y los motores con silicona repelente al agua, se le sujetaron se le sujetaron dos cajas de Petri y dos láminas portaobjetos (para improntas celulares) en las cuales se recolectó el material biológico después del vuelo exitoso (Imágen III.3). Finalmente se prendió el drone para que se enlazara a los satélites y se pudiera volar de forma segura.

b. Cuando la ballena salía a respirar, se despegó el drone con la ayuda de un estudiante y se voló hacia la ballena a una altura de 6 metros sobre el agua. La aproximación a la ballena siempre se hizo por la aleta caudal.

c. Una vez sobre la ballena, el drone se bajó a una altura de 5 metros sobre la cabeza para recolectar la muestra biológica. Se recolectaron entre tres y siete soplos por cada individuo.

d. Se regresó el drone a la embarcación donde se realizó el procesado de las muestras para el análisis del microbioma bacteriano (ver capítulo IV).





**Imágen III.3.** Equipo para la recolección de soplo. Izquierda: Drone quadcoptero Phantom 3®. Derecha: Lamina portaobjetos y caja Petri sujetas al drone. (Fotos: Carlos Domínguez)

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

#### **IV. Efecto del uso de drones para el muestreo de soplos sobre el comportamiento de la ballena azul (*Balaenoptera musculus*)**

*“Hay una gran diferencia entre una sociedad que caza ballenas y otra que las contempla”*

Anónimo

##### **IV.1 Introducción**

Debido a la crisis en la pérdida de biodiversidad, se ha dado incremento en el estudio de animales de vida silvestre para explorar aspectos de su biología y ecología básica, funciones fisiológicas, relaciones taxonómicas evolutivas, el desarrollo de estrategias de vida entre otros; con el objetivo de generar planes de conservación para las especies (Kremen & Ostfeld, 2005; Linklater & Gedir, 2011; Sikes *et al.*, 2011). La mayoría de estudios en mamíferos de vida silvestre se realizan en los hábitats naturales y la captura y contención física es el método más utilizado para la obtención de muestras biológicas (McMahon *et al.*, 2012). En mamíferos marinos pequeños (p.e. delfines, lobo marino, focas y marsopas) es posible realizar una restricción física para la obtención de muestras (ver Kershaw y Hall, 2016; Banuet-Martínez *et al.*, 2017; Nabi *et al.*, 2017). Sin embargo estos métodos suelen ser muy estresantes y peligrosos para los animales y para los investigadores (McMahon *et al.*, 2012).

En 1959, Russel y Burch postularon el principio de las tres Rs (reducción, refinamiento y reemplazo) con el objetivo de crear protocolos de investigación con animales que contribuyeran a la generación de nuevos conocimientos para la ciencia, pero buscando siempre el bienestar de los animales experimentales (Balls, 2010; Tannenbaum & Bennett, 2015). Teniendo en cuenta estos principios, en el estudio de mamíferos marinos se han realizado algunos intentos para implementar métodos poco o no invasivos en los cuales se usaron aeronaves no tripuladas para la obtención de muestras biológicas (ver Acevedo-Whitehouse, Rocha-Gosselin y Gendron, 2010; Hunt *et al.*, 2013),

Los drones son vehículos aéreos no tripulados que son manejados a distancia con un control remoto (Sandbrook, 2015) y hay algunos que son capaces de volar de forma autónoma con un plan de vuelo establecido (Van Gemert *et al.*, 2015). Desde que su uso fue propuesto por primera vez para la recolección de soplo en cetáceos (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2010), el uso de aeronaves no tripuladas para la obtención de muestras biológicas en mamíferos marinos ha aumentado en los últimos años (Adame *et al.*, 2017; Apprill *et al.*, 2017; Christiansen *et al.*, 2016; Ivoševi *et al.*, 2015; Jiménez & Mulero-Pázmány, 2019). Esto debido, en gran parte, a la disminución en los costos de esta tecnología y a que son relativamente fáciles de usar (Goebel *et al.*, 2015; Pomeroy *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2018). Aunque esta tecnología tiene grandes ventajas para la investigación científica, son muy pocos los estudios que han determinado el impacto que puede tener el uso de drones sobre las especies en vida libre (Christiansen *et al.*, 2016; Rümmler *et al.*, 2016; Weimerskirch *et al.*, 2017).

Con la popularización de los drones en los investigadores de mamíferos marinos, es necesario cuantificar el efecto negativo que se puede generar con el uso de estos artefactos para generar protocolos que minimicen los efectos negativos de los drones en los animales (Pomeroy *et al.*, 2015; C. Smith *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2018; Vas *et al.*, 2015). En este estudio evaluamos los comportamientos de superficie y de buceo de la ballena azul (*Balaenoptera musculus*) en el Golfo de California, con el objetivo de determinar los efectos del drone, en la conducta normal de estos animales, durante el muestreo de aire exhalado condensado (soplo).

## **IV.2 Métodos**

### **IV.2.1. Recolección de los datos para el análisis de comportamiento**

Para la realización de este estudio, solo se tuvieron en cuenta los datos obtenidos en ausencia de embarcaciones turísticas de avistamiento de ballenas. Se tomaron registros antes, durante y después de cada vuelo con el drone. El tiempo en superficie (desde que el animal sale a superficie hasta que inicia un buceo), el tiempo de buceo (duración de cada buceo) y el número de soplos (cantidad de soplos que realiza cada ballena mientras está en la superficie), fueron obtenidos de forma visual o directamente de la computadora portátil. Se calcularon los

siguientes parámetros: el intervalo entre soplos (tiempo entre cada uno de los soplos en superficie), la duración total de ciclo (el tiempo de buceo más el tiempo en superficie), la tasa de soplos (número de soplos por minuto durante un ciclo completo) y la proporción en superficie (proporción de tiempo que la ballena está en superficie durante un ciclo completo) (Dorsey *et al.*, 1989).

#### IV.2.2. Obtención de datos de vuelo del dron

Para calcular la altura “real” de vuelo (aproximación más óptima) fue necesario ajustar los datos obtenidos mediando el GPS y el altímetro del dron, pues esta lectura de altura se modifica cuando se vuela sobre el agua y deja de ser exacta. Para realizar estas correcciones se usaron fotografías del dron cuando estaba sobre la ballena (Figura IV.1) y se utilizó la altura del dron como referencia de medida. La distancia de vuelo y el tiempo de vuelo fueron obtenidos directamente de la aplicación de vuelo DJI Go (DJI®, China)



**Imagen IV.1.** Recolección de soplo en una ballena azul. El círculo rojo muestra la posición del dron con respecto a la ballena. (Foto: Carlos Domínguez)

### IV.3 Análisis estadísticos

Antes de realizar cada análisis, se inspeccionó la distribución de los datos con lo que se determinó el tipo de estadística para el análisis de los datos obtenidos. Se utilizó estadística paramétrica para examinar diferencia de medias de cada una de las variables de comportamiento en los diferentes periodos de muestreo (ANOVA: para comparaciones antes, durante y después, del vuelo del dron, de los valores de tiempo en superficie, número de soplos y soplos por minuto; *Test-t*: comparaciones entre antes y después, del vuelo del dron, para duración de buceo, duración total del ciclo y proporción en superficie). El nivel de significancia estadística usado fue  $\alpha = 0.05$ . Los análisis estadísticos fueron realizados con el software R v.3.3.4 (R Core Team, 2018). Las gráficas se hicieron con el paquete *ggplot2* (Wickham, 2016) en R.

### IV.4 Resultados

En total, se registraron 194 eventos de comportamientos (tiempo en superficie más tiempo de buceo) que incluyen datos de antes, durante y después de los 14 vuelos que se realizaron con el dron. Para cada ballena, se promediaron los registros obtenidos en cada periodo de muestreo. El seguimiento de los individuos tuvo una duración entre 97 a 345 minutos (media = 242 minutos  $\pm$  SD 77). La altura aproximada de cada vuelo durante los muestreos fue de 5 m (media = 4.56 m  $\pm$  SD 0.77). La duración de los vuelos fue de 5.3 minutos (mínimo 4.1, máximo 11.4 minutos) y la distancia promedio recorrida durante cada vuelo fue de 300 m (mínimo 150 – máximo 720 metros).

No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables de comportamiento analizadas durante los diferentes periodos de muestreo (Tabla IV.1): Tiempos en superficie (ANOVA,  $F_{2,34} = 1.16$ ,  $p = 0.32$ ), tiempos de buceo ( $t = 1.96$ ,  $df = 23$ ,  $p = 0.06$ ), número de soplos en superficie (ANOVA,  $F_{2,34} = 1.27$ ,  $p = 0.29$ ), intervalo entre soplos (ANOVA,  $F_{2,35} = 0.83$ ,  $p = 0.82$ ), duración total de ciclo ( $t = 21.83$ ,  $df = 21$ ,  $p = 0.08$ ), tasa de soplos ( $t = 20.47$ ,  $df = 20$ ,  $p = 0.64$ ), y porcentaje en superficie ( $t = 0.31$ ,  $df = 21$ ,  $p = 0.75$ ).

**Tabla IV.1.** Valores medios (media  $\pm$  SD) de las variables de comportamiento de estudio, antes, durante y después del vuelo con el drone

<b>Comportamiento</b>	<b>Antes</b>	<b>Durante</b>	<b>Después</b>
<b>Tiempo en superficie (minutos)</b>	2.53 $\pm$ 0.34	2.54 $\pm$ 0.44	2.43 $\pm$ 0.23
<b>Tiempo de buceo (minutos)</b>	10.80 $\pm$ 0.81	---	9.97 $\pm$ 1.10
<b>Soplos en superficie</b>	11.08 $\pm$ 1.39	11.61 $\pm$ 1.53	10.75 $\pm$ 1.49
<b>Intervalo entre soplos (segundos)</b>	13.73 $\pm$ 1.65	13.39 $\pm$ 1.13	13.62 $\pm$ 1.44
<b>Tasa de soplos (soplos/minuto)</b>	1.21 $\pm$ 0.13	---	1.18 $\pm$ 0.13
<b>Duración total de ciclo (minutos)</b>	13.38 $\pm$ 0.91	---	12.49 $\pm$ 1.34
<b>Porcentaje en superficie (%)</b>	19.29 $\pm$ 1.94	---	19.53 $\pm$ 1.64

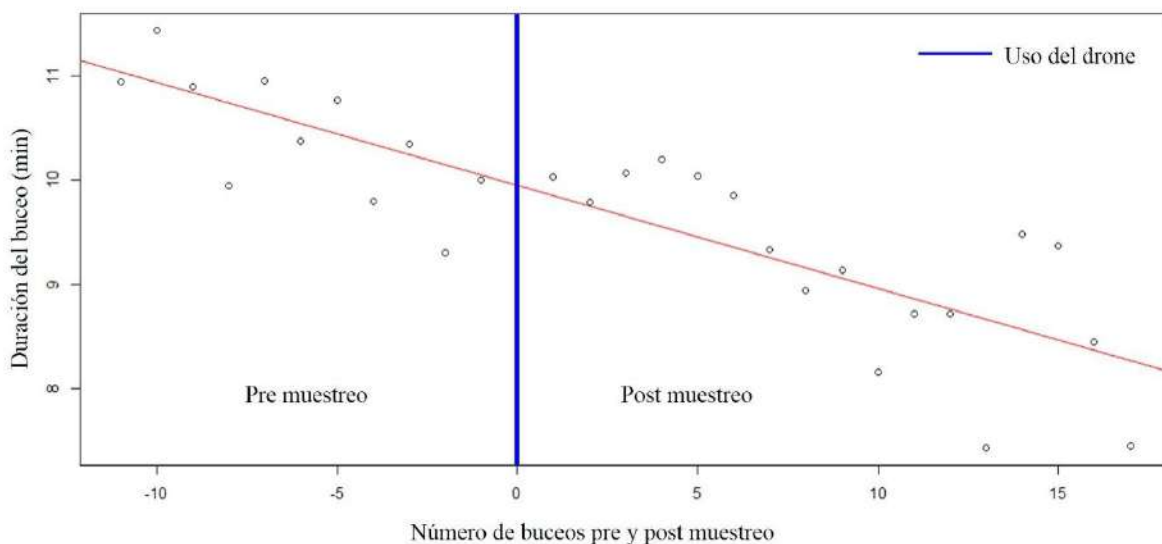
#### IV.5 Discusión

Durante la última década ha habido un incremento en el uso de soplo de cetáceos ya que es una fuente biológica que revela información sobre el estrés (Thompson *et al.*, 2014), ciclos reproductivos (C Hogg *et al.*, 2009), ADN (Frère *et al.*, 2010), requerimientos de energía para reproducción (Christiansen *et al.*, 2016), microbioma bacteriano y salud (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2010; Apprill *et al.*, 2014; Jiménez & Mulero-Pázmány, 2019; Raverty *et al.*, 2017). Los estudios mencionados anteriormente han demostrado que la información que se obtiene de los soplos es muy útil para los investigadores. Además, es una herramienta que permite muestrear grandes cetáceos, lo cual hace algunos años era técnicamente imposible (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2010). Es por esto que es importante evaluar los posibles efectos negativos, para lo cual es necesario monitorear las respuestas de comportamiento a los diferentes tipos de drones con el objetivo de generar guías para usar esta tecnología de muestreo en diferentes especies.

Los resultados obtenidos de tiempo en superficie y tiempo de buceo fueron similares a los identificados en el 2014 y 2015 en la misma área de muestreo y utilizando la misma metodología del presente estudio (1.8  $\pm$  0.8 min and 8.3  $\pm$  3.6 min, n= 586; Diane Gendron, datos sin publicar). Estos muestreos se realizaron durante un estudio de evaluación del

comportamiento de la ballena azul, por lo cual utilizaron un método de observación pasiva y sin ningún tipo de interacción con los animales, además no hubo muestreo de ningún tipo en los animales (Diane Gendron, comunicación personal).

Algunos estudios han reportado que no existe evidencia observable de alguna alteración en el comportamiento de las ballenas en respuesta a la actividad de los drones (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2010; Durban *et al.*, 2015; Goebel *et al.*, 2015). Se han observado disminuciones en los tiempos de buceo y superficie en respuesta a actividades antropogénicas como la observación de ballenas de aleta, *Balaenoptera physalus* (Stone *et al.*, 1992) y de ballenas azules (Diane Gendron y Geraldine Busquets-Vass, datos no publicados). Por lo tanto, se propone que los tiempos de buceo y de superficie son parámetros válidos para determinar el cambio de comportamiento de las ballenas en respuesta a actividades antropogénicas. El tiempo de buceo se mantuvo similar hasta seis inmersiones después del muestreo (Figura IV.1). Después de eso (80,22 minutos después) se observó una disminución en el tiempo de buceo, lo cual puede estar relacionado con algún factor no relacionado al uso del drone, como se discutirá a continuación.



**Figura IV.1.** Tiempos de buceo después del vuelo con el drone

Hay muchos factores que pueden influir en la duración de la inmersión de una ballena. Por ejemplo, el tráfico de gran número de embarcaciones para el avistamiento de ballenas (Parsons, 2012), el comportamiento de la ballena (e.g. búsqueda de alimento *versus* no búsqueda de alimento), profundidad de inmersión (Croll *et al.*, 2001) y distribución de profundidad de presa (Croll *et al.*, 1998).

Se ha reportado que la distancia de la plataforma de lanzamiento (barco que sigue al dron) podría alterar el comportamiento de una ballena (Parsons, 2012). Sin embargo, durante el muestreo de soplo que se realizó a las ballenas, el bote se mantuvo al menos a 200 m de las ballenas y con el motor apagado; solo se prendió la embarcación cuando el vuelo con el dron fue mayor de 200 m de distancia del bote y la ballena ya no estaba en superficie.

En cuanto a la altitud de vuelo, el dron se mantuvo a unos 5 m detrás de la cabeza de la ballena y no pareció modificar el comportamiento que estuvo presentado la ballena antes del vuelo. Aunque algunos mamíferos marinos pueden escuchar el ruido de los drones bajo el agua, el efecto de dicho ruido submarino es probablemente pequeño y no perturba a los animales (Christiansen *et al.*, 2016).

#### **IV.6 Conclusiones**

Este es el primer estudio que cuantifica los parámetros (tiempo de superficie y buceo, soplos en superficie, intervalo entre soplos, duración del ciclo completo, tasa de soplo y porcentaje de tiempo en superficie) para evaluar los efectos del muestreo de soplos con drones en grandes cetáceos. No se encontraron evidencia de modificaciones en el comportamiento de las ballenas después del muestreo.

Se debe prestar especial atención a la ruta de aproximación, que solo se debe hacer de la cola a la cabeza, y debe evitar volar al frente o sobre la cabeza. Además, la altura mínima de vuelo debe determinarse en función del tipo de dron, y debe mantenerse una distancia mínima desde la plataforma de lanzamiento hasta la ballena cuando se acerque al individuo.



Los resultados de este estudio no deben ser extrapolados a otras especies. Por el contrario, los protocolos de muestreo y vuelo de drones deben ser específicos de cada especie y deben desarrollarse e implementarse siempre que sea posible. Solo de esta manera será posible reconocer los beneficios del muestreo basado en drones y así expandir nuestro conocimiento de las ballenas, mientras se minimiza el estrés de muestreo para los animales.

Los estudios futuros deberían apuntar a aumentar el tamaño de las muestras para lograr un mayor poder estadístico y ayudar a determinar si las respuestas conductuales al muestreo basado en drones son inequívocamente nulas o mínimas. Esto es particularmente importante, ya que no solo está creciendo el uso de drones para la investigación de ballena, sino que los recorridos de observación de ballenas también han comenzado a incorporar el uso de drones para filmar ballenas azules en nuestra área de estudio.

**Anexo 1: Artículo científico derivado de este capítulo: Domínguez-Sánchez, C., Acevedo-Whitehouse, K., Gendron D. 2018 Effect of drone-based blow sampling on blue whale (*Balaenoptera musculus*) behavior. *Marine Mammal Science* 34(8): 841-850. doi: 10.1111/mms.12482**

## V. Caracterización del microbioma bacteriano del sistema respiratorio de ballena azul (*Balaenoptera musculus*) en el Golfo de California

“El mar es la encarnación de una existencia supernatural y maravillosa”

Julio Verne

### V.1 Introducción

Durante las últimas tres décadas, el ecosistema marino ha sido afectado por diversos factores como contaminación marina (e.g. micro y macroplásticos), derrames de petróleo, destrucción de hábitats (e.g. arrecifes de coral), pesca indiscriminada y cambio climático (Cossaboon *et al.*, 2019; Dris *et al.*, 2015; Nelms *et al.*, 2019; Thomas *et al.*, 2015; Young *et al.*, 2017). Estos factores ocasionan diferentes niveles de estrés en los animales lo que los hace más susceptibles a patógenos medio ambientales (McCallum *et al.*, 2003; Rocha Gosselin, 2009). La evidencia de este fenómeno se puede observar como un aumento en la presentación de enfermedades y mortalidades atípicas de mamíferos marinos (Burge *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2017; Sanderson & Alexander, 2020; Van Bresseem *et al.*, 2014). En los océanos, los mamíferos marinos tienen una alta importancia ecológica debido a su sensibilidad a los cambios ambientales y a su estado de amenaza, lo que hace que sean considerados centinelas del ecosistema (Bik *et al.*, 2016; Bossart, 2011; Moore, 2008; Nelson *et al.*, 2015).

En los últimos años se ha demostrado que el microbioma de los mamíferos está conformado por diferentes comunidades bacterianas (Li *et al.*, 2019; Watson *et al.*, 2019; Wypych *et al.*, 2019), las cuales están determinadas por la composición (diversidad y abundancia relativa de especies) y las interacciones entre los diferentes grupos bacterianos (Lee y Mazmanian, 2010; Shade y Handelsman, 2012; Stubbendieck, Vargas-Bautista y Straight, 2016). Además, se ha señalado que las sinergias de las comunidades de bacterias con el hospedador son vitales para la supervivencia de ambos (Foster *et al.*, 2017). En la última década se han dado varios avances en el estudio del microbioma en cetáceos en varias especies (Aprill *et al.*, 2014,

2017; Johnson *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2012; Mulero-Pázmány *et al.*, 2017; Raverty *et al.*, 2017; Venn-Watson *et al.*, 2008). Sin embargo, solo dos de estos estudios han utilizado secuenciación masiva y han logrado identificar el microbioma central del tracto respiratorio, además se han podido identificar bacterias que son potencialmente patógenas para el tracto respiratorio de humanos (Apprill *et al.*, 2017; Mulero-Pázmány *et al.*, 2017).

Si se quiere usar el microbioma bacteriano como herramienta para evaluar el estado de salud animal, es fundamental distinguir entre bacterias comensales y bacterias transitorias, con el objetivo de identificar aquellas que pueden desencadenar enfermedades (Huang *et al.*, 2016). Para lograr esto, primero es necesario caracterizar el microbioma de animales sanos e identificar las bacterias que predominan en la comunidad (Huse *et al.*, 2012), es decir, el microbioma central (Bierlich *et al.*, 2018; Ingala *et al.*, 2018). El microbioma central juega un papel importante en la homeostasis de un órgano (Björk *et al.*, 2018; Hernandez-Agreda *et al.*, 2017; Ross *et al.*, 2019; Shade & Handelsman, 2012). Al momento de determinar el microbioma central, es importante tener en cuenta el umbral de detección (abundancia relativa) y el porcentaje de ocurrencia (prevalencia) (Astudillo-García *et al.*, 2017). La selección de estos criterios han sido y varían ampliamente entre los estudios publicados arbitrarios (Hernandez-Agreda *et al.*, 2017; Shade & Handelsman, 2012). Por ejemplo, las anotaciones centrales de microbioma han oscilado entre un 30% (Ainsworth *et al.*, 2015) hasta un 100% (Antwis *et al.*, 2018; Apprill *et al.*, 2017; Huse *et al.*, 2012), y los umbrales de detección han oscilado entre 0.001% y 0.1% (Antwis *et al.*, 2018; Astudillo-García *et al.*, 2017)

Conocer el microbioma bacteriano normal de los individuos en aparente buen estado de salud y establecer una base sobre su composición es el primer paso para identificar cambios asociados a alguna perturbación que conlleve a la presentación de enfermedades respiratorias y establecer índices de salud para la población (Lemon *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2012; Mackenzie *et al.*, 2017b; Shade & Handelsman, 2012). El objetivo de este capítulo fue determinar y caracterizar el microbioma bacteriano central del tracto respiratorio de la ballena azul en el Golfo de California.

## **V.2 Métodos**

### **V.2.1. Trabajo de campo**

La obtención de aire exhalado condensado (soplo) se realizó siguiendo la metodología explicada en el capítulo III de esta tesis. Para realizar el análisis microbiológico del soplo, después de cada vuelo, a cada caja de Petri se vertió 1 ml de alcohol al 96% para la preservación del DNA bacteriano, se mezcló el material biológico con una pipeta Pasteur y se colocó el contenido en microtubos graduados de polipropileno de 1500 µl (Eppendorf™, Thermo Fisher Scientific, USA). Estas muestras se almacenaron a -20°C (durante la temporada de muestreo) y posteriormente a -80°C en el Laboratorio de Plasticidad Inmune y Ecoepidemiología Molecular de la Universidad Autónoma de Querétaro. Como controles ambientales se recolectaron muestras de aire (se simuló una recolección de soplo con el dron) y agua en ausencia de ballenas. Adicionalmente se colectaron muestras de estornudo del piloto del dron (misma persona que procesó las muestras en campo y en el laboratorio). Se usó el mismo proceso que las muestras de soplo para la conservación de las muestras control.

### **V.2.2. Trabajo de laboratorio**

#### **V.2.2.1 Extracción de DNA de las muestras de soplo**

El DNA genómico fue extraído de las muestras de soplo con el kit de extracción QIAamp® DNA Mini Kit y se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Se midió la concentración y la calidad del producto (relación 260/280 nm). Para esto se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop (Qiagen, USA), el cual se configuró para la medición de DNA de doble cadena. Se usó agua de grado molecular como control.

#### **V.2.2.2 Amplificación de las regiones variables V3-V4 del gen 16S rRNA**

Para comprobar la viabilidad del DNA extraído, en cada muestra se amplificó un fragmento de 461 pb correspondiente a las regiones variables V3 y V4 del gen eubacteriano 16S

rRNA. Para esto, se utilizaron los oligonucleótidos 341F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-[CCTACGGGNGGCWGCAG]) and 785R (5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-[GACTACHVGGGTATCTAATCC]) (Thijs *et al.*, 2017); siendo las secuencias de los adaptadores de Illumina para los primers *forward* y *reverse*, las primeras 33 y 34 pares de bases, respectivamente. La reacción de PCR se llevó a cabo en volúmenes de 10 µl que contenían 1X de Buffer (10X PCR Rxn Buffer –MgCl<sub>2</sub>; Invitrogen, Brasil), 1.5mM de MgCl<sub>2</sub> (0.0mM MgCl<sub>2</sub>; Invitrogen, Brasil), 0,2 mM dTNPs (10mM dNTP Mix; Invitrogen, Brasil), 0.42 mM de cada primer, 0.25 U de Taq polimerasa (Taq polimerase Recombinant, Invitrogen, Brasil) y 0.2µg de BSA (Bovine Serum Albumin; Invitrogen, Brasil). La amplificación de este fragmente se realizó en el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) y se utilizaron las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 25 ciclos que consisten en desnaturalización (94 °C por 45 s), alineamiento (58 °C por 40 s) y extensión (72 °C por 1 min) y un paso de extensión final a 72 °C durante 10 min. Las muestras en las que se amplificaron las regiones V3-V4 del gen 16s rRNA, se enviaron a secuenciación de manera comercial en la plataforma MiSeq System 250x2 (Illumina Inc, USA) en la Unidad de Secuenciación e Identificación de Polimorfismos del Instituto Nacional de Medicina Genómica (Ciudad de México, México).

### V.2.2.3 Análisis bioinformático de las secuencias

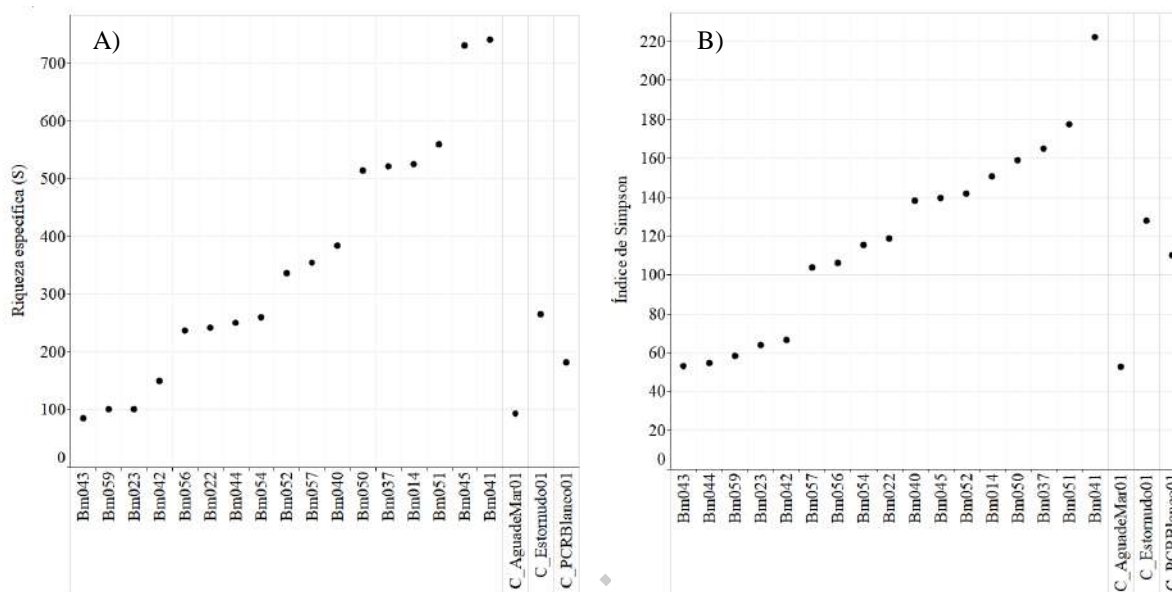
El control de calidad de las secuencias crudas (379,813 lecturas) se realizó utilizando FASTQC (Afgan *et al.*, 2018). Para inferir las variantes de la secuencia de los amplicones se utilizó el Algoritmo Divisivo de Eliminación de Amplicones 2 (dada2, v.1.9.1) (Callahan *et al.*, 2016). Se filtraron y recortaron las secuencias según el umbral de calidad (se estableció en Q > 25). Posteriormente se combinaron lecturas idénticas en “secuencias únicas”, determinando la abundancia correspondiente al número de lecturas de cada “secuencia única”. Las lecturas *forward* y *reverse* de cada muestra se combinaron en una única secuencia combinada (*contig*). Después de construir la tabla de ASVs y eliminar las quimeras (detectadas mediante autorreferencia), las secuencias se clasificaron e identificaron con DECIPHER (v.2.0) (Wright, 2016), utilizando la base de datos de secuencias de RNA SILVA (v.132) como referencia de

identidad taxonómica (Quast *et al.*, 2013). Finalmente, se identificaron y se eliminaron las secuencias pertenecientes a arqueas, cloroplastos, eucariotas, desconocidos y mitocondrias utilizando *phyloseq* (v.1.25.0) (McMurdie & Holmes, 2013). Una vez obtenidas la tabla de ASVs y la tabla taxonómica (generadas con *dada2*), se identificó la distribución de los conteos de lecturas en todas las muestras y se hizo una gráfica de barras apiladas para tener una idea de la composición de la comunidad en las muestras. Para lograr esto, se eliminaron los taxones de baja abundancia y solo se incluyeron aquellos que contribuyeron en más del 0,02% de la abundancia relativa de cada muestra. Se estimó la cobertura de muestreo en muestras de soplo y controles técnicos utilizando el estimador de cobertura de Good con el paquete *QsRutils* (v.0.1.4) (B. Zhang *et al.*, 2017). Se calcularon medidas de diversidad alfa: riqueza (S) e índice de diversidad de Simpson (D) con *vegan* (v.2.5.4) (Oksanen *et al.*, 2019). Estas métricas se probaron estadísticamente para normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk y para evaluar las diferencias en las métricas de diversidad alfa entre soplos y controles, se realizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. Se usó el paquete *microbiome* (v.1.3.1) (Lahti *et al.*, 2017) para determinar el microbioma central (detección de umbral = 0.2 / 100, prevalencia = 50/100). *Vegan* también fue utilizado el análisis permutacional multivariado de la varianza (PERMANOVA) en distancias Unifrac no ponderadas, con el objetivo de identificar diferencias entre la composición del microbioma de la ballena azul y los controles técnicos. Se utilizó *SourceTracker* (Knights *et al.*, 2013) para estimar la proporción de la comunidad bacteriana en las muestras de golpes de las ballenas azules que proviene del conjunto de controles técnicos. Todos los gráficos fueron generados en R utilizando *ggplot2* (Wickham, 2016).

### V.3 Resultados

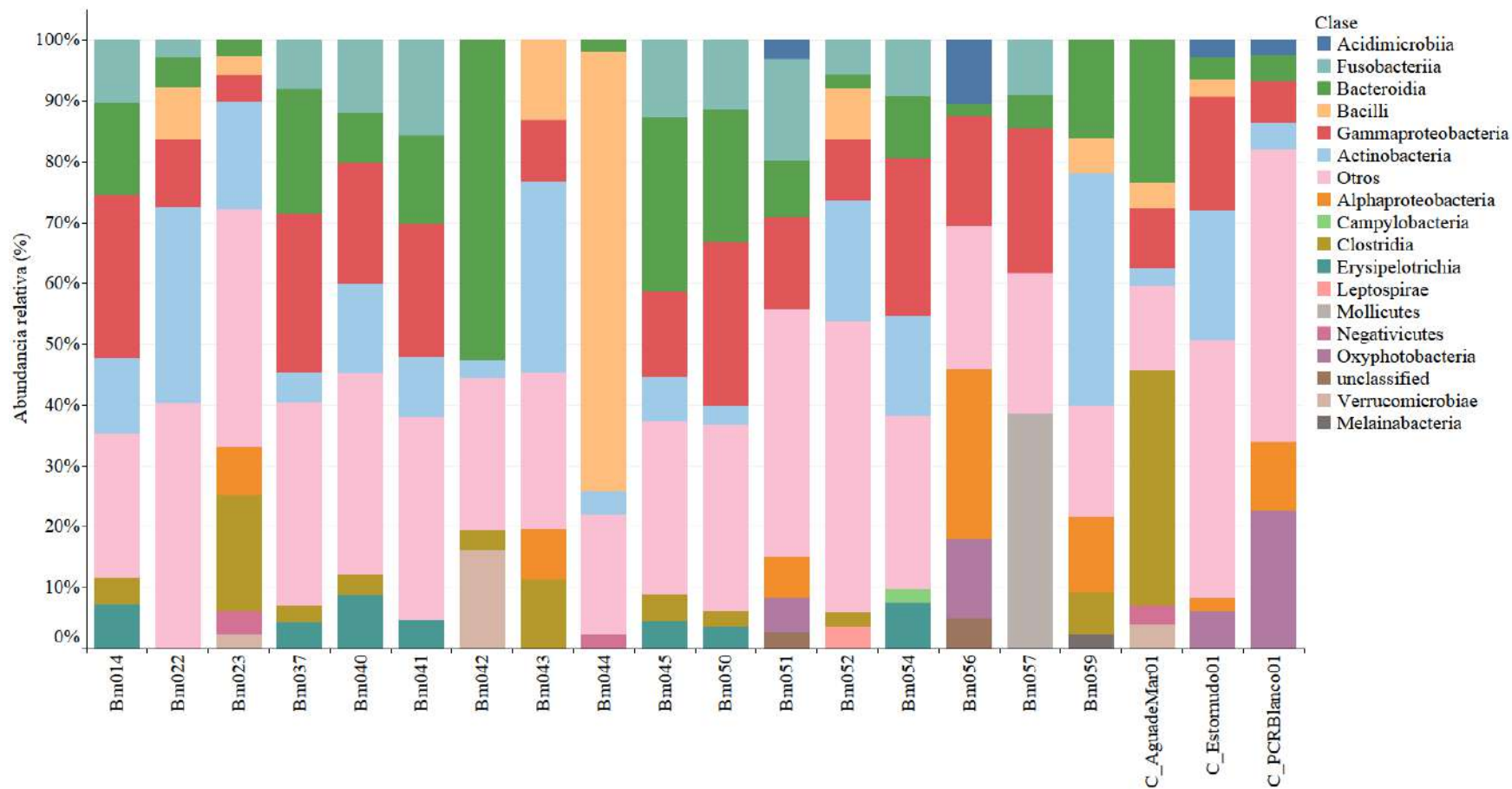
Se secuenciaron 20 muestras (17 muestras de soplo y tres controles técnicos: agua de mar, estornudo humano y blanco de PCR). En total se identificaron 379,813 secuencias (23585 secuencias únicas), que corresponden a 2732 variantes de secuencia de amplicones. Los resultados de rarefacción mostraron que la cobertura de muestreo fue mayor al 96 % en todas las muestras, indicando que el esfuerzo de muestreo de las comunidades fue bueno. Se identificaron diferencias entre animales y los controles técnicos (PERMANOVA,  $F=17.677$ ,  $p<0.001$ ). Con los análisis de las medidas de diversidad alfa (Figura V.1) se identificó una

riqueza media de 317 especies (mínimo= 135 y máximo= 638 especies) y el índice de Simpson demostró una diversidad media de 0.94 (mínimo=0.53, máximo=0.98).



**Figura V.1.** Medidas de diversidad alfa para las 20 muestras secuenciadas (17 soplos y 3 controles técnicos). A) Indica la riqueza de especies de especies y B) muestra el índice de diversidad de Simpson

Los resultados de diversidad filogenética mostraron dieciséis clases bacterianas en las 20 muestras secuenciadas (Figura V.2). Algunas de estas clases fueron compartidas entre las muestras de agua de mar y las muestras de soplo, incluyendo *Bacilli*, *Gammaproteobacteria*, *Clostridia*, *Negativicutes* y *Verrucomicrobiae*. Las muestras de soplo de ballena incluían clases bacterianas que no fueron identificadas en ninguna de las muestras control: *Acidiomicrobia*, *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Campylobacteria*, *Erysipelotrichia*, *Leptospirae*, *Mollicutes* y *Oxyphotobacteria*. Solo en un soplo de ballena (Bm057) fue identificado *Mycoplasma* spp. (34.4% de abundancia relativa).



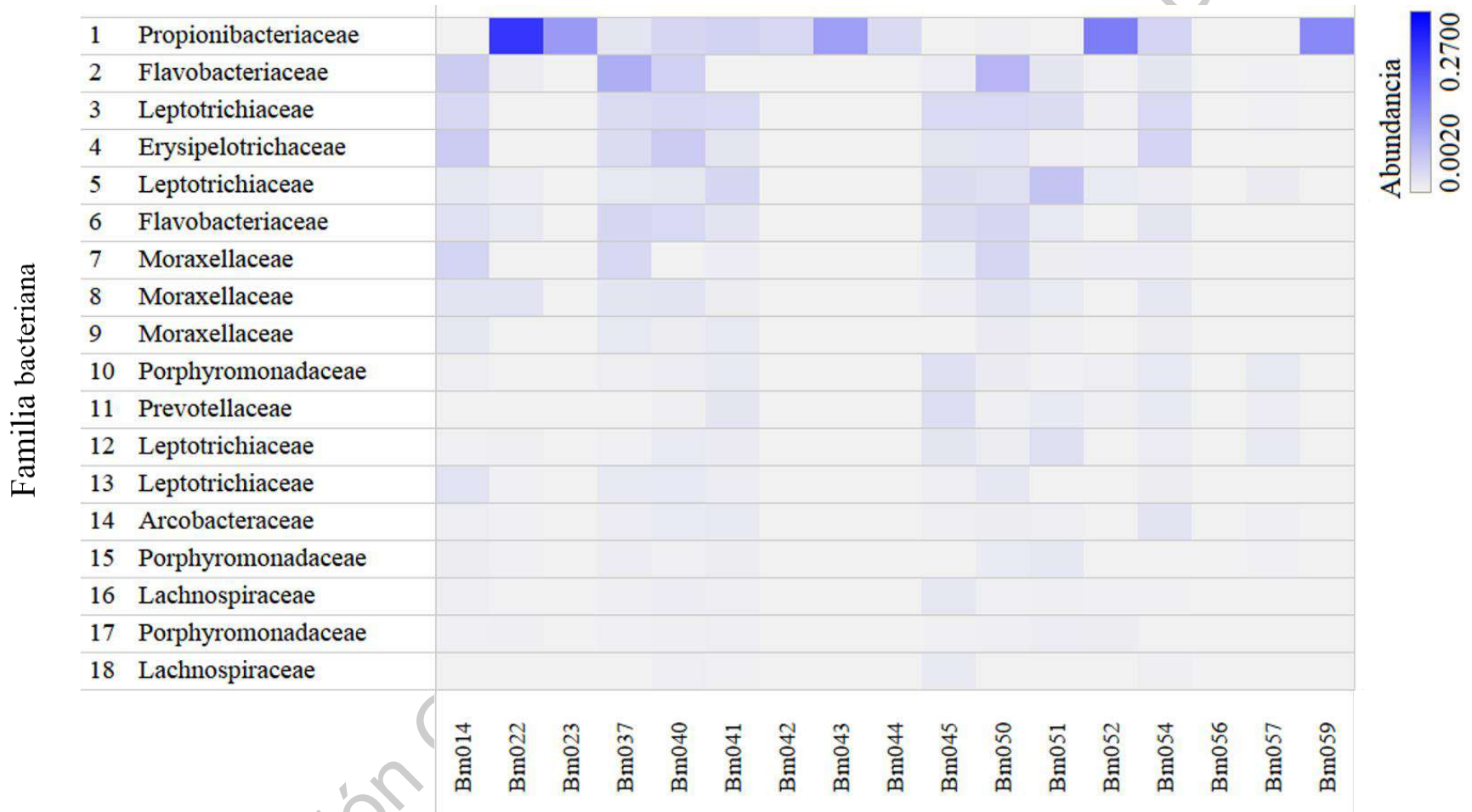
**Figura V.2.** Análisis filogenético de todas las muestras analizadas (muestras de soplo y controles técnicos). En la gráfica se observan las dieciséis clases bacterianas identificadas, clases bacterianas no clasificadas y “otros” (correspondiente a la suma de taxones bacterianos que no alcanzaron el umbral de detección de 0.02%).



Dieciocho ASVs (Tabla V.1 y Figura V.3), correspondientes a diez familias bacterianas (*Campylobacteraceae*, *Cardiobacteriaceae*, *Erysipelotrichiaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Leptotrichiaceae*, *Moraxellaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae* y *Propionibacteriaceae*) estuvieron presentes en más del 50 % de las muestras y fueron considerados como el microbioma central común en el tracto respiratorio de las ballenas azules del Golfo de California. En dos muestras control (C\_Estornudo01 y C\_PCRBlanco01), se identificó *Cutinebacterium* spp. (14.8% y 3.6% de abundancia relativa, respectivamente) perteneciente a la familia Propionibacteriaceae y que hace parte del microbioma central identificado para la ballena azul). En la muestra de agua (C\_AguadeMar01), la bacteria de género *Herbaspirillum* spp. se encontró en un 14.5% de abundancia relativa. Igualmente, esta bacteria fue identificada en tres soplos (Bm023, Bm043 y Bm059) en una abundancia relativa de 6.1%, 8.3% y 8.7%, respectivamente.

**Tabla V.1.** Clasificación taxonómica de los dieciocho ASVs que hacen parte del bacterioma central común del tracto respiratorio de la ballena azul en el Golfo de California

	Filo	Clase	Orden	Familia	Género
1	Actinobacteria	Actinobacteria	Propionibacteriales	Propionibacteriaceae	<i>Cutibacterium</i>
2	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Leptotrichiaceae	<i>Oceanivirga</i>
3	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	<i>Dielma</i>
4	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Leptotrichiaceae	<i>Oceanivirga</i>
5	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Moraxella</i>
6	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Moraxella</i>
7	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Moraxella</i>
8	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>Porphyromonas</i>
9	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	<i>Alloprevotella</i>
10	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Leptotrichiaceae	<i>unclassified</i>
11	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Leptotrichiaceae	<i>Oceanivirga</i>
12	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	<i>Arcobacter</i>
13	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>Porphyromonas</i>
14	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	<i>Natronaerovirga</i>
15	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cardiobacteriales	Cardiobacteriaceae	<i>Suttonella</i>
16	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>Porphyromonas</i>
17	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	<i>Natronaerovirga</i>
18	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Tenacibaculum</i>



**Figura V.3.** Abundancia relativa de clases bacterianas que forman el microbioma respiratorio central de la ballena azul.

#### V.4 Discusión

El número de varamientos atípicos de mamíferos marinos está en aumento, y las enfermedades respiratorias son unas de las principales causas de estos eventos (Colegrove *et al.*, 2005; Domiciano *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2009; Nelson *et al.*, 2019). Con el avance de la ciencia y las tecnología de secuenciación masivo se ha hecho más evidente que las comunidades bacterianas interactúan estrechamente con el huésped generando como resultado la supervivencia de ambos (Bosch *et al.*, 2016; Coyte *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2019; Wypych *et al.*, 2019). Estos organismos colonizan los diferentes órganos y tejidos de los animales creando comunidades específicas para cada región anatómica (Johnson *et al.*, 2009). Identificar la diversidad y abundancia relativa de las bacterias que constituyen el microbioma bacteriano en animales sanos representa un avance importante para establecer una línea base que ayude a identificar posibles taxones bacterianos asociados con enfermedades respiratorias (Lemon *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2016; Mackenzie *et al.*, 2017a; Mulero-Pázmány *et al.*, 2017) con lo cual será posible realizar predicciones de salud poblacional en las especies (Shade & Handelsman, 2012). En este capítulo fue caracterizado el microbioma respiratorio de la ballena azul, y fue identificado su microbioma bacteriano central.

Debido a las condiciones ambientales de las vías aéreas en cetáceos: cálidas, húmedas y con alta presencia de lípidos y proteínas (Coulombe *et al.*, 2018; Piscitelli *et al.*, 2013), lo convierte en un ambiente adecuado para la proliferación bacteriana (Johnson *et al.*, 2009), incluso a pesar de que las respuestas fisiológicas del tracto respiratorio (i.e. tensoactivos antimicrobianos, respuesta inmune, producción de moco, el cambio en la dirección de la vía aérea desde los senos a la faringe y los cambios abruptos de presión y oxígeno) pueden limitar el crecimiento de muchos microorganismos en los pulmones (Johnson *et al.*, 2009).. Fueron identificadas 2,732 ASVs en las 17 muestras de soplo analizadas. Estas muestras tuvieron diferentes niveles de riqueza y abundancia relativa entre las ballenas azules, lo cual puede ser un indicador de las modificaciones temporales que ocurren normalmente en el microbioma de animales sanos (Eloe-fadrosh & Rasko, 2013; The human Microbiome Project Consortium, 2012b). Las modificaciones temporales están determinadas principalmente por diversos factores como la inhalación de bacterias medioambientales durante la respiración, la eliminación de

bacterias por procesos fisiológicos (acción mucociliar y acción del sistema inmune) y ciertas características de pH, temperatura, humedad y disponibilidad de recursos al interior del sistema respiratorio (Dickson *et al.*, 2016a; Faner *et al.*, 2017; Huffnagle *et al.*, 2017; Wypych *et al.*, 2019). Es posible que estas variaciones en la composición del microbioma bacteriano también pueden deberse a la técnica de muestreo utilizada, pues es muy difícil estandarizar completamente la técnica para obtener el mismo volumen de muestra en cada vuelo del dron. Por otro lado, el volumen de aire y agua expulsado durante cada respiración es diferente en cada ballena y esto posiblemente se debe al tamaño de cada animal, la profundidad y duración del buceo previo al muestreo. Aunque se ha demostrado que el uso de drones para el muestreo de soplos no modifica el comportamiento de los animales (Domínguez-Sánchez *et al.*, 2018), existen limitaciones como la altura y la velocidad de vuelo así como la velocidad del viento y el número de soplos recolectados, pueden potencialmente generar diferencias en el volumen de muestra obtenido (Aprill *et al.*, 2017).

Existen muchos índices que sirven para determinar la diversidad de las comunidades bacterianas (Hill *et al.*, 2003; Jost, 2007; Morris *et al.*, 2014). En este estudio se decidió utilizar el índice de diversidad de Simpson para identificar la diversidad alfa ya que este índice considera la riqueza y la uniformidad de las especies (Haegeman *et al.*, 2014; Morris *et al.*, 2014) y ha sido identificado como uno de los mejores estimadores de diversidad en comunidades bacterianas desconocidas (Johnson & Burnet, 2016). En este estudio el índice de Simpson tuvo una media de 0.94 (mínimo=0.53, máximo=0.98), lo que indica una alta diversidad bacteriana en casi todas las muestras de soplo. Se ha demostrado que el microbioma de los animales sanos presenta una gran diversidad lo que les permite resistir a cambios que puedan ocurrir debido a amenazas ambientales (Chan *et al.*, 2013).

Los filos bacterianos identificados en mayor abundancia fueron *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*, que son bacterias que han sido reportadas como los principales componentes del microbioma de un tracto respiratorio sano en diversos mamíferos (Bassis *et al.*, 2015; Dickson *et al.*, 2016a; Faner *et al.*, 2017; Wypych *et al.*, 2019). La diversidad encontrada en este estudio es similar a la reportada en el soplo de ballena jorobada (Aprill *et al.*, 2017; Mulero-Pázmány *et al.*, 2017) y en delfín nariz de botella (Bik *et al.*, 2016; Johnson

*et al.*, 2009), lo que sugiere que el microbioma bacteriano respiratorio es conservado entre cetáceos y otros mamíferos.

En las muestras de ballena azul, el porcentaje de “otros” (taxones bacterianos que no alcanzan el umbral de detección de 0.02%) fue mayor al reportado en ballena jorobada (Apprill *et al.*, 2017). Esto se puede deber a que el microbioma del sistema respiratorio de la ballena azul es más complejo que el de la ballena jorobada. Otro posible motivo se debe a que este estudio se realizó la clasificación bacteriana con ASVs y no con unidades taxonómicas operacionales (OTUs) como en el estudio de ballenas jorobada. Las OTUs identifican las bacterias teniendo en cuenta un 97 % de similitud en la secuencias (Callahan *et al.*, 2017; Edgar, 2018) y aunque se usan extensamente para analizar el microbioma bacteriano (Marlène Chiarello *et al.*, 2015; Cui *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019; Nishida & Ochman, 2018; Ross *et al.*, 2019; Sanders *et al.*, 2015), recientes estudios han determinado que el uso de ASVs para la clasificación bacteriana es más detallado y eficiente (Callahan *et al.*, 2017; Forster *et al.*, 2019). Adicionalmente, el paquete *dada2* que se usó para el análisis de ASVs permite realizar el análisis de las muestras de forma independiente o agrupada. Este último método permite identificar un mayor número de bacterias que se encuentran sub-representadas en las muestras (Callahan *et al.*, 2016), lo cual puede explicar el mayor porcentaje de especies raras identificadas en este estudio comparado con el estudio en ballenas jorobadas (ver Apprill *et al.*, 2017). Las comunidades bacterianas complejas pueden ser beneficiosas para las ballenas dado que los microbiomas con mayor riqueza de especies son mucho más productivos y eficientes (Bell *et al.*, 2005). Es importante mencionar que la mayoría de estudios publicados sobre microbioma bacteriano no consideran importantes los taxones bacterianos con baja abundancia relativa; sin embargo se ha demostrado que estas bacterias tienen un papel importante en el funcionamiento de los ecosistemas (Jiao *et al.*, 2019; Willis *et al.*, 2017). Además se ha señalado que estas bacterias presentes en abundancia relativa baja son de particular relevancia en los procesos donde se altere la composición normal del microbioma, ya que son las bacterias más importantes para el restablecimiento del microbioma central normal de un ecosistema (Hausmann *et al.*, 2018; Skopina *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019).

El análisis filogenético identificó ocho filos bacterianos en las muestras de soplo y algunos de estos también fueron detectados en agua de mar. Esto sugiere que durante la exhalación se produce un acarreo de agua del mar por lo cual es posible detectar bacterias del mar en las muestras de soplo aunque en menor abundancia relativa. Sin embargo, en las muestras de soplo se identificaron clases bacterianas como *Acidimicrobia*, *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Campylobacteria*, *Erysipelotrichia*, *Leptospirae*, *Mollicutes* y *Oxyphotobacteria*, las cuales no se encontraron en las muestras control. Este hallazgo demuestra que las comunidades identificadas en las muestras de soplo fueron propias y representativas de las ballenas azules.

Poder determinar el microbioma central de una región anatómica particular en un huésped es muy importante porque la persistencia de esta microbiota en la mayoría de individuos sugiere que estos microorganismos pueden ser benéficos para la especie (Hernandez-Agreda *et al.*, 2017). Se determinó que dieciocho ASVs pertenecientes a las familias *Campylobacteraceae*, *Cardiobacteriaceae*, *Erysipelotrichiaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Leptotrichiaceae*, *Moraxellaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae* y *Propionibacteriaceae* conforman el microbioma central del sistema respiratorio de la ballena azul en el Golfo de California. La bacteria del género *Porphyromona* también ha sido identificada en la piel y en el soplo de las ballenas jorobadas (Apprill *et al.*, 2014, 2017) las cuales fueron muestreadas en el este del océano Pacífico Norte y Vancouver, las cuales son áreas que se encuentran dentro de la ruta migratoria de la ballena azul (Abrahms *et al.*, 2019). Al igual que *Porphyromona*, *Fusobacterium* ha sido descrita como parte del microbioma central respiratorio en humanos (Charlson, 2012; Charlson *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2013). Y ambas bacterias se han identificado en baja abundancia en el tracto respiratorio de ovejas (Glendinning *et al.*, 2016). *Moraxella* spp., es una bacteria que se encuentra normalmente en el sistema respiratorio de perros sanos (Tress *et al.*, 2017) y humanos (Yi *et al.*, 2014) ha sido identificada en vacas que presentan enfermedades respiratorias (Lima *et al.*, 2016) y está considerada como un patógeno oportunista en infecciones del tracto respiratorio inferior en humanos (Mora, 1998). La presencia de este microorganismo en el soplo de ballena azul, sugiere que *Moraxella* puede ser una bacteria comensal del tracto respiratorio, aunque también puede

convertirse en un patógeno oportunista y genere alguna enfermedad respiratoria (Riesbeck, 2020).

Los taxones bacterianos identificados en el sistema respiratorio de la ballena azul, en el presente estudio son similares a los reportados en diversas especies de animales domésticos y silvestres, además de que se sabe que algunas de estas bacterias son causantes de diversas patologías en varias especies de animales. En este momento no es posible decir si la población de las ballenas usadas para este estudio está sana o enferma. Sin embargo, debido a que encontramos bacterias similares en la mayoría de ballenas, podemos asumir que estos taxones forman parte del microbioma respiratorio de animales sanos.

Algunos géneros bacterianos, como *Staphylococcus*, *Propionibacterium* y *Corinebacterium*, identificados en el soplo de la ballena azul han sido reportados como taxones centrales de la piel de humanos y otros mamíferos terrestres (Byrd *et al.*, 2018; Grice & Segre, 2011; Worthing *et al.*, 2018). Recientemente han sido catalogadas como bacterias de la piel de delfines nariz de botella, *Tursiops truncatus*, orcas y ballenas jorobadas (Apprill *et al.*, 2014; Chiarello *et al.*, 2017; Hooper *et al.*, 2018). La identificación de estas bacterias en las muestras de ballena azul de este estudio, sugiere que estas bacterias colonizan el epitelio de los orificios nasales externos y son expulsadas durante la exhalación (Apprill *et al.*, 2017).

Se identificó a *Herbaspirillum* spp. como el género bacteriano más abundante en la muestra de agua de mar. Adicionalmente, fue identificada en tres muestras de soplo (Bm023, Bm043 y Bm059) pero con abundancias relativas muy baja. Resulta interesante que *Herbaspirillum* spp. es una bacteria reportada en el suelo y el agua dulce (Dobritsa *et al.*, 2010), aunque también ha sido descrita como una bacteria presente en el agua desionizada de laboratorio por lo cual ha sido identificada como un agente contaminante de la secuenciación del gen 16S rRNA (Bohus *et al.*, 2011; Grahn *et al.*, 2003; Kéki *et al.*, 2013; Mohammadi *et al.*, 2005). Con SourceTracker fue posible identificar que *Herbaspirillum* spp. no provenía de los reactivos de laboratorio. Por lo tanto, la explicación más parsimoniosa de la detección de esta bacteria en las muestras de soplo es que durante la obtención de muestra se recolectó una mayor cantidad de agua de mar que en las otras muestras.

Las bacterias identificadas en el soplo de la ballena azul han sido identificadas en la orofaringe, nasofaringe y boca de diferentes mamíferos terrestres (German & Palmer, 2006; Guglielmetti *et al.*, 2010) en los cuales estas estructuras anatómicas están interconectadas. Los cetáceos, por su parte, no presentan esta conexión anatómica pues su tracto respiratorio está completamente separado del tracto digestivo (Apprill *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2017). Lo anterior sugiere que el microbioma central que se describe aquí forma parte del sistema respiratorio de las ballenas y que no se incluye bacterias de la cavidad oral.

Se identificó *Mycoplasma* spp. en un soplo de ballena azul (Bm057) con 34.4 % de abundancia relativa. La presencia de esta bacteria puede ser indicativa de una proliferación transitoria en el sistema respiratorio o una infección activa respiratoria, ya que esta bacteria está presente en el sistema respiratorio de animales y personas sanas en abundancia relativa baja (0.02 %). En procesos patológicos activos, como neumonía y otras enfermedades respiratorias, la abundancia relativa de *Mycoplasma* suele incrementar (Dai *et al.*, 2018). De hecho esta bacteria ha sido reportada como una bacteria implicada en diversas enfermedades respiratorias en animales (Cai *et al.*, 2019; Choi *et al.*, 2019; Tao *et al.*, 2019) y en humanos (Li *et al.*, 2019; Prince *et al.*, 2018; Qu *et al.*, 2018). En mamíferos marinos, durante eventos de mortalidad inusual, se ha asociado la presencia de *Mycoplasma* con signos de enfermedades respiratorias en la marsopa de puerto (*Phocoena phocoena*), zifido de Sowerby (*Mesoplodon bidens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) (Foster *et al.*, 2011; Haulena *et al.*, 2013). Sin embargo, en cetáceos no se conoce muy bien el papel de *Mycoplasma* durante episodios de enfermedad, especificidad de huéspedes ni la dinámica de esta bacteria en poblaciones de animales de vida silvestre (Foster *et al.*, 2011). Adicionalmente, esta muestra (Bm057) tuvo menor riqueza de especies y diversidad bacteriana. Esto es interesante porque se ha reportado que la disminución en la riqueza de especies puede indicar alteraciones en el microbioma, lo cual es característico de diversas enfermedades (Hilty *et al.*, 2010; Man *et al.*, 2017). Basados en reportes de otros animales y en humanos, es posible que la ballena Bm057 haya tenido, al momento del muestreo, una infección respiratoria que involucra *Mycoplasma*. Con el diseño experimental de la presente tesis no fue posible obtener información clínica relevante que permita decir, sin ninguna duda, que la ballena está enferma, pero se propone que estudios



futuros consideren usar la presencia de *Mycoplasma* spp. en el soplo como un indicador de salud respiratoria subóptima.

## V.5 Conclusiones

Este es el primer estudio que caracteriza el microbioma del tracto respiratorio de la ballena azul. Se demostró que la población de ballenas azules del Golfo de California tiene un microbioma central entre los individuos. A pesar de ser un número relativamente bajo de muestras analizadas, el número de ballenas muestreadas corresponde al 17 % de las ballenas azules que llegan al Golfo de California durante el invierno/primavera (SEMARNAT, 2018; Ugalde de la Cruz, 2008), por lo que no es un porcentaje despreciable de la población, y es posible hacer inferencias poblacionales sobre el microbioma respiratorio.

La riqueza y abundancia relativa fue comparable con lo reportado en el microbioma de otros animales y humanos sanos. Se propone que el microbioma central común del tracto respiratorio de la ballena azul se use como una línea base para futuros estudios de largo término en los cuales se desee relacionar los cambios en la composición (diversidad y abundancia relativa) y los patrones de co-ocurrencia del microbioma respiratorio que puedan reflejar estados de enfermedad individual y poblacional.

**Anexo 2: Artículo científico derivado de este capítulo: Carlos A. Domínguez-Sánchez<sup>1</sup>, Roberto C. Álvarez-Martínez<sup>2</sup>, Diane Gendron<sup>3</sup>, Karina Acevedo-Whitehouse (2020) Core respiratory microbiome of the blue whale, *Balaenoptera musculus*. Environmental Microbiology.**

## **VI. Diferencias del microbioma bacteriano del sistema respiratorio de ballena azul (*Balaenoptera musculus*): un reflejo de su historia de vida**

*“Hasta las bacterias funcionan por consenso, o no funcionan”*

Eduard Punset

### **VI.1 Introducción**

Las bacterias forman parte de comunidades dinámicas y altamente complejas (Hauffe & Barelli, 2019), las cuales participan en ciclos biogeoquímicos en todos los ecosistemas y realizan funciones que impactan la salud de todos los organismos vivos (Widder *et al.*, 2016). Hasta el momento, nuestro entendimiento sobre la función de estas comunidades bacterianas cambiantes es limitada (Trevelline *et al.*, 2019). Se sabe que la dinámica de estas comunidades está determinada por factores intrínsecos, como las diversas interacciones entre los diferentes taxones, y extrínsecos como las condiciones ambientales (ej. temperatura, humedad y pH) y condiciones propias del hospedero (ej. procesos inmunológicos o limitación de nutrientes) (Coyte *et al.*, 2015; Dickson *et al.*, 2016a; Widder *et al.*, 2016). Estos diferentes factores pueden generar cambios temporales en la composición y función de las comunidades microbianas, así como en su estructuración espacial (Huang *et al.*, 2013), haciendo que la dinámica del microbioma sea difícil de predecir (Lima *et al.*, 2020).

Con las nuevas tecnologías de secuenciación masiva está siendo posible realizar estudios más complejos sobre los microbiomas a lo largo del tiempo, con lo cual se está comenzando a entender un poco más la dinámica de diferentes comunidades bacterianas (Gilbert *et al.*, 2016). En los animales, el microbioma bacteriano puede ser modificado por la dieta (Bokulich *et al.*, 2016; Dickson *et al.*, 2016b; Newbold & Ramos-Morales, 2020), ciclos hormonales (Vitali *et al.*, 2017; Wessels *et al.*, 2018; Williams *et al.*, 2020), actividad sexual (Levy *et al.*, 2020), estados de salud o enfermedad (Faner *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2013; Huang & Boushey, 2015; Lima *et al.*, 2016; Yamanishi & Pawankar, 2020), entre otros. Para entender

este complejo dinamismo es necesario el uso de herramientas bioinformáticas especializadas para el análisis de series de tiempo (The Human Microbiome Project Consortium, 2012a). Las cuales, debido al rápido avance de la tecnología son más accesibles para la comunidad científica (Burke & Darling, 2016; Caruso *et al.*, 2019; Thijs *et al.*, 2017).

En este capítulo se plantearon dos objetivos diferentes: 1) identificar cambios en la composición del microbioma bacteriano entre sexo (machos vs. Hembras), y edades (de jóvenes a adultos); y 2) evaluar la dinámica del microbioma bacteriano en diferentes temporadas de muestreo (2016, 2017 y 2018) y a lo largo de una misma temporada (2018) pero en diferentes momentos del día (mañana, medio día y tarde). Adicionalmente se realizó el un análisis de un individuo muestreado durante las tres temporadas en diversas horas del día con el objetivo de identificar la variabilidad del microbioma bacteriano a nivel individual.

## **VI.2 Métodos**

### **VI.2.1. Trabajo de campo**

La recolección de las muestras y el procesamiento de estas se describieron en los capítulos III, IV y V de la presente tesis.

### **VI.2.2. Estimación de la edad de las ballenas**

La edad en estos animales es difícil de determinar y solo se pueden realizar estimaciones basadas en el primer año de avistamiento y en la etapa de vida (cria, juvenil, adulto), la cual también se determina de manera subjetiva por lo cual no es precisa (Diane Gendron, comunicación personal). El cálculo de la edad de cada individuo se realizó con la información existente en los registros de avistamientos de los últimos 30 años. En este estudio se calcularon dos edades; la real y la aproximada. La edad real se pudo calcular ya que los animales fueron foto-identificados como crías y acompañadas de sus madres; por lo cual la edad correspondería al tiempo transcurrido desde el primer año de avistamiento a la fecha. La edad aproximada se calculó teniendo en cuenta el año del primer avistamiento, su tamaño corporal y, en el caso de las hembras, el primer avistamiento con cría.

### **VI.2.3. Trabajo de laboratorio**

La extracción de DNA de las muestras de soplo y la amplificación de las regiones variables V3-V4 del gen 16S rRNA se realizó de la misma manera que la explicada en el capítulo V, de la presente tesis.

#### **VI.2.3.1 Procesamiento de las secuencias del gen 16S rRNA**

El control de calidad de secuencias crudas se realizó con FastQC v.0.11.5 (Afgan *et al.*, 2018). Se eliminaron de los archivos FASTQ las secuencias cortas (menos de 20 pares de bases), las lecturas de baja calidad (el umbral de calidad "Q" para filtrar secuencias fue Q = 25)

los adaptadores Illumina y los *primers* de PCR con Trimomatic v. 0.36.6. Esto se hizo ya que las lecturas cortas, de baja calidad o contaminadas pueden generar resultados falsos positivos durante el análisis bioinformático (Bolger *et al.*, 2014). Una vez filtradas y recortadas, las secuencias se analizaron en R v.3.5.2 (R Core Team, 2018) utilizando varios paquetes. Las comunidades microbianas se analizaron utilizando teniendo como base el *pipeline* para DADA2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2; dada2 v.1.9.1), que caracteriza las comunidades bacterianas usando variantes únicas en la secuencia de los amplicones (ASV) (Callahan *et al.*, 2017) para construir la tabla de ASV. Después identificar las ASV y eliminar las quimeras (usando autorreferencia), se asignó la taxonomía utilizando un método clasificador bayesiano y la base de datos de secuencias de ARN SILVA v.132 como referencia de taxones bacterianos (Quast *et al.*, 2013). Finalmente, se identificaron y eliminaron las secuencias pertenecientes a arqueas, cloroplastos, eucariotas, dominios desconocidos y mitocondrias utilizando *phyloseq* v.1.25.0 (McMurdie & Holmes, 2013).

#### VI.2.3.2 Visualización de datos y análisis estadísticos

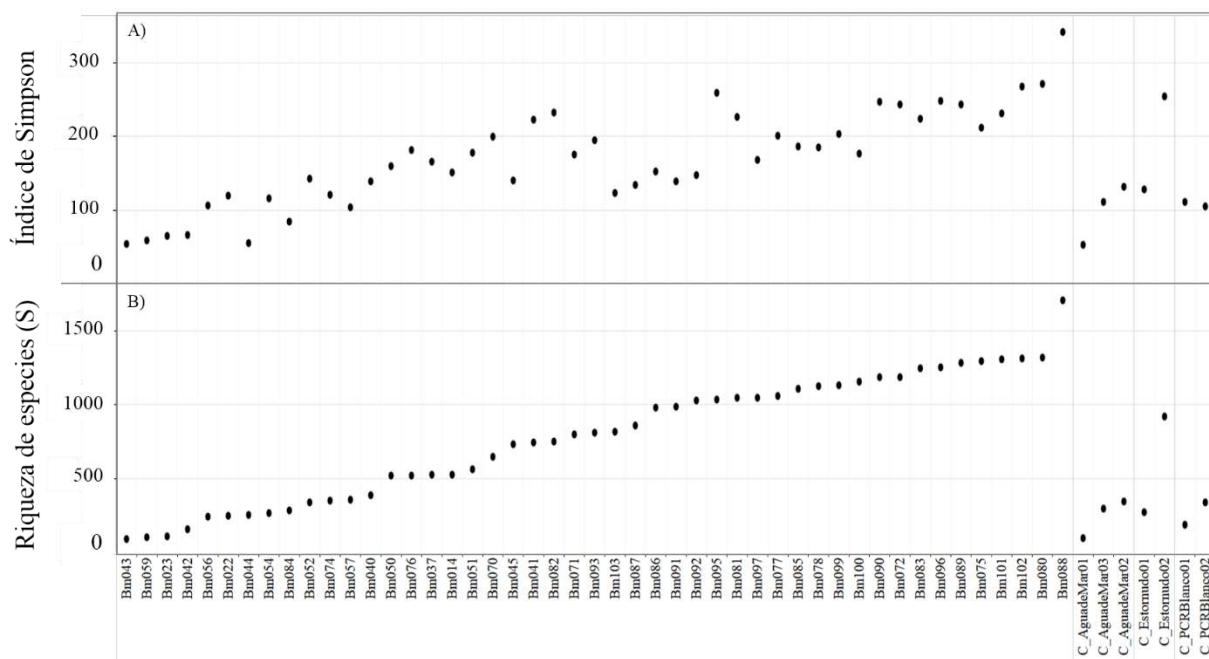
Los taxones bacterianos de baja abundancia (menos de 0.02% de abundancia relativa) conocidos como "biosfera rara" (Zhang *et al.*, 2019) se agruparon bajo el nombre de "otros" en cada una de las muestras. El paquete *phyloseq* también se usó para identificar la distribución de las lecturas en todas las muestras, identificar la cobertura de muestreo, graficar las curvas de rarefacción y la abundancia relativa por phylum con el objetivo de tener una idea general de la composición de la comunidad bacteriana en las muestras de soplo. Se utilizaron varios estimadores de diversidad alfa: riqueza (S), índice de diversidad de Simpson (D) e índice de diversidad de Shannon (H) con *vegan* v.2.5.4 (Oksanen *et al.*, 2019) y se realizó el test de normalidad (Shapiro-Wilk) para comprobar los valores de normalidad estadísticamente. Para identificar diferencias en los índices de diversidad alfa entre soplos y controles, y entre sexos, se realizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para calcular las diferencias entre las estaciones (2016, 2017 y 2018), y la hora (AM, M y PM). También se utilizó *vegan* para construir matrices de distancia basados en la abundancia de especies usando Unweight-UniFrac y teniendo en cuenta presencia/ausencia de especies con el índice de Jaccard. Posteriormente se realizó un análisis de varianza permutacional

(PERMANOVA) para investigar diferencias en la diversidad beta entre la composición de microbiomas y la riqueza de diferentes tipos de muestras (soplos de ballena azul y controles técnicos), sexo (hembra y macho), temporada de muestreo (2016, 2017 y 2018) y hora del día (AM, M y PM). Usando el microbioma v.1.3.1 (Lahti *et al.*, 2017) identificamos el microbioma central (umbral de detección = 0.2/100, prevalencia = 50/100). Para calcular el porcentaje de la comunidad bacteriana en las muestras de soplo de ballena azul que proviene de las muestras de control técnico, lo que podría indicar cierta contaminación durante el procesamiento de la muestra, se utilizó SourceTracker (Knights *et al.*, 2013). Se utilizó el Algoritmo de Girvan-Newman para generar redes de orden jerárquico con el objetivo de identificar el número de comunidades en las que se debe dividir una red (Newman, 2004). Además, es un algoritmo altamente efectivo para comprender la estructura de la comunidad (Newman & Girvan, 2004). Las gráficas fueron realizados con Tableau v.2020.3 (Murphy, 2013)

### **VI.3 Resultados**

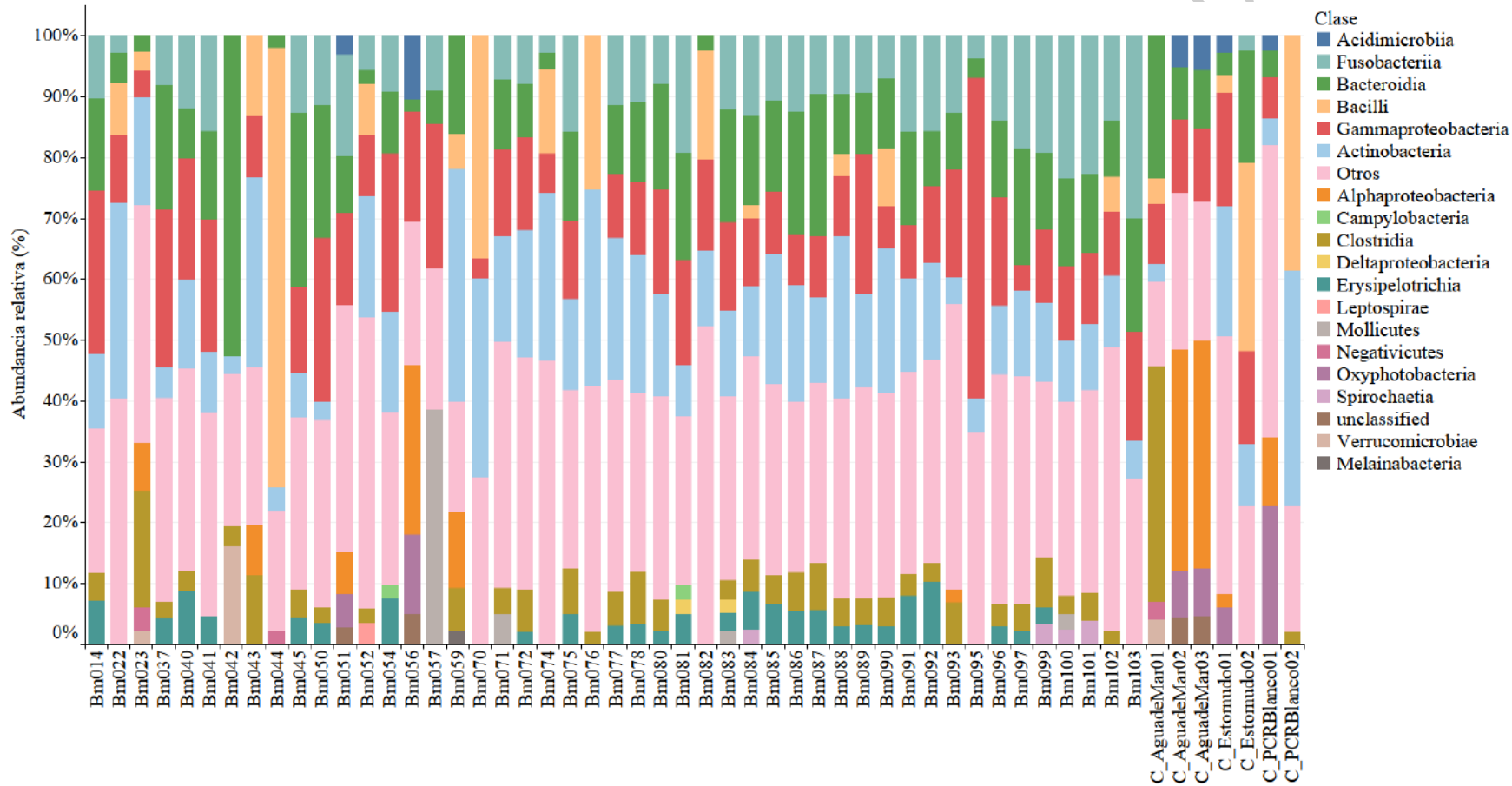
#### **VI.3.1. Análisis general de lecturas de secuenciación V3-V4**

Se procesaron 47 muestras de soplo (pertenecientes a 21 ballenas) y siete controles técnicos (tres muestras de agua de mar, dos muestras de estornudos humanos y dos blancos de PCR) mediante secuenciación masiva (miSeq-Illumina) de las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16S rRNA. Se obtuvieron un total de 5'105,131 lecturas directas (la profundidad media de secuenciación por muestra fue de 96,481.58 lecturas). Las lecturas en reversa tuvieron mala calidad debido a errores de secuenciación y se eliminaron del análisis. Después del proceso de filtrar se eliminaron el 11,3% de las lecturas (576,879 lecturas) y se conservaron 4'528,252 lecturas. Se identificaron 3741 ASV en todas las muestras (soplos y controles técnicos). Las medidas de diversidad alfa (Figura VI.1) revelaron una riqueza (S) media de 710 especies (máximo = 1710 y mínimo = 85) y el índice de Simpson demostró una diversidad media de 0.96 (máximo = 0.99 y mínimo = 0.48).



**Figura VI.1.** Medidas de diversidad alfa para las 54 muestras secuenciadas (47 soplos y 7 controles técnicos). A) Índice de diversidad de Simpson y B) Riqueza de especies.

En el análisis filogenético se identificaron 17 clases bacterianas (*Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia*, *Negativicutes*, *Bacteroidia*, *Fusobacteriia*, *Mollicutes*, *Melainabacteria*, *Oxyphotobacteria*, *Leptospirae*, *Spirochaetia*, *Campylobacteria* y *Verrucomicrobiae*; Figura VI.2) pertenecientes a 11 filos bacterianos (Tabla VI.1), presentando mayor abundancia relativa, los filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Fusobacteria* (este último solo identificado en soplos y muestras de estornudo humano).



**Figura VI.2.** Análisis filogenético de todas las muestras analizadas (muestras de soplo y controles técnicos). En la gráfica se observan las diecisiete clases bacterianas identificadas, clases bacterianas no clasificadas y “otros” (correspondiente a la suma de taxones bacterianos que no alcanzaron el umbral de detección de 0.02%).



**Tabla VI.1.** Abundancias relativas por filo y clase identificadas en las muestras de soplo y en los diferentes controles técnicos

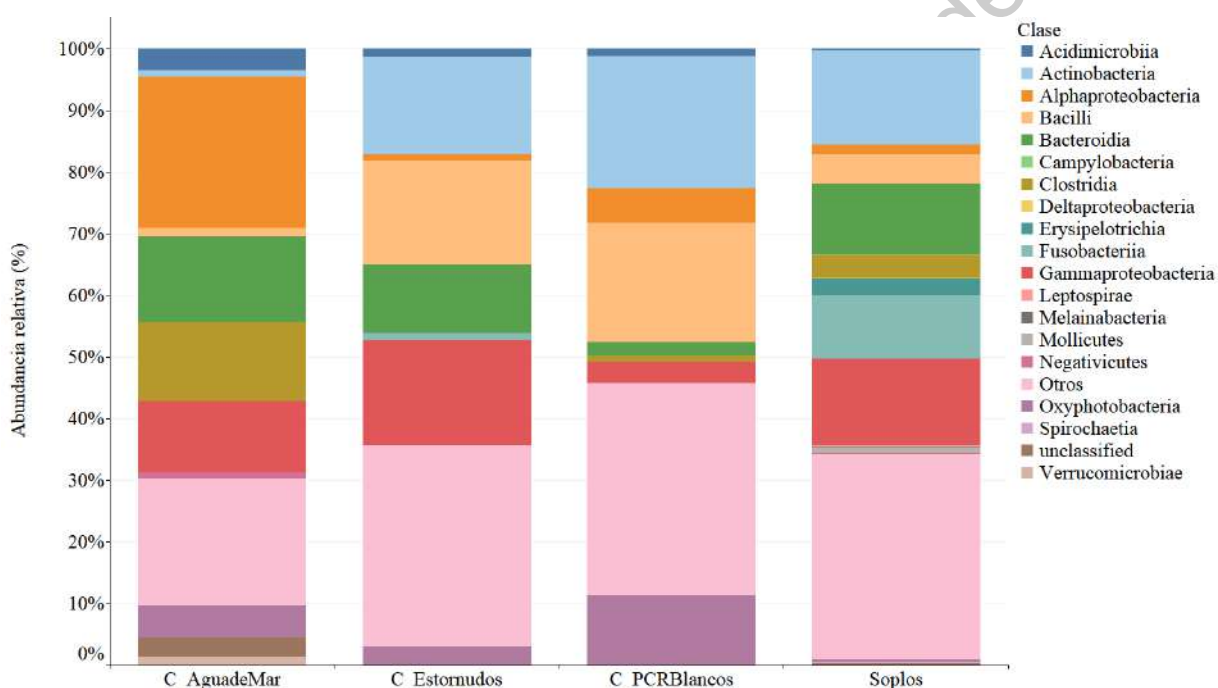
Filo	Clase	Soplo	Estornudo humano	Blanco PCR	Agua de mar
Otros*	Otros*	33.37%	32.52%	34.38%	20.77%
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	1.43%	1.10%	5.63%	24.57%
	Deltaproteobacteria	0.10%			
	Gammaproteobacteria	14.14%	17.00%	3.44%	11.40%
Actinobacteria	Acidimicrobiia	0.29%	1.38%	1.23%	3.59%
	Actinobacteria	15.33%	15.73%	21.50%	0.96%
Firmicutes	Bacilli	4.91%	16.93%	19.31%	1.36%
	Clostridia	3.87%		1.03%	12.90%
	Erysipelotrichia	2.66%			
	Negativicutes	0.13%			0.99%
Bacteroidetes	Bacteroidia	11.37%	11.02%	2.15%	13.91%
Fusobacteria	Fusobacteriia	10.25%	1.26%		
Tenericutes	Mollicutes	1.05%			
Cyanobacteria	Melainabacteria	0.05%			
	Oxyphotobacteria	0.40%	3.06%	11.32%	5.20%
Spirochaetes	Leptospirae	0.08%			
	Spirochaetia	0.26%			
Marinimicrobia (SAR406_clade)	unclassified	0.17%			2.99%
Epsilonbacteraeota	Campylobacteria	0.10%			
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	0.05%			1.35%

\*Conjunto de bacterias que no alcanzan el umbral de detección de 0,02%

### VI.3.2. Muestras de soplo vs. Controles técnicos

Las muestras de soplo revelaron mayor riqueza de ASV (media = 780.61 especies) comparada con las muestras control (media = 316.12 especies) y fueron diferentes en entre ellos (Wilcoxon rank,  $p = 0.0052$ ), a su vez las muestras de soplo fueron más diversas (media del índice de Simpson = 0.97 y media del índice de Shannon = 5.20) comparado con los controles (media del índice de Simpson = 0.95 y media del índice de Shannon = 4.25) y fueron estadísticamente diferentes entre ellos (Wilcoxon rank, índice de Simpson,  $p = 0.0022$ ; índice

de Shannon,  $p = 0.0018$ ). Los análisis de diversidad beta demostraron diferencias entre soplos y controles técnicos tanto en riqueza de especies (PERMANOVA,  $F = 3.68$ ,  $p = 0.001$ ) como en abundancia relativa (PERMANOVA,  $F = 5.45$ ,  $p = 0.001$ ). El análisis filogenético (Figura VI.3) reveló 19 clases bacterianas en todas las muestras de las cuales siete son únicas en los soplos de ballena azul (*Campylobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Erysipelotrichia*, *Leptospirae*, *Melainabacteria*, *Mollicutes* y *Spirochaetia*) y dos son únicas en agua de mar (*Negativicutes* y *Verrucomicrobiae*).



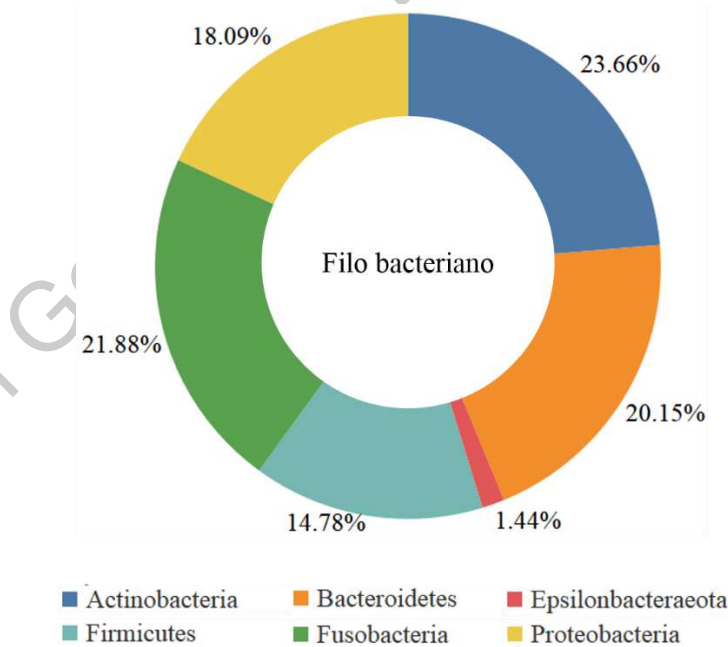
**Figura VI.3.** Análisis filogenético del soplo (muestras de soplo agrupadas) y los diferentes controles técnicos. En la gráfica se observan las diecisiete clases bacterianas identificadas, clases bacterianas no clasificadas y “otros” (correspondiente a la suma de taxones bacterianos que no alcanzaron el umbral de detección de 0.02%).

Los soplos de las ballenas y cada uno de los controles tuvieron diferentes clases bacterianas dominantes siendo estas para los soplos, *Actinobacteria* (abundancia relativa de 15.33%); en los estornudos humanos, *Gammaproteobacteria* (abundancia relativa de 17.00%); en el de agua de mar, *Alphaproteobacteria* (abundancia relativa de 24.57%) y en los blancos de

PCR, *Actinobacteria* (abundancia relativa de 21.50%). El agua de mar y los soplos fueron las únicas muestras en las cuales hubo bacterias a las cuales no se les pudo hacer la asignación taxonómica correspondiente a partir de la clase taxonómica.

### VI.3.3. Análisis del microbioma central común

Se identificaron 36 ASVs correspondientes a seis filos bacterianos (Figura VI.4) en los cuales se incluyen 17 familias bacterianas (*Arcobacteriaceae*, *Burkholderiaceae*, *Bacillales Family\_XI*, *Cardiobacteriaceae*, *Clostridiales Family\_XII*, *Corynebacteriaceae*, *Erysipelotrichiaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Leptotrichiaceae*, *Marinifilaceae*, *Microbacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Propionibacteriaceae* y *Ruminococcaceae*; Figura VI.5 y Tabla VI.2) los cuales estuvieron presentes en más del 50% de las muestras. En estos 36 ASVs, también se identificaron los 17 ASVs reportados en el capítulo V del presente trabajo.



**Figura VI.4.** Porcentaje de filos bacterianos que conforman el bacterioma central común del tracto respiratorio de la ballena azul en el Golfo de California.

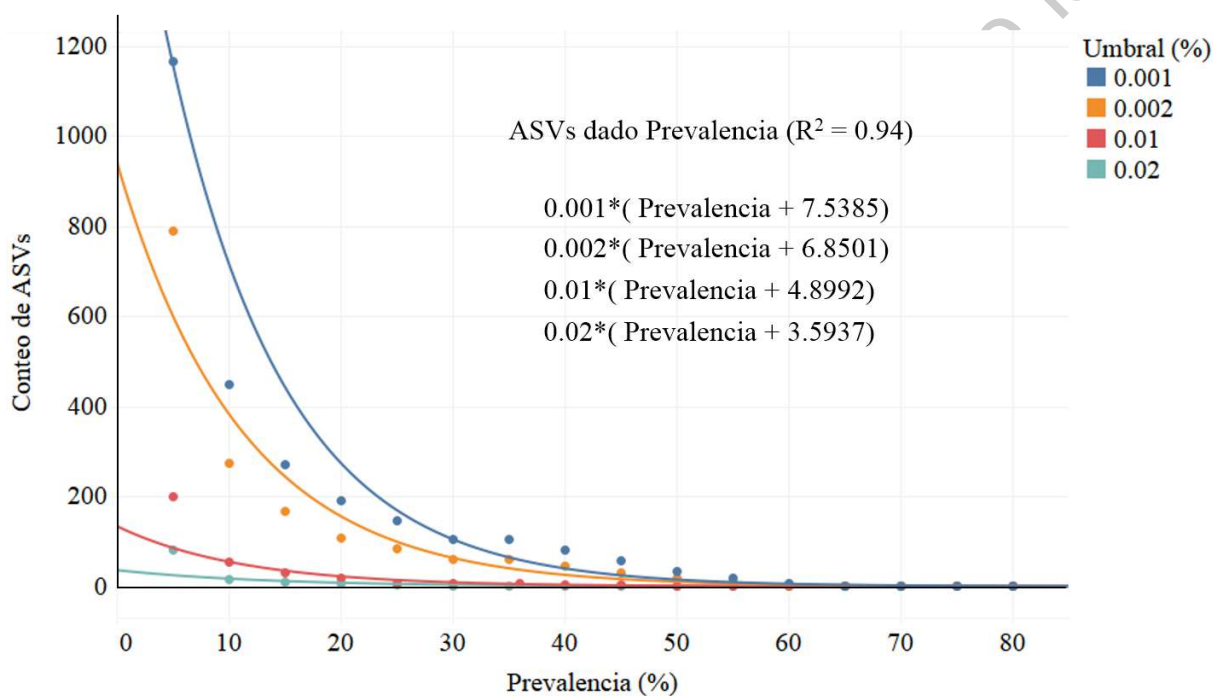


**Tabla VI.2.** Clasificación taxonómica de los 36 ASVs que hacen parte del bacterioma central común del tracto respiratorio de la ballena azul en el Golfo de California

	<b>Filo</b>	<b>Clase</b>	<b>Order</b>	<b>Familia</b>	<b>Género</b>
1*	Actinobacteria	Actinobacteria	Propionibacteriales	Propionibacteriaceae	<i>Cutibacterium</i>
2*	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Leptotrichiaceae	<i>Oceanivirga</i>
3*	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Leptotrichiaceae	<i>unclassified</i>
4*	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Psychrobacter</i>
5*	Bacteroidetes	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>unclassified</i>
6*	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	<i>unclassified</i>
7*	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>Porphyromonas</i>
8*	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Psychrobacter</i>
9	Bacteroidetes	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>unclassified</i>
10	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	<i>unclassified</i>
11	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium_1</i>
12*	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	<i>Alloprevotella</i>
13*	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	<i>Natranaerovirga</i>
14*	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	unclassified	<i>unclassified</i>
15*	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	<i>unclassified</i>
16	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	<i>unclassified</i>
17	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium_1</i>
18*	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Leptotrichiaceae	<i>Oceanivirga</i>
19*	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	<i>unclassified</i>
20	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Family_XII	<i>Fusibacter</i>
21*	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Leptotrichiaceae	<i>Oceanivirga</i>
22	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>
23*	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	unclassified	<i>unclassified</i>
24	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Leptotrichiaceae	<i>unclassified</i>
25	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cardiobacteriales	Cardiobacteriaceae	<i>Suttonella</i>
26*	Epsilonbacteraeota	Campylobacteria	Campylobacterales	Arcobacteraceae	<i>Arcobacter</i>
27	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cardiobacteriales	Cardiobacteriaceae	<i>Suttonella</i>
28	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cardiobacteriales	Cardiobacteriaceae	<i>unclassified</i>
29	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>unclassified</i>
30	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Psychrobacter</i>
31	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Family_XI	<i>Helcococcus</i>
32	Bacteroidetes	Bacteroidia	Flavobacteriales	unclassified	<i>unclassified</i>
33	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae</i>
34	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	<i>unclassified</i>
35	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Marinifilaceae	<i>unclassified</i>
36	Bacteroidetes	Bacteroidia	unclassified	unclassified	<i>unclassified</i>

\* Taxones bacterianos identificados y reportados en el capítulo V, de la presente tesis.

Se realizaron análisis de la tendencia del microbioma central (Figura VI.6) basado en la prevalencia (del 5% al 100%) y cuatro valores de umbral de detección (0.001, 0.002, 0.01 y 0.02). Con los datos obtenidos fue posible calcular un modelo de tendencia lineal (ASVs dado prevalencia). Se encontró que el microbioma central puede variar desde 1166 ASVs (prevalencia = 5%, umbral de detección = 0.001) hasta 1 ASV (prevalencia = 80%, umbral de detección = 0.02), siendo *Propionebacterium* spp., la bacteria con mayor prevaencia en los soplos analizados.

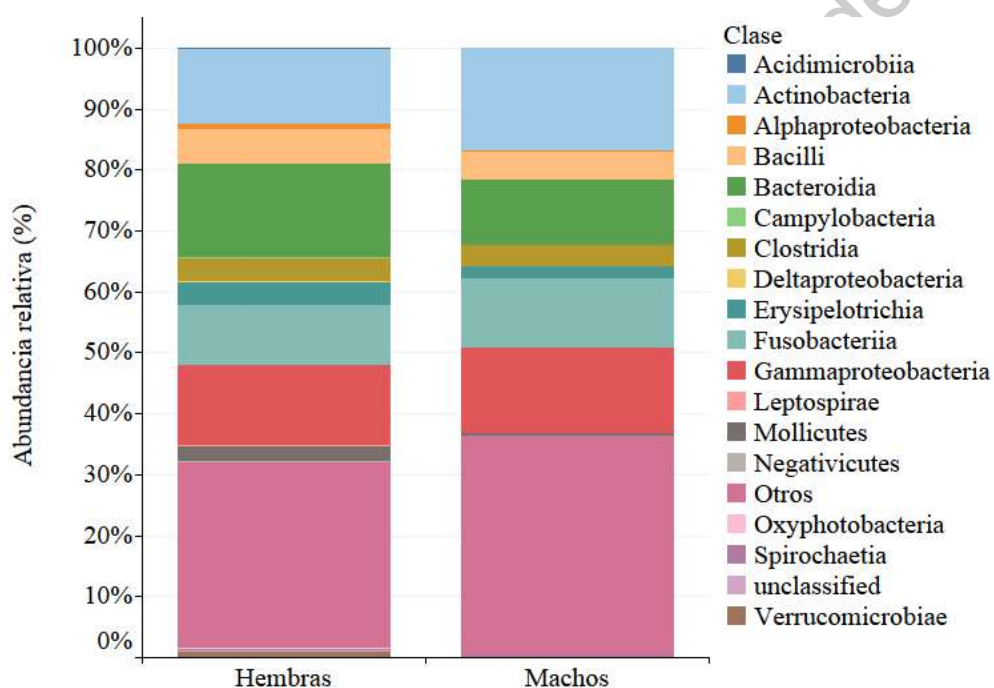


**Figura VI.6.** Modelo exponencial de la tendencia del microbioma central del sistema respiratorio de la ballena azul en el Golfo de California. Se calculó usando cuatro valores de umbral de detección con una prevalencia de 5% a 100%.

#### VI.3.4. Análisis basado en sexo: hembras vs. machos

Se analizaron 47 soplos (17 de hembras, 23 de machos y 7 desconocidos, i.e. ballenas a las cuales no se les ha determinado el sexo) los cuales pertenecen a un total de 8 hembras, 5 machos y 4 desconocidas (ballenas a las cuales no se les ha determinado el sexo). Durante este apartado solo se analizaron los soplos de ballenas cuyo sexo fue conocido. Se identificaron 3,741

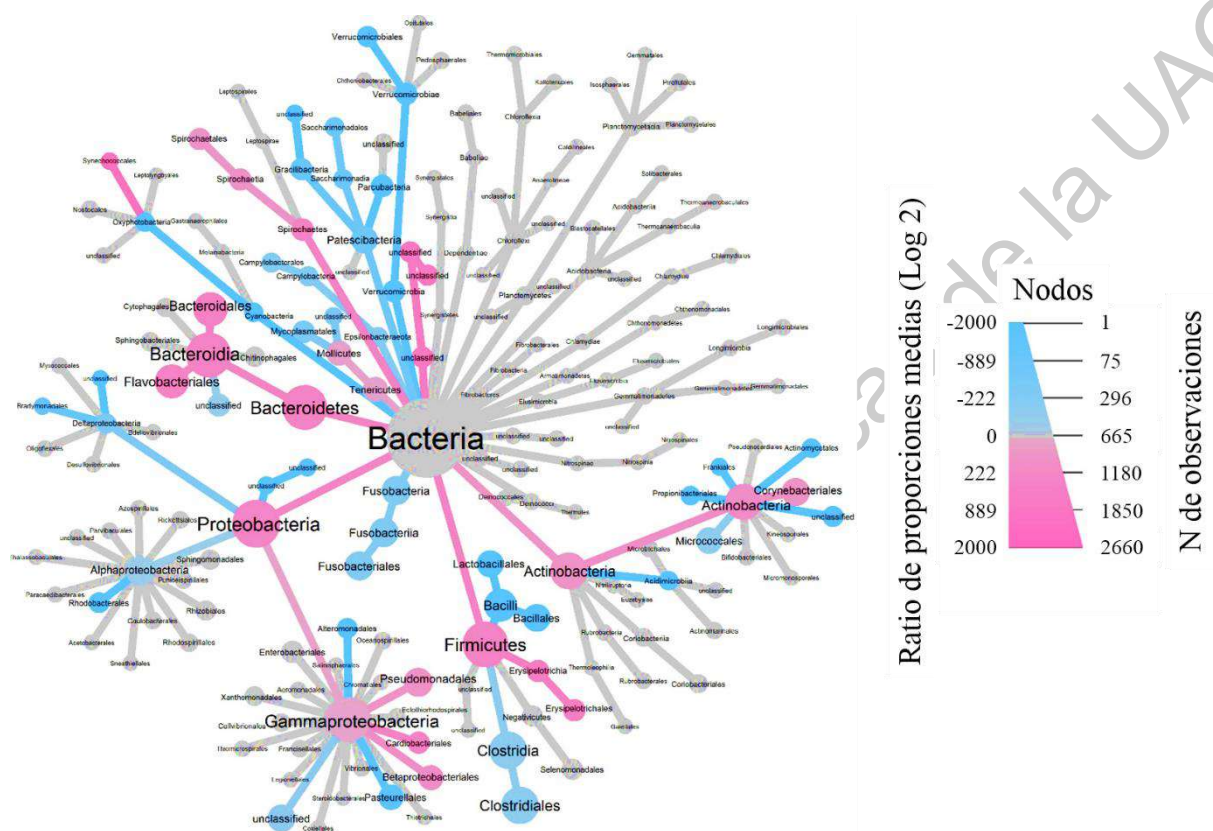
ASVs pertenecientes a 17 clases bacterianas (*Acidimicrobia*, *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacilli*, *Bacteroidia*, *Campylobacteria*, *Clostridia*, *Deltaproteobacteria*, *Erysipelotrichia*, *Fusobacteriia*, *Gammaproteobacteria*, *Leptospirae*, *Mollicutes*, *Negativicutes*, *Oxyphotobacteria*, *Spirochaetia* y *Verrucomicrobiae*; Figura VI.7). Las muestras de los machos revelaron mayor riqueza de ASV (media = 1005.52 especies) comparada con las muestras de hembra (media = 694.64 especies) y fueron diferentes entre ellos (Wilcoxon rank,  $p = 0.017$ ).



**Figura VI.7.** Análisis filogenético de los soplos de hembras y machos. En la gráfica se observan las diecisiete clases bacterianas identificadas, clases bacterianas no clasificadas y “otros” (correspondiente a la suma de taxones bacterianos que no alcanzaron el umbral de detección de 0.02%).

No se encontraron diferencias significativas entre hembras y machos con respecto al índice de Simpson (Wilcoxon rank,  $p = 0.59$ ). Con los análisis de diversidad beta entre los soplos de hembras y machos, no se identificaron diferencias ni en riqueza de especies (PERMANOVA,  $p = 0.059$ ) ni en abundancia relativa (PERMANOVA,  $p = 0.364$ ). Sin embargo, al realizar un análisis más detallado y comparando diferentes niveles taxonómicos, se pudieron

identificar seis clases bacterianas únicas en los soplos de hembras (Figura VI.8, *Acidimicrobia*, *Campylobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Leptospirae*, y *Oxyphotobacteria*).



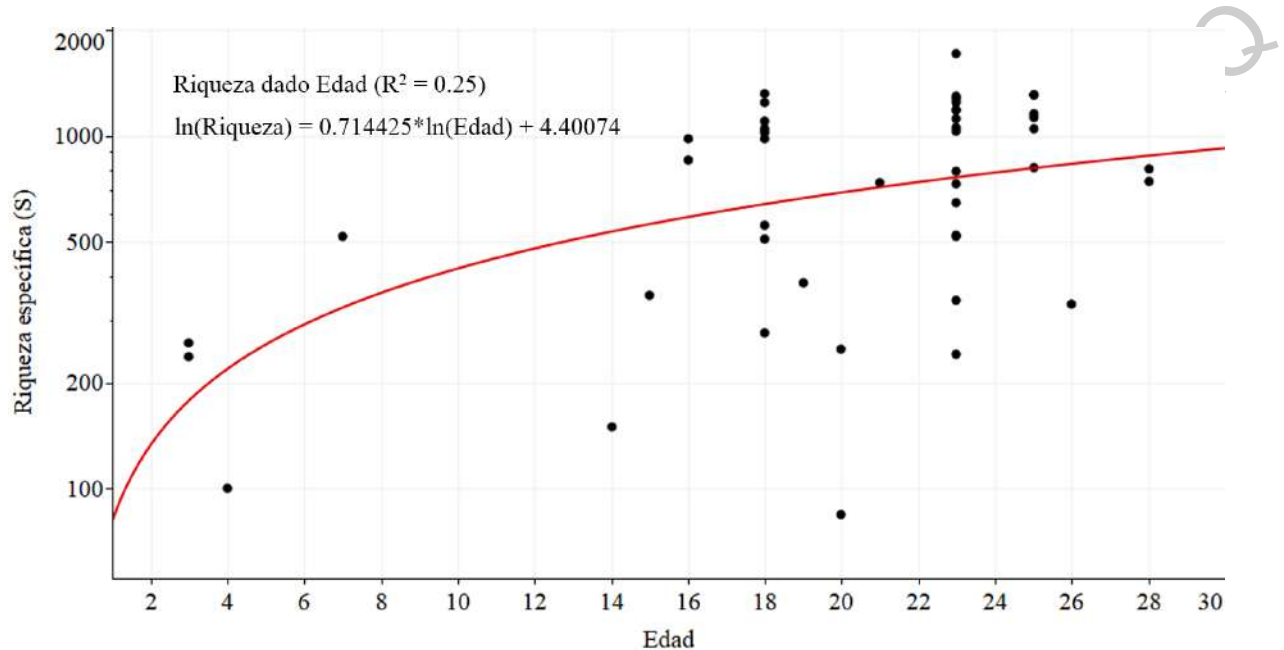
**Figura VI.8.** El heat-tree muestra la variación en los filotipos significativamente diferentes en abundancia relativa, en las muestras de soplo entre hembras y machos de ballena azul. Los tamaños de los nodos corresponden al número de ASVs observados dentro de un filotipo dado. Los colores representan la diferencia de pliegue logarítmico de la abundancia relativa media de un filotipo dado en las hembras en comparación con los machos. Específicamente, el azul representa una mayor abundancia relativa de ASV en machos y el rosa representa una mayor abundancia relativa de ASVs en hembras.

### VI.3.5. Análisis basado en la edad

Se analizaron 47 soplos de 18 ballenas cuyas edades varían desde 3 hasta 29 años de edad. De estas ballenas se conocía la edad exacta de siete ballenas (basados en que el primer avistamiento fue siendo neonato) y a las 11 restantes se les calculó la edad aproximada (ver metodología).. La distribución de los datos obtenidos se ajustó a un modelo logarítmico (Figura



VI.9) y se determinó que la riqueza de especies era mayor conforme aumentaba la edad (riqueza=81.5111\*edad<sup>0.714425</sup>; R<sup>2</sup>=0.25, p=0.0003).



**Figura VI.9.** Modelo logarítmico. Se observa la riqueza de especies en función de la edad de los individuos muestreados. Los colores representan individuos diferentes de ballena azul.

### VI.3.6. Análisis de la dinámica del microbioma bacteriano en diferentes temporadas de muestreo

Se procesaron 47 muestras de soplo recolectados durante tres temporadas de muestreo (Figura VI.10): 2016 (n= 4), 2017 (n= 13) y 2018 (n= 30). Se identificaron 3741 ASV en todos los soplos, pertenecientes a dieciocho clases bacterianas (*Acidimicrobia*, *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacilli*, *Bacteroidia*, *Campylobacteria*, *Clostridia*, *Deltaproteobacteria*, *Erysipelotrichia*, *Fusobacteriia*, *Gammaproteobacteria*, *Leptospirae*, *Melainabacteria*, *Mollicutes*, *Negativicutes*, *Oxyphotobacteria*, *Spirochaetia* y *Verrucomicrobiae*). Hubo bacterias detectadas solo en una temporada y en otras no: *Verrucomicrobiae* solo se detectó en los soplos del año 2016; *Acidimicrobia*, *Leptospirae*, *Malainabacteria* y *Oxyphotobacteria* solo

se identificaron en los soplos del año 2017; *Campilobacteria*, *Deltaproteobacteria* y *Spirochaetia* solo se detectaron en los soplos del 2018.

Las medidas de diversidad alfa revelaron una riqueza (S) media de 710 especies (máximo = 1710 y mínimo = 85) y el índice de Simpson demostró una diversidad media de 0.96 (máximo = 0.99 y mínimo = 0.48). Los análisis de diversidad beta demostraron diferencias entre los soplos de las tres temporadas de muestreo, tanto en riqueza de especies (PERMANOVA,  $F= 2.91$ ,  $p = 0.001$ ) como en abundancia relativa (PERMANOVA,  $F= 3.76$ ,  $p = 0.001$ ).

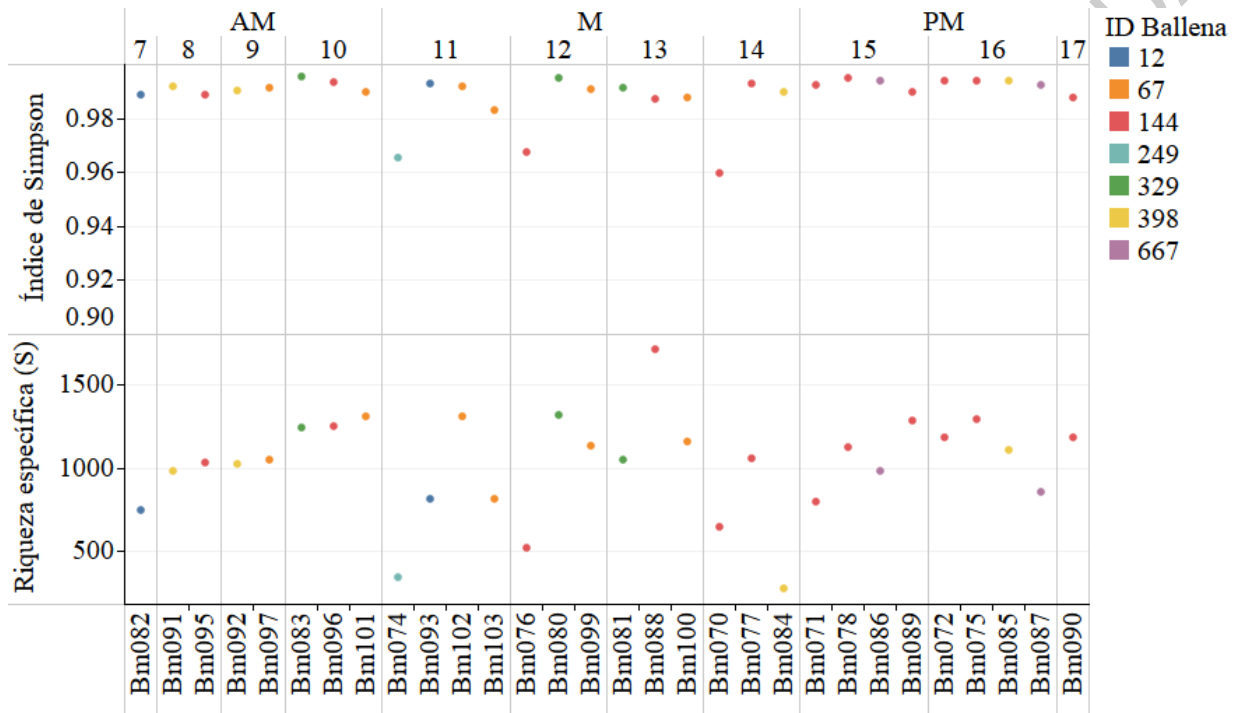


**Figura VI.10.** Análisis filogenético de los soplos en las tres temporadas de muestreo (2016, 2017 y 2018). En la gráfica se observan las dieciocho clases bacterianas identificadas, clases bacterianas no clasificadas y “otros” (correspondiente a la suma de taxones bacterianos que no alcanzaron el umbral de detección de 0.02%).

### VI.3.7. Análisis de la dinámica del microbioma bacteriano en la misma temporada de muestreo

En este análisis solo se tuvieron en cuenta los soplos del 2018, pues en estos soplos se conoce la fecha y la hora exacta de la recolección. Se analizaron 30 soplos pertenecientes a siete

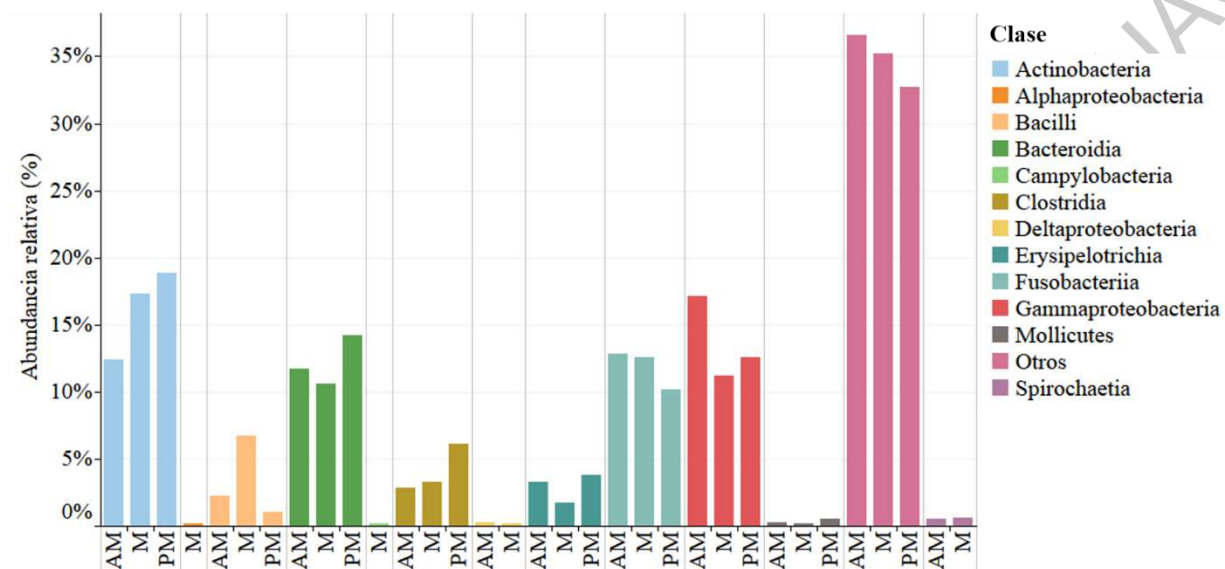
diferentes individuos. Estos soplos fueron obtenidos de 7 a 17 horas (Figura VI.11). El objetivo fue determinar si el microbioma del sistema respiratorio de la ballena azul era dinámico y como se modificaba a lo largo del día y de la temporada de muestreo. Se determinó la riqueza de especies (min = 277, máx = 1710) y el índice de Simpson (min = 0.96, máx = 0.99).



**Figura VI.11.** Índice de Simpson y riqueza de especies, en función del tiempo y la hora de muestreo (superior) de cada soplo (inferior). En color se muestran las diferentes ballenas muestreadas (ID Ballena).

Para intentar entender mejor la dinámica del microbioma se agruparon los datos en horarios de muestreo (denominados en este estudio: tiempos): mañana, AM (7, 8, 9 y 10), mediodía, M (11, 12, 13 y 14) y tarde, PM (15, 16 y 17). Se identificaron 12 clases bacterianas (Figura 22), de las cuales *alphaproteobacteria* y *Campilobacteria* solo estuvieron presentes en los soplos recolectados en el tiempo M; y *Deltaproteobacteria* y *Spirochaetia* no estuvieron presentes en los soplos PM. Los análisis de diversidad alfa no identificaron diferencias en la riqueza de especies entre los soplos obtenidos en AM vs. M (Wilcoxon rank,  $p = 0.541$ ), pero si entre M vs. PM (Wilcoxon rank,  $p = 0.006$ ) y entre AM vs. PM (Wilcoxon rank,  $p = 0.018$ ). Los

análisis de diversidad beta no mostraron diferencias en la abundancia relativa (PERMANOVA,  $F= 1.416$ ,  $p = 0.12$ ), pero si en la riqueza de especies (PERMANOVA,  $F= 1.783$ ,  $p = 0.004$ ) durante los diferentes tiempos (AM, M y PM) de muestreo.



**Figura VI.12.** Abundancia relativa de las clases bacterianas presentes en los soplos recolectados durante los diferentes tiempos (AM, M y PM) de muestreo

En base a los resultados, se determinó que las diferencias encontradas durante estos análisis se deben a diferencias en los animales muestreados y no a la hora (o tiempo) de muestreo. Esto se aclarará en el siguiente apartado en el cual se realizó el análisis por individuo del microbioma bacteriano del sistema respiratorio, en el cual no se encontraron diferencias ni en la riqueza de especies ni en la abundancia relativa a lo largo del muestreo.

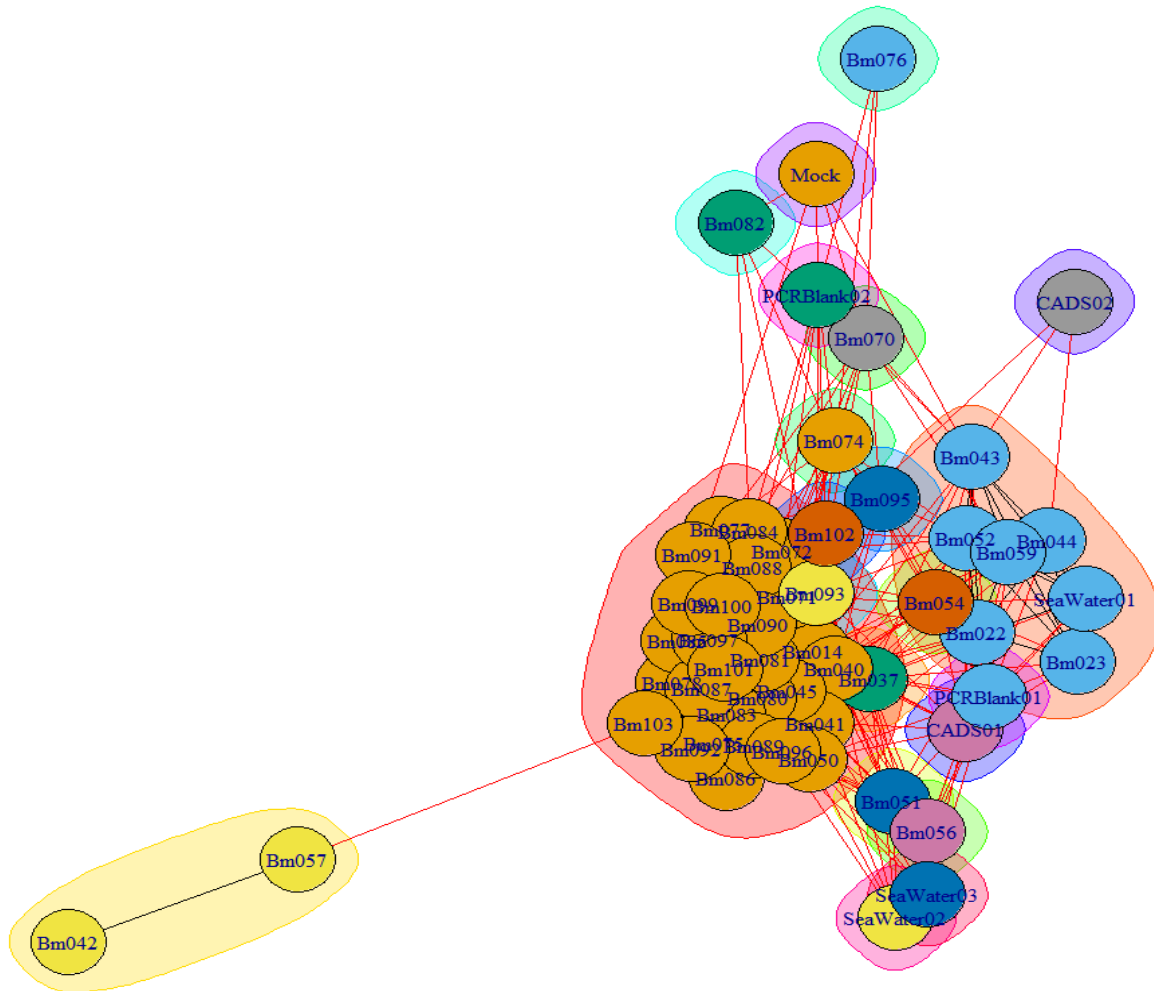
### VI.3.8. Análisis dinámico individual (ID 144)

Para realizar este análisis se utilizaron trece soplos del individuo ID 144 (un macho del cual se tienen registros de avistamiento desde 1996 y visita regularmente el área de estudio), los cuales fueron recolectados desde las 8 hasta las 17 horas en siete diferentes días. Se identificaron 3,444 ASV en todas las muestras analizadas. En los resultados de diversidad filogenética se

identificaron ocho clases bacterianas (*Actinobacteria*, *Bacilli*, *Bacteroides*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia*, *Fusobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Mollicutes*) de las cuales ninguna fue identificada como bacteria potencialmente patógena. Las medidas de diversidad alfa revelaron una riqueza (S) media de 1,072 especies (máximo = 1,710 y mínimo = 519) y el índice de Simpson expuso una diversidad media de 0.96 (máximo = 0.99 y mínimo = 0.95). No hubo diferencias ni en la riqueza de especies ( $\chi^2 = 0.90$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.64$ ), ni en el índice de Simpson ( $\chi^2 = 3.61$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.16$ ) entre los tiempos (AM, M y PM) de muestreo. Se realizó un análisis de microbioma central y se identificaron 845 ASV compartidos en más del 50% de los soplos del individuo ID 144

### **VI.3.9. Análisis de redes de intermediación**

Se realizó una red de intermediación usando el algoritmo Girvan-Newman (Figura VI.13), lo que permitió identificar, principalmente, dos clusters (naranja y azul) en los que se agruparon la mayoría de los soplos. Sin embargo, se observó un cluster (amarillo) formado por los soplos de dos hembras adultas (Bm057 y Bm042) alejados del bloque principal de soplos. Estos soplos presentaron una composición de microbioma diferente a las otras ballenas (PERMANOVA,  $p = 0.001$ ), con menor riqueza de especies y mayor abundancia relativa de *Mycoplasma* spp. (38,8%) y *Prevotella* spp. (13.84%), respectivamente.



**Figura VI.13.** Red de intermediación realizada con el algoritmo Girvan-Newman. Se observan tres comunidades, indicadas por las áreas sombreadas (amarilla, roja y naranja), que tienen vínculos internos densos y conexiones esparcidas entre grupos, principalmente el formado por los soplos Bm042 y Bm057.

## VI.4 Discusión

### VI.4.1. Análisis general de lecturas de secuenciación V3-V4

En este estudio se identificaron 3741 ASVs en las 47 muestras de soplo analizadas, las cuales tuvieron diferente riqueza de especies y abundancia relativa entre las ballenas azules muestreadas. Esto podría reflejar las modificaciones temporales que ocurren normalmente en el microbioma de animales sanos debido a diversos factores medio ambientales e inherentes del

huésped (Dickson *et al.*, 2016b; Eloe-fadrosh & Rasko, 2013; Faner *et al.*, 2017; Huffnagle *et al.*, 2017). Es posible que, como se mencionó en el capítulo V del presente trabajo, las variaciones en la composición del microbioma bacteriano pueden deberse a la técnica de muestreo utilizada, pues es casi imposible realizar vuelos idénticos con el dron para recolectar las muestras de soplo. Variaciones en la altura, dirección del viento y el número de soplos recolectados, puede interferir directamente en el volumen de muestra que se recolecta (Apprill *et al.*, 2017). Adicional a esto, durante cada respiración el volumen de aire exhalado y agua expulsado es diferente en cada ballena.

Para realizar un estudio de la estructura del microbioma es importante tener en cuenta la riqueza de especies y la diversidad de las comunidades bacterianas (Hill *et al.*, 2003; Jost, 2007; Morris *et al.*, 2014). En este estudio se identificó una riqueza media de 710 especies, determinando que el soplo de la ballena azul tiene mayor riqueza de especies bacterianas en el sistema respiratorio comparado con otras especies cercanas como la ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*; Apprill *et al.*, 2017; Vendl *et al.*, 2020), la ballena gris (*Eschrichtius robustus*) y la ballena piloto de aleta larga (*Globicephala melas*; Vendl, Slavich, *et al.*, 2020). La alta riqueza de especies detectadas en este estudio puede deberse a las técnicas de recolección de los soplos (dron [presente estudio] vs. Panel de acrílico/helicóptero a control remoto [Vendl *et al.*, 2020]) o a las diferentes regiones hipervariables del gen 16S rRNA secuenciadas (regiones V3-V4 [presente estudio] vs. región V4 [Vendl *et al.*, 2020]). Se comprobó que el uso de las regiones hipervariables V3 y V4 es mejor para la caracterización del microbioma bacteriano ya que son regiones grandes en las cuales se presentan la mayor variación de bases (Huang *et al.*, 2016; Ojha *et al.*, 2017). Adicionalmente, la mayor riqueza identificada puede deberse a las diferentes técnicas y procesos bioinformáticos utilizados. En el presente estudio se utilizó el algoritmo DADA2 para determinar los ASVs, a diferencia de los otros estudios donde se trabajó con unidades taxonómicas operacionales (OTUs). El uso de OTUs tiene desventajas pues identifican las bacterias teniendo en cuenta un 97% de similitud en la secuencias y no el 100% de similitud (Callahan, McMurdie y Holmes, 2017; Edgar, 2018); y aunque se usan extensamente para analizar el microbioma bacteriano (Chiarello *et al.*, 2015; Sanders *et al.*, 2015; Nishida y Ochman, 2018; Li *et al.*, 2019; Ross, Rodrigues-Hoffmann y Neufeld, 2019), recientes estudios han determinado que el uso de ASVs para la clasificación bacteriana es más detallado y eficiente

pues tienen en cuenta cambios en solo una base (Callahan, McMurdie y Holmes, 2017; Forster *et al.*, 2019). Adicionalmente, permite analizar todas las secuencias simultáneamente lo que permite identificar un mayor número de bacterias que están en poca abundancia (Callahan *et al.*, 2016).

Otra herramienta importante para evaluar la estructura de las comunidades bacterianas son los índices de diversidad (Watson *et al.*, 2019). Actualmente existen diversos índices para determinar la diversidad de una comunidad (Moreno, 2001), sin embargo, el índice de diversidad de Simpson es uno de los estimadores de diversidad alfa más conocidos y usados por la comunidad científica (Johnson y Burnet, 2016). En el presente estudio se identificó que el índice de Simpson tuvo una media de 0.96 (mínimo=0.48, máximo=0.99), demostrando una alta diversidad bacteriana en la mayoría de las muestras de soplo. *Proteobacteria* (15,67%), *Actinobacteria* (15,62%), *Firmicutes* (11,57%), *Bacteroidetes* (11,37%) y *Fusobacteria* (10,25%) son los filos bacterianos identificados en mayor abundancia; bacterias que han sido reportadas como componentes fundamentales del microbioma respiratorio en diversos animales y humanos (Bassis *et al.*, 2015; Dickson *et al.*, 2016b; Huffnagle *et al.*, 2017; Vendl, Slavich, *et al.*, 2020; Wypych *et al.*, 2019; Yamanishi & Pawankar, 2020). La diversidad encontrada en este estudio es mayor a la reportada en el soplo de ballena jorobada (Apprill *et al.*, 2017; Mulero-Pázmány *et al.*, 2017) y en delfín nariz de botella (Johnson *et al.*, 2009; Bik *et al.*, 2016). Se ha demostrado que los microbiomas bacterianos con mayor riqueza de especies pueden ser beneficiosas para los hospederos dado que son mucho más productivos y eficientes, permitiendo el restablecimiento rápido del microbioma después de alguna perturbación (Astudillo-García *et al.*, 2017; Bell *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2013).

#### **VI.4.2. Muestras de soplo vs. controles técnicos**

Con este análisis fue posible comprobar que la estructura del microbioma respiratorio de la ballena azul es diferente al microbioma detectado en las muestras control. Esto fue posible al identificar diferencias en la riqueza de especies (Wilcoxon rank,  $p=0.0052$ ) y en los índices de diversidad (Wilcoxon rank, índice de Simpson,  $p=0.0022$ ; índice de Shannon,  $p=0.0018$ ). Como se mencionó anteriormente, los microbiomas con estructuras más complejas son vitales



para desarrollo y supervivencia de los hospederos, ya que cumplen funciones biológicas, bioquímicas o ecológicas esenciales para el hospedero (Risely, 2020).

El análisis filogenético identificó once filos bacterianos en las muestras de soplo y algunos de estos también fueron detectados en agua de mar. Sin embargo, en las muestras de soplo se identificaron clases bacterianas como *Deltaproteobacteria*, *Erysipelotrichia*, *Leptospirae*, *Mollicutes*, *Melainabacteria*, *Spirochaetia* y *Camylobacteria*, que se consideraron propias del sistema respiratorio de la ballena azul, ya que no fueron identificadas en ninguna de las muestras control. *Acidimicrobiia*, *Negativicutes* y *Oxyphotobacteria* fueron identificadas en el agua de mar y en las muestras de soplos, presentando mayor abundancia relativa en la muestra control. Estas bacterias han sido reportadas principalmente en algas y corales (Alvarez-Yela *et al.*, 2019; Garcia-Pichel *et al.*, 2020; Hernandez-Agreda *et al.*, 2017), es decir, forman parte del ecosistema marino. Es por esto que no se considera azaroso haberlas detectado en el soplo de las ballenas, ya que durante la fase de exhalación, se expulsa el agua de mar acumulada en los orificios nasales externos. Con el uso de *SourceTracker* fue posible determinar que los soplos de las ballenas azules muestreadas tienen una similitud del 41,5% con la muestra de estornudo humano, compartiendo ocho clases bacterianas también reportadas en otros mamíferos terrestres (Bond *et al.*, 2017; Huffnagle, Dickson y Lukacs, 2017; Invernizzi, Lloyd y Molyneaux, 2020) y marinos como parte del microbioma respiratorio del sistema respiratorio (Apprill *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2012; Vendl, Slavich, *et al.*, 2020). Esto puede deberse a que estas clases bacterianas son indispensables en la estructura de las comunidades bacterianas en diversas especies de mamíferos, con el objetivo de mantener el buen funcionamiento de los pulmones (Dickson *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2013; Invernizzi *et al.*, 2020; Wypych *et al.*, 2019). Es importante considerar que esta similitud en el microbioma respiratorio puede deber a factores de coevolución (Shapira, 2016) en la cual diversas bacterias han evolucionado junto con sus hospederos cumpliendo funciones importantes para el desarrollo, metabolismo, inmunidad, comportamiento y la salud (Sampson & Mazmanian, 2015; Sison-Mangus *et al.*, 2015).

Finalmente, los análisis de diversidad beta demostraron que el soplo de la ballena azul es diferente a las muestras control, tanto en riqueza de especies como en abundancia relativa. Esto es importante, porque aunque existen bacterias de agua de mar presentes en el soplo, hay

una diferencia en la composición entre el microbioma del sistema respiratorio de la ballena azul y el agua de mar. Adicionalmente, también se confirmó que no existió contaminación durante el procesamiento de las muestras.

### **VI.4.3. Análisis del microbioma central**

El microbioma central es un término ampliamente utilizado que ha cambiado para tener diferentes definiciones, que en algunos casos identifican componentes superpuestos de la comunidad microbiana (Risely, 2020). Existen varios enfoques para definir el microbioma central en función de la estabilidad temporal (microbioma central dinámico: taxones de bacterias presentes en diferentes etapas del huésped, está esencialmente relacionado con el tiempo; Shade y Handelsman, 2012; Ozkan *et al.*, 2017), nivel funcional (microbioma central funcional: conjunto de genes de bacterias que son importantes para los procesos metabólicos del huésped; Dinsdale *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2020), influencia ecológica (microbioma central ecológico: taxones de bacterias que son importantes para dar forma a la estructura de sus comunidades ecológicas; Foster *et al.*, 2017; Coyte *et al.*, 2019), eficacia biológica del huésped (Microbioma central asociado al *fitness*: taxones microbianos cuya presencia aumenta la aptitud biológica del huésped; Sison-Mangus, Mushegian y Ebert, 2015; Shapira, 2016) y frecuencia de presencia de bacterias (microbioma central común: taxones bacterianos más extendidos compartidos por una proporción considerable de hospederos; Risely, 2020). El microbioma central común juega un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad funcional y la homeostasis de cada hábitat corporal (e.g. Piel, intestino, pulmones) del huésped (Björk *et al.*, 2018; Hernandez-Agreda *et al.*, 2017; Ross *et al.*, 2019; Shade & Handelsman, 2011; Vuong *et al.*, 2017).

Poder determinar el microbioma central común de una región anatómica particular en un huésped es muy importante porque la persistencia de esta microbiota en la mayoría de individuos sugiere que estos microorganismos pueden ser benéficos para la especie (Hernandez-Agreda *et al.*, 2017). Se determinó que 36 ASVs pertenecientes a las familias (*Arcobacteriaceae*, *Burkholderiaceae*, *Bacillales Family\_XI*, *Cardiobacteriaceae*, *Clostridiales Family\_XII*, *Corynebacteriaceae*, *Erysipelotrichiaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Leptotrichiaceae*, *Marinifilaceae*, *Microbacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Porphyromonadaceae*,

*Prevotellaceae*, *Propionibacteriaceae* y *Ruminococcaceae*) conforman el microbioma central del sistema respiratorio de la ballena azul en el Golfo de California. Aunque con este segundo análisis se identificaron el doble de ASVs formando el microbioma central común, 17 géneros bacterianos se identificaron en ambos estudios (capítulos V y VI del presente estudio), lo que sugiere que estos géneros son fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis del sistema respiratorio.

En este análisis se incluyó la tendencia del microbioma central común, es decir se calculó el microbioma central basado en una prevalencia de 5% al 100% y con cuatro valores del umbral de detección (0.001, 0.002, 0.01, 0.02). Se decidió hacer este análisis ya que aún no hay un consenso general sobre los parámetros indicados para evaluar el microbioma central común (Astudillo-García *et al.*, 2017; Risely, 2020). Con estos parámetros fue posible determinar un microbioma central común máximo de 1,166 especies, compartido por tres ballenas, y un microbioma central común mínimo de una especie compartido por 38 ballenas. Siendo *Propionibacterium* spp. el género bacteriano con mayor prevalencia en los soplos analizados. Esta bacteria ha sido identificada en la piel de las ballenas jorobadas (Apprill *et al.*, 2011, 2014) y otros animales domésticos. Su presencia en las muestras de soplo se le atribuye a que durante la exhalación es posible recolectar células cutáneas en las cuales está presente este género bacteriano.

#### **VI.4.4. Análisis basado en sexo: hembras vs. machos**

Los análisis de diversidad beta realizados en este estudio indicaron que los soplos tanto de hembras como machos son iguales en la composición del microbioma del sistema respiratorio. Estos resultados son semejantes a los reportados en orcas (Raverty *et al.*, 2017) y en ballena jorobada (Apprill *et al.*, 2017) en los cuales el género no tuvo ningún efecto en la estructura de la comunidad bacteriana. Estudios sobre el microbioma entérico del elefante marino del Norte en etapas tempranas de su desarrollo identificaron una mayor riqueza de taxones bacterianos en machos que en hembras, a los 30 días de nacimiento, resultado que no le atribuyen al género *per se*, si no a un mejor estado de salud de los machos (Stoffel *et al.*, 2020). En el presente estudio no fue posible determinar el estado de salud de los individuos; sin embargo,

como se discutirá más adelante, en los soplos de algunas hembras se identificaron bacterias potencialmente patógenas.

Explicar las diferencias entre sexos en el microbioma puede ser complejo. Por un lado, se sabe que en muchas especies de vertebrados las hembras tienen respuestas inmunes más efectivas que los machos, lo que les proporciona una mayor resistencia a muchos tipos de enfermedades infecciosas (Cannon & St. Pierre, 1997; Klinger *et al.*, 1998; Yurkovetskiy *et al.*, 2013). Esto puede ser debido a la ausencia de hormonas androgénicas inmunosupresoras o a las propiedades inmunoestimulantes de los estrógenos (Olsen & Kovacs, 1996; Schröder *et al.*, 1998). En humanos, se han observado diferencias de género en términos de infección en diversos ensayos clínicos y epidemiológicos, generalmente siendo mayor la prevalencia de enfermedades en hombres (Eidinger & Garrett, 1972). Asimismo, se ha demostrado que las infecciones del tracto respiratorio son más frecuentes en hombres entre los 0 y 15 años, y en mujeres entre los 15 y 25 años, cuando entran en edad reproductiva (Jensen-Fangel *et al.*, 2004). En animales se ha demostrado que la respuesta de anticuerpos a antígenos exógenos es mejor en las hembras (Olsen & Kovacs, 1996). Sin embargo, las diferencias entre sexos también podrían reflejar diferencias en la historia de vida de machos y hembras. Este es un punto a tener en cuenta ya que, tanto hembras como machos, afrontan diferentes retos, fisiológicos y/o conductuales, a lo largo de su vida (Stoffel *et al.*, 2020) y varias de estas diferencias pueden influir directa o indirectamente en la composición del microbioma respiratorio.

En el presente estudio se realizó un análisis más detallado del microbioma bacteriano comparando diferentes niveles taxonómicos, y fue posible identificar seis clases bacterianas únicas (*Acidimicrobia*, *Epsilonproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Spirochaetes*, y *Oxyphotobacteria*) y en poca abundancia relativa, en los soplos de las hembras. De estas bacterias, la que podría tener importancia clínica es *Leptospira* spp. (Clase: *Spirochaetes*), una bacteria que rara vez se detecta en el tejido pulmonar mediante los métodos convencionales (Pereira Da Silva *et al.*, 2002; Tattevin *et al.*, 2005). Esta bacteria causa leptospirosis, una zoonosis que se presenta en un gran número de especies animales, incluidos los mamíferos marinos (Piredda *et al.*, 2020). Esta bacteria ha sido reportada ampliamente en poblaciones de pinnípedos principalmente en el lobo marino de California, asociada a cuadros clínicos de

nefritis severas (Cameron *et al.*, 2008; Colagross-Schouten *et al.*, 2002). Además, la bacteria fue reportada recientemente en un delfín nariz de botella varado; sin embargo los estudios histopatológicos no revelaron ningún tipo de lesión característica de esta bacteria (Piredda *et al.*, 2020). Adicionalmente, *Leptospira* fue identificada en 17 especies de cetáceos varados, algunos de ellos con lesiones correspondientes a nefritis intersticial (ver Obusan *et al.*, 2019). La detección del género *Leptospira* en el soplo de las ballenas azules hace hincapié en la necesidad de entender la dinámica de esta bacteria en el hospedero y las diferentes regiones anatómicas en los que generalmente no son identificadas. Es en este punto donde las nuevas tecnologías de secuenciación masiva tienen un gran potencial para el entendimiento de diversas patologías.

En dos soplos pertenecientes a dos hembras adultas, fue posible observar un aumento en la abundancia relativa de dos bacterias patógenas. *Prevotella* (13.84% abundancia relativa) en el soplo Bm042 y *Mycoplasma* spp. (38,8% abundancia relativa), en el soplo Bm057. Aunque estas bacterias también fueron identificadas en otros soplos, incluyendo individuos machos; la abundancia relativa fue aproximadamente del 2%. Es importante recalcar que durante algunas etapas del ciclo reproductivo (principalmente durante la gestación) las hembras son susceptibles a un mayor número de enfermedades debido a un estado de inmunosupresión hormonal (Schröder *et al.*, 1998). Sin embargo no fue posible relacionar la presencia de estas bacterias con parámetros clínicos o paraclínicos que indicaran un estado de preñez.

Independiente a este hallazgo, nuestros resultados apoyan la idea de que el microbioma respiratorio común de la ballena azul se conserva en la mayoría de individuos y que las bacterias que hacen parte de él constituyen una estructura importante para el mantenimiento de esta comunidad bacteriana tanto en hembras como en machos. Como se demostró en este capítulo, existen pequeñas diferencias que no pueden ser identificadas cuando se realizan análisis estadísticos a gran escala, sin embargo el análisis detallado del microbioma de cada individuo develó información importante sobre la composición del microbioma del sistema respiratorio en algunos individuos de ballena azul.

#### **VI.4.5. Análisis basado en la edad**

Anteriormente se pensaba que el sistema respiratorio de los animales era estéril antes del nacimiento (Gallacher & Kotecha, 2016). Sin embargo se ha demostrado que existe una colonización bacteriana *in utero* de los pulmones (Aagaard *et al.*, 2014), que prepara al recién nacido para una gran exposición a microorganismos inespecíficos que ocurre durante el parto, muchos de estos de origen materno (Bosch *et al.*, 2016; Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Estos microorganismos se adaptan al medioambiente y colonizan principalmente las mucosas del recién nacido (Man *et al.*, 2017). Posterior a esta sucesión primaria, ocurre la sucesión secundaria, en la cual existe una reestructuración de la composición del microbioma debido a diferentes estados de disbiosis (Hernández-Castro *et al.*, 2005), los cuales van a presentarse continuamente durante los primeros años de vida de los animales, tiempo en el cual se establece un microbioma bacteriano estable (Man *et al.*, 2017).

En humanos ha sido posible identificar patrones en la composición del microbioma siendo predominantes en la infancia las *Bifidobacteria*, en la pubertad los *Bacteroides* y en la adultez los *Firmicutes* (Nagpal *et al.*, 2018). En el presente estudio no fue posible identificar un patrón en la composición del microbioma en diferentes etapas de vida, posiblemente por los pocos datos y replicas obtenidas para cada etapa, además del poco conocimiento que se tiene sobre las diferentes etapas de vida en estos animales. Sin embargo, fue posible generar un modelo logarítmico y determinar que, a mayor edad mayor riqueza de especies; lo cual concuerda con lo que ha sido reportado y estudiado en humanos (Biesbroek *et al.*, 2014; Bosch *et al.*, 2016). Este modelo estadístico no tienen un coeficiente de determinación muy alto ( $R^2 = 0.26$ ) por lo que debe ser usado con cuidado si se desea usar como un modelo predictivo de la riqueza de especies bacterianas en función de la edad de un individuo.

#### **VI.4.6. Análisis de la dinámica del microbioma bacteriano**

El microbioma dinámico identifica la estabilidad temporal de taxones bacterianos entre individuos o poblaciones (Björk *et al.*, 2018). Este microbioma identifica taxones que están

presentes constantemente en un tiempo determinado, pero también es posible caracterizar taxones que solo están presentes durante una temporada o una etapa de vida (Risely, 2020). En el presente estudio se evaluaron soplos de ballena azul en tres temporadas de muestreo (2016, 2017 y 2018), siendo la composición del microbioma bacteriano diferente entre las tres temporadas. Diversos estudios en mamíferos marinos han demostrado cambios temporales en la estructura del microbioma: en la piel de ballenas jorobadas se evidenció un cambio en la abundancia relativa del microbioma central común a lo largo del tiempo, posiblemente relacionados con la estación del año, la cual se asocia a cambios en la temperatura del agua y esta a su vez genera cambios en la bioquímica de la piel, lo que influye en el crecimiento microbiano (Bierlich *et al.*, 2018). En orcas, se encontraron diferencias entre los microbiomas respiratorios en cuatro diferentes años de muestreo (Raverty *et al.*, 2017), y en delfín nariz de botella identificaron cambios durante los varios meses de estudio (Lima *et al.*, 2012; Vendl, Nelson, *et al.*, 2020). Estos cambios temporales de las comunidades bacterianas también han sido reportados en mamíferos terrestres (incluido humanos), principalmente en el sistema digestivo y se ha demostrado que la variación más común en la estructura de las comunidades microbianas se debe a las estaciones del año como respuesta a la disponibilidad de alimento (Amato *et al.*, 2014; Smits *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017). Dentro de los cambios temporales aquí identificados se identificó la presencia de algunos taxones bacterianos en algunos años y en otros no, como *Verrucomicrobia*, el cual solo se detectó en el año 2016; *Acidimicrobia*, *Leptospirae*, *Malainabacteria* y *Oxyphotobacteria* que solo se identificaron el año 2017; y *Campilobacteria*, *Deltaproteobacteria* y *Spirochaetia* que solo se detectaron en el año 2018. Sin embargo, estos hallazgos fueron a nivel individual y no poblacional.

El muestreo del 2018 se abordó con el objetivo de analizar la variación temporal del microbioma durante una temporada de muestreo, es decir de febrero a abril; adicional a esto, los soplos fueron agrupados según la hora de muestreo para evaluar el efecto del ciclo circadiano sobre el microbioma respiratorio de las ballenas azules. Los ritmos circadianos son oscilaciones en las variables biológicas con intervalos regulares de tiempo (aproximadamente 24 horas) y que se presentan en la mayoría de los organismos, incluidas bacterias (Voigt *et al.*, 2016); durante estos ciclos se regula y optimiza el funcionamiento de los diferentes sistemas en función del día (Frazier & Chang, 2020). En este estudio no fue posible evaluar la relación entre el

microbioma y el ciclo circadiano ya que no hubo diferencias en la composición microbiana de los soplos, aunque se posible identificó diferencia en la riqueza de especies entre los soplos durante las distintas horas de muestreo; contrario a lo reportado en corales donde identificaron que el microbioma temporal tiene cambios principalmente en la abundancia relativa y no en la riqueza de especies (Björk *et al.*, 2018), dando soporte a la idea de que los microbiomas internos tienden a ser más estables que los externos (Franzosa *et al.*, 2015). Con esto en cuenta, fue posible identificar 12 clases bacterianas, de las cuales *alphaproteobacteria* y *Campilobacteria* solo estuvieron presentes en los soplos recolectados a medio día cuando el sol está cerca del zenit (en el tiempo M); y *Deltaproteobacteria* y *Spirochaetia* no estuvieron presentes en los soplos colectados durante la tarde (tiempo PM). Estos hallazgos, al igual que lo mencionado en el análisis por años de muestreo, se deben a los diferentes animales muestreados y no a la hora del muestreo. También es posible que estos hallazgos se deban a la dinámica de buceo en los diferentes tiempos de muestreo. La duración y profundidad de los buceo en los misticetos está estrechamente relacionada con la disponibilidad de alimento (Croll *et al.*, 2001). En la costa oeste de Australia, se demostró que durante la tarde las ballenas se alimentan profundamente en la columna de agua por lo cual sus tiempos de buceo son mayores; mientras que en la mañana sus buceo son superficiales, siendo los tiempos de buceo son más cortos (Owen *et al.*, 2016). Las diferencias en la profundidad y tiempo de buceo pueden tener un gran impacto en la respiración, ya que un aumento de la presión (a más profundidad mayor presión) comprime los tejidos, y modifica la dinámica de perfusión gaseosa en los alvéolos (Snyder, 1983). Sin embargo, los pulmones de los cetáceos tienen adaptaciones morfológicas y fisiológicas que les permiten soportar el estrés mecánico causado durante los periodos de inmersión, permitiendo que la función pulmonar se mantenga durante el buceo (Kooyman, 1973); siendo la principal adaptación el colapso alveolar, en la que el aire y el surfactante pulmonar se moviliza a las vías aéreas superiores (Miller, 2005), siendo posible el acarreo de diversas bacterias, las cuales fueron detectadas en los soplos de las ballenas azules en diferentes horas del día.

Finalmente, se analizaron múltiples soplos de un mismo individuo, durante las tres temporadas y durante diferentes horas de muestreo (esto solo fue posible en el año 2018). No se hallaron diferencias en la composición (riqueza y abundancia relativa) microbiana entre los trece soplos analizados. Al realizar el análisis de microbioma central común entre los soplos del



mismo individuo se identificaron 845 ASVs, teniendo una estructura mucho más conservada que el microbioma central común poblacional (descrito en el capítulo V de esta tesis). Este núcleo individual de taxones bacterianos puede ser una herramienta poderosa para distinguir entre diferentes taxa bacterianas que tengan una variabilidad interindividual o intraindividual, como ha sido demostrado en humanos (Franzosa *et al.*, 2015; Lloyd-Price *et al.*, 2017), y proporciona una amplia información sobre la comunidad establecida a nivel individual (Risely, 2020). En base en los resultados aquí obtenidos se sugiere que el microbioma bacteriano del sistema respiratorio de la ballena azul es muy estable a nivel individual y tiene una estructura que se mantiene a lo largo del tiempo, es decir que las diferencias son mayores entre individuos y no varían considerablemente dentro de cada individuo. Estudios en delfín nariz de botella, también han reportado que las muestras temporales de cada individuo fueron más similares entre sí que comparadas con muestras de otros individuos, lo que indica que en estos animales el microbioma respiratorio tiene niveles similares a nivel individual y no poblacional (Lima *et al.*, 2012).

#### **VI.4.7. Análisis de redes de intermediación**

Las enfermedades infecciosas son motivo de preocupación en los mamíferos marinos ya que pueden tener severas consecuencias en las poblaciones animales (Daszak *et al.*, 2000; Gulland & Hall, 2007; Van Bresseem *et al.*, 2009), particularmente aquellas que están amenazadas y que cuentan con un número reducido de individuos. Esto es porque en esas poblaciones las enfermedades infecciosas, cuando son dependientes de la frecuencia, pueden tener un gran impacto sobre los parámetros demográficos y acelerar su velocidad de extinción (Weiss *et al.*, 2020). Los modelos de predicción de brotes de enfermedades se han convertido en una herramienta valiosa para evaluar la incidencia de diversas enfermedades con el objetivo de diseñar estrategias que mitiguen el impacto de varios patógenos en las poblaciones de vida silvestre (Norman, 2008). Matemáticamente, los redes describen patrones de conexiones entre un grupo de individuos y sus interacciones, representados gráficamente con nodos y líneas; respectivamente (Guimarães *et al.*, 2007; Sah *et al.*, 2018).

Con el uso de esta aproximación metodológica se construyó una red usando el algoritmo Girvan-Mewman, para identificar la intermediación de los nodos, es decir se cuantificó el número de veces que un nodo actúa como un puente a lo largo del camino más corto entre otros dos nodos (Clauset *et al.*, 2004; Newman & Girvan, 2004). Esto significa que los bordes se interpretan como distancias, no como fuerzas de conexión (Newman, 2004). Con esta metodología fue posible identificar dos soplos (Bm042 y Bm057) pertenecientes a dos diferentes hembras adultas, con microbioma respiratorio diferente a las demás, tanto en riqueza, como en abundancia relativa de ASVs. Estos dos soplos se pueden observar alejados del conglomerado de soplos, lo cual indica que la relación de estos dos soplos con los otros 45 es menor y casi no comparten ASVs similares. Específicamente, el soplo Bm042, presentó menor riqueza de especies y mayor abundancia relativa de *Prevotella* (13.84%) y de *Porphyromonas*. (2.34%), bacterias que han sido descritas como patógenos oportunistas durante el refriado común en humanos (Langevin *et al.*, 2017; Salk *et al.*, 2016), siendo los principales agentes etiológicos de las neumonías bacterianas secundarias (Bassis *et al.*, 2015; De Steenhuijsen Pipers *et al.*, 2016; Hanada *et al.*, 2018; Tsang *et al.*, 2019). En cetáceos, *Prevotella* ha sido reportada en el sistema digestivo de ballena franca (*Eubalaena australis*) y delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) pero sin evidencia de su patogenicidad (Marón *et al.*, 2019; Soverini *et al.*, 2016). Esta bacteria también ha sido reportada en mamíferos terrestres, principalmente en el tracto gastrointestinal (Amato *et al.*, 2013; Godoy-Vitorino *et al.*, 2012; Yildirim *et al.*, 2010).

La caracterización del microbioma respiratorio en el soplo Bm057, mostró menor riqueza de especies y mayor abundancia relativa de *Mycoplasma* spp. (38,8%). Esta bacteria ha sido reportada como agente etiológico en enfermedades respiratorias en animales (Cai *et al.*, 2019; Choi *et al.*, 2019; Tao *et al.*, 2019) y en humanos (C. Li *et al.*, 2019; Prince *et al.*, 2018; Qu *et al.*, 2018). En los animales marinos, durante eventos de mortalidad inusual, se identificó esta bacteria principalmente en sistema respiratorio de lobo marino de California (Foster *et al.*, 2011; Haulena *et al.*, 2013), y en menor prevalencia en marsopas de puerto y zifido de Sowerby.

Basados en reportes de otros animales y en humanos, es posible que las ballenas de los soplos Bm042 y Bm057, al momento del muestreo, hayan presentado alguna infección respiratoria que involucra *Prevotella* y *Mycoplasma*; respectivamente. Debido al tipo de estudio

realizado, no fue posible obtener información de relevancia clínica que nos permita decir, sin duda alguna, que estas dos ballenas estaban enfermas.

## VI.5 Conclusiones

El objetivo principal de este capítulo fue analizar la dinámica ecológica del microbioma bacteriano del sistema respiratorio de la ballena azul. Los resultados sugieren que aunque existe un microbioma central común para la población de ballenas azules del estudio, la variación en la estabilidad del microbioma puede ser grande en individuos de la misma especie. Sin embargo, las variaciones intraindividuales son pocas, como pudo observarse al analizar el soplo del individuo ID144. En un microbioma estable, el microbioma temporal permite identificar taxones que mantiene la estabilidad de la comunidad bacteriana. Si bien, el microbioma central aquí reportado resultó bastante diverso, se encontró que únicamente se mantiene un núcleo de 12 especies bacterianas. Este núcleo podría representar la base del microbioma central del tracto respiratorio en la ballena azul, revelando un punto de enfoque principal para diversos estudios ecológicos. Por otro lado, la riqueza y abundancia relativa fue comparable con lo reportado en el microbioma de otros animales y humanos sanos. Se propone que el microbioma central común del tracto respiratorio de la ballena azul se use como una línea base para futuros estudios de largo término en los cuales se desee relacionar los cambios en la composición (diversidad y abundancia relativa).

A pesar de ser una especie dimórfica, el microbioma bacteriano presentó pocas diferencias entre machos y hembras siendo el microbioma respiratorio de los machos más rico en especies comparado con el de las hembras. No obstante, el hallazgo de bacterias, patógenas en otras especies, como *Leptospira* spp., únicamente en hembras adultas, representa un punto de partida para analizar la etiología de la infección y las consecuencias de salud en estos individuos. Asimismo, el análisis de redes reveló dos individuos con un microbioma aislado al de los otros individuos, lo que nos sugiere un estado de disbiosis.

Este es el primer estudio en analizar la dinámica del microbioma bacteriano de la ballena azul. Debido a las implicaciones del microbioma en el estado de salud de los individuos,

las variaciones reportadas pueden ser utilizadas como indicadores de salud y enfermedad. Por esto, es esencial dar un seguimiento constante a estos individuos, así como las condiciones ecológicas a las que se enfrentan, para comprender a profundidad la dinámica del microbioma.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## CONCLUSIONES GENERALES

“Las ballenas azules son la onda y el microbioma está de moda”

Carlitos, 2020

En el diseño de un proyecto de investigación con animales se debe tener prioridad en el bienestar de los animales, y para ello es importante considerar el principio de las tres Rs. Teniendo en cuenta esto y con el objetivo de refinar la metodología para causar el menor estrés durante el muestreo; se utilizó un dron como herramienta no invasiva para la obtención de soplo. En el capítulo IV de esta tesis, los resultados reportados reflejan que esta aeronave no tripulada no modificó el comportamiento normal de las ballenas durante la colección de la muestra biológica, lo que la hace una tecnología de relevancia para futuros estudios en grandes cetáceos. Sin embargo, es importante prestar especial atención a la técnica de recolección del soplo, principalmente a la aproximación y a la altura mínima de vuelo.

Las nuevas tecnologías de secuenciación masiva se han convertido en una herramienta fundamental para el análisis del microbioma en diversos ecosistemas. Este es el primer estudio que hace uso de la secuenciación masiva del gen 16s rRNA para caracterizar el bacterioma del tracto respiratorio de la ballena azul. En el capítulo V de esta tesis, se evidenció que el bacterioma del tracto respiratorio, en esta especie, presenta una estructura similar a la de otros mamíferos, estando constituido en su mayoría por *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria*. Adicionalmente, se demostró la presencia de un bacterioma central común en la población de ballenas azules del Golfo de California. Es importante continuar el estudio del bacterioma, incluyendo aspectos funcionales, en esta especie con el objetivo de comprender mejor la dinámica bacteriana en el sistema respiratorio de la ballena azul.

En el ámbito ecológico y microbiológico se ha demostrado que el microbioma bacteriano juega un papel muy importante en los ecosistemas, tanto en su estado de salud como de enfermedad. Como consecuencia de esto, se están desarrollando nuevas técnicas de

investigación que están cambiando la visión que tenemos de los microorganismos. En el capítulo VI de esta tesis, se abordó el análisis del bacterioma del tracto respiratorio de la ballena azul teniendo en cuenta el sexo y la edad de las ballenas; así como las variaciones de este en el tiempo. Se encontraron pocas diferencias entre sexos; sin embargo hubo mayor riqueza específica en el bacterioma respiratorio de los machos comparado con el de las hembras. No fue posible detectar diferencias entre grupos etarios, aunque los resultados sugieren que el bacterioma se hace más diverso a medida que los animales crecen. Por otro lado, las variaciones temporales encontradas en este estudio se deben más a los individuos muestreados que al tiempo de muestreo; por lo cual es importante continuar con este tipo de estudios utilizando un número de muestra más grande.

Los microorganismos juegan un papel muy importante en el estado de salud de los animales; por lo cual, la presencia o ausencia de algunos taxones bacterianos puede ser utilizada como indicador de salud y enfermedad. El análisis de redes reveló dos individuos con un bacterioma diferente al de las demás ballenas, con baja riqueza de especies y presencia de *Mycoplasma* y *Prevotella* en gran abundancia. Esto presenta un punto de partida para analizar la etiología de la infección y las posibles consecuencias en la salud de esta población de ballena azul.

Finalmente, con todos los resultados obtenidos y derivados de la presente investigación, se propone que el microbioma central común del tracto respiratorio de la ballena azul se use como una línea base para futuros estudios de largo término en los cuales se desee relacionar los cambios en la composición (diversidad y abundancia relativa) y los patrones de co-ocurrencia del microbioma respiratorio, que puedan reflejar estados de enfermedad individual y poblacional.

## BIBLIOGRAFIA

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Science Translational Medicine*, 6(237), 237ra65. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>.The
- Abrahms, B., Hazen, E. L., Aikens, E. O., Savoca, M. S., Goldbogen, J. A., Bograd, S. J., Jacox, M. G., Irvine, L. M., Palacios, D. M., & Mate, B. R. (2019). Memory and resource tracking drive blue whale migrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(12), 5582–5587. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819031116>
- Acevedo-Whitehouse, K. A., Rocha-Gosselin, A., & Gendron, D. (2010). A novel non-invasive tool for disease surveillance of free-ranging whales and its relevance to conservation programs. *Animal Conservation*, 13(2), 217–225. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2009.00326.x>
- Adame, K., Pardo, M. A., Salvadero, C., Beuer, E., & Elorriaga-Verplancken, F. R. (2017). Detectability and categorization of California sea lions using an unmanned aerial vehicle. *Marine Mammal Science*, 33(3), 913–925. <https://doi.org/10.1111/mms.12403>
- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., Van Den Beek, M., Bouvier, D., Ech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltemann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A., & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 46, W537–W544. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>
- Ainsworth, T. D., Krause, L., Bridge, T., Torda, G., Raina, J. B., Zakrzewski, M., Gates, R. D., Padilla-Gamiño, J. L., Spalding, H. L., Smith, C., Woolsey, E. S., Bourne, D. G., Bongaerts, P., Hoegh-Guldberg, O., & Leggat, W. (2015). The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts. *ISME Journal*, 9(10), 2261–2274. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.39>
- Alvarez-Yela, A. C., Mosquera-Rendón, J., Noreña-P, A., Cristancho, M., & López-Alvarez, D. (2019). Microbial diversity exploration of marine hosts at Serrana Bank, a coral atoll of the Seaflower Biosphere Reserve. *Frontiers in Marine Science*, 6, 338. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00338>

- Amato, K. R., Leigh, S. R., Kent, A., Mackie, R. I., Yeoman, C. J., Stumpf, R. M., Wilson, B. A., Nelson, K. E., White, B. A., & Garber, P. A. (2014). The Gut Microbiota Appears to Compensate for Seasonal Diet Variation in the Wild Black Howler Monkey (*Alouatta pigra*). *Microbial Ecology*, *69*(2), 434–443. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0554-7>
- Amato, K. R., Yeoman, C. J., Kent, A., Righini, N., Carbonero, F., Estrada, A., Rex Gaskins, H., Stumpf, R. M., Yildirim, S., Torralba, M., Gillis, M., Wilson, B. A., Nelson, K. E., White, B. A., & Leigh, S. R. (2013). Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *ISME Journal*, *7*, 1344–1353. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.16>
- Anderson, M. J., Ellingsen, K. E., & McArdle, B. H. (2006). Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecology Letters*, *9*, 683–693. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00926.x>
- Antwis, R. E., Lea, J. M. D., Unwin, B., & Shultz, S. (2018). Gut microbiome composition is associated with spatial structuring and social interactions in semi-feral Welsh Mountain ponies. *Microbiome*, *6*(207), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0593-2>
- Apprill, A., Miller, C., Moore, M. J., Durban, J. W., Fearnbach, H., & Barrett-Lennard, L. G. (2017). Extensive Core Microbiome in Drone-Captured Whale Blow Supports a Framework for Health Monitoring. *MSystems*, *2*(5), e00119-17. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00119-17>
- Apprill, A., Mooney, T., Lyman, E., Stimpert, A., & Rappé, M. (2011). Humpback whales harbour a combination of specific and variable skin bacteria. *Environmental Microbiology Reports*, *3*(2), 223–232. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00213.x>
- Apprill, A., Robbins, J., Eren, A., Pack, A., Reveillaud, J., Mattila, D., Moore, M. J., Niemeyer, M., Moore, K., & Mincer, T. (2014). Humpback whale populations share a core skin bacterial community: Towards a health index for marine mammals? *PLoS ONE*, *9*(3), e90785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090785>
- Astudillo-García, C., Bell, J. J., Webster, N. S., Glasl, B., Jompa, J., Montoya, J. M., & Taylor, M. W. (2017). Evaluating the core microbiota in complex communities: A systematic investigation. *Environmental Microbiology*, *19*(4), 1450–1462. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13647>
- Attard, C., Beheregaray, L., & Möller, L. (2016). Towards population-level conservation in the



- critically endangered Antarctic blue whale: The number and distribution of their populations. *Scientific Reports*, 6(22291), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep22291>
- Balls, M. (2010). The Principles of Humane Experimental Technique: Timeless Insights and Unheeded Warnings. *ALTEX*, 27(Special Issue), 19–23.
- Bancroft, A. J., Hayes, K. S., & Grensis, R. K. (2012). Life on the edge : the balance between macrofauna , microflora and host immunity. *Trends in Parasitology*, 28(3), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.12.001>
- Banuet-Martínez, M., Aquino, W. E. de, Elorriaga-Verplancken, F. R., Flores-Morán, A., García, O. P., Camacho, M., & Acevedo-Whitehouse, K. (2017). Climatic anomaly affects the immune competence of California sea lions. *PLoS ONE*, 12(6), e0179359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179359>
- Barnas, A. F., Felege, C. J., Rockwell, R. F., & Ellis-Felege, S. N. (2018). A pilot(less) study on the use of an unmanned aircraft system for studying polar bears (*Ursus maritimus*). *Polar Biology*, 41, 1055–1062. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2270-0>
- Bassis, C. M., Erb-Downward, J. R., Dickson, R. P., Freeman, C. M., Schmidt, T. M., Young, V. B., Beck, J. M., Curtis, J. L., & Huffnagle, G. B. (2015). Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *mBio*, 6(2), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00037-15>
- Bean, H., Dimandja, J.-M., & Hill, J. E. (2012). Bacterial Volatile Discovery using Solid Phase Microextraction and Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 901, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.038>.Bacterial
- Bell, T., Newman, J. A., Silverman, B. W., Turner, S. L., & Lilley, A. K. (2005). The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature*, 436(7054), 1157–1160. <https://doi.org/10.1038/nature03891>
- Berta, A., Sumich, J. L., & Kovacs, K. M. (2006). Cetacean Evolution and Systematics. En *Marine Mammals: Evolutionary Biology* (Second, pp. 51–87). Elsevier. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2006.00402.x>
- Bierlich, K. C., Miller, C., DeForce, E., Friedlaender, A. S., Johnston, D. W., & Apprill, A. (2018). Temporal and regional variability in the skin microbiome of humpback whales

- along the Western Antarctic Peninsula. *Applied and Environmental Microbiology*, 84, e02574-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02574-17>
- Biesbroek, G., Tsvitshivadze, E., Sanders, E. A. M., Montijn, R., Veenhoven, R. H., Keijser, B. J. F., & Bogaert, D. (2014). Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(11), 1283–1292. <https://doi.org/10.1164/rccm.201407-1240OC>
- Bik, E. M., Costello, E. K., Switzer, A. D., Callahan, B. J., Holmes, S. P., Wells, R. S., Carlin, K. P., Jensen, E. D., Venn-watson, S., & Relman, D. A. (2016). Marine mammals harbor unique microbiotas shaped by and yet distinct from the sea. *Nature Communications*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms10516>
- Björk, J. R., O'Hara, R. B., Ribes, M., Coma, R., & Montoya, J. M. (2018). The dynamic core microbiome: Structure, dynamics and stability. *bioRxiv*, 137885. <https://doi.org/10.1101/137885>
- Bleich, A., & Fox, J. G. (2015). The Mammalian Microbiome and Its Importance in Laboratory Animal Research. *ILAR Journal*, 56(2), 153–158. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilv031>
- Bohus, V., Kéki, Z., Márialigeti, K., Baranyi, K., Patek, G., Schunk, J., & Tóth, E. (2011). Bacterial communities in an ultrapure water containing storage tank of a power plant. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 58(4), 371–382. <https://doi.org/10.1556/AMicr.58.2011.4.12>
- Bokulich, N. A., Chung, J., Battaglia, T., Henderson, N., Jay, M., Li, H., Lieber, A. D., Wu, F., Perez-Perez, G. I., Chen, Y., Schweizer, W., Zheng, X., Contreras, M., Dominguez-Bello, M. G., & Blaser, M. J. (2016). Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Microbiome*, 8(343), 343ra82. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad7121>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bond, S. L., Timsit, E., Workentine, M., Alexander, T., & Léguillette, R. (2017). Upper and lower respiratory tract microbiota in horses: Bacterial communities associated with health and mild asthma (inflammatory airway disease) and effects of dexamethasone. *BMC*

*Microbiology*, 17(1), 184. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1092-5>

- Bosch, A., Levin, E., van Houten, M. A., Hasrat, R., Kalkman, G., Biesbroek, G., de Steenhuijsen Piters, W. A. A., de Groot, P. K. C. M., Pernet, P., Keijser, B. J. F., Sanders, E. A. M., & Bogaert, D. (2016). Development of Upper Respiratory Tract Microbiota in Infancy is Affected by Mode of Delivery. *EBioMedicine*, 9, 336–345. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.05.031>
- Bossart, G. D. (2011). Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. *Veterinary Pathology*, 48(3), 676–690. <https://doi.org/10.1177/0300985810388525>
- Boynton, P. J., & Greig, D. (2016). Species richness influences wine ecosystem function through a dominant species. *Fungal Ecology*, 22, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.04.008>
- Brat, D., & Pathak, I. (2020). Impact of pollution on aquatic biodiversity. *Iconic Research and Engineering Journals*, 42(3–4), 11–15.
- Bretz, B. Y. W. L., & Schmidt-nielsen, K. (1971). Bird respiration: flow patterns in the duck lung. *Journal of Exploratory Biology*, 54, 103–118.
- Brinton, E., Fleminger, A., & Siegel-causey, D. (1986). the Temperate and Tropical Planktonic Biotas of the Gulf of California. *Direct*, XXVII, 228–266. [http://calcofi.org/newhome/publications/CalCOFI\\_Reports/v27/pdfs/Vol\\_27\\_Brinton\\_eta\\_l.pdf](http://calcofi.org/newhome/publications/CalCOFI_Reports/v27/pdfs/Vol_27_Brinton_eta_l.pdf)
- Brinton, E., & Townsend, A. W. (1980). Euphausiids in the Gulf of California - the 1957 cruises. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports*, 21, 211–236. [http://www.calcofi.org/newhome/publications/CalCOFI\\_Reports/v21/v21\\_toc.htm](http://www.calcofi.org/newhome/publications/CalCOFI_Reports/v21/v21_toc.htm)
- Burge, C. A., Mark Eakin, C., Friedman, C. S., Froelich, B., Hershberger, P. K., Hofmann, E. E., Petes, L. E., Prager, K. C., Weil, E., Willis, B. L., Ford, S. E., & Harvell, C. D. (2014). Climate Change Influences on Marine Infectious Diseases: Implications for Management and Society. *Annual Review of Marine Science*, 6(1), 249–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135029>
- Burke, C. M., & Darling, A. E. (2016). A method for high precision sequencing of near full-length 16S rRNA genes on an Illumina MiSeq. *PeerJ*, 4, e2492. <https://doi.org/10.7717/peerj.2492>
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews*

- Microbiology*, 16(3), 143–155. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
- Cai, H. Y., McDowall, R., Parker, L., Kaufman, E. I., & Caswell, J. L. (2019). Changes in antimicrobial susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* over time. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 1, 34–41.
- Calambokidis, J., & Barlow, J. (2004). Abundance of Blue and Humpback Whales in the Eastern North Pacific Estimated By Capture-Recapture and Line-Transect Methods. *Marine Mammal Science*, 20(1), 63–85. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2004.tb01141.x>
- Calambokidis, J., Barlow, J., Ford, J. K. B., Chandler, T. E., & Douglas, A. B. (2009). Insights into the population structure of blue whales in the Eastern North Pacific from recent sightings and photographic identification. *Marine Mammal Science*, 25(4), 816–832. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2009.00298.x>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME Journal*, 11, 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Cameron, C. E., Zuerner, R. L., Raverty, S., Colegrove, K. M., Norman, S. A., Lambourn, D. M., Jeffries, S. J., & Gulland, F. M. (2008). Detection of pathogenic *Leptospira* bacteria in pinniped populations via PCR and identification of a source of transmission for zoonotic leptospirosis in the marine environment. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1728–1733. <https://doi.org/10.1128/JCM.02022-07>
- Campo, A. M., & Duval, V. S. (2014). Diversidad y valor de importancia para la conservación de la vegetación natural. Parque Nacional Lihué Calel (Argentina). *Anales de Geografía de la Universidad Complutense*, 34(2), 25–42. [https://doi.org/10.5209/rev\\_AGUC.2014.v34.n2.47071](https://doi.org/10.5209/rev_AGUC.2014.v34.n2.47071)
- Cannon, J. G., & St. Pierre, B. A. (1997). Gender differences in host defense mechanisms. *Journal of Psychiatric Research*, 31(1), 99–113.
- Carabias, J., de la Maza, J., Gutierrez, D., Gómez, M., & Bermúdez, B. (2000). Descripción del Área. En *Programa de Manejo Parque Nacional Bahía de Loreto* (1era ed., pp. 15–36). <https://issuu.com/ecoalianza/docs/320>

- Cardoso, P., Rigal, F., & Carvalho, J. C. (2015). BAT - Biodiversity Assessment Tools, an R package for the measurement and estimation of alpha and beta taxon, phylogenetic and functional diversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(2), 232–236. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12310>
- Caruso, V., Song, X., Asquith, M., & Karstens, L. (2019). Performance of Microbiome Sequence Inference Methods in Environments with Varying Biomass. *mSystems*, 4(1), e00163-18. <https://doi.org/10.1128/msystems.00163-18>
- Carvalho, J. C., Cardoso, P., & Gomes, P. (2012). Determining the relative roles of species replacement and species richness differences in generating beta-diversity patterns. *Global Ecology and Biogeography*, 21(7), 760–771. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2011.00694.x>
- Caut, S., Laran, S., Garcia-Hartmann, E., & Das, K. (2011). Stable isotopes of captive cetaceans (killer whales and bottlenose dolphins). *Journal of Experimental Biology*, 214(4), 538–545. <https://doi.org/10.1242/jeb.045104>
- Centelleghes, C., Carraro, L., Gonzalvo, J., Rosso, M., Esposti, E., Gili, C., Bonato, M., Pedrotti, D., Cardazzo, B., Povinelli, M., & Mazzariol, S. (2020). The use of Unmanned Aerial Vehicles (UAVs) to sample the blow microbiome of small cetaceans. *PloS one*, 15(7), e0235537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235537>
- Chaban, B., Albert, A., Links, M. G., Gardy, J. L., Tang, P., & Hill, J. E. (2013). Characterization of the Upper Respiratory Tract Microbiomes of Patients with Pandemic H1N1 Influenza. *PLoS ONE*, 8(7), e69559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069559>
- Chan, D. K. P., Tsui, H. C. L., & Kot, B. C. W. (2017). Database documentation of marine mammal stranding and mortality: Current status review and future prospects. *Diseases of Aquatic Organisms*, 126, 247–256. <https://doi.org/10.3354/dao03179>
- Chan, Y. K., Estaki, M., & Gibson, D. L. (2013). Clinical consequences of diet-induced dysbiosis. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 63(SUPPL.2), 28–40. <https://doi.org/10.1159/000354902>
- Chao, A., & Jost, L. (2015). Estimating diversity and entropy profiles via discovery rates of new species. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(8), 873–882. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12349>
- Charlson, E. S. (2012). *The human respiratory tract microbiome in health and disease*.

- Charlson, E. S., Bittinger, K., Chen, J., Diamond, J. M., Li, H., Collman, R. G., & Bushman, F. D. (2012). Assessing Bacterial Populations in the Lung by Replicate Analysis of Samples from the Upper and Lower Respiratory Tracts. *PLoS ONE*, 7(9), e42786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042786>
- Chen, J., Bittinger, K., Charlson, E. S., Hoffmann, C., Lewis, J., Wu, G. D., Collman, R. G., Bushman, F. D., & Li, H. (2012). Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics*, 28(16), 2106–2113. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts342>
- Chen, K., & Pachter, L. (2005). Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. *PLoS Computational Biology*, 1(2), 0106–0112. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010024>
- Chiarello, M, Villéger, S., Bouvier, C., Auguet, J. C., & Bouvier, T. (2017). Captive bottlenose dolphins and killer whales harbor a species-specific skin microbiota that varies among individuals. *Scientific Reports*, 7, 15269. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15220-z>
- Chiarello, Marlène, Villéger, S., Bouvier, C., Bettarel, Y., & Bouvier, T. (2015). High diversity of skin-associated bacterial communities of marine fishes is promoted by their high variability among body parts, individuals and species. *FEMS Microbiology Ecology*, 91, 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv061>
- Choi, W., Yang, A. X., Waltenburg, M. A., Choe, S., Steiner, M., Radwan, A., Lin, J., Maddox, C. W., Stern, A. W., Fredrickson, R. L., & Lau, G. W. (2019). FOXA2 depletion leads to mucus hypersecretion in canine airways with respiratory diseases. *Cellular Microbiology*, 21, e12957. <https://doi.org/10.1111/cmi.12957>
- Christiansen, F., Dujon, A. M., Sprogis, K. R., Arnould, J. P. Y., & Bejder, L. (2016). Noninvasive unmanned aerial vehicle provides estimates of the energetic cost of reproduction in humpback whales. *Ecosphere*, 7(10). <https://doi.org/10.1002/ECS2.1468>
- Chu, N. D., & Vollmer, S. V. (2016). Caribbean corals house shared and host-specific microbial symbionts over time and space. *Environmental Microbiology Reports*, 8(4), 493–500. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12412>
- Clapham, P. J. (2016). Managing leviathan: Conservation challenges for the great whales in a post-whaling world. *Oceanography*, 29(3), 214–225. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2016.70>

- Clauset, A., Newman, M. E. J., & Moore, C. (2004). Finding community structure in very large networks. *Physical Review E - Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*, 70, 1–6. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.70.066111>
- Colagross-Schouten, A. M., Mazet, J. A. K., Gulland, F. M. D., Miller, M. A., & Hietala, S. (2002). Diagnosis and seroprevalence of leptospirosis in California sea lions from coastal California. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(1), 7–17. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-38.1.7>
- Colegrove, K. M., Greig, D. J., & Gulland, F. M. D. (2005). Causes of Live Strandings of Northern Elephant Seals (*Mirounga angustirostris*) and Pacific Harbor Seals (*Phoca vitulina*) Along the Central California Coast, 1992-2001. *Aquatic Mammals*, 31(1), 1–10. <https://doi.org/10.1578/am.31.1.2005.1>
- CONANP-SEMARNAT. (2018). *Manual para la observación pasiva de ballena azul y otros cetáceos en el Golfo de California*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- CONANP. (2016). Parque Nacional Bahía de Loreto. En *Fichas de evaluación ecológica de áreas naturales protegidas del noroeste de México* (p. 240). [https://simec.conanp.gob.mx/pdf\\_score/6.pdf](https://simec.conanp.gob.mx/pdf_score/6.pdf)
- Cossaboon, J. M., Hoh, E., Chivers, S. J., Weller, D. W., Danil, K., Maruya, K. A., & Dodder, N. G. (2019). Apex marine predators and ocean health: Proactive screening of halogenated organic contaminants reveals ecosystem indicator species. *Chemosphere*, 221, 656–664. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.050>
- Costa-Urrutia, P., Sanvito, S., Victoria-Cota, N., Enríquez-Paredes, L., & Gendron, D. (2013). Fine-Scale Population Structure of Blue Whale Wintering Aggregations in the Gulf of California. *PLoS ONE*, 8(3), e58315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058315>
- Coulombe, H. N., Ridgway, S. H., & Evans, W. E. (2018). *Respiratory Water Exchange in Two Species of Porpoise Published by : American Association for the Advancement of Science*  
Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1715927> L . TRACHEA ` - MUSCLE TISSUE. 149(3679), 86–88.
- Coyte, K., Rao, C., Rakoff-Nahoum, S., & Foster, K. (2019). Community assembly in the microbiome: ecological insights into infant microbiome development. *Access Microbiology*, 1(1A), 241. <https://doi.org/10.1099/acmi.ac2019.po0102>
- Coyte, K. Z., Schluter, J., & Foster, K. R. (2015). The ecology of the microbiome: Networks,

- competition, and stability. *Science*, 350(6261), 663–666.  
<https://doi.org/10.1126/science.aad2602>
- Coyte, Katharine Z, Schluter, J., & Foster, K. R. (2015). The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science*, 350(6261), 663–666.  
<https://doi.org/10.1126/science.aad2602>
- Croll, D. A., Acevedo-gutierrez, A., Tershy, B. R., & Urban-ramirez, J. (2001). The diving behavior of blue and fin whales: is dive duration shorter than expected based on oxygen stores? *Comparative Biochemistry and Physiology*, 129, 797–809.
- Croll, D. A., Tershy, B. R., Hewitt, R. P., Demer, D. A., Fiedler, P. C., Smith, S. E., Armstrong, W., Popp, J. M., Kiekhefer, T., Lopez, V. R., Urban, J., & Gendron, D. (1998). An integrated approach to the foraging ecology of marine birds and mammals. *Deep-Sea Research II*, 45, 1353–1371.
- Cui, L., Morris, A., Huang, L., Beck, J. M., Twigg, H. L., von Mutius, E., & Ghedin, E. (2014). The Microbiome and the Lung. *Annals of the American Thoracic Society*, 11(Supplement 4), S227–S232. <https://doi.org/10.1513/annalsats.201402-052pl>
- Curzer, H., Perry, G., Wallace, M., & Perry, D. (2015). The Three Rs of Animal Research : What they Mean for the Institutional Animal Care and Use Committee and Why. *Science and Engineering Ethics*, 22(2), 549–565. <https://doi.org/10.1007/s11948-015-9659-8>
- Dai, W., Wang, H., Zhou, Q., Feng, X., Lu, Z., Li, D., Yang, Z., Liu, Y., Li, Y., Xie, G., Shen, K., Yang, Y., Zheng, Y., & Li, S. (2018). The concordance between upper and lower respiratory microbiota in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia article. *Emerging Microbes and Infections*, 7(1), 92. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0097-y>
- Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to biodiversity and human health. *Science*, 287(5452), 443–449.  
<https://doi.org/10.1126/science.287.5452.443>
- de Boo, M., Rennie, A., Buchanan-Smith, H., & Hendriksen, C. (2005). The interplay between replacement, reduction and refinement: considerations where the Three Rs interact. *Animal Welfare*, 14, 327–332.
- De Steenhuijsen Piters, W. A. A., Huijskens, E. G. W., Wyllie, A. L., Biesbroek, G., Van Den Bergh, M. R., Veenhoven, R. H., Wang, X., Trzcinski, K., Bonten, M. J., Rossen, J. W. A., Sanders, E. A. M., & Bogaert, D. (2016). Dysbiosis of upper respiratory tract microbiota



- in elderly pneumonia patients. *ISME Journal*, 10(1), 97–108. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.99>
- Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Freeman, C. M., McCloskey, L., Beck, J. M., Huffnagle, G. B., & Curtis, J. L. (2015). Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted island model of lung biogeography. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(6), 821–830. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201501-029OC>
- Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Martinez, F. J., & Huffnagle, G. B. (2016a). The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annual Review of Physiology*, 78, 7.1-7.24. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105238>
- Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Martinez, F. J., & Huffnagle, G. B. (2016b). The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annual Review of Physiology*, 78, 7.1-7.24. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105238>
- Dinsdale, E. A., Edwards, R. A., Hall, D., Angly, F., Breitbart, M., Brulc, J. M., Furlan, M., Desnues, C., Haynes, M., Li, L., McDaniel, L., Moran, M. A., Nelson, K. E., Nilsson, C., Olson, R., Paul, J., Brito, B. R., Ruan, Y., Swan, B. K., ... Rohwer, F. (2008). Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature*, 452(7187), 629–632. <https://doi.org/10.1038/nature06810>
- Ditmer, M. A., Vincent, J. B., Werden, L. K., Tanner, J. C., Laske, T. G., Iaizzo, P. A., Garshelis, D. L., & Fieberg, J. R. (2015). Bears Show a Physiological but Limited Behavioral Response to Unmanned Aerial Vehicles. *Current Biology*, 25(17), 2278–2283. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.024>
- Ditmer, M. A., Werden, L. K., Tanner, J. C., Vincent, J. B., Callahan, P., Iaizzo, P. A., Laske, T. G., & Garshelis, D. L. (2018). Bears habituate to the repeated exposure of a novel stimulus, unmanned aircraft systems. *Conservation Physiology*, 6, 1–7. <https://doi.org/10.1093/conphys/coy067>.....Introduction
- Dobritsa, A. P., Reddy, M. C. S., & Samadpour, M. (2010). Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1418–1426. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.009381-0>

- Domiciano, I. G., Domit, C., Broadhurst, M. K., Koch, M. S., & Bracarense, A. P. (2016). Assessing Disease and Mortality among Small Cetaceans Stranded at a World Heritage Site in Southern Brazil. *PLoS ONE*, *11*(2), e0149295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149295>
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(26), 11971–11975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
- Domínguez-Sánchez, C. A., Acevedo-Whitehouse, K. A., & Gendron, D. (2018). Effect of drone-based blow sampling on blue whale (*Balaenoptera musculus*) behavior. *Marine Mammal Science*, *34*(3), 841–850. <https://doi.org/10.1111/mms.12482>
- Dong, X. (2016). The gravity dual of Rényi entropy. *Nature Communications*, *7*(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms12472>
- Dorsey, E. M., Richardson, W. J., & Würsig, B. (1989). Factors affecting surfacing, respiration, and dive behaviour of bowhead whales, *Balaena mysticetus*, summering in the Beaufort Sea. *Canadian Journal of Zoology*, *67*(7), 1801–1815. <https://doi.org/10.1139/z89-257>
- Dris, R., Imhof, H., Sanchez, W., & Gasperi, C. J. (2015). Beyond the ocean : contamination of freshwater ecosystems with (micro-) plastic particles. *Environmental chemistry*, *12*, 539–550. <https://doi.org/10.1029/2007JC004712>
- Durban, J W, Fearnbach, H., Perryman, W. L., & Leroi, D. J. (2015). Photogrammetry of killer whales using a small hexacopter launched at sea 1. *Journal of Unmanned Vehicle Systems*, *3*, 1–5. <https://doi.org/10.1139/juvs-2015-0020>
- Durban, John W., Moore, M. J., Chiang, G., Hickmott, L. S., Bocconcelli, A., Howes, G., Bahamonde, P. A., Perryman, W. L., & LeRoi, D. J. (2016). Photogrammetry of blue whales with an unmanned hexacopter. *Marine Mammal Science*, *32*(4), 1510–1515. <https://doi.org/10.1111/mms.12328>
- Dziak, R. P., Haxel, J. H., Lau, T. K., Heimlich, S., Caplan-Auerbach, J., Mellinger, D. K., Matsumoto, H., & Mate, B. (2017). A pulsed-air model of blue whale B call vocalizations. *Scientific Reports*, *7*, 9122. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09423-7>
- Edgar, R. C. (2018). Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs.

- Bioinformatics*, 34(14), 2371–2375. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty113>
- Eidinger, D., & Garrett, T. J. (1972). Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. *Journal of Experimental Medicine*, 136, 1098–1116. <https://doi.org/10.1084/jem.136.5.1098>
- Eloe-fadrosch, E. A., & Rasko, D. A. (2013). The Human Microbiome: From Symbiosis to Pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, 64, 145–163. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-010312-133513>
- Faner, R., Sibila, O., Agustí, A., Bernasconi, E., Chalmers, J. D., Huffnagle, G. B., Manichanh, C., Molyneaux, P. L., Paredes, R., Brocal, V. P., Ponomarenko, J., Sethi, S., Dorca, J., & Monsó, E. (2017). The microbiome in respiratory medicine: Current challenges and future perspectives. *European Respiratory Journal*, 49(4), 1–12. <https://doi.org/10.1183/13993003.02086-2016>
- Flecknell, P. (2002). Replacement, Reduction and Refinement. *ALTEX*, 19(2), 73–78.
- Foot, N. J., Orgeig, S., & Daniels, C. B. (2006). The evolution of a physiological system: The pulmonary surfactant system in diving mammals. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 154(1–2), 118–138. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2006.04.012>
- Forster, D., Lentendu, G., Filker, S., Dubois, E., Wilding, T. A., & Stoeck, T. (2019). Improving eDNA-based protist diversity assessments using networks of amplicon sequence variants. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14764>
- Fortuna, F. (2017). *Functional estimation of diversity profiles*. 1–13. <https://doi.org/10.1002/env.2645>
- Foster, G., McAuliffe, L., Dagleish, M. P., Barley, J., Howie, F., Nicholas, R. A. J., & Ayling, R. D. (2011). Mycoplasma Species Isolated from Harbor Porpoises (*Phocoena phocoena*) and a Sowerby's Beaked Whale (*Mesoplodon bidens*) Stranded in Scottish Waters. *Journal of Wildlife Diseases*, 47(1), 206–211. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.1.206>
- Foster, K. R., Schluter, J., Coyte, K. Z., & Rakoff-Nahoum, S. (2017). The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash. *Nature*, 548, 43–51. <https://doi.org/10.1038/nature23292>
- Franzosa, E. A., Huang, K., Meadow, J. F., Gevers, D., Lemon, K. P., Bohannan, B. J. M., & Huttenhower, C. (2015). Identifying personal microbiomes using metagenomic codes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(22),

E2930–E2938. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423854112>

- Frazier, K., & Chang, E. B. (2020). Intersection of the Gut Microbiome and Circadian Rhythms in Metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 31(1), 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.08.013>
- Frère, C. H., Krzyszczyk, E., Patterson, E. M., Hunter, S., Ginsburg, A., & Mann, J. (2010). Thar she blows! A novel method for DNA collection from cetacean blow. *PLoS ONE*, 5(8), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012299>
- Freschi, L., Vincent, A. T., Jeukens, J., Emond-Rheault, J. G., Kukavica-Ibrulj, I., Dupont, M. J., Charette, S. J., Boyle, B., & Levesque, R. C. (2019). The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. *Genome Biology and Evolution*, 11(1), 109–120. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy259>
- Fricker, A. M., Podlesny, D., & Fricke, W. F. (2019). What is new and relevant for sequencing-based microbiome research? A mini-review. *Journal of Advanced Research*, 19, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.006>
- Gallacher, D. J., & Kotecha, S. (2016). Respiratory microbiome of new-born infants. *Frontiers in Pediatrics*, 4(10). <https://doi.org/10.3389/fped.2016.00010>
- Garcia-Pichel, F., Zehr, J. P., Bhattacharya, D., & Pakrasi, H. B. (2020). What's in a name? The case of cyanobacteria. *Journal of Phycology*, 56(1), 1–5. <https://doi.org/10.1111/jpy.12934>
- Gendron, D. (1992). Population structure of daytime surface swarms of *Nyctiphanes simplex* (Crustacea: Euphausiacea) in the Gulf of California, Mexico. *Marine Ecology Progress Series*, 87, 1–6. <https://doi.org/10.3354/meps087001>
- Gendron, Diane. (2002). *Ecología poblacional de la ballena azul, Balaenoptera musculus, de la Península de Baja California*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).
- Gendron, Diane, & Ugalde de la Cruz, A. (2012). A new classification method to simplify blue whale photo-identification technique. *Journal of Cetacean Resource Management*, 12(1), 79–84.
- Gendron Laniel, D. (1990). *Relación entre la abundancia de eufausidos y de ballenas azules (Balaenoptera musculus) en el Golfo de California*. Instituto Politecnico Nacional - Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.

- German, R. Z., & Palmer, J. B. (2006). Anatomy and development of oral cavity and pharynx. *GI Motility online*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/gimo5>
- Gilbert, J. A., Quinn, R. A., Debelius, J., Xu, Z. Z., Morton, J., Garg, N., Jansson, J. K., Dorrestein, P. C., & Knight, R. (2016). Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease. *Nature*, 535(7610), 94–103. <https://doi.org/10.1038/nature18850>
- Glendinning, L., Wright, S., Pollock, J., Tennant, P., & Collie, D. (2016). Variability of the Sheep Lung Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(11), 3225–3238. <https://doi.org/10.1128/AEM.00540-16>.Editor
- Godoy-Vitorino, F., Goldfarb, K. C., Karaoz, U., Leal, S., Garcia-Amado, M. A., Hugenholtz, P., Tringe, S. G., Brodie, E. L., & Dominguez-Bello, M. G. (2012). Comparative analyses of foregut and hindgut bacterial communities in hoatzins and cows. *ISME Journal*, 6(3), 531–541. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.131>
- Goebel, M. E., Perryman, W. L., Hinke, J. T., Krause, D. J., Hann, N. A., Gardner, S., & LeRoi, D. J. (2015). A small unmanned aerial system for estimating abundance and size of Antarctic predators. *Polar Biology*, 38(5), 619–630. <https://doi.org/10.1007/s00300-014-1625-4>
- Golicher, D. (2010). *Cómo cuantificar la diversidad de especies usando R*. 1–18. [http://www.dfpd.edu.uy/ceerp/ceerp\\_norte/cn/Biologia/BIODIV/Como\\_cuantificar\\_la\\_diversidad\\_algunos\\_ejercicios.pdf](http://www.dfpd.edu.uy/ceerp/ceerp_norte/cn/Biologia/BIODIV/Como_cuantificar_la_diversidad_algunos_ejercicios.pdf)
- Grahn, N., Olofsson, M., Ellnebo-Svedlund, K., Monstein, H. J., & Jonasson, J. (2003). Identification of mixed bacterial DNA contamination in broad-range PCR amplification of 16S rDNA V1 and V3 variable regions by pyrosequencing of cloned amplicons. *FEMS Microbiology Letters*, 219, 87–91. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01190-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01190-4)
- Gregorius, H. R. (2020). Factorization of joint metacommunity diversity into its marginal components: an alternative to the partitioning of trait diversity. *Theory in Biosciences*. <https://doi.org/10.1007/s12064-020-00316-4>
- Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 244–253. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>.The
- Guass, O., Haapanen, L. M., Dowd, S. E., Širović, A., & McLaughlin, R. W. (2016). Analysis of the microbial diversity in faecal material of the endangered blue whale, *Balaenoptera*

- musculus. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 109(7), 1063–1069. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0698-1>
- Guerrero, M., Urbán, J., & Rojas, L. (2006). *Las ballenas del Golfo de California* (I. N. de Ecología (ed.); Primera). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. <https://doi.org/10.3989/scimar.2003.67n11>
- Guerrini, F., Mari, L., & Casagrandi, R. (2019). Modeling plastics exposure for the marine biota: Risk maps for fin whales in the Pelagos Sanctuary (North-Western Mediterranean). *Frontiers in Marine Science*, 6, 299. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00299>
- Guglielmetti, S., Taverniti, V., Minuzzo, M., Arioli, S., Stuknyte, M., Karp, M., & Mora, D. (2010). Oral bacteria as potential probiotics for the pharyngeal mucosa. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 3948–3958. <https://doi.org/10.1128/AEM.00109-10>
- Guhad, F. (2005). Introduction to the 3Rs (Refinement , Reduction and Replacement). *Contemporary Topics*, 44(2), 58–59.
- Guimarães, P. R., Argollo e Menezes, M., Baird, R. W., Lusseau, D., & Dos Reis, S. F. (2007). Vulnerability of a killer whale social network to disease outbreaks. *Physical Review E*, 76, 042901. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.76.042901>
- Gulland, F. M. D., & Hall, A. J. (2007). Is marine mammal health deteriorating? Trends in the global reporting of marine mammal disease. *EcoHealth*, 4(2), 135–150. <https://doi.org/10.1007/s10393-007-0097-1>
- Haaber, J., Penadés, J. R., & Ingmer, H. (2017). Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 25(11), 893–905. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.011>
- Haegeman, B., Hamelin, J., Moriarty, J., Neal, P., Dushoff, J., & Weitz, J. S. (2013). Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. *The ISME Journal*, 7(6), 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.10>
- Haegeman, B., Sen, B., Godon, J. J., & Hamelin, J. (2014). Only Simpson Diversity can be Estimated Accurately from Microbial Community Fingerprints. *Microbial Ecology*, 68(2), 169–172. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0394-5>
- Hanada, S., Pirzadeh, M., Carver, K. Y., & Deng, J. C. (2018). Respiratory viral infection-induced microbiome alterations and secondary bacterial pneumonia. *Frontiers in Immunology*, 9, 2640. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02640>

- Hauffe, H. C., & Barelli, C. (2019). Conserve the germs: the gut microbiota and adaptive potential. *Conservation Genetics*, 20, 19–27. <https://doi.org/10.1007/s10592-019-01150-y>
- Haulena, M., Gulland, F. M. D., Lawrence, J. A., Fauquier, D. A., Jang, S., Aldridge, B., Spraker, T., Thomas, L. C., Brown, D. R., Wendland, L., & Davidson, M. K. (2013). Lesions Associated With a Novel Mycoplasma Sp. in California Sea Lions (*Zalophus Californianus*) Undergoing Rehabilitation. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(1), 40–45. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.1.40>
- Hausmann, B., Pelikan, C., Rattei, T., Loy, A., & Pester, M. (2018). Growth arrest in the active rare biosphere. *bioRxiv*, 284430. <https://doi.org/10.1101/284430>
- Hernandez-Agreda, A., Gates, R. D., & Ainsworth, T. D. (2017). Defining the Core Microbiome in Corals' Microbial Soup. *Trends in Microbiology*, 25(2), 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.003>
- 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. *Veterinary Journal*, 170, 359–363. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.08.008>
- Hill, M. O. (1973). Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences. *Ecology*, 54(2), 427–432.
- Hill, T. C., Walsh, K. A., Harris, J. A., & Moffett, B. F. (2003). Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 43, 1–11.
- 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(1), e8578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008578>
- Hogg, C., & Rogers, T. (2009). Determination of steroid hormones in whale blow: It is possible. *Marine Mammals Science*, 25(3), 605–618.
- Hogg, C., Rogers, T. L., Shorter, A., Barton, K., Miller, P. J. O., & Nowacek, D. (2009). Determination of steroid hormones in whale blow: It is possible. *Marine Mammal Science*, 25(3), 605–618. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2008.00277.x>
- Hogg, Carolyn. (2005). Development of a non-invasive technique to determine reproductive hormones in cetaceans. En *Atlantic*. <http://prijipati.library.usyd.edu.au/handle/2123/1865>

- Hooper, R., Brealey, J. C., van der Valk, T., Alberdi, A., Durban, J. W., Fearnbach, H., Robertson, K. M., Baird, R. W., Hanson, M. B., Wade, P., Gilbert, M. T. P., Morin, P. A., Wolf, J. B. W., Foote, A. D., & Guschanski, K. (2018). Host-derived population genomics data provides insights into bacterial and diatom composition of the killer whale skin. *Molecular Ecology*, *March*, 1–19. <https://doi.org/10.1111/mec.14860>
- Hooper, L. V., Littman, D., & Macpherson, A. (2012). Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science*, *336*(1268), 1223490. <https://doi.org/10.1126/science.1223490>
- Hosseini, S. M., Toldo, C., & Yaakov, I. (2019). *Supersymmetric R\'enyi entropy and charged hyperbolic black holes*. 07. <http://arxiv.org/abs/1912.04868>
- Huang, Y. J., & Boushey, H. A. (2015). The sputum microbiome in chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Annals of the American Thoracic Society*, *12*(November), S176–S180. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201506-319AW>
- Huang, Y. J., Charlson, E. S., Collman, R. G., Colombini-Hatch, S., Martinez, F. D., & Senior, R. M. (2013). The role of the lung microbiome in health and disease: A national heart, lung, and blood institute workshop report. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *187*(12), 1382–1387. <https://doi.org/10.1164/rccm.201303-0488WS>
- Huang, Y., Yang, B., & Li, W. (2016). Defining the normal core microbiome of conjunctival microbial communities. *Clinical Microbiology and Infection*, *22*(7), 643.e7–643.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.008>
- Huffnagle, G. B., Dickson, R. P., & Lukacs, N. W. (2017). The respiratory tract microbiome and lung inflammation: A two-way street. *Mucosal Immunology*, *10*(2), 299–306. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.108>
- Hunt, K. E., Moore, M. J., Rolland, R. M., Kellar, N. M., Hall, A. J., Kershaw, J., Raverty, S. A., Davis, C. E., Yeates, L. C., Fauquier, D. A., Rowles, T. K., & Kraus, S. D. (2013). *Overcoming the challenges of studying conservation physiology in large whales : a review of available methods*. *1*(January), 1–24. <https://doi.org/10.1093/conphys/cot006>
- Huse, S. M., Ye, Y., Zhou, Y., & Fodor, A. A. (2012). A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. *PLoS ONE*, *7*(6), e34242. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034242>
- Iknayan, K. J., Tingley, M. W., Furnas, B. J., & Beissinger, S. R. (2014). Detecting diversity:



- Emerging methods to estimate species diversity. *Trends in Ecology and Evolution*, 29(2), 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.10.012>
- Ilangakoon, A. (2012). Exploring anthropogenic activities that threaten endangered blue whales (*Balaenoptera musculus*) off Sri Lanka. *Journal of Marine Animals and their Ecology*, 5(1), 3–7.
- Ingala, M. R., Simmons, N. B., Wultsch, C., Krampis, K., Speer, K. A., & Perkins, S. L. (2018). Comparing microbiome sampling methods in a wild mammal: Fecal and intestinal samples record different signals of host ecology, evolution. *Frontiers in Microbiology*, 9, 803. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00803>
- Invernizzi, R., Lloyd, C. M., & Molyneaux, P. L. (2020). Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs. *Immunology*, 160, 171–182. <https://doi.org/10.1111/imm.13195>
- Ivoševi, B., Han, Y., Cho, Y., & Kwon, O. (2015). The use of conservation drones in ecology and wildlife research. *Journal of Ecology Environment*, 38(1), 113–118. <https://doi.org/10.5141/ecoenv.2015.012>
- Jami, E., Shterzer, N., & Mizrahi, I. (2014). Evaluation of Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis for Bacterial Fingerprinting of Rumen Microbiome Compared to Pyrosequencing Technology. *Pathogens*, 3, 109–120. <https://doi.org/10.3390/pathogens3010109>
- Jensen-Fangel, S., Mohey, R., Johnsen, S. P., Andersen, P. L., Toft Sørensen, H., & Østergaard, L. (2004). Gender differences in hospitalization rates for respiratory tract infections in Danish youth. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 36, 31–36. <https://doi.org/10.1080/00365540310017618>
- Jiao, S., Wang, J., Wei, G., Chen, W., & Lu, Y. (2019). Dominant role of abundant rather than rare bacterial taxa in maintaining agro-soil microbiomes under environmental disturbances. *Chemosphere*, 235, 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.174>
- Jiménez, J., & Mulero-Pázmány. (2019). Drones for Conservation in Protected Areas : Present and Future. *Drones*, 3(1), 1–23. <https://doi.org/10.3390/drones3010010>
- Johnson, K. V. A., & Burnet, P. W. J. (2016). Microbiome: Should we diversify from diversity? *Gut Microbes*, 7(6), 455–458. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1241933>
- Johnson, W. R., Torralba, M., Fair, P. A., Bossart, G. D., Nelson, K. E., & Morris, P. J. (2009).

- Novel diversity of bacterial communities associated with bottlenose dolphin upper respiratory tracts. *Environmental Microbiology Reports*, 1(6), 555–562. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00080.x>
- Jost, L. (2007). Partitioning diversity into independent alpha and beta components. *Ecology*, 88(10), 2427–2439. <https://doi.org/10.1890/06-1736.1>
- Joyce, K. E., Duce, S., Leahy, S. M., Leon, J., & Maier, S. W. (2018). Principles and practice of acquiring drone-based image data in marine environments. *Marine and Freshwater Research*, 70, 952–963.
- Kéki, Z., Grébner, K., Bohus, V., Márialigeti, K., & Tóth, E. (2013). Application of special oligotrophic media for cultivation of bacterial communities originated from ultrapure water. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 60(3), 345–357. <https://doi.org/10.1587/transcom.E98.B.1640>
- Kelly, B. J., Gross, R., Bittinger, K., Sherrill-Mix, S., Lewis, J. D., Collman, R. G., Bushman, F. D., & Li, H. (2015). Power and sample-size estimation for microbiome studies using pairwise distances and PERMANOVA. *Bioinformatics*, 31(15), 2461–2468. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv183>
- Kemper, C. M., Tomo, I., Bingham, J., Bastianello, S. S., Wang, J., Gibbs, S. E., Woolford, L., Dickason, C., & Kelly, D. (2016). Morbillivirus-associated unusual mortality event in South Australian bottlenose dolphins is largest reported for the Southern Hemisphere. *Royal Society Open Science*, 3(12), 160838. <https://doi.org/10.1098/rsos.160838>
- Kershaw, J. L., & Hall, A. J. (2016). Seasonal variation in harbour seal (*Phoca vitulina*) blubber cortisol - A novel indicator of physiological state? *Scientific Reports*, 6, 21889. <https://doi.org/10.1038/srep21889>
- Kim, B.-R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., Lee, J. H., Kim, H. B., & Isaacson, R. E. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 2089–2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Klinger, G., Eick, S., Klinger, G., Pfister, W., Gräser, T., Moore, C., & Oettel, M. (1998). Influence of hormonal contraceptives on microbial flora of gingival sulcus. *Contraception*, 57, 381–384. [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(98\)00044-4](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(98)00044-4)
- Knights, D., Kuczynski, J., Charlson, E. S., Zaneveld, J., Mozer, M. C., Collman, R. G.,

- Bushman, F. D., Knight, R., & Kelley, S. T. (2013). Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nature Methods*, 8(9), 761–763. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1650>. Bayesian
- Koleff, P., Gaston, K., & Lennon, J. (2003). Measuring beta diversity for presence-absence data. *Journal of Animal Ecology*, 72, 367–382. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2003.00710.x>
- Kooyman, G. L. (1973). Respiratory adaptations in marine mammals. *American Zoologist*, 13, 457–468. <https://doi.org/10.1093/icb/13.2.457>
- Kouyos, R. D., Salathé, M., & Bonhoeffer, S. (2007). The Red Queen and the persistence of linkage-disequilibrium oscillations in finite and infinite populations. *BMC evolutionary biology*, 7, 211. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-211>
- Kremen, C., & Ostfeld, R. S. (2005). A call to ecologists: Measuring, analyzing, and managing ecosystem services. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 3(10), 540–548. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2005\)003\[0540:ACTEMA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2005)003[0540:ACTEMA]2.0.CO;2)
- Lahti, L., Shetty, S., Blake, T., & Salajarvi, J. (2017). *Tools for microbiome analysis in R*. <http://microbiome.github.com/microbiome>
- Langevin, S., Pichon, M., Smith, E., Morrison, J., Bent, Z., Green, R., Barker, K., Solberg, O., Gillet, Y., Javouhey, E., Lina, B., Katze, M. G., & Josset, L. (2017). Early nasopharyngeal microbial signature associated with severe influenza in children: A retrospective pilot study. *Journal of General Virology*, 98, 2425–2437. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000920>
- Leeper, R. (2019). The Role of Slower Vessel Speeds in Reducing Greenhouse Gas Emissions, Underwater Noise and Collision Risk to Whales. *Frontiers in Marine Science*, 6, 505. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00505>
- Legendre, P., Borcard, D., & Pres-Nieto, P. (2005). Analyzing beta diversity: Partitioning the spatial variation of community composition data. *Ecological Monographs*, 4, 435–450.
- Lemon, K. P., Klepac-Ceraj, V., Schiffer, H. K., Brodie, E. L., Lynch, S. V., & Kolter, R. (2010). Comparative Analyses of the Bacterial Microbiota of the Human Nostril and Oropharynx. *mBio*, 1(3), e00129-10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00129-10>. Editor
- Lenzi, E. K., Mendes, R. S., & Da Silva, L. R. (2000). Statistical mechanics based on Renyi entropy. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 280(3), 337–345. [https://doi.org/10.1016/S0378-4371\(00\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4371(00)00007-8)

- Levy, M., Bassis, C. M., Kennedy, E., Yoest, K. E., Becker, J. B., Bell, J., Berger, M. B., & Bruns, T. M. (2020). The rodent vaginal microbiome across the estrous cycle and the effect of genital nerve electrical stimulation. *Plos One*, *15*(3), e0230170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230170>
- Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P., Roy, R., Bircher, J. S., Schlegel, M. L., Tucker, T. A., Mark, D., Knight, R., & Gordon, J. I. (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, *320*(5883), 1647–1651. <https://doi.org/10.1126/science.1155725>. Evolution
- Li, C., Tan, X., Bai, J., Xu, Q., Liu, S., Guo, W., Yu, C., Fan, G., Lu, Y., Zhang, H., Yang, H., Chen, J., & Liu, X. (2019). A survey of the sperm whale (*Physeter catodon*) commensal microbiome. *PeerJ*, *7*, e7257. <https://doi.org/10.7717/peerj.7257>
- Li, K., Bihan, M., Yooseph, S., & Methé, B. (2012). Analyses of the Microbial Diversity across the Human Microbiome. *PloS one*, *7*(6), e32118. <https://doi.org/10.1371/Citation>
- Lima, L., Weissman, M., Reed, M., Papudeshi, B., Alker, A. T., Morris, M., Edwards, R. A., de Putron, S. J., Vaidya, N. K., & Dinsdale, E. A. (2020). Modeling of the Coral Microbiome: the Influence of Temperature and Microbial Network. *mBio*, *11*(2), e02691-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02691-19>
- Lima, N., Rogers, T., Acevedo-Whitehouse, K. A., & Brown, M. V. (2012). Temporal stability and species specificity in bacteria associated with the bottlenose dolphins respiratory system. *Environmental Microbiology Reports*, *4*(1), 89–96. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00306.x>
- Lima, S. F., Teixeira, A. G. V., Higgins, C. H., Lima, F. S., & Bicalho, R. C. (2016). The upper respiratory tract microbiome and its potential role in bovine respiratory disease and otitis media. *Scientific Reports*, *6*(June), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep29050>
- Linklater, W. L., & Gedir, J. V. (2011). Distress unites animal conservation and welfare towards synthesis and collaboration. *Animal Conservation*, *14*(1), 25–27. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2010.00399.x>
- Lira-lucio, J. A., Ram, A., Buend, I., Rojas-serrano, J., Mej, M., & Gloria, P. (2020). Lung Microbiome Participation in Local Immune Response Regulation in Respiratory Diseases. *Microorganisms*, *8*, 1059.
- Little, A. E. F., Robinson, C. J., Peterson, S. B., Raffa, K. F., & Handelsman, J. (2008). Rules

- of Engagement: Interspecies Interactions that Regulate Microbial Communities. *Annual Review of Microbiology*, 62, 375–401.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.030608.101423>
- Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Rahnavard, G., Crabtree, J., Orvis, J., Hall, A. B., Brady, A., Creasy, H. H., McCracken, C., Giglio, M. G., McDonald, D., Franzosa, E. A., Knight, R., White, O., & Huttenhower, C. (2017). Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature*, 550(7674), 61–66.  
<https://doi.org/10.1038/nature23889>
- Lockyer, C. (1984). Review of baleen whale (Mysticeti) reproduction and implications for management. *Reproduction in whales, dolphins and porpoises. Proc. conference, La Jolla, CA, 1981, January 1984*, 27–50.
- Lozupone, C. A., Hamady, M., Kelley, S. T., & Knight, R. (2007). Quantitative and qualitative  $\beta$  diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1576–1585.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01996-06>
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489(7415), 220–230.  
<https://doi.org/10.1038/nature11550>.Diversity
- Ma, Z. S. (2018). Measuring Microbiome Diversity and Similarity with Hill Numbers. En *Metagenomics: Perspectives, Methods, and Applications*. Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102268-9.00008-2>
- Mackenzie, B. W., Waite, D. W., Hoggard, M., Taylor, M. W., Biswas, K., & Douglas, R. G. (2017a). *Moving beyond descriptions of diversity: clinical and research implications of bacterial imbalance in chronic rhinosinusitis* \*. 291–297.
- Mackenzie, B. W., Waite, D. W., Hoggard, M. W., Taylor, M., Biswas, K., & Douglas, R. G. (2017b). Moving beyond descriptions of diversity: clinical and research implications of bacterial imbalance in chronic rhinosinusitis. *Rhinology journal*, 55(4), 291–297.  
<https://doi.org/10.4193/Rhino17.135>
- Magurran, A. E. (2004). 2-4\_MeasuringBiologicalDiversity. En *Measuring biological diversity* (pp. 19–215).
- Magurran, A. E., & Dornelas, M. (2010). Biological diversity in a changing world.

- Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1558), 3593–3597. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0296>
- Man, W. H., De Steenhuijsen Piters, W. A. A., & Bogaert, D. (2017). The microbiota of the respiratory tract: Gatekeeper to respiratory health. *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 259–270. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.14>
- Marón, C. F., Kohl, K. D., Chirife, A., Di Martino, M., Fons, M. P., Navarro, M. A., Beingesser, J., McAloose, D., Uzal, F. A., Dearing, M. D., Rowntree, V. J., & Uhart, M. (2019). Symbiotic microbes and potential pathogens in the intestine of dead southern right whale (*Eubalaena australis*) calves. *Anaerobe*, 57, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.04.003>
- Marris, E. (2013). FLY , AND BRING ME DATA. *Nature*, 498, 156–158. <https://doi.org/10.1038/498156a>
- Marrugan, A. (2004). Introduction: measurement of (biological) diversity. En *Measuring biological diversity* (pp. 1–17). Blackwell Science.
- Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489(7415), 231–241. <https://doi.org/10.1038/nature11551>
- McCallum, H., Harvell, D., & Dobson, A. (2003). Rates of spread of marine pathogens. *Ecology Letters*, 6(12), 1062–1067. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00545.x>
- Mcfarland, L. V. (2000). Normal flora: diversity and functions. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12, 193–207.
- McMahon, C. R., Harcourt, R., Bateson, P., & Hindell, M. A. (2012). Animal welfare and decision making in wildlife research. *Biological Conservation*, 153, 254–256. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.05.004>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Melcón, M. L., Cummins, A. J., Kerosky, S. M., Roche, L. K., Wiggins, S. M., & Hildebrand, J. A. (2012). Blue Whales Respond to Anthropogenic Noise. *PLoS ONE*, 7(2), 32681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032681>
- Miller, N. J. (2005). *The evolution of a physiological system: The pulmonary surfactant system*

- in diving mammals* [University of Adelaide]. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2006.04.012>
- Mohammadi, T., Reesink, H. W., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Savelkoul, P. H. M. (2005). Removal of contaminating DNA from commercial nucleic acid extraction kit reagents. *Journal of Microbiological Methods*, *61*, 285–288. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.11.018>
- Molina-Ferriol, M., & Merle-Farinós, H. (2012). Los componentes alfa, beta y gamma de la biodiversidad. Aplicación al estudio de comunidades vegetales. *Universidad Politécnica de Valencia*, *10*.
- Moore, S. E. (2008). Marine mammals as ecosystem sentinels. *Journal of Mammalogy*, *89*(3), 534–540. <https://doi.org/10.1644/07-MAMM-S-312R1.1>
- Mora Mora, M. (1998). Moraxella Catarrhalis en tracto respiratorio inferior. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, *19*(3–4), 181–187. [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-29481998000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29481998000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- Moreno, C. E. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. *M&T - Manuales y Tesis SEA*, *1*, 84. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103709>
- Moreno, C. E., Calderón-Patrón, J. M., Martín-Regalado, N., Martínez-Falcón, A. P., Ortega-Martínez, I. J., Rios-Díaz, C. L., & Rosas, F. (2018). Measuring species diversity in the tropics: a review of methodological approaches and framework for future studies. *Biotropica*, *50*(6), 929–941. <https://doi.org/10.1111/btp.12607>
- Moreno, C. E., & Rodríguez, P. (2010). A consistent terminology for quantifying species diversity? *Oecologia*, *163*, 279–282. <https://doi.org/10.1007/s00442-010-1812-0>
- Morris, K., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T. S., Meiners, T., Müller, C., Obermaier, E., Prati, D., Socher, S. A., Sonnemann, I., Wäschke, N., Wubet, T., Wurst, S., & Rillig, M. C. (2014). Choosing and using diversity indices: Insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecology and Evolution*, *4*(18), 3514–3524. <https://doi.org/10.1002/ece3.1155>
- Morris, P. J., Johnson, W. R., Pisani, J., Bossart, G. D., Adams, J., Reif, J. S., & Fair, P. A. (2011). Isolation of culturable microorganisms from free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the southeastern United States. *Veterinary Microbiology*, *148*(2–4), 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.025>

- Mouton, M., & Botha, A. (2012). Cutaneous lesions in cetaceans: An indicator of ecosystem status? En A. Romero & E. O. Keith (Eds.), *New Approaches to the Study of Marine Mammals* (pp. 123–144). InTech.
- Mulero-Pázmány, M., Jenni-Eiermann, S., Strebel, N., Sattler, T., Negro, J., & Tablado, Z. (2017). Unmanned aircraft systems as a new source of disturbance for wildlife: A systematic review. *PloS one*, *12*(6), e0178448.
- Murphy, S. A. (2013). Data Visualization and Rapid Analytics: Applying Tableau Desktop to Support Library Decision-Making. *Journal of Web Librarianship*, *7*(4), 465–476. <https://doi.org/10.1080/19322909.2013.825148>
- Nabi, G., Hao, Y., Zeng, X., Jinsong, Z., McLaughlin, R. W., & Wang, D. (2017). Hematologic and biochemical differences between two free ranging Yangtze finless porpoise populations: The implications of habitat. *PLoS ONE*, *12*(11), e0188570. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188570>
- Nagpal, R., Mainali, R., Ahmadi, S., Wang, S., Singh, R., Kavanagh, K., Kitzman, D. W., Kushugulova, A., Marotta, F., & Yadav, H. (2018). Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutrition and Healthy Aging*, *4*(4), 267–285. <https://doi.org/10.3233/NHA-170030>
- Nelms, S. E., Barnett, J., Brownlow, A., Davison, N. J., Deaville, R., Galloway, T. S., Lindeque, P. K., Santillo, D., & Godley, B. J. (2019). Microplastics in marine mammals stranded around the British coast: ubiquitous but transitory? *Scientific Reports*, *9*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37428-3>
- Nelson, T., Apprill, A., Mann, J., Rogers, T. L., & Brown, M. V. (2015). The marine mammal microbiome: current knowledge and future directions. *Microbiology Australia in Focus*, *36*(1), 8. <https://doi.org/10.1071/MA15004>
- Nelson, T., Rogers, T. L., & Brown, M. V. (2013). The gut bacterial community of mammals from marine and terrestrial habitats. *PLoS ONE*, *8*(12), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083655>
- Nelson, T., Wallen, M. M., Bunce, M., Oskam, C. L., Lima, N., Clayton, L., & Mann, J. (2019). Detecting respiratory bacterial communities of wild dolphins: implications for animal health. *Marine Ecology Progress Series*, *622*, 203–217.
- Newbold, C. J., & Ramos-Morales, E. (2020). Review: Ruminal microbiome and microbial



- metabolome: Effects of diet and ruminant host. *Animal*, 14(S1), S78–S86. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003252>
- Newman, M. E. J. (2004). Fast algorithm for detecting community structure in networks. *Physical Review E - Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*, 69, 1–5. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.69.066133>
- Newman, M. E. J., & Girvan, M. (2004). Finding and evaluating community structure in networks. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 69, 1–15. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.69.026113>
- Nishida, A. H., & Ochman, H. (2018). Rates of gut microbiome divergence in mammals. *Molecular Ecology*, 27(8), 1884–1897. <https://doi.org/10.1111/mec.14473>
- Nishiwaki, M. (1952). On the age-determination of Mysticoceti, chiefly blue and fin whales. *Sci. Rpts. Whales Res. Inst.*, 7(December 1950), 87–119.
- Norman, S. A. (2008). Spatial epidemiology and GIS in marine mammal conservation medicine and disease research. *EcoHealth*, 5(3), 257–267. <https://doi.org/10.1007/s10393-008-0185-x>
- Obusan, M. C. M., Villanueva, R. M. D., Siringan, M. A. T., Rivera, W. L., & Aragonés, L. V. (2019). *Leptospira* spp. And *Toxoplasma gondii* in stranded representatives of wild cetaceans in the Philippines. *BMC Veterinary Research*, 15, 372. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2112-5>
- Ohishi, K., Amano, M., Nakamatsu, K., Miyazaki, N., Tajima, Y., Yamada, T. k., Matsuda, A., Ochiai, M., Matsuishi, T. f., Taru, H., Iwao, H., & Maruyama, T. (2020). Serologic survey of *Brucella* infection in cetaceans inhabiting along the coast of Japan. *Wildlife Science*, 82(1), 43–46.
- Ojha, A., Sinha, D. K., Padmakumari, A. P., Bentur, J. S., & Nair, S. (2017). Bacterial Community Structure in the Asian Rice Gall Midge Reveals a Varied Microbiome Rich in Proteobacteria. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09791-0>
- Oksanen, J., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, H. H., & Szoecs, E. (2019). *vegan: Community Ecology Package* (2.5.4). <http://cran.r-project.org/package=vegan>
- Olivares-Mendez, M. A., Fu, C., Ludivig, P., Bissyandé, T. F., Kannan, S., Zurad, M., Annaiyan,

- A., Voos, H., & Campoy, P. (2015). Towards an Autonomous Vision-Based Unmanned Aerial System against Wildlife Poachers. *Sensors*, *15*, 31362–31391. <https://doi.org/10.3390/s151229861>
- Olsen, N. J., & Kovacs, W. J. (1996). Gonadal steroids and immunity. *Endocrine Reviews*, *17*(4), 369–384. <https://doi.org/10.1210/er.17.4.369>
- Ortega-Ortiz, C. D., Gómez-Muñoz, V. M., & Gendron, D. (2018). Allometry and morphometry of blue whales photographed in the Gulf of California: Insights into subspecies taxonomy in the Eastern North Pacific. *Endangered Species Research*, *37*, 183–194. <https://doi.org/10.3354/esr00910>
- Owen, K., Jenner, C. S., Jenner, M. N. M., & Andrews, R. D. (2016). A week in the life of a pygmy blue whale: Migratory dive depth overlaps with large vessel drafts. *Animal Biotelemetry*, *4*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40317-016-0109-4>
- Ozkan, J., Nielsen, S., Diez-Vives, C., Coroneo, M., Thomas, T., & Willcox, M. (2017). Temporal Stability and Composition of the Ocular Surface Microbiome. *Scientific Reports*, *7*(1), 9880. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10494-9>
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., & Olsen, G. J. (1986). The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences. En K. C. Marshall (Ed.), *Advances in Microbial Ecology*. *Advances in Microbial Ecology*.
- Pachiadaki, M. G., Brown, J. M., Brown, J., Bezuidt, O., Berube, P. M., Biller, S. J., Poulton, N. J., Burkart, M. D., La Clair, J. J., Chisholm, S. W., & Stepanauskas, R. (2019). Charting the Complexity of the Marine Microbiome through Single-Cell Genomics. *Cell*, *179*(7), 1623–1635. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.017>
- Paniagua-Mendoza, A., Gendron, D., Romero-Vivas, E., & Hildebrand, J. A. (2017). Seasonal acoustic behavior of blue whales (*Balaenoptera musculus*) in the Gulf of California, Mexico. *Marine Mammal Science*, *33*(1), 206–218. <https://doi.org/10.1111/mms.12362>
- Parsons, E. C. M. (2012). The Negative Impacts of Whale-Watching. *Journal of Marine Biology*, *2012*, 807294. <https://doi.org/10.1155/2012/807294>
- Parsons, K. M., Durban, J. W., & Claridge, D. E. (2003). Comparing two alternative methods for sampling small cetaceans for molecular analysis. *Marine Mammal Science*, *19*(1), 224–231. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2003.tb01104.x>
- Peltier, H., Beaufils, A., Cesarini, C., Dabin, W., Dars, C., Demaret, F., Dhermain, F., Doremus,

- G., Labach, H., Van Canneyt, O., & Spitz, J. (2019). Monitoring of Marine Mammal Strandings Along French Coasts Reveals the Importance of Ship Strikes on Large Cetaceans: A Challenge for the European Marine Strategy Framework Directive. *Frontiers in Marine Science*, 6, 486. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00486>
- Penny, S. G., White, R. L., Scott, D. M., Mactavish, L., Pernetta, A. P., & Penny, S. G. (2019). Using drones and sirens to elicit avoidance behaviour in white rhinoceros as an anti-poaching tactic. *Proceeding of Royal Society B*, 286, 20191135.
- Pereira Da Silva, J. J., Dalston, M. O., De Carvalho, J. E. M., Setúbal, S., De Oliveira, J. M. C., & Pereira, M. M. (2002). Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(4), 395–399. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822002000400017>
- Pereyra, L. C., & Moreno, C. E. (2013). Divide and conquer: A review of methods to partition the regional species diversity into its alpha and beta components. *Revista Chilena de Historia Natural*, 86(3), 231–239. <https://doi.org/10.4067/s0716-078x2013000300001>
- Pershing, A. J., Christensen, L. B., Record, N. R., Sherwood, G. D., & Stetson, P. B. (2010). The impact of whaling on the ocean carbon cycle: Why bigger was better. *PLoS ONE*, 5(8), e12444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012444>
- Phillips, M., Basa-dalay, V., Bothamley, G., Cataneo, R. N., Kim, P., Piedad, M., Natividad, R., Schmitt, P., & Wai, J. (2010). Breath biomarkers of active pulmonary tuberculosis. *Breath biomarkers of active pulmonary tuberculosis*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.01.003>
- Piredda, I., Palmas, B., Noworol, M., Tola, S., Longheu, C., Bertasio, C., Scaltriti, E., Denurra, D., Cherchi, M., Picardeau, M., Boniotti, M. B., & Ponti, M. N. (2020). Isolation of *Leptospira interrogans* from a Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) in the Mediterranean Sea. *Journal of Wildlife Diseases*, 56(3), 1–3. <https://doi.org/10.7589/2019-07-186>
- Pirotta, V., Smith, A., Ostrowski, M., Russell, D., Jonsen, I. D., Grech, A., & Harcourt, R. (2017). An Economical Custom-Built Drone for Assessing Whale Health. *Frontiers in Marine Science*, 4(425), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00425>
- Piscitelli, M. A., Raverty, S. A., Lillie, M. A., & Shadwick, R. E. (2013). A review of cetacean lung morphology and mechanics. *Journal of Morphology*, 274(12), 1425–1440.

<https://doi.org/10.1002/jmor.20192>

- Pomeroy, P., O'Connor, L., & Davies, P. (2015). Assessing use of and reaction to unmanned aerial systems in gray and harbor seals during breeding and molt in the UK. *Journal of Unmanned Vehicle Systems*, 3(3), 102–113. <https://doi.org/10.1139/juvs-2015-0013>
- Poretzky, R., Rodriguez-R, L., Luo, C., Tsementzi, D., & Konstantinidis, K. (2014). Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS ONE*, 9(4), e93827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093827>
- Porter, T. M., & Hajibabaei, M. (2018). Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. *Molecular Ecology*, 27, 313–338. <https://doi.org/10.1111/mec.14478>
- Prince, O. A., Krunkosky, T. M., Sheppard, E. S., & Krause, D. C. (2018). Modelling persistent *Mycoplasma pneumoniae* infection of human airway epithelium. *Cellular Microbiology*, 20, e12810. <https://doi.org/10.1111/cmi.12810>
- Prodan, A., Tremaroli, V., Brolin, H., Zwinderman, A., Nieuwdorp, M., & Levin, E. (2020). Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PLoS ONE*, 15(1), e0227434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227434>
- Purvis, A., & Hector, A. (2000). Getting the measure of diversity. *Nature*, 405, 212–219.
- Qu, J., Yang, C., Bao, F., Chen, S., Gu, L., & Cao, B. (2018). Epidemiological characterization of respiratory tract infections caused by *Mycoplasma pneumoniae* during epidemic and post-epidemic periods in North China, from 2011 to 2016. *BMC Infectious Diseases*, 18, 335. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3250-2>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Rg Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41, D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- R Core Team. (2018). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (3.3.4). R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org>
- Ramette, A. (2009). Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(8), 2495–2505. <https://doi.org/10.1128/AEM.02409-08>

- Ratnarajah, L., Melbourne-Thomas, J., Marzloff, M. P., Lannuzel, D., Meiners, K. M., Chever, F., Nicol, S., & Bowie, A. R. (2016). A preliminary model of iron fertilisation by baleen whales and Antarctic krill in the Southern Ocean: Sensitivity of primary productivity estimates to parameter uncertainty. *Ecological Modelling*, 320, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2015.10.007>
- Raverty, S. A., Rhodes, L. D., Zabek, E., Eshghi, A., Cameron, C. E., Hanson, M. B., & Schroeder, J. P. (2017). Respiratory Microbiome of Endangered Southern Resident Killer Whales and Microbiota of Surrounding Sea Surface Microlayer in the Eastern North Pacific. *Scientific Reports*, 7(394), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00457-5>
- Real, R., & Vargas, J. (1996). The probabilistic basis of Jaccard's index of similarity. *Systematic Biology*, 45(3), 380–385. <https://doi.org/10.1093/sysbio/45.3.380>
- Regalado, J., Lundberg, D., Deusch, O., Kersten, S., Karasov, T., Poersch, K., Shirsekar, G., & Weigel, D. (2020). Combining whole-genome shotgun sequencing and rRNA gene amplicon analyses to improve detection of microbe–microbe interaction networks in plant leaves. *ISME Journal*, 14, 2116–2130. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0665-8>
- Reidenberg, J. S. (2007). Anatomical Adaptations of Aquatic Mammals. *The Anatomical Record*, 290, 507–513. <https://doi.org/10.1002/ar.20541>
- Reidenberg, J. S., & Laitman, J. T. (1987). Position of the Larynx in Odontoceti. *The Anatomical Record*, 218(1), 98–106. <https://doi.org/10.1002/ar.1092180115>
- Reidenberg, J. S., & Laitman, J. T. (2008). Sisters of the Sinuses : Cetacean Air Sacs. *The Anatomical Record*, 291, 1389–1396. <https://doi.org/10.1002/ar.20792>
- Reilly, S. B., Bannister, J. L., Best, P. B., Brown, M., Jr., B., Butterworth, D. S., Clapham, P. J., Cooke, J., Donovan, G. P., Urbán, J., & Zerbini, A. N. (2008). Balaenoptera musculus. The IUCN Red List of Threatened Species 2008. *The IUCN Red List of Threatened Species*, 8235, e.T2477A9447146. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T2477A9447146.en>.
- Reilly, S. B., & Thayer, V. G. (1990). Blue whale distribution in the eastern tropical Pacific. *Marine mammal science*, 6(4), 265–277.
- Renyi, A. (1961). On Measures of Entropy and Information. *Fourth Berkeley Symposium. Math, Statistic, and Prob*, 547–561.
- Rice, D. W. (1974). Whales and whale research in the eastern North Pacific. En W. E. Schevill

- (Ed.), *The Whale Problem: A Status Report* (pp. 170–195). Harvard University Press.
- Ricotta, C. (2005). On parametric diversity indices in ecology: A historical note. *Community Ecology*, 6(2), 241–244.
- Ricotta, C., & Podani, J. (2017). On some properties of the Bray-Curtis dissimilarity and their ecological meaning. *Ecological Complexity*, 31, 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2017.07.003>
- Riesbeck, K. (2020). Complement evasion by the human respiratory tract pathogens *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. *FEBS Letters*, 1–12. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13758>
- Risely, A. (2020). Applying the core microbiome to understand host–microbe systems. *Journal of Animal Ecology*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13229>
- Robertson, V., Haltli, B., McCauley, E., Overy, D., & Kerr, R. (2016). Highly Variable Bacterial Communities Associated with the Octocoral *Antilloporia elisabethae*. *Microorganisms*, 4, 1–23. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4030023>
- Robles-Malagamba, M. J., Walsh, M. T., Ahasan, M. S., Thompson, P., Wells, R. S., Jobin, C., Fodor, A. A., Winglee, K., & Waltzek, T. B. (2020). Characterization of the bacterial microbiome among free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Heliyon*, 6(6), e03944. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03944>
- Rocha Gosselin, A. (2009). Caracterización de la carga microbiana y parasitaria de tres especies de misticetos en las costas de la Península de Baja California, México. *PhD Thesis*, 113.
- Ross, A. A., Rodrigues-Hoffmann, A., & Neufeld, J. D. (2019). The skin microbiome of vertebrates. *Microbiome*, 7(79), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0694-6>
- Rueda-Flores, M. (2007). *Variabilidad de Perfiles de Ácidos Grasos de Ballena Azul, *Balaenoptera musculus*, en el Golfo de California*. Instituto Politecnico Nacional - Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.
- Rümmler, M., Mustafa, O., Maercker, J., Peter, H., & Esefeld, J. (2016). Measuring the influence of unmanned aerial vehicles on Adélie penguins Measuring the influence of unmanned aerial vehicles on Ade. *Polar Biology*, 39(7), 1329–1334. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1838-1>
- Russell, J. A., Dutilleul, N., & Rudgers, J. A. (2014). Nature's microbiome: Introduction. *Molecular Ecology*, 23(6), 1225–1237. <https://doi.org/10.1111/mec.12676>

- Russo, C. D., Weller, D. W., Nelson, K. E., Chivers, S. J., Torralba, M., & Grimes, D. J. (2018). Bacterial Species Identified on the Skin of Bottlenose Dolphins Off Southern California via Next Generation Sequencing Techniques. *Microbial Ecology*, 75(2), 303–309. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1071-2>
- Sah, P., Mann, J., & Bansal, S. (2018). Disease implications of animal social network structure: A synthesis across social systems. *Journal of Animal Ecology*, 87(3), 546–558. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12786>
- Salk, H. M., Simon, W. L., Lambert, N., Kennedy, R. B., Grill, D. E., Kabat, B. F., & Poland, G. A. (2016). Taxa of the nasal microbiome are associated with influenza-specific IgA response to live attenuated influenza vaccine. *PLoS ONE*, 11(9), e0162803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162803>
- Sampson, T. R., & Mazmanian, S. K. (2015). Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host and Microbe*, 17(5), 565–576. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.011>
- Sandbrook, C. (2015). The social implications of using drones for biodiversity conservation. *Ambio*, 44(4), 636–647. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0714-0>
- Sanders, J. G., Beichman, A. C., Roman, J., Scott, J. J., Emerson, D., McCarthy, J. J., & Girguis, P. R. (2015). Baleen whales host a unique gut microbiome with similarities to both carnivores and herbivores. *Nature Communications*, 6, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms9285>
- Sanderson, C. E., & Alexander, K. A. (2020). Unchartered waters: Climate change likely to intensify infectious disease outbreaks causing mass mortality events in marine mammals. *Global change biology*, 1–18. <https://doi.org/10.1111/gcb.15163>
- Schröder, J., Kahlke, V., Staubach, K. H., Zabel, P., & Stüber, F. (1998). Gender differences in human sepsis. *Archives of Surgery*, 133, 1200–1205. <https://doi.org/10.1001/archsurg.133.11.1200>
- Schroeder, J. P., Raverty, S., Zabek, E., Cameron, C. E., Eshghi, A., Bain, D., Wood, R., Rhodes, C. L., & Hanson, B. (2008). *Investigation into the Microbial Culture and Molecular Screening of exhaled breaths of Endangered Southern Resident Killer Whales ( SRKW ) and Pathogen Screening of the Sea Surface Microlayer ( SML ) in Puget Sound.* 1–8.
- Sears, R., & Calambokidis, J. (2002). Update COSEWIC Assessment and Update Status Report

- on the Blue Whale *Balaenoptera musculus* in Canada. En *COSEWIC Assessment and Update Status Report on the Blue Whale Balaenoptera musculus in Canada* (pp. 1–32). Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. [http://www.sararegistry.gc.ca/virtual\\_sara/files/cosewic/sr\\_blue\\_whale\\_e.pdf](http://www.sararegistry.gc.ca/virtual_sara/files/cosewic/sr_blue_whale_e.pdf)
- Sears, R., Williamson, J. M., Wenzel, F. W., Bérubé, M., Gendron, D., & Jones, P. W. (1990). Photographic identification of the blue whales (*Balaenoptera musculus*) in the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Report International Whaling Commission*, 12, 335–342.
- SEMARNAT. (2011). Normal Oficial Mexicana NOM-131-SEMARNAT-2010. *Diario Oficial de la Federación*, 1–13.
- SEMARNAT. (2018). *Programa de Acción para la Conservación de la Especie Ballena Azul (Balaenoptera musculus)*,.
- Shade, A., & Handelsman, J. (2011). Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome. *Environmental Microbiology*, 14(1), 4–12. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x>
- Shade, A., & Handelsman, J. (2012). Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome. *Environmental Microbiology*, 14(1), 4–12. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x>
- Shannon, C. (1948). A mathematical theory of communication. *Bell Systems Technological Journal*, 27, 379–423.
- Shapira, M. (2016). Gut Microbiotas and Host Evolution: Scaling Up Symbiosis. *Trends in Ecology and Evolution*, 31(7), 539–549. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.03.006>
- Sharp, S. M., McLellan, W. A., Rotstein, D. S., Costidis, A. M., Barco, S. G., Durham, K., Pitchford, T. D., Jackson, K. A., Daoust, P. Y., Wimmer, T., Couture, E. L., Bourque, L., Frasier, T., Frasier, B., Fauquier, D., Rowles, T. K., Hamilton, P. K., Pettis, H., & Moore, M. J. (2019). Gross and histopathologic diagnoses from north atlantic right whale eubalaena glacialis mortalities between 2003 and 2018. *Diseases of Aquatic Organisms*, 135(1), 1–31. <https://doi.org/10.3354/dao03376>
- Shuikan, A., Ali Alharbi, S., Alkhalifah, D. H., & Hozzein, W. (2019). High-Throughput Sequencing and Metagenomic Data Analysis. En *Metagenomics - Basics, Methods and Applications*. InTechopen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89944>
- Sikes, R. S., Gannon, W. L., & Animal Care and Use Committee of the American Society of



- Mammalogists. (2011). Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy*, 92(1), 235–253. <https://doi.org/10.1644/10-MAMM-F-355.1>
- Simpson, E. (1949). Measure of diversity. *Nature*, 163, 688.
- Sison-Mangus, M. P., Mushegian, A. A., & Ebert, D. (2015). Water fleas require microbiota for survival, growth and reproduction. *ISME Journal*, 9(1), 59–67. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.116>
- Skopina, M. Y., Vasileva, A. A., Pershina, E. V., & Pinevich, A. V. (2016). Diversity at low abundance: The phenomenon of the rare bacterial biosphere. *Microbiology*, 85(3), 272–282. <https://doi.org/10.1134/S0026261716030139>
- Smith, C. M., Tang, C. Y., & Reidenberg, J. S. (2017). Visualizing the Anatomy and Position of the Larynx in Balaenopterid Whales. *The FASEB Journal*, 31(1).
- Smith, C., Sykora-Bodie, S., Bloodworth, B., Pack, S., Spradlin, T., & LeBoeuf, N. (2016). Assessment of known impacts of unmanned aerial systems (UAS) on marine mammals: data gaps and recommendations for researchers in the United States. *Journal of Unmanned Vehicle Systems*, 4(1), 31–44. <https://doi.org/10.1139/juvs-2015-0017>
- Smits, S. A., Leach, J., Sonnenburg, E. D., Gonzalez, C. G., Lichtman, J. S., Reid, G., Knight, R., Manjurano, A., Changlucha, J., Elias, J. E., Dominguez-Bello, M. G., & Sonnenburg, J. L. (2017). Seasonal Cycling in the Gut Microbiome of the Hadza Hunter-Gatherers of Tanzania. *Science*, 357(6563), 802–806. <https://doi.org/10.1002/encr.31084>
- Snyder, G. K. (1983). Respiratory adaptations in diving mammals. *Respiration Physiology*, 54(3), 269–294. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(83\)90072-5](https://doi.org/10.1016/0034-5687(83)90072-5)
- Socolar, J. B., Gilroy, J. J., Kunin, W. E., & Edwards, D. P. (2016). How Should Beta-Diversity Inform Biodiversity Conservation? *Trends in Ecology and Evolution*, 31(1), 67–80. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.11.005>
- Somerfield, P. J., Clarke, K. R., & Warwick, R. M. (2008). Simpson Index. *Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set, 1975*, 3252–3255. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00133-6>
- SØrum, H. S., & Sunde, M. S. (2001). Review article Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Veterinary Research*, 32, 227–241.

- Soverini, M., Quercia, S., Biancani, B., Furlati, S., Turrone, S., Biagi, E., Consolandi, C., Peano, C., Severgnini, M., Rampelli, S., Brigidi, P., & Candela, M. (2016). The bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) faecal microbiota. *FEMS microbiology ecology*, *92*(4), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw055>
- Stirling, G., & Wilsey, B. (2001). Empirical Relationships between Species Richness, Evenness, and Proportional Diversity. *The American Naturalist*, *158*(3), 286–299. <https://doi.org/10.1086/321317>
- Stoffel, M. A., Acevedo-Whitehouse, K., Morales-Durán, N., Grosser, S., Chakarov, N., Krüger, O., Nichols, H. J., Elorriaga-Verplancken, F. R., & Hoffman, J. I. (2020). Early sexual dimorphism in the developing gut microbiome of northern elephant seals. *Molecular Ecology*, *29*(11), 2109–2122. <https://doi.org/10.1111/mec.15385>
- Stone, G., Katona, S., Mainwaring, A., Allen, J., & Corbett, H. (1992). Respiration and surfacing rates of fin whales (*Balaenoptera physalus*) observed from a lighthouse tower. *Report of the International Whaling Commission*, *42*, 739–745.
- Suzuki, A., Segawa, T., Sawa, S., Nishitani, C., Ueda, K., Itou, T., Asahina, K., & Suzuki, M. (2019). Comparison of the gut microbiota of captive common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in three aquaria. *Journal of Applied Microbiology*, *126*(1), 31–39. <https://doi.org/10.1111/jam.14109>
- Tablado, Z., & Jenni, L. (2015). Determinants of uncertainty in wildlife responses to human disturbance. *Biological Reviews*, *92*(1), 216–233. <https://doi.org/10.1111/brv.12224>
- Tang, Z. Z., Chen, G., & Alekseyenko, A. V. (2016). PERMANOVA-S: Association test for microbial community composition that accommodates confounders and multiple distances. *Bioinformatics*, *32*(17), 2618–2625. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw311>
- Tannenbaum, J., & Bennett, B. T. (2015). Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *54*(2), 120–132.
- Tao, Y., Shu, J., Chen, J., Wu, Y., & He, Y. (2019). A concise review of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Research in Veterinary Science*, *123*, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.007>
- Tartu, S., Fisk, A. T., Götsch, A., Kovacs, K. M., Lydersen, C., & Routti, H. (2020). First assessment of pollutant exposure in two balaenopterid whale populations sampled in the

- Svalbard Archipelago, Norway. *Science of the Total Environment*, 718, 137327. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137327>
- Tattevin, P., Léveller, G., Flicoteaux, R., Jauréguiberry, S., Le Tulzo, Y., Dupont, M., Arvieux, C., & Michelet, C. (2005). Respiratory manifestations of leptospirosis: A retrospective study. *Lung*, 183, 283–289. <https://doi.org/10.1007/s00408-004-2541-0>
- Tepper, G. (2010). *Species Diversity and Extinction* (G. Tepper (ed.); 1a ed., Vol. 1). Nova Science Publishers. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- The human Microbiome Project Consortium. (2012a). A framework for human microbiome research. *Nature*, 486, 215–221. <https://doi.org/10.1038/nature11209>
- The human Microbiome Project Consortium. (2012b). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486, 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Thijs, S., De Beeck, M. O., Beckers, B., Truyens, S., Stevens, V., Van Hamme, J. D., Weyens, N., & Vangronsveld, J. (2017). Comparative evaluation of four bacteria-specific primer pairs for 16S rRNA gene surveys. *Frontiers in Microbiology*, 8, 494. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00494>
- Thomas, P. O., Reeves, R. R., & Brownell, R. L. (2015). Status of the world's baleen whales. *Marine Mammal Science*, 32(2), 682–734. <https://doi.org/10.1111/mms.12281>
- Thomas, P. O., Reeves, R. R., & Brownell, R. L. (2016). Status of the world's baleen whales. *Marine Mammal Science*, 32(2), 682–734. <https://doi.org/10.1111/mms.12281>
- Thompson, L., Spoon, T., Goertz, C., Hobbs, R., & Romano, T. (2014). Blow collection as a non-invasive method for measuring cortisol in the beluga (*Delphinapterus leucas*). *PLoS ONE*, 9(12), e114062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114062>
- Thukral, A. K. (2017). A review on measurement of Alpha diversity in biology. *Agricultural Research Journal*, 54(1), 1. <https://doi.org/10.5958/2395-146x.2017.00001.1>
- Torres, L. G., Nieuwkerk, S. L., Lemos, L., & Chandler, T. E. (2018). Drone up! Quantifying whale behavior from a new perspective improves observational capacity. *Frontiers in Marine Science*, 5, 319. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00319>
- Tremblay, J., & Yergeau, E. (2019). Systematic processing of ribosomal RNA gene amplicon sequencing data. *GigaScience*, 8, 1–14. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz146>
- Tress, B., Dorn, E. S., Suchodolski, J. S., Nisar, T., Ravindran, P., Weber, K., Hartmann, K., & Schulz, B. S. (2017). Bacterial microbiome of the nose of healthy dogs and dogs with nasal

- disease. *Plos One*, 12(5), e0176736.
- Trevathan-Tackett, S. M., Sherman, C. D. H., Huggett, M. J., Campbell, A. H., Laverock, B., Hurtado-McCormick, V., Seymour, J. R., Firl, A., Messer, L. F., Ainsworth, T. D., Negandhi, K. L., Daffonchio, D., Egan, S., Engelen, A. H., Fusi, M., Thomas, T., Vann, L., Hernandez-Agreda, A., Gan, H. M., ... Macreadie, P. I. (2019). A horizon scan of priorities for coastal marine microbiome research. *Nature Ecology and Evolution*, 3(11), 1509–1520. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0999-7>
- Trevelline, B. K., Fontaine, S. S., Hartup, B. K., & Kohl, K. D. (2019). Conservation biology needs a microbial renaissance: A call for the consideration of host-associated microbiota in wildlife management practices. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286, 20182448. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2448>
- Tsang, T. K., Lee, K. H., Foxman, B., Balmaseda, A., Gresh, L., Sanchez, N., Ojeda, S., Lopez, R., Yang, Y., Kuan, G., & Gordon, A. (2019). Association Between the Respiratory Microbiome and Susceptibility to Influenza Virus Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 1–9. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz968>
- Tuomisto, H. (2010). A consistent terminology for quantifying species diversity? Yes, it does exist. *Oecologia*, 164(4), 853–860. <https://doi.org/10.1007/s00442-010-1812-0>
- Turner, M. A. (2013). *The effect of a paced auditory serial addition test ( PASAT ) intervention on the profile of volatile organic compounds in human breath : a pilot study*. 017102. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/7/1/017102>
- Ugalde de la Cruz, A. (2008). *Abundancia y tasa de supervivencia de ballenas azules en el Golfo de California*. Instituto Politecnico Nacional - Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.
- Uhen, M. D. (2007). Evolution of Marine Mammals : Back to the Sea After 300 Million Years. *The Anatomical Record*, 522(6), 514–522. <https://doi.org/10.1002/ar.20545>
- Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews*, 70(1), S38–S44. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x>
- Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., & Vargas-Albores, F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297–313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>

- Valenzuela-Molina, M., Atkinson, S., Mashburn, K., Gendron, D., & Brownell, R. L. (2018). Fecal steroid hormones reveal reproductive state in female blue whales sampled in the Gulf of California, Mexico. *General and Comparative Endocrinology*, *261*, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.02.015>
- Van Bresseem, M. F., Duignan, P. J., Banyard, A., Barbieri, M., Colegrove, K. M., de Guise, S., di Guardo, G., Dobson, A., Domingo, M., Fauquier, D., Fernandez, A., Goldstein, T., Grenfell, B., Groch, K. R., Gulland, F., Jensen, B. A., Jepson, P. D., Hall, A., Kuiken, T., ... Wellehan, J. F. X. (2014). Cetacean morbillivirus: Current knowledge and future directions. *Viruses*, *6*, 5145–5181. <https://doi.org/10.3390/v6125145>
- Van Bresseem, M. F., Raga, J. A., Di Guardo, G., Jepson, P. D., Duignan, P. J., Siebert, U., Barrett, T., De Oliveira Santos, M. C., Moreno, I. B., Siciliano, S., Aguilar, A., & Van Waerebeek, K. (2009). Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. *Diseases of Aquatic Organisms*, *86*, 143–157. <https://doi.org/10.3354/dao02101>
- Van Gemert, J. C., Verschoor, C. R., Mettes, P., Epema, K., Koh, L. P., & Wich, S. (2015). *Nature Conservation Drones for Automatic Localization and Counting of Animals*. In *Computer Vision—ECCV 2014 Workshops, Part I; Agapito, L., Bronstein, M.M., Rother, C., Eds.; Springer: Cham, Switzerland*, 255–270. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16178-5>
- Vas, E., Lescroël, A., Duriez, O., Boguszewski, G., & Grémillet, D. (2015). Approaching birds with drones: first experiments and ethical guidelines. *Biology Letters*, *11*(2). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0754>.
- Vendl, C., Nelson, T., Ferrari, B., Thomas, T., & Rogers, T. (2020). Highly abundant core taxa in the blow within and across captive bottlenose dolphins provide evidence for a temporally stable airway microbiota. *BMC Microbiology*, 1–29. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-17418/v1>
- Vendl, C., Slavich, E., Nelson, T., Acevedo-Whitehouse, K., Montgomery, K., Ferrari, B., Thomas, T., & Rogers, T. (2020). Does sociality drive diversity and composition of airway microbiota in cetaceans? *Environmental Microbiology Reports*, *12*, 324–333. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12835>
- Venn-Watson, S., Daniels, R., & Smith, C. (2012). Thirty year retrospective evaluation of

- pneumonia in a bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* population. *Diseases of Aquatic Organisms*, 99, 237–242. <https://doi.org/10.3354/dao02471>
- Venn-Watson, S., Smith, C. R., & Jensen, E. D. (2008). Primary bacterial pathogens in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*: Needles in haystacks of commensal and environmental microbes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 79, 87–93. <https://doi.org/10.3354/dao01895>
- Vitali, D., Wessels, J. M., & Kaushic, C. (2017). Role of sex hormones and the vaginal microbiome in susceptibility and mucosal immunity to HIV-1 in the female genital tract. *AIDS Research and Therapy*, 14, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12981-017-0169-4>
- Voigt, R. M., Forsyth, C. B., Green, S. J., Engen, P. A., & Keshavarzian, A. (2016). Circadian Rhythm and the Gut Microbiome. En *International Review of Neurobiology* (1a ed., Vol. 131). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.07.002>
- Vuong, H. E., Yano, J. M., Fung, T. C., & Hsiao, E. Y. (2017). The Microbiome and Host Behavior. *Annual Review of Neuroscience*, 40(1), 21–49. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031347>
- Waltzek, T. B., Cortés-Hinojosa, G., Wellehan, J. F. X., & Gray, G. C. (2012). Marine mammal zoonoses: A review of disease manifestations. *Zoonoses and Public Health*, 59(8), 521–535. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01492.x>
- Watson, R. L., De Koff, E. M., & Bogaert, D. (2019). Characterising the respiratory microbiome. *European Respiratory Journal*, 53(2), 1–11. <https://doi.org/10.1183/13993003.01711-2018>
- Watts, N., Amann, M., Arnell, N., Ayeb-Karlsson, S., Belesova, K., Boykoff, M., Byass, P., Cai, W., Campbell-Lendrum, D., Capstick, S., Chambers, J., Dalin, C., Daly, M., Dasandi, N., Davies, M., Drummond, P., Dubrow, R., Ebi, K. L., Eckelman, M., ... Montgomery, H. (2019). The 2019 report of The Lancet Countdown on health and climate change: ensuring that the health of a child born today is not defined by a changing climate. En *The Lancet* (Vol. 394, Número 10211, pp. 1836–1878). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32596-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32596-6)
- Weimerskirch, H., Prudor, A., & Schull, Q. (2017). Flights of drones over sub-Antarctic seabirds show species- and status-specific behavioural and physiological responses. *Polar Biology*, 41(2), 259–266. <https://doi.org/10.1007/s00300-017-2187-z>

- Weiss, M. N., Franks, D. W., Balcomb, K. C., Ellifrit, D. K., Silk, M. J., Cant, M. A., & Croft, D. P. (2020). Modelling cetacean morbillivirus outbreaks in an endangered killer whale population. *Biological Conservation*, 242(September 2019), 108398. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108398>
- Wessels, J. M., Felker, A. M., Dupont, H. A., & Kaushic, C. (2018). The relationship between sex hormones, the vaginal microbiome and immunity in HIV-1 susceptibility in women. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 11, dmm035147. <https://doi.org/10.1242/dmm.035147>
- Whittaker, R. H. (1972). Evolution and Measurement of Species Diversity. *Taxon*, 21, 213–251. <https://doi.org/10.2307/1218190>
- Wickham, H. (2016). *Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. <http://ggplot2.org>
- Widder, S., Allen, R. J., Pfeiffer, T., Curtis, T. P., Wiuf, C., Sloan, W. T., Cordero, O. X., Brown, S. P., Momeni, B., Shou, W., Kettle, H., Flint, H. J., Haas, A. F., Laroche, B., Kreft, J. U., Rainey, P. B., Freilich, S., Schuster, S., Milferstedt, K., ... Wilmes, P. (2016). Challenges in microbial ecology: Building predictive understanding of community function and dynamics. *ISME Journal*, 10, 2557–2568. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.45>
- Williams, C. L., Garcia-Reyero, N., Martyniuk, C. J., Tubbs, C. W., & Bisesi, J. H. (2020). Regulation of endocrine systems by the microbiome: Perspectives from comparative animal models. *General and Comparative Endocrinology*, 292, 113437. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113437>
- Willis, A., Bunge, J., & Whitman, T. (2017). Improved detection of changes in species richness in high diversity microbial communities. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C: Applied Statistics*, 66(5), 963–977. <https://doi.org/10.1111/rssc.12206>
- Worthing, K. A., Abraham, S., Coombs, G. W., Pang, S., Saputra, S., Jordan, D., Trott, D. J., & Norris, J. M. (2018). Clonal diversity and geographic distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from Australian animals: Discovery of novel sequence types. *Veterinary Microbiology*, 213, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.018>
- Wright, E. S. (2016). Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R. *The R Journal*, 8(1), 352–359. <https://doi.org/V12242009>
- Wu, Q., Wang, X., Ding, Y., Hu, Y., Nie, Y., Wei, W., Ma, S., Yan, L., Zhu, L., & Wei, F.

- (2017). Seasonal variation in nutrient utilization shapes gut microbiome structure and function in wild giant pandas. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1862), 20170955. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0955>
- Wypych, T. P., Wickramasinghe, L. C., & Marsland, B. J. (2019). The influence of the microbiome on respiratory health. *Nature Immunology*, 20, 1279–1290. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0451-9>
- Xue, Z., Kable, M. E., & Marco, M. L. (2018). Impact of DNA Sequencing and Analysis Methods on 16S rRNA Gene Bacterial Community Analysis of Dairy Products. *mSphere*, 3, e00410-18. <https://doi.org/10.1128/msphere.00410-18>
- Yamanishi, S., & Pawankar, R. (2020). Current advances on the microbiome and role of probiotics in upper airways disease. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 20(1), 30–35. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000604>
- Yeom, D. J., & Kim, J. H. (2011). Comparative evaluation of species diversity indices in the natural deciduous forest of Mt. Jeombong. *Forest Science and Technology*, 7(2), 68–74. <https://doi.org/10.1080/21580103.2011.573940>
- Yi, H., Yong, D., Lee, K., Cho, Y., & Chun, J. (2014). Profiling bacterial community in upper respiratory tracts. *BMC Infectious Diseases*, 14(583), 1–10.
- Yildirim, S., Yeoman, C. J., Janga, S. C., Thomas, S. M., Ho, M., Leigh, S. R., Primate, M. C., White, B. A., Wilson, B. A., & Stumpf, R. M. (2014). Primate vaginal microbiomes exhibit species specificity without universal Lactobacillus dominance. *ISME Journal*, 8, 2431–2444. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.90>
- 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(11), e13963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013963>
- Young, H. S., Wood, C. L., Kilpatrick, A. M., Lafferty, K. D., Nunn, C. L., & Vincent, J. R. (2017). Conservation, biodiversity and infectious disease: scientific evidence and policy implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372, 20160124. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0124>
- Yurkovetskiy, L., Burrows, M., Khan, A. A., Graham, L., Volchkov, P., Becker, L., Antonopoulos, D., Umesaki, Y., & Chervonsky, A. V. (2013). Gender bias in



autoimmunity is influenced by microbiota. *Immunity*, 39, 400–412.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.013>

Zhang, B., Penton, C. R., Xue, C., Quensen, J. F., Roley, S. S., Guo, J., Garoutte, A., Zheng, T., & Tiedje, J. M. (2017). Soil depth and crop determinants of bacterial communities under ten biofuel cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 112, 140–152.  
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.04.019>

Zhang, Y., Dong, S., Gao, Q., Ganjurjav, H., Wang, X., & Geng, W. (2019). “Rare biosphere” plays important roles in regulating soil available nitrogen and plant biomass in alpine grassland ecosystems under climate changes. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 279, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.11.025>

Zhicheng, D., & Yan, C. (2013). Transcriptomics : Advances and approaches. *Science china*, 56(10), 960–967. <https://doi.org/10.1007/s11427-013-4557-2>