

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Doctorado en Ciencias
en Ciencias de la vida
con orientación en Biología Ambiental**

**Edad, filogenia y ciclo de vida: Factores que moldean la
composición de la microbiota intestinal en la foca de puerto
(*Phoca vitulina richardii*)**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Doctor en Ciencias

Presenta:

Arlette Marimar Pacheco Sandoval

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Arlette Marimar Pacheco Sandoval

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. María Asunción Lago Lestón
Co-directora de tesis

Dra. Yolanda Schramm Urrutia
Co-directora de tesis

Dra. Gisela Heckel Dziendzielewski

Dra. Ma. Elena Solana Arellano

Dr. Marcel Martínez Porchas



Dra. Ana Denise Re Araujo
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Arlette Marimar Pacheco Sandoval** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la vida [con orientación en Biología Ambiental](#).

Edad, filogenia y ciclo de vida: Factores que moldean la composición de la microbiota intestinal en la foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*)

Resumen aprobado por:

Dra. María Asunción Lago Lestón
Co-directora de tesis

Dra. Yolanda Schramm Urrutia
Co-directora de tesis

Los microorganismos desempeñan un papel fundamental en la fisiología y la salud de los animales. A pesar de su importancia, la información sobre la microbiota de los mamíferos marinos es escasa. Conocer los factores naturales que influyen en la composición y función de la microbiota es crucial para entender la influencia de los microorganismos en los animales. Mediante la secuenciación del gen 16S ARNr (V4), este estudio evaluó el efecto del ciclo anual, el sexo, la edad y la filogenia en la microbiota intestinal de las focas de puerto del Pacífico (*Phoca vitulina richardii*). Se colectaron muestras fecales de focas y otros pinnípedos que habitan en México y se utilizó RStudio para realizar análisis de diversidad, abundancia diferencial e inferencias funcionales. Con respecto al efecto del ciclo anual, los cambios en la composición y función de la microbiota se relacionaron con diferencias en requerimientos energéticos y periodos de ayuno. Los microorganismos responden a cambios en el metabolismo energético y proporcionan nutrientes fundamentales en periodos de escasa alimentación. Estos hallazgos resaltan la importancia de la microbiota en la fisiología de las focas de puerto. El sexo tiene un impacto mínimo en la composición microbiana del intestino debido al bajo dimorfismo sexual y a la alta variabilidad intrasexual de las focas. La influencia de la localidad en la microbiota, se relacionó con cambios en el consumo de presas y a una exposición a diferentes fuentes microbianas. La principal causa de las variaciones microbianas relacionadas con la edad fueron las diferencias en la dieta. A medida que las focas crecen, el grupo núcleo se reduce y la diversidad microbiana aumenta. Las hembras adultas y las crías tuvieron mayores similitudes microbianas que los machos adultos con crías. De acuerdo al estudio de las funciones de la microbiota, las crías estaban transitando de una dieta basada en leche a una sólida. Además, las vías metabólicas relacionadas con una drástica pérdida de peso y masa corporal, indicaron un mayor estrés metabólico en las crías a finales de la temporada de crianza, cuando las crías son destetadas y comienzan a ayunar. Aunque la filogenia fue un factor importante en la microbiota del intestino, similitudes en la dieta o en los ciclos anuales conllevan a tener una microbiota similar. La microbiota de los pinnípedos responde a preferencias alimenticias y necesidades energéticas diferentes. En comparación con las demás especies, las focas de puerto del Pacífico y los lobos finos de Guadalupe presentaron la mayor abundancia de bacterias potencialmente patógenas. Mediante el estudio de la microbiota intestinal, la foca de puerto puede usarse como una especie centinela de la costa de Baja California. Debido a su estilo de vida sedentario y costero, esta especie puede ofrecer información esencial sobre el estado del ecosistema local. Por lo tanto, la presencia de bacterias potencialmente patógenas en la microbiota de las focas, podría indicar cambios ambientales y riesgos para esta especie y los humanos.

Palabras clave: foca de puerto del Pacífico, microbiota del intestino, pinnípedos, centinela ambiental.

Abstract of the thesis presented **by Arlette Marimar Pacheco Sandoval** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Science [with orientation in Environmental Biology](#).

**Age, phylogeny and life cycle: factors shaping the gut microbiota composition in harbor seals
(*Phoca vitulina richardii*)**

Abstract approved by:

Dra. María Asunción Lago Lestón
Thesis co-advisor

Dra. Yolanda Schramm Urrutia
Thesis co-advisor

Microorganisms play important roles in animals' physiology and health. Despite its importance, information on marine mammals' microbiota is scarce. Knowing the natural factors that influence the microbiota composition and function is crucial to understanding how microorganisms affect animals. By sequencing the V4 region of the 16S rRNA gene, this study evaluated the impact of the annual cycle, sex, age, and phylogeny on the gut microbiota of Pacific harbor seals (*Phoca vitulina richardii*). Fecal samples were collected from seals and other pinnipeds inhabiting Mexico, and RStudio was used to perform diversity, differential abundance, and functional inferences analyses. Regarding the effect of the annual cycle, variations in energy requirements and fasting periods were correlated with changes in the composition and function of the microbiota. Microbes can adapt to variations in energy metabolism and supply vital nutrients when food is scarce. These findings highlight the importance of the microbiota in the harbor seal's physiology. Sex has a minimal impact on gut microbial composition due to a slight sexual dimorphism and high intrasexual variability of harbor seals. The effect of locality on the microbiota was related to changes in prey and exposure to different microbial sources. The primary cause of age-related microbial variations was diet differences. As seals grow, the core microbiota shrinks, and microbial diversity increases. Adult females and pups had more microbial similarities than adults males and pups. According to the study of the microbiota's function, pups were transitioning from a milk-based diet to a solid one. Additionally, metabolic pathways related to a dramatic weight loss and body mass indicated higher metabolic stress in pups in the late breeding season, when they are weaned and start fasting. Although phylogeny was important in gut microbial composition, similarities in species' diets or annual cycles lead to similar microbiota. Pinnipeds' microbiota adapts to different dietary demands and energy requirements. Compared to the other species, Pacific harbor seals and Guadalupe fur seals had the highest abundance of potentially harmful microorganisms. Harbor seals can serve as an environmental sentinel for the Baja California coast by studying its gut microbiota. Due to their sedentary and coastal lifestyle, this species can provide critical information about the local environment. Therefore, potentially harmful bacteria in the seals' microbiota might indicate environmental changes and risks to this species and humans.

Keywords: Pacific harbor seal, gut microbiota, pinnipeds, environmental sentinel.

Dedicatoria

A Dani, porque tu fortaleza creció y tu sonrisa jamás me faltó. Te amo, siempre.

A Ram, porque en la pérdida te encontré y volví a creer.

A mi familia, que me sostiene y me guía.

“Porque sólo existes tú, Dani, y el espacio sin tiempo en donde ambas nos hemos instalado”

Agradecimientos

A CONACyT por la beca otorgada. Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por haberme aceptado como estudiante de doctorado en Ciencias de la Vida y la UABC por el apoyo financiero para las salidas de campo (UABC-CA-310). A SEMARNAT por los permisos de colecta otorgados (SGPA/OGVS/11448/19)

A mis directoras de tesis, la Dra. Asunción Lago y la Dra. Yolanda Schramm por aceptarme como estudiante, por dejarme armar este proyecto y por su apoyo económico. Gracias a Asun por su apoyo en el laboratorio y gracias a Yoli por armar la logística de las salidas de campo, por tu compañía y ayuda durante las estancias en el campo, gracias por invitarme también a otras salidas. Gracias a ambas por su apoyo para que pudiera asistir a los congresos internacionales y por las comidas.

Agradezco a los miembros de mi comité, a la Dra. Gisela Heckel, Dra. Elena Solana y Dr. Marcel Martínez por su apoyo durante el desarrollo de mi tesis, en los trámites administrativos y por estar siempre disponibles en los avances y requisitos adicionales. Gracias por sus comentarios y preguntas que ayudaron a enriquecer esta tesis.

Gracias a los miembros de las cooperativas pesqueras de Isla Cedros, Isla Natividad e Islas San Benito, por apoyarnos en el traslado y brindarnos un lugar para hospedarnos. Un agradecimiento a quienes me apoyaron durante las salidas de campo: Yam, Jenny, Migue, Lupita, Denise, Edgar, Adair, Josselyn, Dra. Ivonne, Dra. Alicia y Yoli. Muchas gracias por apoyarme, desde coleccionar heces hasta capturar crías de focas.

Gracias a mis amigas de la maestría-doctorado, quienes me alentaron y me llevaron (en la madrugada) al Estero de Punta Banda para recolectar las muestras del periodo de descanso. Gracias por sumarse a la aventura y por su disposición de asistir a los muestreos, en gran medida por ustedes pude mejorar esta tesis. Te agradezco, Jenny, por tu apoyo en el laboratorio y en las secuenciaciones, gracias por darme fuerzas y tener siempre palabras sinceras. Gracias, Yam, por tu apoyo en el laboratorio y en las secuenciaciones. Muchas gracias por todo tu cariño, empatía y consuelo y por siempre estar al pendiente de mí. Gracias Karla por el apoyo, las risas y la complicidad. Gracias a todas ustedes por las sesiones de desahogo que me renovaban, por las reuniones, los festejos y, en especial, por su amistad incondicional, las quiero mucho.

Gracias a mis amigos incondicionales, Erika, Ramiro y Adriana, porque a pesar de mis ausencias y cancelaciones, ustedes siempre me han buscado y me han tenido mucha paciencia. Gracias por pertenecer a mi lado todo este tiempo, los quiero siempre.

A Edgar, por su apoyo y motivación en estos años.

A mi gran amiga, Martha, por su apoyo incondicional en todo este tiempo. Por tener siempre palabras de consuelo, por su empatía, su amor, por su ayuda infinita y por su fortaleza.

A mi familia, por todo su apoyo y motivación en los tiempos difíciles, gracias por el consuelo, por creer en mí y por ser parte fundamental de los logros obtenidos. Siempre serán el pilar de mi vida y mi razón de ser. Gracias a papá por fomentar mi crecimiento y por su apoyo, a mamá, por estar siempre presente y cuidarme, a Mari, por creer en mí y por su amor, a Ilse, por ser mi cómplice de vida.

Un agradecimiento especial a Ram, muchas gracias por las ilustraciones de las focas de puerto, fueron un éxito en los congresos. En especial te agradezco por ser mi confidente y esa parte de Dani que me perdí, gracias por ser tú, un ejemplo de vida. Gracias por compartirme historias, anécdotas y por escucharme. Gracias por creer en mí, por ser mi confidente y por enseñarme a sobrevivir y después a vivir.

Al amor de mi infancia, Dani, todo esto es por ti. El haber terminado la tesis y otros logros es porque quiero que estés orgullosa de mí, en donde estés. Es mi homenaje. Agradezco infinitamente que el camino nos volviera a unir y haber sido parte de tu vida una vez más. Siempre te amaré y por ti, confiaré.

Tabla de contenido

Página

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	xiv
Lista de tablas.....	xxi
 Capítulo 1. Introducción general	 1
1.1 Antecedentes generales.....	2
1.2 Justificación	3
1.3 Hipótesis general.....	4
1.4 Objetivos	4
1.4.1 Objetivo general	4
 Capítulo 2. El ciclo anual	 5
2.1 Introducción	5
2.2 Antecedentes	6
2.3 Áreas de estudio.....	6
2.3.1 Isla de Todos Santos.....	6
2.3.2 Estero de Punta Banda	7
2.4 Hipótesis.....	8
2.5 Objetivos	8
2.5.1 Objetivo general.....	8
2.5.2 Objetivos particulares	8

2.6	Métodos	9
2.6.1	Colecta de muestras.....	9
2.6.2	Extracción de ADN.....	9
2.6.3	Sexado genético de las muestras de heces.....	9
2.6.4	Amplificación del gen 16S ARNr	10
2.6.5	Preparación de las librerías.....	11
2.6.6	Secuenciación.....	12
2.6.7	Procesamiento y análisis de las secuencias	12
2.6.8	Asignación taxonómica	13
2.6.9	Diversidad alfa.....	13
2.6.10	Diversidad beta	14
2.6.11	Abundancia diferencial	16
2.6.12	Inferencia funcional	16
2.7	Resultados	17
2.7.1	Colecta de muestras.....	17
2.7.2	Extracción de ADN.....	18
2.7.3	Amplificación del gen 16S ARNr	20
2.7.4	Sexado genético de las muestras	21
2.7.5	Descripción general del set de datos	22
2.7.6	Composición taxonómica general de las muestras de heces.....	23
2.7.7	Análisis de diversidad alfa	24
2.7.8	Análisis general de diversidad beta.....	25
2.7.9	Cambios en la estructura de la comunidad microbiana entre las focas de puerto durante las etapas de reproducción-muda y postmuda	26
2.7.10	Cambios en la estructura de la comunidad microbiana entre las focas de puerto del EPB y TS.....	27
2.7.11	Cambios en la estructura de la comunidad microbiana entre hembras y machos de focas de puerto.....	29

2.7.12	La estructura de la comunidad microbiana difiere entre las colonias del EPB y TS durante el periodo de reproducción-muda	30
2.7.13	La estructura de la comunidad microbiana difiere entre las colonias del EPB y TS durante el periodo de postmuda.....	31
2.7.14	La estructura de la comunidad microbiana difiere entre hembras y machos durante el periodo de reproducción-muda	32
2.7.15	La estructura de la comunidad microbiana difiere entre los machos de las colonias del EPB y TS	33
2.8	Discusión	34
2.8.1	Los cambios en la estructura y función de la microbiota entre las etapas del ciclo anual son el resultado de diferencias energéticas	35
2.8.2	La localidad es el factor de mayor influencia en la microbiota de las focas de puerto	36
2.8.3	Cambios en las colonias de focas de puerto durante las etapas del ciclo anual	37
2.8.4	Cambios en la composición y función de la microbiota en hembras y machos	38
2.8.5	Mayor abundancia de bacterias potencialmente patógenas en las hembras de focas de puerto.....	39
2.9	Conclusión	40
Capítulo 3.	La edad	42
3.1	Introducción	42
3.2	Hipótesis.....	43
3.3	Objetivos	43
3.3.1	Objetivo general.....	43
3.3.2	Objetivos particulares	43
3.4	Métodos	43
3.4.1	Colecta de muestras.....	43
3.4.2	Extracción de ADN.....	44
3.4.3	Sexado genético de las muestras de heces.....	45
3.4.4	Amplificación del gen 16S ARNr	45

3.4.5 Preparación de las librerías.....	45
3.4.6 Secuenciación.....	46
3.4.7 Procesamiento y análisis de las secuencias	46
3.4.8 Medidas de riqueza y diversidad filogenética.....	47
3.4.8.1 Diversidad alfa.....	47
3.4.8.2 Diversidad beta	48
3.4.9 Abundancia diferencial	48
3.4.10 Inferencia funcional	49
3.5 Resultados	49
3.5.1 Extracción de ADN.....	49
3.5.2 Amplificación del gen 16S ARNr	50
3.5.3 Sexado genético de las muestras	50
3.5.4 Descripción general del set de datos	51
3.5.5 Composición taxonómica de la muestra de vagina.....	51
3.5.6 Composición taxonómica de las muestras de heces y recto de cría.....	52
3.5.7 Composición taxonómica y comparación de las muestras de crías y adultos	54
3.5.8 Inferencias funcionales de la comunidad microbiana de crías y adultos.....	56
3.5.9 El efecto de la edad y el sexo en la estructura de la comunidad microbiana de focas de puerto.....	57
3.5.10 Diferencias en la composición de la microbiota entre hembras y machos adultos con crías	58
3.5.11 Diferencias en la composición de la microbiota entre hembras adultas y crías.....	59
3.5.12 Diferencias en la composición de la microbiota entre machos adultos y crías	60
3.6 Discusión	62
3.6.1 Las muestras de recto como alternativa para evaluar la microbiota del intestino en las crías de focas de puerto	62
3.6.2 La edad como factor clave en la estructura de la comunidad bacteriana	62
3.6.3 El grupo núcleo de crías y adultos.....	64

3.6.4	El posible papel de la microbiota del intestino en las crías de foca de puerto.....	65
3.6.5	El sexo tiene un efecto mínimo en la estructura de la comunidad microbiana de las focas de puerto.....	66
3.6.6	Similitudes en la estructura de la comunidad microbiana entre hembras adultas y crías de foca de puerto	67
3.6.7	Posibles amenazas en la conservación de la foca de puerto	68
3.7	Conclusión	68
Capítulo 4.	La filogenia	70
4.1	Introducción	70
4.2	Antecedentes	71
4.3	Hipótesis.....	71
4.4	Objetivos	72
4.4.1	Objetivo general.....	72
4.4.2	Objetivos particulares	72
4.5	Métodos	73
4.5.1	Colecta de muestras.....	73
4.5.1.1	Elefante marino del norte(<i>Mirounga angustirostris</i>).....	73
4.5.1.2	Lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>) y lobo fino de Guadalupe (<i>Arctocephalus philippii townsendi</i>)	74
4.5.1.3	Foca de puerto del Pacífico (<i>Phoca vitulina richardii</i>).....	74
4.5.2	Extracción de ADN.....	74
4.5.3	Amplificación del gen 16S ARNr	75
4.5.4	Preparación de las librerías.....	75
4.5.5	Secuenciación.....	76
4.5.6	Procesamiento y análisis de las secuencias	76
4.5.7	Medidas de riqueza y diversidad filogenética.....	76
4.5.7.1	Diversidad alfa.....	76

4.5.7.2	Diversidad beta	77
4.5.8	Abundancia diferencial	77
4.5.9	Inferencia funcional	77
4.6	Resultados	78
4.6.1	Extracción de ADN.....	78
4.6.2	Amplificación del gen 16S ARNr	78
4.6.2.1	Elefante marino del norte (<i>Mirounga angustirostris</i>).....	78
4.6.2.2	Lobo fino de Guadalupe (<i>Arctocephalus philippii townsendi</i>)	79
4.6.2.3	Lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>)	79
4.6.3	Descripción general del set de datos	80
4.6.4	Composición taxonómica de las muestras de heces.....	81
4.6.4.1	Análisis general de las especies	81
4.6.4.2	Análisis general por familia	83
4.6.4.3	Elefante marino del norte	84
4.6.4.4	Lobo fino de Guadalupe.....	84
4.6.4.5	Lobo marino de California.....	85
4.6.4.6	Foca de puerto	86
4.6.5	Análisis de diversidad alfa	86
4.6.6	Diversidad beta	87
4.6.6.1	Análisis general de las especies	87
4.6.6.2	Análisis general por familia	88
4.6.7	Comparación de la comunidad microbiana del intestino entre las especies de pinnípedos.....	90
4.6.7.1	Foca de puerto vs foca elefante.....	90
4.6.7.2	Foca de puerto vs lobo marino de California.....	91
4.6.7.3	Foca de puerto vs lobo fino de Guadalupe	92
4.6.7.4	Elefante marino del norte vs lobo fino de Guadalupe	93

4.6.7.5	Elefante marino del norte vs lobo marino de California.....	94
4.6.7.6	Lobo fino de Guadalupe vs lobo marino de California.....	95
4.6.8	Resumen de resultados.....	96
4.7	Discusión	98
4.7.1	La microbiota de los fócidos difiere debido a ciclos de vida contrastantes.....	99
4.7.2	Similitudes en la microbiota de los otáridos son el resultado de historias de vida parecidas.....	101
4.7.3	Las focas de puerto y los lobos marinos de California comparten una microbiota similar debido a dietas parecidas	103
4.7.4	La microbiota de los lobos finos de Guadalupe, un reflejo de su dieta especialista	104
4.8	Conclusión	105
Literatura citada		107
Anexo		119

Lista de figuras

Figura	Página
1. Ubicación geográfica de las colonias de estudio de foca de puerto (<i>Phoca vitulina richardii</i>) en la costa occidental de la península de Baja California, México. Estero de Punta Banda (EPB) e islas Todos Santos (TS).	7
2. Sitios de muestreo en la isla Todos Santos sur en las etapas de premuda (PRM), muda (M) y postmuda (PM).	18
3. Productos de extracción de ADN de las muestras fecales de la colonia Todos Santos (TS) en las etapas de premuda (A), muda (B) y postmuda (C). E: escalera.	19
4. Productos de extracción de ADN de las muestras fecales de la colonia del Estero de Punta Banda (EPB) en las etapas de premuda (A), muda (B) y postmuda (C). E: escalera.	19
5. Productos de PCR de la región V4 del gen 16S ARNr de algunas muestras de la colonia Todos Santos correspondientes a las etapas de premuda (A), muda (B) y postmuda (C). El tamaño del fragmento esperado es de aprox. 400 pb. E: escalera.	20
6. Productos de PCR de la región V4 del gen 16S ARNr de algunas muestras de la colonia del Estero de Punta Banda correspondientes a las etapas de premuda (A), muda (B) y postmuda (C). El tamaño del fragmento esperado es de aprox. 400 pb. E: escalera.	20
7. Productos de PCR del sexado de las muestras. A) Los machos presentaron dos bandas y B) las hembras una. Se incluyeron triplicados de las muestras y controles positivos de crías cuyo sexo era conocido (C2 y C10). E: escalera, N: control negativo.	21
8. Descripción general del set de datos de las muestras del Estero de Punta Banda (EPB) e isla Todos Santos (TS) en los periodos de reproducción-muda (Rep-muda) y postmuda. A) Histograma del número de secuencias por muestra. B) Cantidad de lecturas obtenidas por colonia y sexo. En la tabla se muestran los números de muestras por sexo, etapa y colonia. C) Gráfica de rarefacción por muestra agrupada por colonia y etapa. H=hembra, M=macho.	22
9. <i>Phyla</i> de mayor abundancia (>1%) identificado en las heces de focas de puerto del Estero de Punta Banda (EPB) e isla Todos Santos (TS) en las etapas de reproducción-muda y postmuda. <i>Taxa</i> con abundancias menores al 1% se encuentran agrupados en la categoría de "Otros".	23
10. Curva de rango-abundancia de las especies microbianas presentes en las heces de las focas de puerto en las distintas etapas de estudio.	24
11. Comparación de la diversidad alfa en las muestras de heces agrupadas por etapa y colonia. La comparación entre etapas mostró que sólo durante la etapa de postmuda, las colonias presentaron diferencias en su composición microbiana. EPB: Estero de Punta Banda, TS: isla Todos Santos.	24
12. Análisis de coordenadas principales (PCoA) con las distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B) basadas en los grupos de etapa y colonia. EPB: Estero de Punta Banda, TS: isla Todos Santos.	25

13. Composición de la microbiota del intestino de focas de puerto en los periodos de reproducción-muda y postmuda. A) Los 15 ASV más abundantes detectados en la microbiota del intestino de las focas. B) Número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) entre las etapas de estudio. El diagrama de Venn representa el grupo núcleo de microorganismos, el número de ASVs y su abundancia relativa en cada grupo. El análisis de abundancia diferencial revela cambios entre las focas durante las etapas de estudio en taxones microbianos (C) y en rutas metabólicas (D). Los géneros y las vías con un cambio $\log_2\text{-fold} > 0$ son significativamente más abundantes en las focas durante el periodo de reproducción-muda. 27

14. Composición de la microbiota del intestino de focas de puerto del Estero de Punta Banda (EPB) e isla Todos Santos (TS). A) Los 15 ASV más abundantes detectados en la microbiota del intestino de las focas. B) Número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) entre las colonias de estudio. El diagrama de Venn representa el grupo núcleo de microorganismos, el número de ASVs y su abundancia relativa en cada grupo. El análisis de abundancia diferencial revela cambios entre las colonias de estudio en taxones microbianos (C) y en rutas metabólicas (D). Los géneros y las vías con un cambio $\log_2\text{-fold} > 0$ son significativamente más abundantes en las focas durante del EPB. **Paraclostridium*. 28

15. Composición de la microbiota del intestino de hembras (H) y machos (M) de focas de puerto. A) Los 15 ASV más abundantes detectados en la microbiota del intestino de las focas. B) Número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) entre los sexos. El diagrama de Venn representa el grupo núcleo de microorganismos, el número de ASVs y su abundancia relativa en cada grupo. El análisis de abundancia diferencial revela cambios entre las focas los sexo en taxones microbianos (C) y en rutas metabólicas (D). Los géneros y las vías con un cambio $\log_2\text{-fold} > 0$ son significativamente más abundantes en las focas hembra. **Paraclostridium*. 29

16. Cambios en la composición de la microbiota del intestino en las focas del Estero de Punta Banda (EPB) e isla Todos Santos (TS) durante el periodo de reproducción-muda. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B) basadas en las muestras del periodo de reproducción-muda en las colonias de estudio. El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en (C) *taxa* y (D) vías metabólicas (D) entre las colonias del EPB y TS durante el periodo de rep-muda. Los géneros y vías con un cambio $\log_2\text{-fold} > 0$ son significativamente más abundantes en las muestras del EPB. **Paraclostridium*. 30

17. Cambios en la composición de la microbiota del intestino en las focas del Estero de Punta Banda (EPB) e isla Todos Santos (TS) durante el periodo de postmuda. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B) basadas en las muestras del periodo de postmuda en las colonias de estudio. El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en (C) *taxa* y (D) vías metabólicas (D) entre las colonias del EPB y TS durante el periodo de postmuda. Los géneros y vías con un cambio $\log_2\text{-fold} > 0$ son significativamente más abundantes en las muestras del EPB. **Paraclostridium*. 32

18. Cambios en la composición de la microbiota del intestino entre hembras (H) y machos (M) durante la etapa de reproducción-muda. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B). (C) El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en *taxa* entre focas hembras y machos durante el periodo de reproducción-muda. Los géneros con un cambio $\log_2\text{-fold} > 0$ son significativamente más abundantes en las hembras. 33

19. Cambios en la composición de la microbiota del intestino en las focas macho del Estero de Punta Banda (EPB) e isla Todos Santos (TS). Análisis de coordenadas principales (PCoA) de distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B) basadas en las muestras de machos en las colonias de estudio. El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en (C) *taxa* y (D) vías metabólicas (D) entre los machos de las colonias del EPB y TS. Los géneros y vías con un cambio $\log_2\text{-fold} > 0$ son significativamente más abundantes en las muestras de los machos del EPB. ... 34
20. Ubicación geográfica de la colonia de foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*) en Isla Natividad. 44
21. Resumen de los métodos utilizados para procesar y analizar las secuencias del estudio. 47
22. Comparaciones entre los grupos de interés para detectar diferencias en la composición y estructura de la comunidad microbiana de la foca de puerto. Líneas amarillas: Comparaciones generales. Líneas azules: Comparaciones específicas. 48
23. Productos de extracción de ADN de las muestras de crías de focas de puerto de Isla Natividad. E: escalera..... 49
24. Ejemplos de los productos de PCR de la región V4 del gen 16S ARNr de las muestras de crías y adultos de focas de puerto de Isla Natividad. El tamaño del fragmento esperado es de aprox. 400 pb. E: escalera, N: control negativo..... 50
25. Ejemplos de productos de PCR de los genes SRY y ZFX/ZFY de las muestras de crías y adultos de la colonia de foca de puerto de Isla Natividad. Nat: Adulto de isla Natividad..... 50
26. Gráfica de rarefacción de las muestras de estudio agrupadas por edad. H: hembra, M: macho, NI: no identificado..... 51
27. Estructura y diversidad microbiana entre las muestras de heces y vagina de una cría de foca de puerto. A) Gráfica de rarefacción basada en la riqueza de microorganismos. B) Perfiles microbianos clasificados por tipo de muestra (heces y vagina). Sólo se muestran los 15 ASVs más abundantes, el resto se agruparon en la categoría de "Otros". C) *Phyla* con una abundancia relativa $> 1\%$. D) Los 10 ASV más abundantes detectados en el microbioma de crías. E) Número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) en las muestras de heces y vagina. F) El grupo núcleo del microbioma entre las muestras de heces y vagina. El grupo núcleo está formado por ASVs con una prevalencia del 80% y una abundancia relativa $\geq 0.01\%$. El diagrama de Venn muestra el número de ASV y su abundancia relativa en cada muestra. 52
28. Estructura y diversidad microbiana entre las muestras fecales y rectales de dos crías de foca de puerto. A) Perfiles microbianos de dos crías clasificados por tipo de muestra (heces y recto). Sólo se muestran los 15 ASVs más abundantes, el resto se agruparon en la categoría de "Otros". B) *Phyla* con una abundancia relativa $> 1\%$. c) Los 10 ASV más abundantes detectados en el microbioma de crías. D) Número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) en las muestras de heces y recto. E) El grupo núcleo del microbioma entre las muestras fecales y rectales, conformado por ASVs con una prevalencia del 80% y una abundancia relativa $\geq 0.01\%$. El diagrama de Venn muestra el número de ASV y su abundancia relativa en cada muestra. Análisis de componentes principales (PCoA) basados en distancias UniFrac no ponderadas (F) y ponderadas (G) agrupados por edad. Las muestras de heces (P2h, P4h) y de recto (P2r, P4r) de dos crías están resaltadas en negro. 53

29. Composición de la microbiota del intestino de crías y adultos de foca de puerto. A) *Phyla* con una abundancia relativa > 1%. B) Los 15 ASV más abundantes detectados en la microbiota. C) Número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) entre edades y sexos. D) El grupo núcleo del microbioma entre crías y adultos consistió en ASVs con una prevalencia del 80% y una abundancia relativa > 0.01%. El diagrama de Venn muestra el número de ASVs y su abundancia relativa en cada grupo. 55
30. Curva de rango-abundancia de las especies microbianas presentes en las heces de las focas entre las distintas edades de estudio. 56
31. Principales rutas metabólicas del Consorcio Enzimático MetaCyc (EC), encontradas en las muestras de crías y adultos de foca de puerto. El tamaño de la caja simboliza la cantidad de rutas metabólicas encontradas. 56
32. La edad explica las principales diferencias en la diversidad microbiana de focas de puerto. Análisis de coordenadas principales (PCoA) sobre distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B) basadas en grupos de edad y sexo. El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en *taxa* entre adultos y crías (C) y las vías metabólicas (D). Los géneros y vías con un cambio log2-fold > 0 son significativamente más abundantes en los adultos. *Asignación de múltiples especies. 58
33. Composición diferencial entre adultos (hembras y machos) y crías. El diagrama de UpSet muestra el número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) entre adultos y crías. Los porcentajes representan la abundancia media de cada grupo. 59
34. Cambios en la diversidad microbiana entre las hembras adultas y las crías de foca de puerto. Análisis de coordenadas principales (PCoA) sobre distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B); las elipses representan un intervalo de confianza del 90%. El análisis de abundancia diferencial revela cambios entre las hembras adultas y las crías en taxones microbianos (C) y en rutas metabólicas (D). Los géneros y las vías con un cambio log2-fold > 0 son significativamente más abundantes en las hembras adultas. *Asignación de múltiples especies. 60
35. Cambios en la diversidad microbiana entre los machos adultos y de las crías de foca de puerto. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basados en distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B); las elipses representan un intervalo de confianza del 90%. El análisis de abundancia diferencial revela cambios en taxones microbianos entre los machos adultos y las crías (C) y en rutas metabólicas (D). Los géneros y las vías con un cambio log2-fold > 0 son significativamente más abundantes en los machos adultos. 61
36. Ubicación geográfica de las Islas San Benito e Isla Natividad, lugar de muestreo de heces de las cuatro especies de pinnípedos en México. 73
37. Productos de PCR de la región V4 del gen 16S ARNr de las muestras de elefante marino (EM) de la Isla Benito Centro. El tamaño del fragmento esperado es de aprox. 400 pb. E= escalera, C= control positivo y N= control negativo. 78
38. Productos de PCR de la región V4 del gen 16S ARNr de las muestras de lobo fino de Guadalupe (LF) de la Isla San Benito Oeste. El tamaño del fragmento esperado es de aprox. 400 pb. E= escalera y N= control negativo. 79

39. Productos de PCR de la región V4 del gen 16S ARNr de las muestras de lobo marino de California (LC) de la Islas Benito Oeste y Centro. El tamaño del fragmento esperado es de aprox. 400 pb. E= escalera y N= control negativo. 79
40. Descripción general del set de datos. A) Histograma del número de secuencias por muestra. B) Cantidad de lecturas obtenidas por especie. C) Gráfica de rarefacción de las muestras agrupada especie. EM= elefante marino del norte, FP= foca de puerto, LC= lobo marino de California, LF= lobo fino de Guadalupe. 80
41. Composición de la microbiota del intestino de los pinnípedos de México. A) *Phyla* con una abundancia relativa > 1%. B) Los 15 ASV más abundantes detectados en las heces de las especies de estudio. C) Número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) entre las especies de pinnípedos. D) El grupo núcleo del microbioma entre especies consistió en ASVs con una prevalencia del 80%. El diagrama de Venn muestra el número de ASVs en cada núcleo. EM= elefante marino del norte, FP= foca de puerto, LC= lobo marino de California y LF= lobo fino de Guadalupe. 82
42. Curva de rango-abundancia de las especies microbianas presentes en las heces de pinnípedos en México. EM= elefante marino del norte, FP= foca de puerto, LC= lobo marino de California y LF= lobo fino de Guadalupe. 82
43. Composición de la microbiota del intestino de los pinnípedos de México agrupados por familia. A) *Phyla* con una abundancia relativa > 1%. B) Los 15 ASV más abundantes detectados. C) Número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) entre las familias de pinnípedos. D) El grupo núcleo del microbioma entre familias consistió en ASVs con una prevalencia del 80%. El diagrama de Venn muestra el número de ASVs en cada núcleo. 83
44. Composición taxonómica de la microbiota intestinal de elefantes marinos del norte (EM). A) *Phyla* de mayor abundancia (>1%). *Taxa* con abundancias menores al 1% se encuentran agrupados en la categoría de “otros”. B) Los 15 ASV más abundantes detectados en las heces. 84
45. Composición taxonómica de la microbiota intestinal del lobo fino de Guadalupe (LF). A) *Phyla* de mayor abundancia (>1%). *Taxa* con abundancias menores al 1% se encuentran agrupados en la categoría de “otros”. B) Los 15 ASV más abundantes detectados en las heces. 85
46. Composición taxonómica de la microbiota intestinal del lobo marino de California (LC). A) *Phyla* de mayor abundancia (>1%). *Taxa* con abundancias menores al 1% se encuentran agrupados en la categoría de “otros”. B) Los 15 ASV más abundantes detectados en las heces. 85
47. Composición taxonómica de la microbiota intestinal de focas de puerto (FP). A) *Phyla* de mayor abundancia (>1%). *Taxa* con abundancias menores al 1% se encuentran agrupados en la categoría de “otros”. B) Los 15 ASV más abundantes detectados en las heces. 86
48. Comparación de la diversidad alfa en las muestras de heces de los pinnípedos de estudio, entre especies (A) y familias (B). Se muestra el valor de significancia (*p*) de cada índice (. EM= elefante marino del norte, FP= foca de puerto, LC= lobo marino de California y LF= lobo fino de Guadalupe. 87
49. Comparación de la comunidad microbiana de intestino entre las especies de pinnípedos. Análisis de coordenadas principales (PCoA) sobre distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B).

EM= elefante marino del norte, FP= foca de puerto, LC= lobo marino de California y LF= lobo fino de Guadalupe.	88
50. Cambios en la diversidad microbiana entre las familias de pinnípedos en México. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basados en distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B). El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en <i>taxa</i> (C) y vías metabólicas (D) entre familias. Los géneros y vías con un cambio log2-fold> 0 son significativamente más abundantes en fócidos.	89
51. Cambios en la diversidad microbiana entre focas de puerto (FP) y elefantes marinos (EM). El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en <i>taxa</i> (A) y vías metabólicas (B) entre fócidos. Los géneros y vías con un cambio log2-fold> 0 son significativamente más abundantes en focas de puerto.....	90
52. Cambios en la diversidad microbiana entre focas de puerto (FP) y lobos marinos de California (LC). El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en <i>taxa</i> (A) y vías metabólicas (B) entre estas especies. Los géneros y vías con un cambio log2-fold> 0 son significativamente más abundantes en focas de puerto.....	91
53. Cambios en la diversidad microbiana entre focas de puerto (FP) y lobos finos de Guadalupe (LF). El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en <i>taxa</i> (A) y vías metabólicas (B) entre estas especies. Los géneros y vías con un cambio log2-fold> 0 son significativamente más abundantes en focas de puerto.....	92
54. Cambios en la diversidad microbiana entre elefantes marinos (EM) y lobos finos de Guadalupe (LF). El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en <i>taxa</i> (A) y vías metabólicas (B) entre estas especies. Los géneros y vías con un cambio log2-fold> 0 son significativamente más abundantes en elefantes marinos.....	93
55. Cambios en la diversidad microbiana entre elefantes marinos (EM) y lobos marinos de California (LC). El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en <i>taxa</i> (A) y vías metabólicas (B) entre estas especies. Los géneros y vías con un cambio log2-fold> 0 son significativamente más abundantes en elefantes marinos.....	94
56. Cambios en la diversidad microbiana entre lobos marinos de California (LC) y lobos finos de Guadalupe (EM). El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en <i>taxa</i> (A) y vías metabólicas (B) entre estas especies. Los géneros y vías con un cambio log2-fold> 0 son significativamente más abundantes en lobos marinos de California.....	95
57. <i>Phyla</i> detectados en las muestras de heces de foca de puerto del Estero de Punta Banda e Isla Todos Santos (Capítulo 2). La línea punteada indica un umbral de prevalencia igual al 5%.	119
58. No se observaron cambios significativos en la diversidad microbiana entre hembras y machos de focas de puerto durante la etapa de postmuda (A-B), ni entre las hembras del Estero de Punta Banda e isla Todos Santos (C-D). Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las matrices de distancias UniFrac no ponderadas (A, C) y ponderadas (B, D). H= hembra, M= macho, TS=Isla Todos Santos, EPB= Estero de Punta Banda.	123
59. <i>Phyla</i> detectados en la muestra de vagina de foca de puerto de Isla Natividad (Capítulo 3). La línea punteada indica un umbral de prevalencia igual al 5%.....	124

60. *Phyla* detectados en las muestras de crías y adultos de foca de puerto de Isla Natividad (Capítulo 3). La línea punteada indica un umbral de prevalencia igual al 5%. 125
61. *Phyla* de mayor abundancia (>1%) identificado en las heces de crías y focas adultas de Natividad. *Taxa* con abundancias menores al 1% se encuentran agrupados en la categoría de “otros”. ... 126
62. No se observaron cambios significativos en la diversidad microbiana entre los sexos de las focas de puerto (A-B), entre crías hembras y machos (C-D), o entre hembras y los machos adultos (E-F). Análisis de coordenadas principales (PCoA) basados en matrices de distancias UniFrac no ponderadas (A, C, E) y ponderadas (B, D, F). Las elipses representan un intervalo de confianza del 90%. H= hembra, M= macho. 129
63. *Phyla* detectados en las muestras de los pinnípedos en México (Capítulo 4). La línea punteada indica un umbral de 30 conteos y una prevalencia igual a 2. 132

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Número de muestras fecales obtenidas en cada etapa y lugar de muestreo.	18
2. Resultados del análisis de PERMANOVA para las varianzas de distancia UNIFRAC considerando todas las variables de estudio.	26
3. Comparación del grupo núcleo de las focas de puerto durante las etapas de rep-muda y postmuda.	120
4. Comparación del grupo núcleo de las focas de puerto del Estero de Punta Banda (EPB) y Todos Santos (TS).	121
5. Comparación del grupo núcleo de hembras y machos de focas de puerto.	122
6. Comparación del grupo núcleo de crías y adultos de focas de puerto.	127
7. Comparaciones por pares de la prueba PERMANOVA entre las interacciones de edad y sexo, basadas en las matrices de distancia UNIFRAC.	130
8. ASVs compartidos entre hembras adultas- crías y entre machos adultos -crías.	131
9. Grupo núcleo de microorganismos del intestino por especie.	133
10. Grupo núcleo de microorganismos del intestino por familia de pinnípedo.	134

Capítulo 1. Introducción general

La relación simbiótica entre animales y microorganismos se remonta al comienzo de la vida multicelular (Ley et al., 2008). Los animales representaron un entorno rico en nutrientes para los microbios y éstos aportaron genes benéficos al hospedero (Ruth et al., 2008). Esta relación resultó ser una ventaja evolutiva para que los animales desarrollaran nuevas capacidades fisiológicas y pudieran explotar nuevos nichos, convirtiendo a los microorganismos en componentes esenciales en la fisiología de los animales (Foster et al., 2017).

De todas las comunidades microbianas que pueden encontrarse en un animal, aquella que habita el intestino es considerada la más abundante y diversa (Knight y Buhler, 2015). Esta micro-comunidad desempeña múltiples funciones como: asimilación de nutrientes, regulación del sistema inmune y protección contra microorganismos patógenos (Wu et al., 2011). Los estudios sobre la microbiota del intestino se han realizado principalmente en humanos y en organismos modelo (p. ej. ratones) y demuestran que mantener una relación balanceada es benéfica para ambas partes (Amato, 2013; Mcfall-Ngai et al., 2013).

Para comprender la influencia de los microorganismos en un animal, primero es necesario conocer la composición microbiana de un organismo sano, ¿qué tipos de microbios están presentes, qué funciones desempeñan y qué factores lo afectan? (Turnbaugh et al., 2007). La dieta (en específico el tipo de presas consumidas), el ciclo de vida, la edad, así como cambios en el ambiente circundante se han descrito como factores naturales que moldean la composición microbiana de los animales (Degnan et al., 2012; Nelson et al., 2013). Estos factores son difíciles de analizar en especies silvestres debido a la dificultad del muestreo; en particular, en los mamíferos marinos los trabajos de microbiota intestinal son escasos y la mayoría se enfoca en el estudio de animales en cautiverio (Nelson et al., 2013; Numberger et al., 2016; Tsukinowa et al., 2008).

La microbiota de los mamíferos marinos puede proporcionar información esencial sobre su salud, ecología y la calidad del ambiente que los rodea (Soares-Castro et al., 2019). Estos animales son considerados centinelas ambientales (Moore, 2008) y el estudio de su microbiota podría permitir el desarrollo de técnicas de biomonitorio para evaluar la salud de los ecosistemas, utilizando a los mamíferos marinos como bioindicadores (Soares-Castro et al., 2019).

La microbiota tiene un profundo impacto en la salud y fisiología de los organismos, y diversas investigaciones han revelado que las actividades humanas pueden perturbar drásticamente esta comunidad (Bahrndorff et al., 2016; Trevelline et al., 2019). Por lo tanto, una alteración de la diversidad microbiana debe considerarse una grave amenaza para las poblaciones silvestres (Trevelline et al., 2019). A pesar del enorme potencial que tiene el estudio del microbioma para mejorar los esfuerzos de conservación de las especies, pocos esfuerzos se han realizado para integrar estos campos de investigación.

La presente investigación utilizó a la foca de puerto del Pacífico (*Phoca vitulina richardii*) como modelo de estudio. La foca de puerto es una especie considerada sedentaria, los individuos permanecen la mayor parte del año en una región específica, demostrando una alta fidelidad por los sitios que utilizan para alimentarse y descansar (Burns, 2009; Lubinsky-Jinich et al., 2017). De los cuatro pinnípedos¹ presentes en México, la foca de puerto es la especie más susceptible a perturbaciones antropogénicas porque sus hábitats se traslapan con desarrollos urbanos. Por lo tanto, alteraciones en la microbiota intestinal de las focas de puerto podrían ser el reflejo de cambios en el ambiente que las rodea y darían indicios de riesgos potenciales para la especie y para los humanos (Pacheco-Sandoval et al., 2019). El estilo de vida costero, sedentario y cercano a asentamientos humanos de esta especie, podría permitir un monitoreo continuo de las reacciones a las perturbaciones y servir como modelo para comprender el impacto antropogénico en otros pinnípedos presentes en México, posicionando a la foca de puerto como una especie centinela de las costas de Baja California.

Para poder proponer a la foca de puerto como un centinela ambiental, es fundamental conocer la composición de su microbiota y los factores naturales que la afectan. Este estudio se enfocó en evaluar el efecto que tiene: el ciclo anual, el sexo y el hábitat (Capítulo 2), la edad (Capítulo 3) y la filogenia de la foca de puerto (Capítulo 4), en la composición de la microbiota intestinal de esta especie.

1.1 Antecedentes generales

Los estudios sobre la microbiota de la foca de puerto son escasos. Glad y colaboradores (2010) utilizaron focas de puerto del Atlántico (*P. v. vitulina*, en Noruega) sacrificadas para caracterizar la microbiota del

¹ Mamíferos marinos pertenecientes al suborden Carnivora con extremidades palmeadas.

colon por medio de librerías de clones del gen 16S ARNr. Este estudio determinó que la micro-comunidad del colon está compuesta principalmente por dos *phyla*: Firmicutes (50%) y Bacteroidetes (49%).

Un estudio realizado con la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) reportó Proteobacterias en muestras fecales obtenidas de cinco focas de puerto en cautiverio (Numberger et al., 2016). La comunidad microbiana fecal de las focas de puerto estaba compuesta principalmente de Firmicutes (19–43%), Bacteroidetes (22–36%), Fusobacteria (18–32%) y Proteobacteria (5–17%), siendo 21 miembros bacterianos los que contribuían con el $93.7 \pm 8.7\%$ a la abundancia relativa total.

Anteriormente se ha caracterizado la composición de la microbiota y su relación con la dieta en focas de puerto ubicadas en la costa occidental del Pacífico mexicano (Pacheco-Sandoval et al., 2019). Los resultados mostraron que los *phyla* de mayor abundancia fueron: Firmicutes (42%), Bacteroidetes (37%) y Fusobacteria (14%). El género de mayor abundancia fue *Bacteroides*, característico en dietas altas en proteínas. En el perfil funcional de las bacterias se detectaron rutas relacionadas con la degradación de compuestos tóxicos y pesticidas que indican la presencia de estos contaminantes en el entorno de la foca de puerto y representan un riesgo a las poblaciones humanas. Lo anterior podría posicionar a la foca de puerto como centinela ambiental de la costa de Baja California.

Soares-Castro y colaboradores (2019) propusieron el estudio de la microbiota oral como una herramienta de biomonitorio de poblaciones de cetáceos y de su hábitat. Los resultados indican que factores naturales, como la especie, la edad y el estado de salud, moldean la composición de la comunidad microbiana oral. Además, identificaron 15 géneros bacterianos que permitieron discriminar entre los factores analizados. Ellos proponen que sus hallazgos permitirán crear pruebas diagnósticas para determinar el estado de las poblaciones de cetáceos y evaluar la salud de los ecosistemas marinos de la cuenca Atlántica Ibérica.

1.2 Justificación

En México, la foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*) habita en zonas cercanas a la costa del Pacífico y las colonias se encuentran cerca de asentamientos humanos. Es considerado un pinnípedo sedentario al no realizar migraciones y alimentarse cerca de sus colonias de descanso, lo que provoca que sea altamente vulnerable a la presencia de sustancias tóxicas procedentes de actividades humanas. Cambios en la microbiota del intestino podrían indicar alteraciones en su hábitat y permitirían identificar riesgos para la salud y la conservación de esta especie. Así mismo, el estudio de su microbiota intestinal permitiría

identificar riesgos potenciales a la salud humana y conservación de hábitat, lo que posicionaría a la foca de puerto como un centinela ambiental de las costas de Baja California.

Para poder proponer a la foca de puerto como un centinela ambiental por medio del estudio de su microbiota intestinal, es necesario comprender cómo factores naturales, por ejemplo: el sexo, el ciclo anual, la edad y la filogenia, moldean la composición de la comunidad microbiana.

1.3 Hipótesis general

Conocer los efectos que tienen factores naturales como el ciclo anual, el sexo, la edad y la filogenia en la microbiota intestinal de la foca de puerto, permitirá establecer el perfil de una comunidad microbiana basal y saludable. Cambios en la estructura de ésta micro-comunidad podrían ayudar a detectar amenazas para la conservación y salud de la especie, así como riesgos potenciales a la salud humana y conservación de hábitat

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Describir cómo factores biológicos (p.ej. sexo, ciclo anual, edad) y específicos de la especie (filogenia) moldean e influyen en la composición y las funciones metabólicas de la microbiota intestinal de la foca de puerto.

Capítulo 2. El ciclo anual

2.1 Introducción

El ciclo anual de la foca de puerto consiste principalmente en las etapas de reproducción y muda, seguido por una fase de alimentación y navegación continua en agua (Allen et al., 2011c). Dependiendo de la latitud, las etapas de reproducción y muda varían temporalmente en respuesta al fotoperiodo (Allen et al., 2011c). A pesar de encontrarse en la misma latitud, las focas de las islas Todos Santos y del Estero de Punta Banda (Ensenada, Baja California, México) presentan un desfase temporal en la fase reproductiva y de muda (Fernández-Martín, 2018; Fernández-Martín et al., 2016). Este desfase podría responder a distintos fotoperiodos, con 13.6 horas luz/día y 14.1 horas luz/día para las islas Todos Santos y el Estero de Punta Banda, respectivamente (Fernández-Martín, 2018).

En Todos Santos, el periodo reproductivo abarca de finales de enero a principios de abril (Fernández-Martín, 2018), seguido de la etapa de muda que ocurre de mediados de abril a mediados de julio (Lubinsky-Jinich et al., 2017, 2019; Tapia-Harris et al., 2017). En el Estero de Punta Banda, el periodo reproductivo abarca de mediados de febrero a mediados de abril (Fernández-Martín, 2018) y la muda ocurre de finales de abril a mediados de julio (Fernández-Martín et al., 2016; Lubinsky-Jinich et al., 2019).

La temporalidad de la muda difiere dependiendo de la edad y el sexo. Los machos añeros son los primeros en comenzar a mudar, seguido de los subadultos, hembras adultas y finalmente machos adultos (Burns, 2009). La muda en hembras adultas comienza unas semanas después del final del periodo de lactancia y se caracteriza por la pérdida y regeneración progresiva del pelo (Feltz y Fay, 1966). Durante este periodo, la sangre administra una mayor cantidad de nutrientes a la piel para promover la creación de pelo nuevo (Paterson et al., 2012). En fócidos, la muda es un proceso abrupto que requiere que los animales se mantengan en tierra para conservar una temperatura superficial de 37°C, óptima para el crecimiento del pelo (Cronin et al., 2014). La pérdida de calor aumenta durante la muda y equivale a la duplicación de la tasa metabólica en reposo (Allen et al., 2011c).

Las etapas de reproducción y muda son procesos metabólicamente demandantes por: a) la producción de leche para alimentar a las crías; b) el alto consumo de energía y nutrientes para reemplazar el pelo (Pitcher, 1986) y c) una menor ingesta de alimento debido a la necesidad de mantenerse mayor tiempo en tierra (Tapia-Harris et al., 2017). Durante aproximadamente cinco meses, la foca de puerto tiene un gasto energético mayor con respecto a otros meses. Para recuperar el peso perdido en estas etapas, al final de

estas temporadas la foca de puerto pasa varias semanas en el agua para alimentarse (periodo de postmuda) (Allen et al., 2011c).

La cantidad de grasa corporal en las focas de puerto varía a lo largo del año a medida que se desplazan entre los periodos asociados con la reproducción y muda (menor volumen), y la temporada de postmuda (mayor volumen de grasa) (Burns, 2009). Independiente del sexo y la etapa de vida, durante la fase de postmuda las focas de puerto poseen un mayor volumen de grasa corporal (Burns, 2009).

2.2 Antecedentes

Cambios energéticos drásticos han demostrado tener impacto en la comunidad microbiana del intestino. Sommer y colaboradores (2016) analizaron la composición de la microbiota intestinal del oso pardo (*Ursus arctos*) durante dos etapas de su ciclo anual (hibernación y fase activa) y determinaron que la composición de la microbiota intestinal sufre cambios drásticos entre fases. Durante la hibernación, la diversidad microbiana es menor, los niveles de miembros del *phylum* Bacteroidetes aumentan y disminuyen los *phyla* Firmicutes y Actinobacteria. Este cambio responde a la necesidad de conservar energía durante la hibernación, en donde metabolitos involucrados en el metabolismo de lípidos se ven afectados. Para evaluar el efecto que tiene el cambio de la composición microbiana intestinal en ambos periodos, trasplantaron la microbiota fecal de los osos en ratones libres de microorganismos. Aquellos que recibieron el trasplante de la comunidad microbiana de osos en la etapa activa tuvieron un aumento de tejido adiposo, en comparación con aquellos a los que les trasplantaron la microbiota de osos en hibernación. Este trabajo sugiere que los animales que poseen etapas anuales con un gasto de energía rápido y elevado, necesitan de microorganismos que les permitan ser más eficientes en el uso y el almacén de energía.

2.3 Áreas de estudio

2.3.1 Isla de Todos Santos

Las dos islas de Todos Santos son de origen continental y están ubicadas en la Bahía de Todos Santos (Ensenada, B. C., México) (Figura 1), con sustratos variados: roca, arena, grava, canto rodado y

combinaciones de los anteriores (Arias-Del Razo et al., 2017). Poseen una población humana transitoria compuesta principalmente por pescadores y personal de la Secretaría de Comunicaciones y Transportes. A lo largo de la isla sur habitan elefantes marinos del norte (*Mirounga angustirostris*), lobos marinos de California (*Zalophus californianus*) y focas de puerto (*Phoca vitulina richardii*) (RAMSAR, 2021).

Las colonias de focas de puerto residen en la isla sur durante todo el año; en primavera se han observado colonias separadas en los lados expuestos (oeste/norte) y protegidos del oleaje (este/sur). Sin embargo, en invierno las colonias se encuentran principalmente en el lado expuesto, alejadas de perturbaciones antropogénicas (Lubinsky-Jinich, 2019). En esta isla se estimó una abundancia de 664 (con intervalo de credibilidad al 95% de 533 – 903) individuos en el año 2016 (Lubinsky-Jinich et al., 2017).

2.3.2 Estero de Punta Banda

Ubicado al suroeste de la Bahía de Todos Santos en Ensenada, B.C. México (Figura 1), el Estero de Punta Banda es un área de 2393 hectáreas compuesta por una laguna costera y una barra arenosa; es considerado un “humedal de importancia nacional” por la convención sobre los Humedales RAMSAR (RAMSAR, 2021). Es un sitio con una gran cantidad de actividades humanas (paso de vehículos, peatones, lanchas) que provocan que la colonia de focas de puerto residente sea perturbada (Ruiz-Mar et al., 2022). En este sitio se han contabilizado hasta 99 focas de puerto durante la temporada reproductiva y de muda (Fernández-Martín et al., 2016).

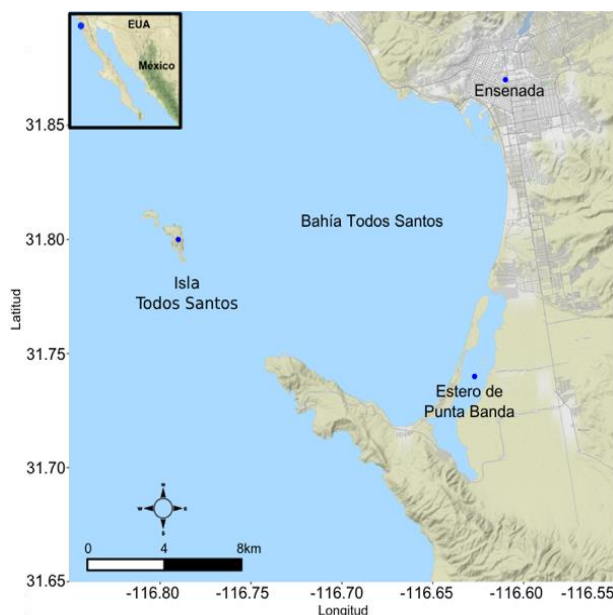


Figura 1. Ubicación geográfica de las colonias de estudio de foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*) en la costa occidental de la península de Baja California, México. Estero de Punta Banda (EPB) e islas Todos Santos (TS).

2.4 Hipótesis

La microbiota intestinal de la foca de puerto cambia durante el periodo de reproducción y muda por la alta demanda energética, en comparación con la fase de postmuda. Debido al desgaste energético de los periodos de reproducción y muda, grupos microbianos que permitan un uso más eficiente de energía y un mejor almacenamiento de grasas se verán favorecidos. Además, el cambio en la composición de la comunidad microbiana del intestino tendrá un impacto en el metabolismo lipídico en relación a la etapa en la que la foca de puerto se encuentre.

2.5 Objetivos

2.5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto que tienen las diversas etapas del ciclo anual de la foca de puerto en la composición y función de la microbiota intestinal.

2.5.2 Objetivos particulares

- Caracterizar la microbiota intestinal de la foca de puerto de las colonias de Todos Santos y del Estero de Punta Banda durante las etapas de reproducción-muda y postmuda.
- Comparar la comunidad microbiana presente en las distintas etapas del ciclo anual para observar variaciones en la composición de la microbiota intestinal entre fases e identificar a los microorganismos con mayor aporte a estos cambios.
- Caracterizar el perfil funcional de las distintas etapas para observar cambios en las rutas metabólicas relacionadas con el periodo de mayor desgaste energético.

2.6 Métodos

2.6.1 Colecta de muestras

Para evaluar el efecto que tiene el ciclo anual de la foca de puerto en su microbiota intestinal, se recolectaron muestras de heces de las colonias de focas de puerto ubicadas en la isla de Todos Santos sur y en el Estero de Punta Banda, en Baja California, México (Figura 1). Se seleccionaron estas colonias debido a la cercanía con la ciudad de Ensenada, lo que facilita muestrear durante tiempos prolongados, y al desfase temporal entre ambas colonias en el periodo de muda. Cada muestra se recogió con una espátula estéril y únicamente se tomó la parte interna para evitar la contaminación cruzada con el medio ambiente. Las muestras se colocaron en tubos estériles con RNAlater® (Sigma-Aldrich) y se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su procesamiento.

2.6.2 Extracción de ADN

Se utilizó el kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)® para extraer el ADN genómico total microbiano de las muestras fecales. Las muestras se centrifugaron a 9500 x g durante 5 minutos para poder decantar el *RNAlater* en el cual fueron preservadas. De cada muestra se utilizaron aproximadamente 220 mg de materia fecal.

Se utilizó el protocolo para aislar ADN de microorganismos patógenos propuesto por el fabricante y para poder detectar microorganismos difíciles de lisar, se utilizó una temperatura de incubación de 95°C. La calidad del ADN se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y los productos de extracción se corrieron a 70 V por 45 min. La concentración del ADN se determinó en el fluorómetro Qubit 3.0 (Invitrogen) con 5 µl por muestra utilizando el kit *Qubit® dsDNA BR Assay* (ThermoFisher™).

2.6.3 Sexado genético de las muestras de heces

Se modificó el protocolo de Robertson y colaboradores (2018) para conocer el sexo de las focas de puerto utilizando las muestras de heces. Este método permite la identificación molecular del sexo por medio de dos juegos de primers que amplifican regiones cortas de los loci SRY y ZFX/ZFY. A diferencia del método

original, que utiliza PCR en tiempo real y la técnica High resolution melting (HRM) para comparar las curvas de disociación de las cadenas de ADN, las amplificaciones se realizaron por PCR de punto final y los productos se corrieron en un gel de agarosa al 2% a 115V por 75 minutos. En el caso de hembras, se espera una banda de aproximadamente 168 pb correspondiente al gen ZFX/ZFY, y en machos una banda de 224 pb y una de 168 pb que corresponden a los genes SRY y ZFX/ZFY, respectivamente.

Para las amplificaciones, se utilizaron los mismos productos de extracción de ADN bacteriano empleados para caracterizar la microbiota del intestino de las focas y se aumentó a 45 ciclos el programa de PCR propuesto por Robertson y colaboradores (2018). En las amplificaciones se incluyeron: a) triplicados de las muestras para obtener resultados consistentes, b) controles positivos correspondientes a muestras rectales de crías de focas de puerto de sexo conocido (una hembra y un macho, sexados en capturas) y c) controles negativos.

Cuando las amplificaciones no fueron exitosas, se realizaron nuevas extracciones de las muestras utilizando el protocolo Isolation of DNA from stool for human analysis propuesto por el fabricante del kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®); lo anterior con la finalidad de aislar mayor cantidad de ADN de foca. Los productos de extracción se cuantificaron en el fluorómetro Qubit 3.0 (Invitrogen) con el kit Qubit® dsDNA BR Assay (ThermoFisher™). En caso de ser necesario, el ADN se limpió con el kit DNeasy PowerClean Pro Cleanup (QIAGEN®) para eliminar inhibidores de la reacción de PCR.

2.6.4 Amplificación del gen 16S ARNr

La región hipervariable V4 del gen 16S ARNr se amplificó con la estrategia y primers propuestos por Kozich y colaboradores (2013). A diferencia de la estrategia de dos pasos de PCR, en esta estrategia la amplificación y la unión de los adaptadores de secuenciación se realizan en un solo paso de PCR, porque los *primers* incluyen los adaptadores, los índices, un *linker* y los oligos específicos para amplificar la región de interés. El PCR se realizó con 5-10 ng de ADN en una reacción de 25 µl utilizando los *primers* específicos para la región V4 del gen 16S ARNr propuestos por Klindworth y colaboradores (2013): 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGGTAA- 3') y 806R (5'-GGGACTACHVGGGTWTCTAAT- 3'). Las reacciones de PCR incluyeron: 5 µl de buffer *MyTaq*[™] (5x), 0.8 µl de primer (concentración 10 µM), 0.156 µl de ADN polimerasa *MyTaq*[™], 10 ng de ADN y el volumen de agua necesario para completar 25 µl por reacción. El programa de PCR consistió en una etapa inicial de 95°C x 30s, desnaturalización inicial de 95°C durante 2 minutos, y 25 ciclos (95°C durante 30 s; 55°C x30 s y 72°Cx 30 s), con una extensión final a 72°C durante 5

min. Las reacciones de PCR se realizaron individualmente para cada muestra y los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1%. El tamaño del fragmento esperado fue de aproximadamente 400 pb.

2.6.5 Preparación de las librerías

Para la normalización de las librerías se utilizó el kit *SequalPrep™ Normalization Plate* (Invitrogen), que permite obtener una concentración final de 1- 2 ng/μl de producto de PCR, y se siguió el protocolo propuesto por el fabricante. Todos los productos normalizados se cuantificaron (2 μl por muestra) en el equipo Qubit® 3.0 de Invitrogen™ con el kit *Qubit® dsDNA BR Assay* (ThermoFisher™). Dependiendo de la concentración de las muestras, se mezclaron 10 μl de los productos de PCR normalizados para crear distintas metamuestras. La concentración de cada metamuestra en pM se determinó utilizando el tamaño final del amplicón (390 pb) en la fórmula:

$$[pM] = \left(\frac{\frac{ng}{\mu l}}{660 \frac{g}{mol} * \text{número de pares de bases del fragmento}} \right) * 1 \times 10^9 \quad (1)$$

La concentración final de pool fue de 978 pM.

Para que las muestras puedan ser secuenciadas, es necesario desnaturalizarlas (separación de las dobles cadenas a hebras simples). Para esto, se utilizó el kit MiSeq® Reagent V2 de 300 ciclos de Illumina® y se siguió el protocolo para la preparación de librerías metagenómicas 16S ARNr (Illumina®) modificado por la Dra. Jennyfers Chong², descrito a continuación. Se agregaron 987 μl del pool (978 pM) y 200 μl de NaOH (0.2 N) en un tubo tipo Eppendorf y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 980 μl del buffer de hibridación a los 20 μl del pool desnaturalizado.

Como control de secuenciación, se utilizó la librería PhiX (de puertamente utilizada en equipos de Illumina). Para diluir y desnaturalizar la librería control, se añadió 1 μl de PhiX (10 000 pM) y 1.5 μl de agua para una concentración de 4000 pM. A los 2.5 μl obtenidos se les agregaron 2.5 μl de NaOH (200 mM) y se incubaron

² Técnico del Laboratorio de Metagenómica del CICESE (2019).

durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 495 µl del buffer de hibridación (HT1) para obtener una concentración de 20 pM.

Para la secuenciación, es necesario combinar la biblioteca de amplicones (16S ARNr) con el control PhiX; cada uno se llevó a una concentración de 7.7 pM. Finalmente, la metamuestra y el PhiX se combinaron añadiendo 675 µl del pool y 75 µl de PhiX, para obtener una solución de trabajo final con un volumen de 750 µl, a una concentración de 7.7 pM con 10% de PhiX.

2.6.6 Secuenciación

Se utilizó una celda de flujo estándar (Illumina®) que produce 2x150 pb de lecturas pareadas (*output* 4.5–5.1 Gb) para secuenciar las librerías y se agregaron los *primers* necesarios para la estrategia de Kozich (2013). Además, se creó un archivo de texto (*sample sheet*) para indicar la combinación de índices de cada muestra para que al final de la corrida, las muestras se separan en archivos distintos. La secuenciación pareada (*paired-end*) se realizó en el equipo MiSeq™ de Illumina® que se encuentra en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE).

2.6.7 Procesamiento y análisis de las secuencias

Las secuencias separadas por muestras (demultiplexadas) se descargaron de la nube BaseSpace™; estos archivos contienen las secuencias sentido (*forward*) y antisentido (*reverse*) independientes con los valores de calidad asociados a cada base (extensión *.fastq*). Todos los análisis posteriores se realizaron en el programa RStudio v.3.6.2 (R Core Team, 2019).

Una de las ventajas de utilizar la estrategia de Kozich para amplificar las muestras, es que los *primers* no son secuenciados, permitiendo un mejor aprovechamiento del número de ciclos de la celda de flujo. En la paquetería Cutadapt (Callahan et al., 2016) se corroboró la presencia de *primers* en cualquiera de sus posibles direcciones y se eliminaron en caso de ser necesario.

El procesamiento de las secuencias se realizó con la paquetería DADA2 v.1.14.1 (Callahan et al., 2016) y se siguió el tutorial de DADA2 (disponible en: <https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>) para obtener las variantes de secuencias de amplicones (ASV, por sus siglas en inglés). Las secuencias se filtraron para

eliminar aquellas que tuvieran nucleótidos indeterminados (maxN=0), una longitud menor a 120 pb (minLen=120) y un número máximo de errores esperados < 2 (maxEE=2, trunQ=2).

DADA2 crea un modelo probabilístico de errores que permite eliminar lecturas erróneas y eliminar réplicas de las secuencias (*dereplicated*) para disminuir la redundancia y el gasto computacional (Callahan et al., 2016), conservando el número de réplicas por ASV. Los ASVs se infirieron con el método *pseudo-pooling* (pool= "pseudo"), que es adecuado especialmente en experimentos longitudinales porque proporciona una descripción precisa de la variabilidad de secuencias al incrementar la detección de ASVs poco abundantes (Quast et al., 2012). Este método permite diferenciar verdaderas secuencias biológicas únicas (*singletons*) de aquellas falsas que necesitan eliminarse (Callahan et al., 2016). Las secuencias sentido y antisentido se unieron y se eliminaron las quimeras (artefactos de PCR). El producto final es una tabla con las abundancias de ASVs por muestra.

2.6.8 Asignación taxonómica

La asignación taxonómica de las secuencias se realizó en el programa R con la paquetería DADA2 y la base de datos SILVA 138 (Quast et al., 2012) entrenada para DADA2. Debido a la longitud de las secuencias (>250 bases), se fijó un *Bootstrap* = 80 (minBoot=80). La asignación taxonómica se llevó hasta nivel de especie (assignSpecies) permitiendo múltiples asignaciones (allowMultiple=TRUE) en el caso de que las secuencias tuvieran varias coincidencias exactas con diferentes especies. El pre-procesamiento involucró la eliminación de secuencias correspondientes a mitocondrias y cloroplastos, *phyla* con prevalencias menores a 1 y *phyla* sin asignación taxonómica, por poder corresponder a falsos positivos.

2.6.9 Diversidad alfa

Las estimaciones de diversidad alfa se calcularon con los conteos crudos de ASVs con la paquetería *phyloseq* (McMurdie y Holmes, 2013), principalmente. En metagenómica, la diversidad alfa se refiere a la riqueza de ASVs en cada muestra y la uniformidad de su distribución. Los índices de diversidad alfa utilizados fueron: a) Shannon, b) número de especies observadas, c) la diversidad filogenética de Faith (PD), que además de considerar el número de especies presentes, pondera sus relaciones filogenéticas y d) rareza. Los taxones raros se definieron como aquellos que tuvieran una prevalencia inferior al 20% y abundancias menores al 0.1%.

Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la distribución de los resultados obtenidos en cada índice (normalidad). Dependiendo del tipo de distribución de los datos (con o sin normalidad), se evaluó la homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Bartlett o Fligner-Killen. Para determinar diferencias significativas en la diversidad microbiana entre las diferentes etapas, colonias y sexos, se crearon modelos mixtos de las variables de estudio y se utilizaron pruebas de análisis de varianzas (ANOVA) y Tukey para comparaciones múltiples en los índices con normalidad y homocedasticidad— y la prueba de Kruskal-Wallis para índices sin distribución normal. Las gráficas de los resultados se crearon con la librería *ggplot2* (Wickham, 2009).

Para conocer los patrones de distribución de los ASVs en las comunidades microbianas, se utilizaron curvas de rango-abundancia modificadas (en términos de proporción). En este tipo de análisis, los ASVs se ordenan de mayor a menor abundancia y se obtiene un perfil de abundancias por rango, lo que permite conocer la dominancia de las especies y el perfil de la comunidad (especies abundantes vs especies raras).

Se definió el grupo núcleo de la microbiota de la foca de puerto como aquellos ASV presentes en al menos el 80% de las muestras con una abundancia relativa $\geq 0.01\%$ y se representaron en diagramas Venn. Para visualizar todos los ASVs únicos y compartidos entre los grupos de estudio, se crearon gráficas UpSet utilizando el paquete UpSetR v.1.4.0.

Debido a que el análisis de UpSet es sensible a diferencias en el tamaño de las muestras, en el análisis de las etapas, se escogieron aleatoriamente 26 muestras de la etapa de reproducción-muda para que fueran equivalentes con el número de muestras obtenidas de la etapa de postmuda.

2.6.10 Diversidad beta

La diversidad beta consiste en el cálculo de métricas de distancia y disimilitud basadas en comparaciones entre muestras; las estimaciones obtenidas son sensibles a diferencias en la profundidad de secuenciación que requieren ser normalizadas. Para este análisis, se realizó una exploración visual de los conteos basados en la prevalencia y el número de secuencias obtenidas de cada ASV detectado para filtrar aquellos *taxa* “raros”. Ajustar los datos a un modelo estadístico adecuado es esencial para realizar inferencias sobre cambios en abundancias de grupos taxonómicos (McMurdie y Holmes, 2014).

Los datos de secuenciación masiva se caracterizan por presentar números discretos no negativos, abundancias de ceros (reales) y una sobre dispersión de los datos, donde la varianza de los conteos de lecturas es mayor que la media. La distribución del tipo Binomial Negativa se ajusta a estas condiciones al poseer un parámetro de dispersión:

$$\sigma^2 = \mu + \alpha\mu^2 ; \alpha > 0 \quad (2)$$

Donde:

$$\sigma^2 = \text{Varianza}; \mu = \text{Media}, \alpha = \text{Parámetro de dispersión}$$

Se utilizó el método propuesto por McMurdie & Holmes (2014) para normalizar las muestras por medio de la transformación y estabilización de las varianzas y ajustar los datos a una distribución Binomial Negativa. El ajuste a un modelo de Binomial Negativa y la estabilización de la varianza de los conteos, se realizó en la librería DeSeq2 (Anders et al., 2010). Los datos se transformaron de acuerdo al modelo de estudio y la tabla generada con la varianza estabilizada se utilizó en los análisis posteriores.

Para la exploración de las similitudes entre muestras se utilizó la técnica de ordenación “análisis de componentes principales (PCoA)”. Este método consiste en reducir las distancias entre los datos para que las relaciones entre muestras puedan visualizarse en un gráfico de dispersión de pocas dimensiones (2-3 ejes). Cada coordenada principal (PC) explica un determinado porcentaje de la variabilidad observada.

Como distancia de ordenación, se empleó la métrica UNIFRAC que considera la filogenia de las comunidades (Lozupone et al., 2011; Lozupone y Knight, 2005); esta métrica puede ser: a) ponderada, que considera la abundancia de los ASVs (cuantitativo) y b) no ponderada, que solamente toma en cuenta la presencia o ausencia de ASVs.

Para conocer si las diferencias en la estructura de las comunidades son estadísticamente significativas entre las variables de estudio, se utilizó la prueba de *adonis* (ANOVA con permutaciones) de la librería *vegan*, con 1000 permutaciones. Esta prueba es análoga a un análisis paramétrico de la varianza, ya que divide las matrices de distancia en fuentes de variación y produce un valor pseudo-F, cuya significación estadística puede determinarse mediante una prueba de permutación. Esta prueba requiere que los grupos de comparación tengan una dispersión homogénea, para ello, se empleó la función *betadisper*

(*vegan*) que determina si un grupo tiene mayor varianza composicional en comparación al otro ($p < 0.05$). Para esta prueba, primero se realizó una comparación general entre las variables de estudio (etapa, colonia y sexo) y posteriormente se hicieron comparaciones de cada componente de las variables de interés.

2.6.11 Abundancia diferencial

La librería *Deseq2* se utilizó para detectar ASVs cuya abundancia fuera estadísticamente diferente entre los grupos de comparación. Se utilizaron las tablas de conteos filtradas, pero no transformadas de ASVs y cada tabla se ajustó bajo el modelo de estudio. Por ejemplo, para detectar si la composición microbiana durante el periodo de postmuda es diferente entre las colonias de estudio, se creó una tabla que contenía solamente los conteos correspondientes a la etapa de postmuda y el modelo se ajustó a la variable colonia ($\sim$ Colonia); posteriormente se contrastaron los datos de postmuda del EPB y TS.

Con el fin de identificar géneros con abundancias diferenciales consistente entre las variables de estudio, se consideró un valor p ajustado < 0.01 y solamente se evaluaron los grupos comparativos que mostraron diferencias estadísticamente significativas en su diversidad beta.

2.6.12 Inferencia funcional

Las muestras se analizaron en el programa PICRUSt2 (Douglas et al., 2020) para predecir la composición funcional de la microbiota de las focas de puerto. PICRUSt2 utiliza la tabla de conteos de ASVs para calcular las abundancias de enzimas y procesos metabólicos de las muestras de estudio.

Las tablas de abundancias de ASVs filtradas, se importaron al entorno de programación Python y se siguió el tutorial de PICRUSt2 con los parámetros predeterminados ([https://github.com/picrust/picrust2/wiki/PICRUSt2-Tutorial-\(v2.4.1\)](https://github.com/picrust/picrust2/wiki/PICRUSt2-Tutorial-(v2.4.1))), descrito brevemente a continuación:

Las secuencias de estudio se alinean (HMMER: <http://hmmer.org>) y se colocan en las ubicaciones más probables dentro de un árbol de referencia (*EPA-NG*: Barbera et al., 2019). El resultado es un nuevo árbol filogenético con las secuencias de estudio y las secuencias de referencia (*GAPPA*: Czech et al., 2020).

Se predice el contenido de los genomas faltantes para cada ASV, el número de copias de cada familia de gen por ASV y el número de copias del gen 16S ARNr (*castor*: Louca & Doebeli, 2018). Las predicciones de familias de genes se basaron en el número de clasificación de enzimas (EC) para poder inferir las rutas metabólicas con la base de datos MetaCyc (*MinPath*: Ye & Doak, 2009). En este paso (*hsp.py*) se calculó el “nearest-sequenced taxon index” (NSTI) de cada ASV para conocer la similitud de los ASVs del estudio con los de referencia. Valores NSTI < 2 indican que las predicciones son confiables porque los ASVs del estudio tienen parientes cercanos que poseen metagenomas caracterizados. Las predicciones de familias de genes se basaron en el número de clasificación de enzimas (EC) para cada ASV.

Los ASVs, normalizados por el número de copias del gen 16S, se multiplican por el número de copias de la familia de genes predichos. El resultado es una tabla con las muestras, los ASVs asociados, y las funciones predichas para cada ASV.

Finalmente, a cada gen se le asigna una descripción de su función y se obtiene una tabla de abundancias de funciones y las correspondientes vías de EC por muestra.

La librería DESeq2 se utilizó para normalizar los conteos de EC obtenidos de PICRUST2. La tabla de ECs se filtró bajo criterios visuales basados en su prevalencia y conteos. Al igual que en el análisis de abundancia diferencial, dependiendo del tipo de comparación, los datos de ECs se transformaron con base en la variable de interés. Con el fin de identificar ECs con abundancia diferencial consistente entre las variables de estudio, se consideró un valor p ajustado < 0.01 y solamente se evaluaron los grupos comparativos que mostraron diferencias estadísticamente significativas en su diversidad beta.

2.7 Resultados

2.7.1 Colecta de muestras

En Todos Santos, el área de estudio comprendió la isla del sur, en dos playas de canto rodado (una expuesta y otra protegida del oleaje) y una plataforma rocosa. En comparación con los muestreos en el Estero de Punta Banda, los sitios de colecta de muestras en Todos Santos variaron entre etapas dependiendo de la disponibilidad de muestras (Figura 2).

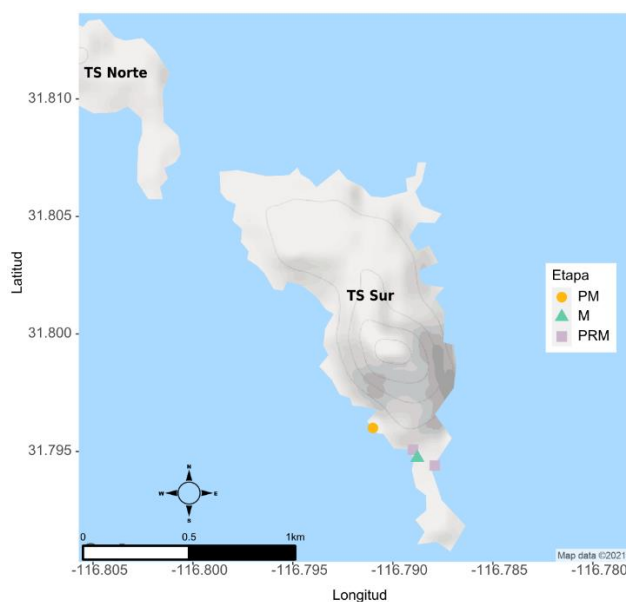


Figura 2. Sitios de muestreo en la isla Todos Santos sur en las etapas de premuda (PRM), muda (M) y postmuda (PM).

Las muestras se colectaron durante los periodos de premuda, muda y postmuda y se obtuvieron un total de 118 muestras (Tabla 1).

Tabla 1. Número de muestras fecales obtenidas en cada etapa y lugar de muestreo.

Periodo	Fecha	Colonia*	Número de muestras
Premuda	11-abr-19	TS	38
	18-abr-19	EPB	12
	24-abr-19		
Muda	19-jun-19	TS	13
	11-jun-19	EPB	25
	12-jun-19		
Postmuda	13-sep-19	TS	13
	01-oct-19	EPB	17
	04-nov-19		
	06-nov-19		

*Todos Santos (TS); Estero de Punta Banda (EPB)

2.7.2 Extracción de ADN

La concentración de ADN presentó variaciones entre cada muestra. En aquellas pertenecientes a la colonia de focas de Todos Santos (TS), el valor promedio obtenido fue 0.763 ng/μl con un rango de 0.2 – 4.92 ng/μl. Los productos de extracción de las muestras de la colonia de TS pueden observarse en la Figura 3.

De la etapa de premuda, se realizó la extracción de ADN de 24 muestras, de las demás etapas se procesaron todas las muestras.

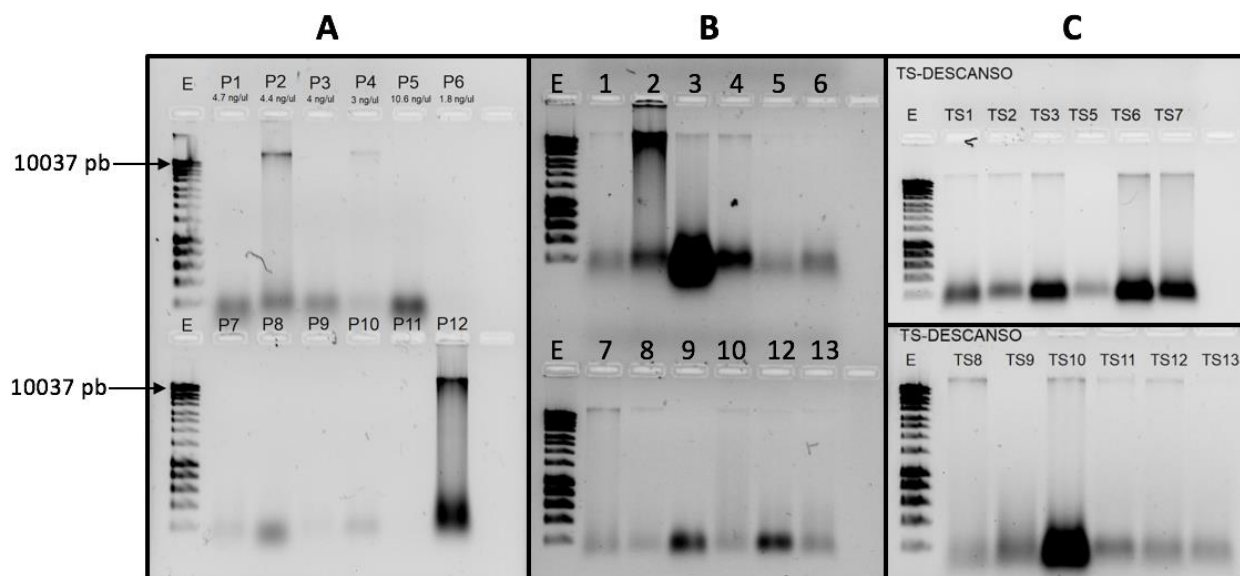


Figura 3. Productos de extracción de ADN de las muestras fecales de la colonia Todos Santos (TS) en las etapas de premuda (A), muda (B) y postmuda (C). E: escalera.

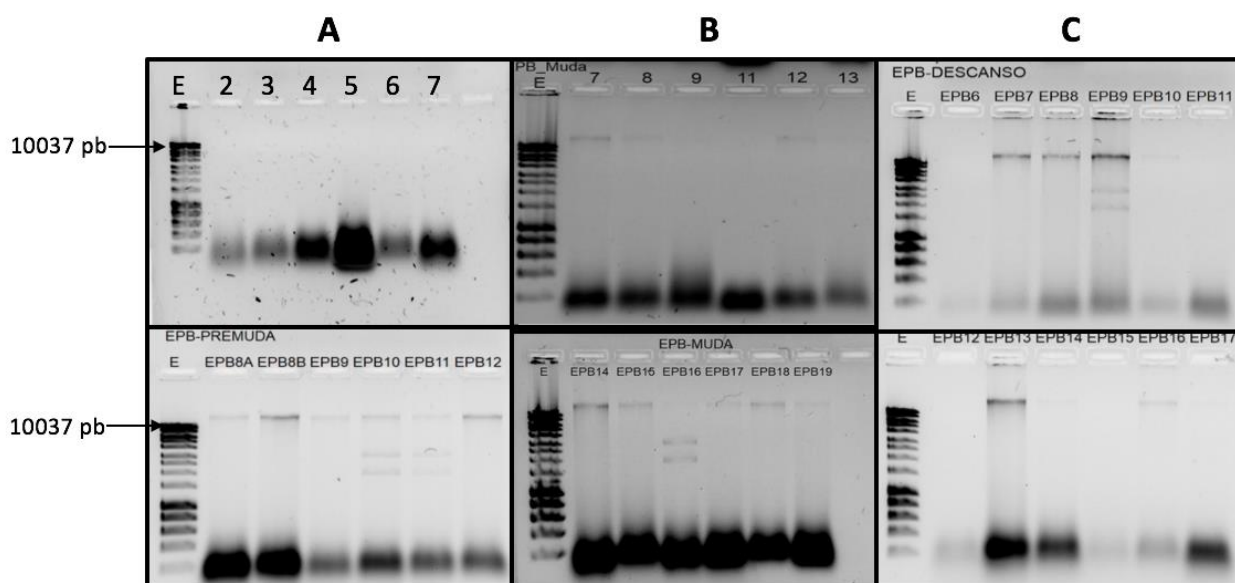


Figura 4. Productos de extracción de ADN de las muestras fecales de la colonia del Estero de Punta Banda (EPB) en las etapas de premuda (A), muda (B) y postmuda (C). E: escalera.

Con respecto a las muestras del Estero de Punta Banda (EPB), el valor promedio de la concentración de ADN obtenido fue 1.45 ng/ μ l con un rango de 0.1 – 9.4 ng/ μ l. Los productos de extracción de las muestras de la colonia del Estero de Punta Banda pueden observarse en la Figura 4. Algunas muestras, principalmente del periodo de premuda, no presentaron una banda visible (Figura 3 y 4). De la etapa de muda, se realizó la extracción de ADN de 20 muestras, de las demás etapas se procesaron todas las muestras.

2.7.3 Amplificación del gen 16S ARNr

La mayoría de las muestras, tanto de la colonia de Todos Santos (Figura 5) como del Estero de Punta Banda (Figura 6) presentaron amplificaciones exitosas al limpiar las muestras con el kit *DNeasy PowerClean Pro Cleanup* (QIAGEN).

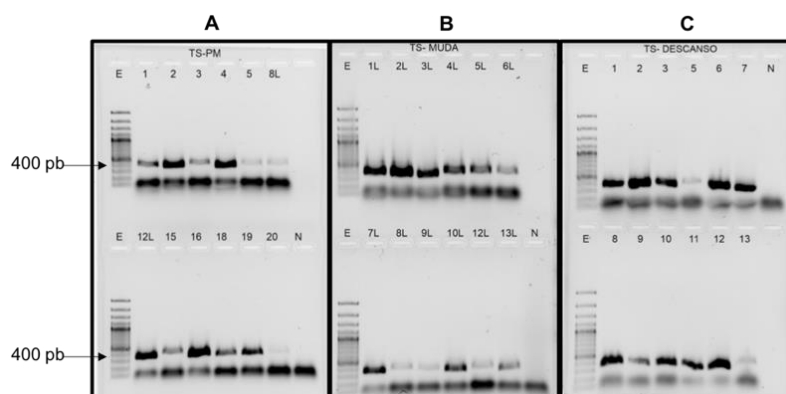


Figura 5. Productos de PCR de la región V4 del gen 16S ARNr de algunas muestras de la colonia Todos Santos correspondientes a las etapas de premuda (A), muda (B) y postmuda (C). El tamaño del fragmento esperado es de aprox. 400 pb. E: escalera.

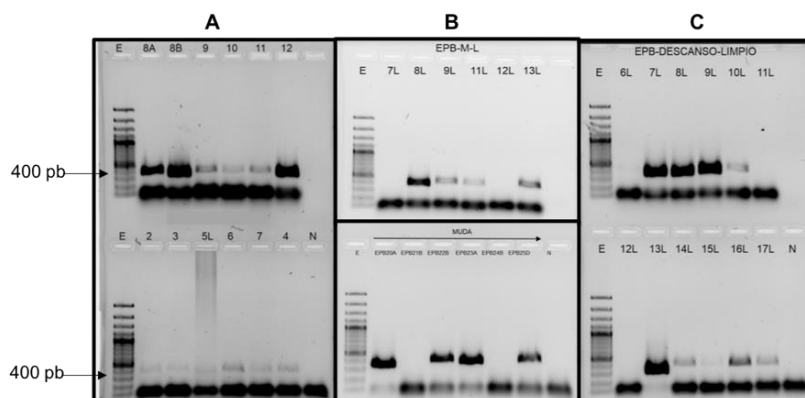


Figura 6. Productos de PCR de la región V4 del gen 16S ARNr de algunas muestras de la colonia del Estero de Punta Banda correspondientes a las etapas de premuda (A), muda (B) y postmuda (C). El tamaño del fragmento esperado es de aprox. 400 pb. E: escalera.

2.7.4 Sexado genético de las muestras

El sexo de las focas se pudo identificar utilizando las muestras de heces, la amplificación por PCR de punto final y la electroforesis. Las muestras de machos presentaron dos bandas de aproximadamente 224 y 168 pb, (Figura 7A) mientras que las hembras sólo presentaron la banda de 168 pb (Figura 7B). El patrón de bandas se comparó con los controles positivos correspondientes a las muestras de crías de sexo conocido (exploración visual). Tres muestras pertenecientes a focas del Estero de Punta Banda no se pudieron sexar, estas muestras fueron: EPB22 de la etapa de muda y EPB10 y EPB16 de la etapa de postmuda.

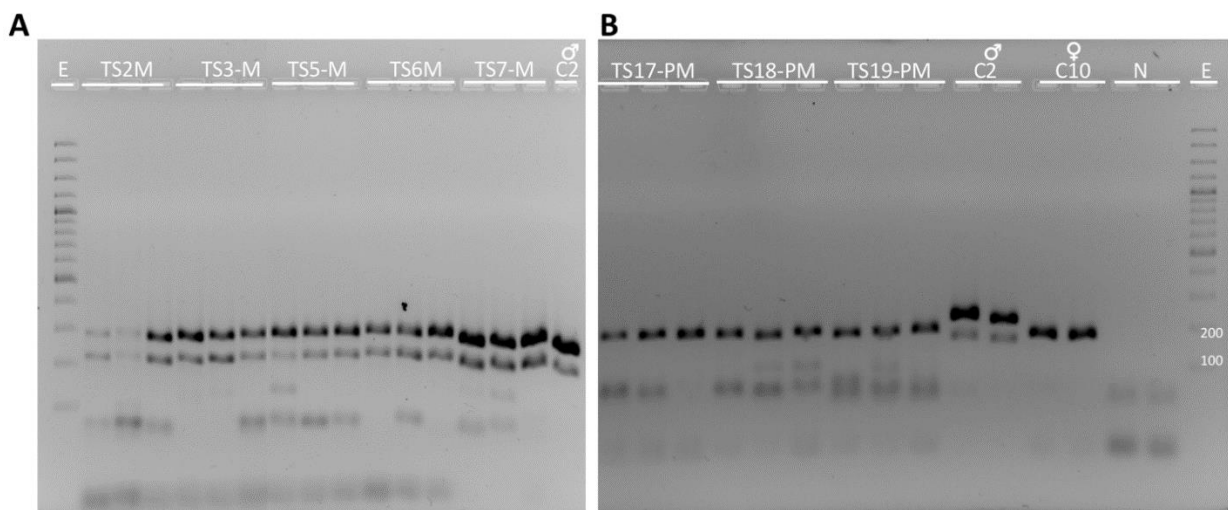


Figura 7. Productos de PCR del sexado de las muestras. A) Los machos presentaron dos bandas y B) las hembras una. Se incluyeron triplicados de las muestras y controles positivos de crías cuyo sexo era conocido (C2 y C10). E: escalera, N: control negativo.

En las muestras de Todos Santos, la proporción de sexos no fue equilibrada respecto a las etapas. La etapa de muda está representada únicamente por machos, mientras que en la premuda la mayoría de las muestras pertenecen a hembras. En el Estero de Punta Banda, la proporción de sexos entre etapas fue más equilibrada. Debido a la desproporción de sexos y que los muestreos se realizaron al final de las etapas de premuda y muda, se decidió unir estas dos variables y denominarlas “Rep-muda”. Las fechas de estos muestreos corresponden a las etapas con mayor desgaste energético en las focas de puerto.

2.7.5 Descripción general del set de datos

Se conservaron un total de 4 846 610 lecturas después del procesamiento de las muestras con DADA2 y de eliminar secuencias no correspondientes a microorganismos, como cloroplastos y mitocondrias. La muestra con el mayor y menor número de lecturas fue TS13-M con 118 877 y EPB3PM con 18 305 lecturas, respectivamente. En general, el promedio de lecturas obtenidas fue 66 638 (Figura 8A). El número de lecturas obtenidas fue diferente entre colonias y etapas. En el set de datos final, se conservaron 72 muestras que cumplieron con profundidades de secuenciación óptimas (Figura 8B).

La gráfica de rarefacción, separada por etapas y colonias, muestra la cantidad de taxa en función al número de lecturas (Figura 8C). Todas las muestras alcanzaron la asíntota, lo que significa que la profundidad de secuenciación fue óptima para muestrear toda la riqueza microbiana por muestra.

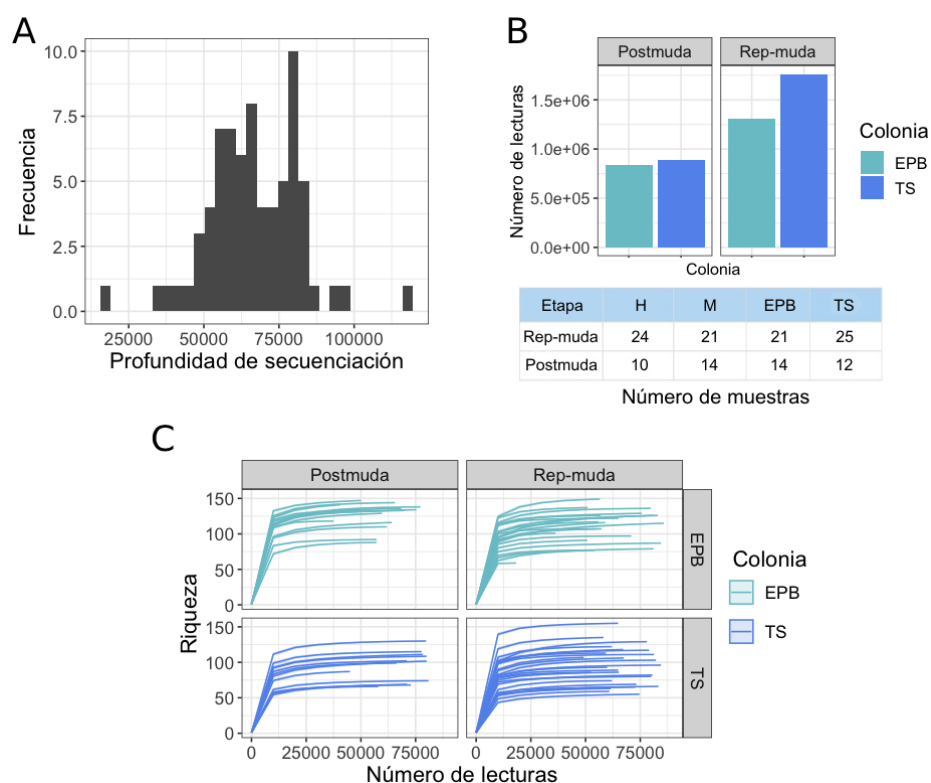


Figura 8. Descripción general del set de datos de las muestras del Estero de Punta Banda (EPB) e isla Todos Santos (TS) en los periodos de reproducción-muda (Rep-muda) y postmuda. A) Histograma del número de secuencias por muestra. B) Cantidad de lecturas obtenidas por colonia y sexo. En la tabla se muestran los números de muestras por sexo, etapa y colonia. C) Gráfica de rarefacción por muestra agrupada por colonia y etapa. H=hembra, M=macho.

2.7.6 Composición taxonómica general de las muestras de heces

En la asignación taxonómica se obtuvieron 782 taxones representados en 7 rangos taxonómicos (desde Reino hasta especie). De los 16 *phyla* identificados en las muestras fecales (Anexo A), solamente 4 tuvieron una alta prevalencia. Estos *phyla* fueron: Bacteroidota, Firmicutes, Fusobacteriota y Proteobacteria (Anexo A).

Los perfiles microbianos revelaron una gran variación intraespecífica en individuos pertenecientes a la misma colonia y etapa (Figura 9). La muestra TS12PM presentó una alta abundancia de taxa “rara” (< 1%) clasificados en la categoría de “otros”. En algunos casos, fue posible identificar los taxa más abundantes (> 1%) hasta nivel de especie, en donde destaca *Photobacterium damsela*, una bacteria patógena.

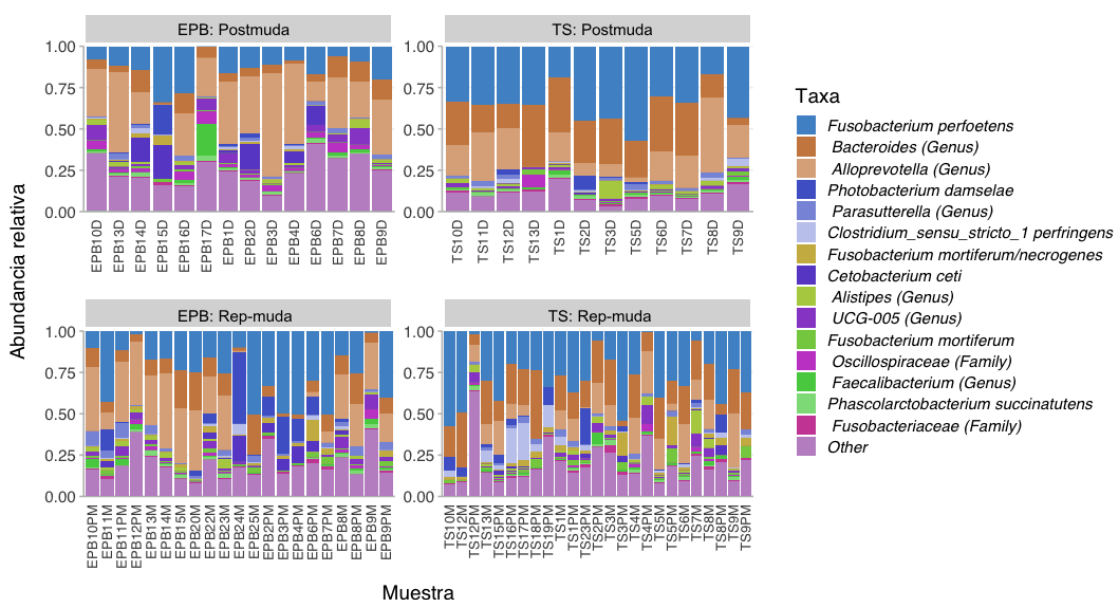


Figura 9. *Phyla* de mayor abundancia (>1%) identificado en las heces de focas de puerto del Estero de Punta Banda (EPB) e isla Todos Santos (TS) en las etapas de reproducción-muda y postmuda. *Taxa* con abundancias menores al 1% se encuentran agrupados en la categoría de “Otros”.

La gráfica de curvas de rango-abundancia (del inglés: *rank abundance curve*) expresada en términos de proporción de especies que contribuyen a la abundancia total, muestra que los *taxa* más abundantes en las muestras de heces representan el 25% de la abundancia acumulada (Figura 10). La forma de la curva, con una pendiente que sube paulatinamente, indica que la comunidad microbiana de las focas de puerto en cada etapa está dominada por pocas especies.

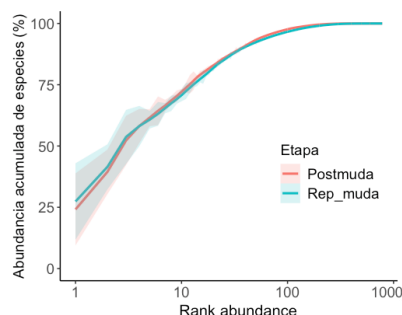


Figura 10. Curva de rango-abundancia de las especies microbianas presentes en las heces de las focas de puerto en las distintas etapas de estudio.

2.7.7 Análisis de diversidad alfa

Los taxa observados y el índice de Shannon presentaron una distribución normal y homocedasticidad, contrario a los índices de diversidad filogenética de Faith y Rareza, que no presentaron normalidad pero sí homogeneidad de varianzas. En todos los modelos mixtos de la prueba ANOVA, la variable más importante fue la “colonia”, seguida de “etapa”. La variable “sexo” no fue significativa en ningún modelo, por lo tanto, fue eliminada. En todos los modelos, la prueba Tukey demostró que sólo en la etapa de postmuda las colonias presentan diferencias en la estructura de su microbiota. Además, en todos los índices (especies observadas, diversidad filogenética, rareza y Shannon), las muestras de la colonia del EPB presentaron una media mayor en comparación con las muestras de TS (Figura 11).

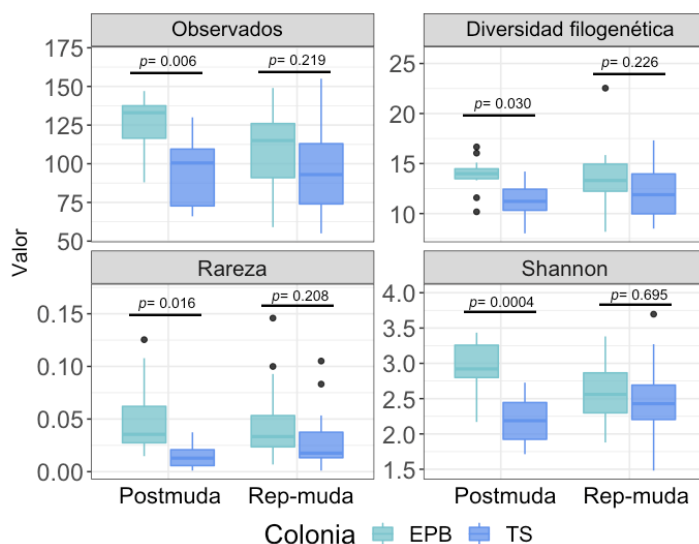


Figura 11. Comparación de la diversidad alfa en las muestras de heces agrupadas por etapa y colonia. La comparación entre etapas mostró que sólo durante la etapa de postmuda, las colonias presentaron diferencias en su composición microbiana. EPB: Estero de Punta Banda, TS: isla Todos Santos.

2.7.8 Análisis general de diversidad beta

En la exploración general de los factores que conllevan a tener una similitud microbiana, se utilizaron las tablas transformadas de las distancias UNIFRAC. Cuando no se considera la abundancia de los microorganismos (UniFrac no ponderado), la prueba *betadisper* indicó que la dispersión de los grupos no es homogénea (*betadisper*- $p=0.023$). Los resultados obtenidos indican que existe una alta variación individual en la estructura de la comunidad en cada grupo de estudio y es visible en la gráfica PCoA (Figura 12 A). Por lo tanto, no se pudo realizar la prueba de PERMANOVA con todas las variables porque no se cumplió con el supuesto de dispersión homogénea. Las pruebas *post hoc* indicaron que no todas las combinaciones de variables poseen dispersiones heterogéneas, por lo que es necesario evaluarlas de manera independiente.

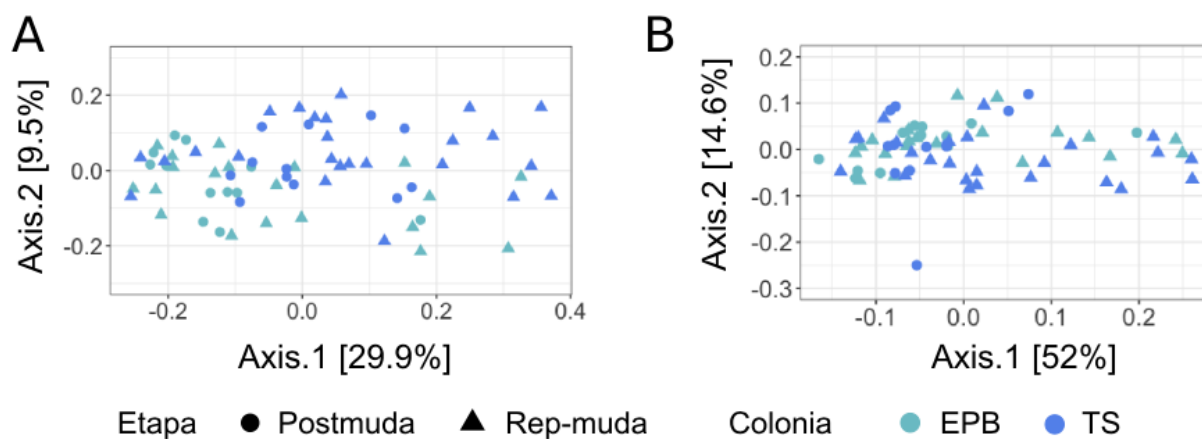


Figura 12. Análisis de coordenadas principales (PCoA) con las distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B) basadas en los grupos de etapa y colonia. EPB: Estero de Punta Banda, TS: isla Todos Santos.

Cuando se considera la abundancia de los microorganismos, la dispersión de los grupos fue homogénea (*betadisper*- $p=0.01$; figura 12 B) y la estructura general de la comunidad microbiana mostró cambios claros y significativos en función de la colonia, etapa y sexo (Tabla 2). Sin embargo, la interacción entre estas variables no fue significativa.

Tabla 2. Resultados del análisis de PERMANOVA para las varianzas de distancia UNIFRAC considerando todas las variables de estudio.

Variable	Ponderado	
	R ²	p
Etapas	0.048	0.013*
Colonia	0.037	0.035*
Sexo	0.061	0.009**
Etapas: Colonia	0.014	0.35
Etapas: Sexo	0.024	0.118
Colonia: Sexo	0.019	0.199
Etapas: Colonia: Sexo	0.016	0.253

Significancia: 0.001**, 0.05*, 0.1*

2.7.9 Cambios en la estructura de la comunidad microbiana entre las focas de puerto durante las etapas de reproducción-muda y postmuda

La comparación entre las etapas de reproducción-muda y postmuda reveló variaciones temporales en la composición de la comunidad microbiana de las focas de puerto relacionadas con la etapa anual en la que se encuentren. Los microorganismos más abundantes fueron *Fusobacterium perfoetens*, *Bacteroides* y *Alloprevotella*, y destaca la presencia de una bacteria potencialmente patógena, *Photobacterium damsela* (Figura 13A). Se detectaron una mayor cantidad de ASVs únicos y totales en las muestras de reproducción-muda en comparación con las de postmuda; ambas etapas comparten 273 ASVs (Figura 13B).

El grupo núcleo entre las etapas está conformado por 21 miembros bacterianos que representan el 70% de la abundancia relativa total (Figura 13B). *Fusobacterium perfoetens* es la bacteria más abundante del grupo núcleo (Anexo B). En el periodo de reproducción-muda no se detectaron microorganismos que fueran compartidos por el 80% de las muestras y tuvieran una abundancia relativa mayor al 0.01%. El grupo núcleo de las muestras de postmuda está conformado por 17 miembros bacterianos y el género *Alloprevotella* es el más abundante.

Los resultados de DESeq2 revelaron 6 géneros responsables de las diferencias observadas en la composición microbiana entre los grupos de etapa (Figura 13C). *Colidextribacter* fue el único género que fue más abundante durante el periodo de postmuda. *Photobacterium damsela* y *Mycoplasma* (bacterias potencialmente patógenas), incrementan su abundancia durante el periodo de reproducción-muda. Estos microorganismos no forman parte del grupo núcleo compartido entre las etapas de estudio. Se detectaron

3 vías EC (del inglés: *Enzyme Classification*) que difieren entre las etapas de estudio, todas ellas siendo más abundantes en el periodo de reproducción y muda (Figura 13D).

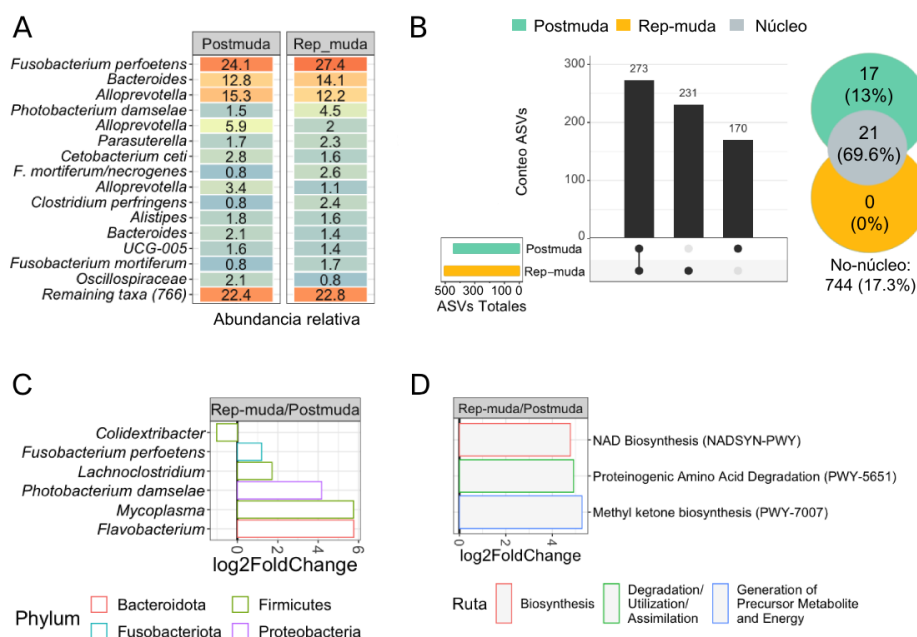


Figura 13. Composición de la microbiota del intestino de focas de puerto en los periodos de reproducción-muda y postmuda. A) Los 15 ASV más abundantes detectados en la microbiota del intestino de las focas. B) Número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) entre las etapas de estudio. El diagrama de Venn representa el grupo núcleo de microorganismos, el número de ASVs y su abundancia relativa en cada grupo. El análisis de abundancia diferencial revela cambios entre las focas durante las etapas de estudio en taxones microbianos (C) y en rutas metabólicas (D). Los géneros y las vías con un cambio $\log_2\text{-fold} > 0$ son significativamente más abundantes en las focas durante el periodo de reproducción-muda.

2.7.10 Cambios en la estructura de la comunidad microbiana entre las focas de puerto del EPB y TS

La comparación entre las focas del EPB y TS reveló cambios en la composición de microbiota del intestino relacionadas con la ubicación de las colonias. Las bacterias más abundantes en ambos grupos fueron *Fusobacterium perfoetens*, *Bacteroides* y *Alloprevotella* (Figura 14A). Las muestras del EPB poseen una mayor riqueza de ASV y su grupo núcleo es más numeroso que aquellas pertenecientes a TS (Figura 14B). Ambas colonias compartieron 280 ASVs. El grupo núcleo de ambas colonias está compuesto por 23 miembros bacterianos que representan el 69% de la abundancia relativa total. En el grupo núcleo del EPB, el género *Alloprevotella* es el más abundante (Anexo C). En TS el grupo núcleo está constituido solamente por dos bacterias, *Rombustia hominis* y *Blautia*. Al igual que en la comparación entre etapas, la especie

Fusobacterium perfoetens fue la más abundante en el grupo núcleo compartido entre las colonias de estudio.

Se detectaron algunos cambios en la composición de la microbiota entre las colonias, con catorce géneros presentando abundancias diferenciales, siendo todos ellos más abundantes en las focas del EPB que en las de TS (Figura 14C). Entre las bacterias detectadas, destaca *Vibrio* sp., un género potencialmente patógeno.

Un total de 21 vías funcionales difirieron entre las focas del EPB y TS (Figura 14D). Todas las rutas con abundancias mayores en TS están relacionadas con la degradación de carbohidratos y compuestos carboxilados. En el EPB, la mayoría de las rutas se relacionan con biosíntesis de cofactores y vitaminas.

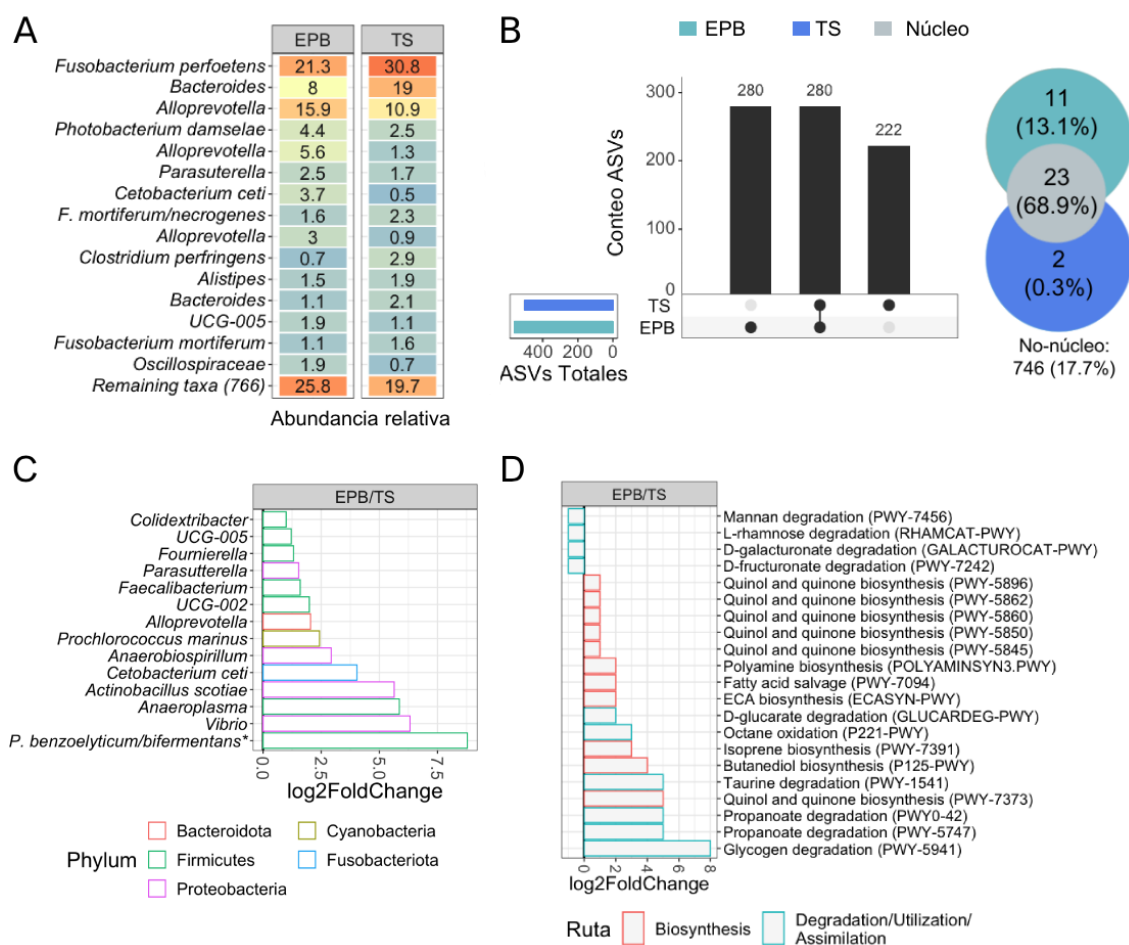


Figura 14 Composición de la microbiota del intestino de focas de puerto del Estero de Punta Banda (EPB) e isla Todos Santos (TS). A) Los 15 ASV más abundantes detectados en la microbiota del intestino de las focas. B) Número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) entre las colonias de estudio. El diagrama de Venn representa el grupo núcleo de microorganismos, el número de ASVs y su abundancia relativa en cada grupo. El análisis de abundancia diferencial revela cambios entre las colonias de estudio en taxones microbianos (C) y en rutas metabólicas (D). Los géneros y las vías con un cambio $\log_2\text{-fold} > 0$ son significativamente más abundantes en las focas durante del EPB. **Paraclostridium*.

2.7.11 Cambios en la estructura de la comunidad microbiana entre hembras y machos de focas de puerto

La comparación entre las focas hembras y machos reveló cambios en la composición de microbiota del intestino relacionados con el sexo. Las bacterias más abundantes en ambos grupos fueron *Fusobacterium perfoetens*, *Bacteroides* y *Alloprevotella* (Figura 15A). Las hembras poseen una mayor riqueza de ASV en comparación con los machos, pero no poseen un grupo núcleo entre ellas (Figura 15B). Ambos sexos comparten 299 ASVs y su grupo núcleo está conformado por 19 miembros bacterianos que representan el 69% de la abundancia relativa total de microorganismos (Figura 15B). Al igual que en las comparaciones entre colonias y etapas, la bacteria más abundante del grupo núcleo es *Fusobacterium perfoetens*. En los machos, la bacteria más dominante es *Alistipes* (Anexo D). En el análisis de abundancias diferenciales se detectaron quince géneros, todos ellos más abundantes en hembras que en machos (Figura 15C). Al igual que en el análisis de etapas, destaca la presencia de bacterias potencialmente patógenas, como *P. damsela* y *Mycoplasma*, lo que indica que las hembras durante el periodo de reproducción-muda poseen una mayor abundancia de estos microorganismos.

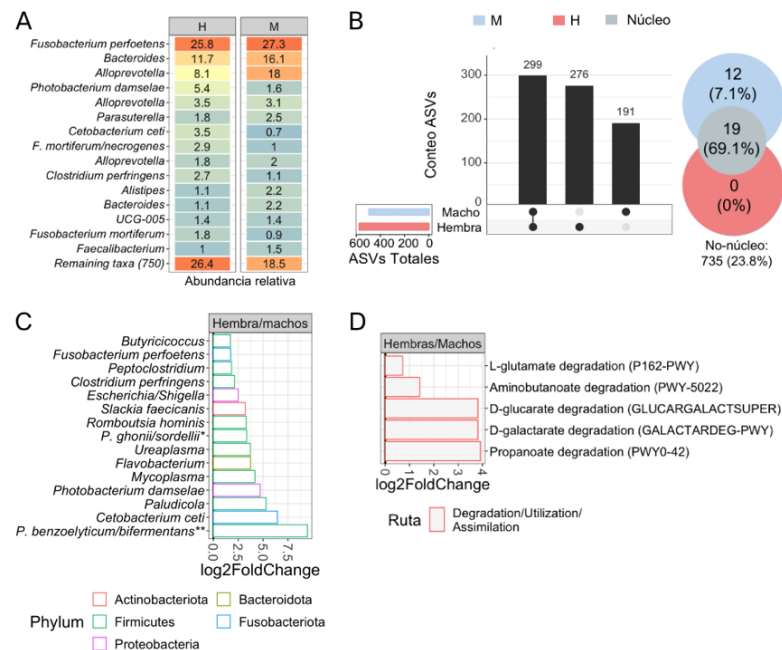


Figura 15. Composición de la microbiota del intestino de hembras (H) y machos (M) de focas de puerto. A) Los 15 ASV más abundantes detectados en la microbiota del intestino de las focas. B) Número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) entre los sexos. El diagrama de Venn representa el grupo núcleo de microorganismos, el número de ASVs y su abundancia relativa en cada grupo. El análisis de abundancia diferencial revela cambios entre las focas los sexo en taxones microbianos (C) y en rutas metabólicas (D). Los géneros y las vías con un cambio log2-fold > 0 son significativamente más abundantes en las focas hembra.

**Paraclostridium*.

Todas las rutas metabólicas con abundancias diferenciales detectadas en la comparación entre los sexos, fueron más abundantes en hembras que en machos y están relacionadas con la degradación, uso y asimilación de aminoácidos, poliaminas y compuestos carboxilados (Figura 15D).

2.7.12 La estructura de la comunidad microbiana difiere entre las colonias del EPB y TS durante el periodo de reproducción-muda

La comparación entre las focas del EPB y TS durante los periodos de reproducción-muda reveló cambios en la composición de microbiota del intestino relacionadas con la ubicación de las colonias. La dispersión microbiana entre individuos no mostró variaciones entre las colonias al considerar la composición (prueba de *betadisper*, $p = 0.578$) y la abundancia de microorganismos (prueba de *betadisper*, $p = 0.965$).

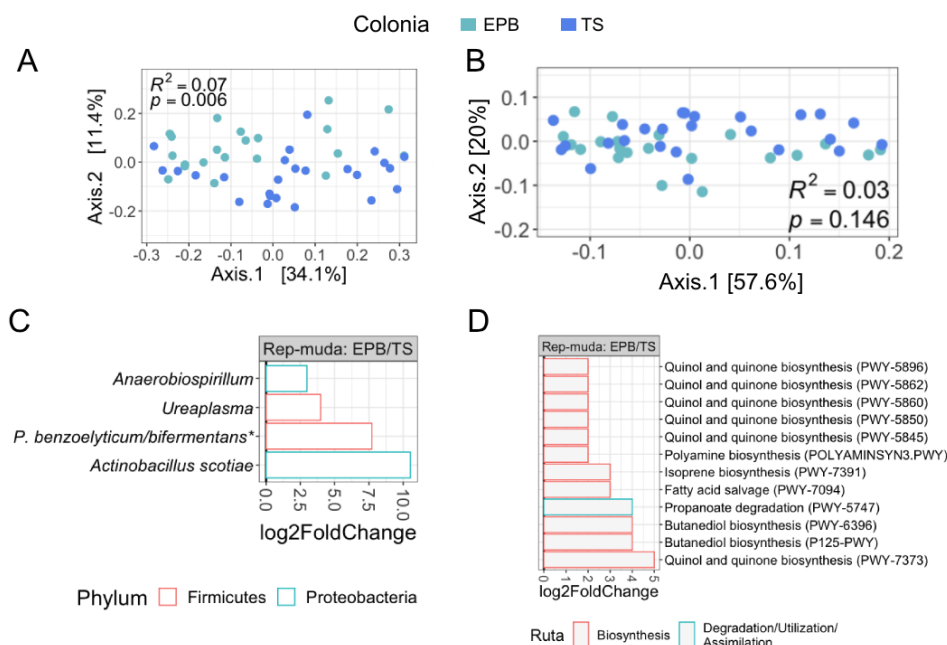


Figura 16. Cambios en la composición de la microbiota del intestino en las focas del Estero de Punta Banda (EPB) e isla Todos Santos (TS) durante el periodo de reproducción-muda. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B) basadas en las muestras del periodo de reproducción-muda en las colonias de estudio. El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en (C) *taxa* y (C) vías metabólicas (D) entre las colonias del EPB y TS durante el periodo de rep-muda. Los géneros y vías con un cambio $\log_2\text{-fold} > 0$ son significativamente más abundantes en las muestras del EPB. **Paraclostridium*.

En este análisis, la variable “colonia” explica una baja proporción de la variación entre las colonias, siendo únicamente significativa cuando no se considera la abundancia de los microorganismos ($R^2 = 0.07$, $p = 0.006$;

figura 16A). Por lo tanto, las focas del EPB y TS poseen diferencias en la diversidad microbiana pero las abundancias de los microorganismos compartidos son similares durante el periodo de reproducción-muda.

Se detectaron algunos cambios en la composición de la microbiota entre las colonias durante el periodo de reproducción-muda. Las cuatro bacterias detectadas son más abundantes en el EPB que en TS (Figura 16C). La mayoría de las rutas metabólicas con abundancias diferenciales están relacionadas con la biosíntesis de cofactores, vitaminas y ácidos grasos (Figura 16D) y todas ellas están enriquecidas en las muestras del EPB durante la etapa de reproducción-muda.

2.7.13 La estructura de la comunidad microbiana difiere entre las colonias del EPB y TS durante el periodo de postmuda

La composición y la abundancia de la comunidad microbiana del intestino varían entre las focas del EPB y TS durante el periodo de postmuda. La dispersión individual dentro de los grupos fue homogénea, lo que indica que las ordenaciones y los resultados obtenidos en las pruebas de PERMANOVA son fiables. Cuando solamente se evalúa la presencia/ausencia de microorganismos, la colonia explica una mayor fracción de la variabilidad ($R^2 = 0.19$, $p = 0.001$) y se logra una mejor separación entre grupos (UniFrac no ponderado; Figura 17A) en comparación con los datos obtenidos de UniFrac ponderado, donde se considera la abundancia de los microorganismos ($R^2 = 0.10$, $p = 0.038$; figura 16B).

Se detectaron ocho taxones en los análisis de abundancia diferencial entre las colonias de estudio durante el periodo de postmuda (Figura 17C). De éstos, solamente dos géneros de bacterias fueron más abundantes en la colonia de TS durante el periodo de postmuda. La especie *Fusobacterium perfoetens*, bacteria detectada previamente como la más abundante en la microbiota de las 72 muestras de estudio, presenta una abundancia significativamente mayor en TS durante la etapa de postmuda (Figura 17C).

Entre las colonias de TS y EPB, se detectaron varios cambios en las rutas metabólicas durante el periodo de postmuda. La mayoría de las rutas enriquecidas en TS están relacionadas con la degradación de compuestos derivados de azúcares y aminos (Figura 17D). En las muestras del EPB, las rutas metabólicas enriquecidas están relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos y degradación de aminos.

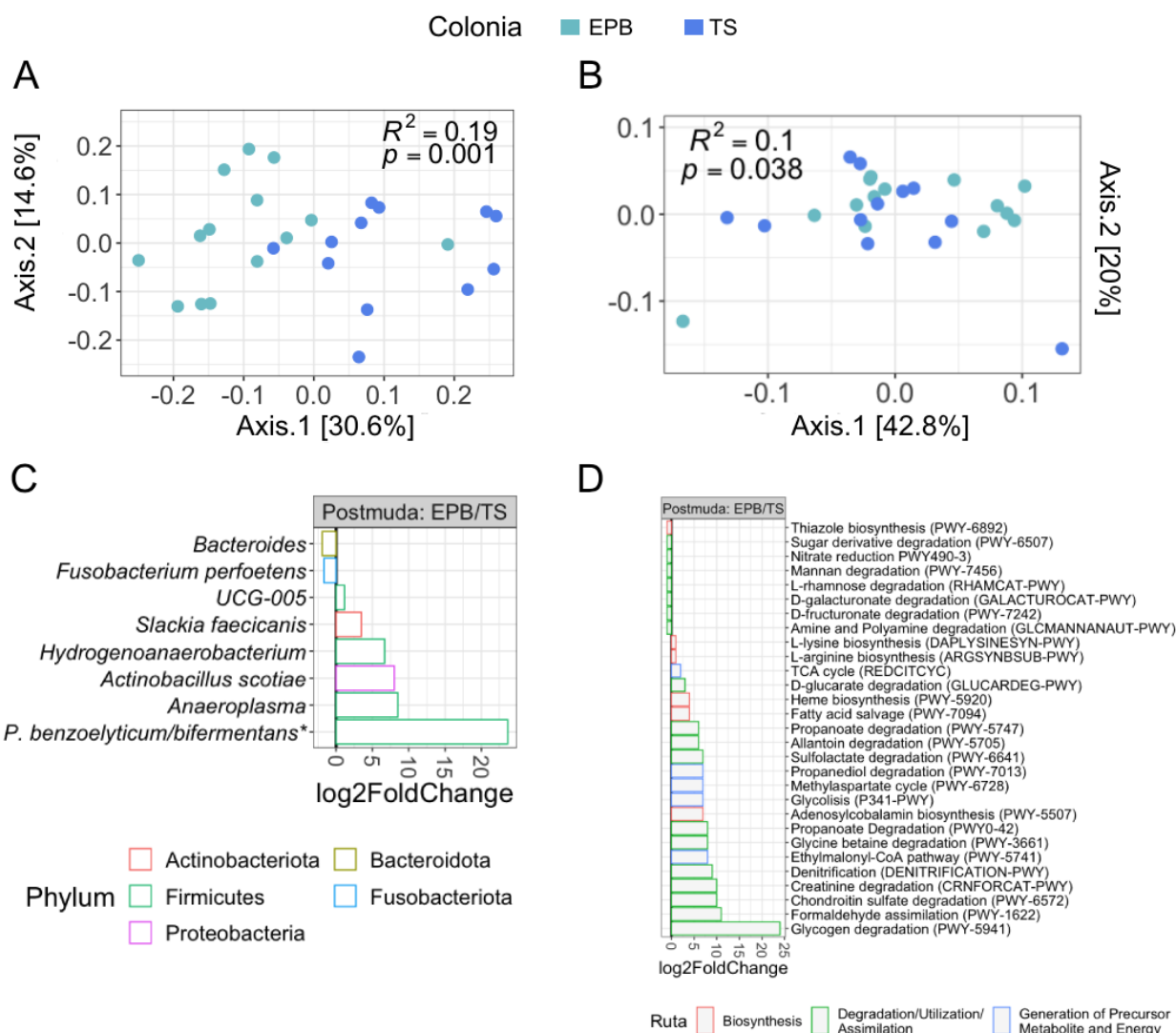


Figura 17. Cambios en la composición de la microbiota del intestino en las focas del Estero de Punta Banda (EPB) e isla Todos Santos (TS) durante el periodo de postmuda. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B) basadas en las muestras del periodo de postmuda en las colonias de estudio. El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en (C) *taxa* y (D) vías metabólicas (D) entre las colonias del EPB y TS durante el periodo de postmuda. Los géneros y vías con un cambio $\log_2\text{-fold} > 0$ son significativamente más abundantes en las muestras del EPB. **Paraclostridium*.

2.7.14 La estructura de la comunidad microbiana difiere entre hembras y machos durante el periodo de reproducción-muda

Solamente durante la reproducción-muda la estructura de la microbiota intestinal fue diferente entre hembras y machos. En la etapa de postmuda no se detectaron cambios (Anexo C). La dispersión de la comunidad microbiana entre individuos no mostró variaciones entre los sexos cuando se consideró la composición (prueba de *betadisper*, $p = 0.578$) y la abundancia de los microorganismos (prueba de *betadisper*, $p = 0.965$). Cuando sólo se evalúa la presencia/ausencia de microorganismos (UniFrac no

ponderado; Figura 18A), se explica una mayor proporción de la variabilidad entre los sexos ($R^2 = 0.05$, $p = 0.02$), en comparación con los resultados obtenidos al considerar su abundancia (UniFrac ponderado; Figura 18B).

Un total de ocho *taxa* mostraron diferencias entre hembras y machos durante la etapa de reproducción-muda, todos ellos fueron más abundantes en hembras (Figura 18C). Destaca la presencia de dos bacterias patógenas, *P. damsela* y *Mycoplasma*. No se observaron cambios significativos en las funciones de la microbiota de hembras y machos durante el periodo de reproducción-muda.

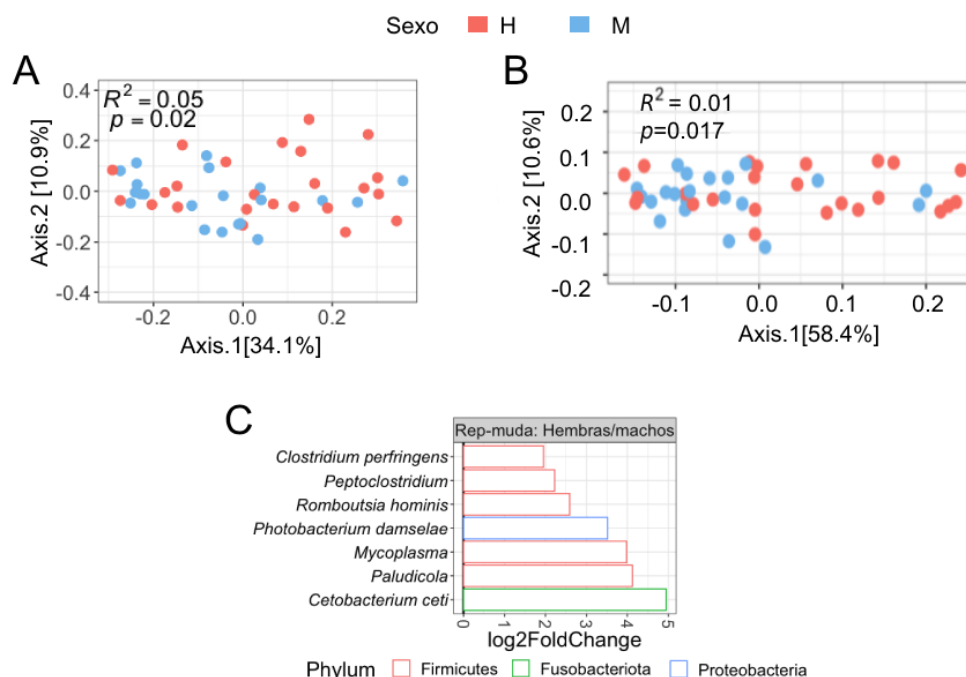


Figura 18. Cambios en la composición de la microbiota del intestino entre hembras (H) y machos (M) durante la etapa de reproducción-muda. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B). (C) El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en *taxa* entre focas hembras y machos durante el periodo de reproducción-muda. Los géneros con un cambio $\log_2\text{-fold} > 0$ son significativamente más abundantes en las hembras.

2.7.15 La estructura de la comunidad microbiana difiere entre los machos de las colonias del EPB y TS

En las colonias del EPB y TS, la composición microbiana de los machos es distinta, en comparación con las hembras que no presentaron variaciones en la comunidad del intestino relacionadas con la pertenencia a una colonia (Anexo C). La dispersión entre individuos no mostró variaciones entre las colonias al considerar

la composición (*betadisper*, $p=0.088$) y la abundancia de microorganismos (*betadisper*, $p=0.290$). En este análisis, al evaluar la presencia/ausencia de los microorganismos, la variable “colonia” explica un mayor porcentaje de la variación ($R^2=0.16$, $p=0.001$; figura 19A), a diferencia de cuando la abundancia de microorganismos es considerada ($R^2=0.09$, $p=0.012$; figura 19B). Solamente se detectó una bacteria con abundancia diferencial entre los machos de las colonias, *Actinobacillus scotiae*, que es más abundante en los machos del EPB que en los machos de TS (Figura 19 D). Múltiples rutas metabólicas presentaron diferencias en esta comparación. La mayoría de las rutas enriquecidas en los machos de TS están relacionadas con la biosíntesis de nucleótidos y vitaminas y en los machos del EPB, con la degradación de aminos y el metabolismo de nutrientes inorgánicos.

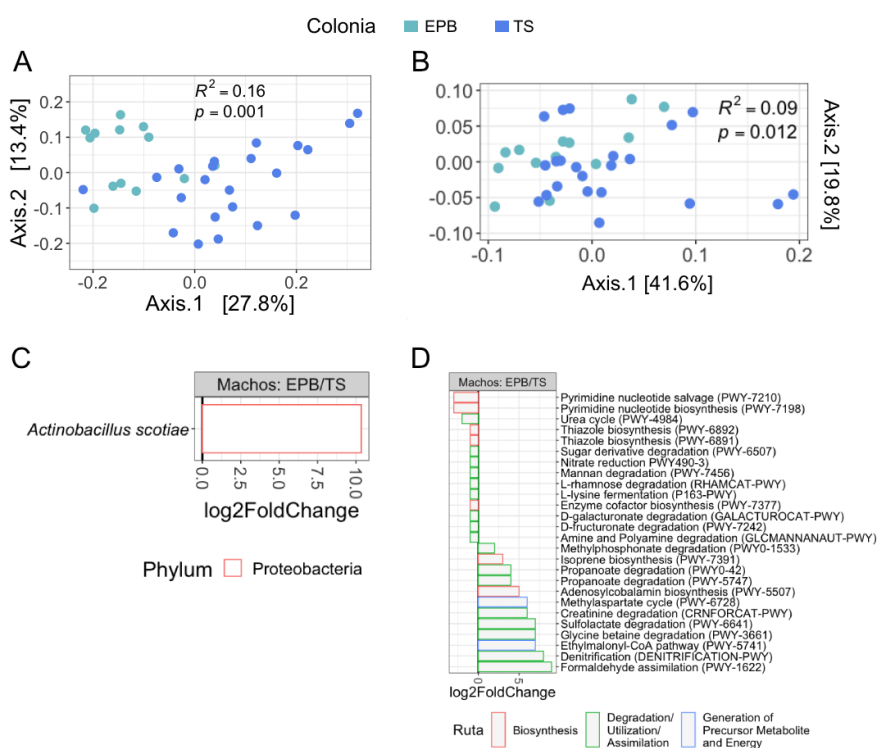


Figura 19. Cambios en la composición de la microbiota del intestino en las focas macho del Estero de Punta Banda (EPB) e isla Todos Santos (TS). Análisis de coordenadas principales (PCoA) de distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B) basadas en las muestras de machos en las colonias de estudio. El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en (C) *taxa* y (D) vías metabólicas (D) entre los machos de las colonias del EPB y TS. Los géneros y vías con un cambio $\log_2\text{-fold} > 0$ son significativamente más abundantes en las muestras de los machos del EPB.

2.8 Discusión

En este capítulo se analizó el ciclo anual y el sexo como un factor que influye en la composición y función de la microbiota del intestino de focas de puerto. Se compararon cada una de estas condiciones en las

poblaciones del Estero de Punta Banda (EPB) e isla Todos Santos (TS). En general, el factor que más influyó en la composición de la microbiota fue la localidad, seguido del ciclo anual. El sexo influyó en la estructura de la microcomunidad cuando se consideraba como covariable. Durante la etapa de postmuda las poblaciones mostraron diferencias significativas en todos los índices de diversidad alfa siendo siempre mayor, el promedio en las focas del EPB.

2.8.1 Los cambios en la estructura y función de la microbiota entre las etapas del ciclo anual son el resultado de diferencias energéticas

Durante el periodo de reproducción y muda, tanto hembras como machos pierden peso y masa corporal. Para que los animales puedan mudar de pelo, necesitan mantenerse en tierra, lo que representa una menor ingesta de comida y un desgaste energético mayor (Allen et al., 2011c; Pitcher, 1986). Durante el periodo de reproducción, ambos sexos están sujetos a desgaste energético, las hembras pierden peso porque amamantan a sus crías (Thompson et al., 1994) y los machos restringen su dieta por cuidar el territorio (van Parijs et al., 1997).

Colidextribacter fue el único género que disminuyó significativamente en el periodo de “rep-muda” (Figura 13C). Algunos estudios han reportado una relación positiva entre *Colidextribacter* con un aumento en los depósitos de grasas y aumento de peso en ovejas y ratones (Cheng et al., 2022; Duan et al., 2021). La disminución de este género durante el periodo de “rep-muda” podría relacionarse con la pérdida de grasa y masa corporal, tanto en machos como en hembras de focas de puerto (Thompson et al., 1994; van Parijs et al., 1997). En contraste, el aumento de esta bacteria en la postmuda indicaría una ganancia de peso en las focas de puerto debido a una alimentación continua.

El incremento en la degradación de aminoácidos proteinogénicos y biosíntesis de NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleótido) en la etapa de “rep-muda” indicaría una debilidad física provocada por la falta de alimento. Durante ayunos prolongados, la única fuente de aminoácidos proviene de la descomposición de aminoácidos proteinogénicos de origen muscular, los cuales son utilizados para la gluconeogénesis (Holeček, 2020). Así mismo, un incremento en la biosíntesis de NAD está relacionado con una disminución de la glicólisis y un uso preferencial de ácidos grasos y proteínas como fuente de energía (Holeček, 2020). Estos resultados reflejan un consumo muy limitado de alimento y mayor desgaste energético de las focas durante las etapas de reproducción y muda, en comparación con la etapa de postmuda.

2.8.2 La localidad es el factor de mayor influencia en la microbiota de las focas de puerto

La localidad fue el factor de mayor influencia en la microbiota del intestino de las focas de puerto, donde las focas del EPB tuvieron una mayor riqueza y diversidad de ASVs en comparación con las de TS (Figura 14B). Estos resultados coinciden con lo previamente reportado, en donde se relacionó una mayor diversidad de bacterias con una mayor riqueza de presas en la población del EPB y con una mayor interacción interespecífica (Pacheco-Sandoval et al., 2019).

Entre los géneros con abundancias diferenciales destaca *Vibrio*, un género con especies patógenas (Hughes et al., 2013), pero que también es una bacteria muy abundante en cefalópodos (Kang et al., 2022). Las focas de puerto consumen peces bentónicos e invertebrados, principalmente (Brassea-Pérez et al., 2019; Durazo, 2015; Pacheco-Sandoval et al., 2019). La mayor abundancia del género *Vibrio* podría indicar un mayor consumo de cefalópodos por las focas del EPB. Estos resultados coinciden con lo reportado por Alamán (2014), quien por medio del análisis de estructuras duras en excretas, encontró un mayor consumo de cefalópodos (*Octopus bimaculatus* y *Loligo opalescens*) en las focas del EPB en comparación con las de TS.

Géneros bacterianos y rutas metabólicas relacionadas con el almacén de energía estuvieron enriquecidos en las focas del EPB. Una mayor abundancia de *Colidextribacter* y *UCG-005* se ha relacionado con aumento de peso en ovejas (Cheng et al., 2022). Además, las rutas de biosíntesis de butanoidol y degradación de *D-glucarate* se han relacionado con un mayor almacén de grasa visceral (Nie et al., 2020). Rutas relacionadas con la generación de energía estuvieron enriquecidas en las muestras del EPB, como la degradación de propanoato (*2-Methylcitrate cycle*), glicógeno y la recuperación de ácidos grasos (Figura 14D). Esto podría ser un indicador de que las focas del EPB poseen un mayor peso que las focas de TS; sin embargo, se necesitan datos morfológicos para corroborarlo.

Las focas del EPB tuvieron un incremento en la degradación de taurina, un aminoácido que proviene principalmente de la dieta y que ejerce múltiples funciones en los mamíferos: participa en la desintoxicación, osmoregulación, conjugación de ácidos biliares, entre otros (Huxtable, 1992). Los animales dependen completamente de las bacterias y hongos para degradar la taurina. En dietas altas en ácidos grasos y colesterol, la taurina fomenta la degradación de colesterol, disminuyendo los niveles de este compuesto en el suero e hígado (Yokogoshi y Oda, 2002). El incremento en las focas del EPB podría indicar una dieta más alta en grasas y colesterol que en las focas de TS.

El enriquecimiento en las focas del EPB de múltiples rutas relacionadas con la biosíntesis de factores de crecimiento para bacterias, específicamente durante el periodo de reproducción y muda (Figura 16D), indicaría que esta población posee una microbiota que promueve el crecimiento y diversificación de especies bacterianas. Quinol y quinonas se han reportado como factores de crecimiento para las bacterias (Fenn et al., 2017), y además desempeñan un papel importante en la generación de energía (Pacífico et al., 2021); estas rutas estuvieron enriquecidas en las muestras de focas del EPB.

La comparación de sexos entre las colonias de estudio reveló que solamente los machos presentaron diferencias entre colonias en la composición y función de su microbiota intestinal. La bacteria que mostró un enriquecimiento en los machos del EPB fue *Actinobacillus scotiae*, una especie cercana a otras bacterias encontradas en cetáceos (Foster et al., 2017).

Múltiples rutas relacionadas con la generación de energía tuvieron abundancias diferenciales entre los machos de TS y EPB. Las rutas relacionadas con nucleótidos de pirimidinas estuvieron enriquecidas en las muestras de TS (Figura 19D). Estos compuestos son precursores en la síntesis de NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleótido) y son considerados compuestos portadores de energía (Moffatt y Ashihara, 2002).

La reducción de nitrato estuvo enriquecida en las muestras de machos de TS. La microbiota del intestino es capaz de reducir el nitrato a óxido nítrico que mejora la función del músculo esquelético, promoviendo el flujo sanguíneo, reduciendo el consumo de oxígeno y mejorando la tolerancia al ejercicio (González-Soltero et al., 2020).

La degradación de propanoato estuvo enriquecida en los machos del EPB (Figura 19D). El propanoato actúa como un precursor de glucosa en el intestino que estimula el eje neuronal “intestino-cerebro”, y promueve la gluconeogénesis intestinal, que mejora la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina (de Vadder et al., 2016).

2.8.3 Cambios en las colonias de focas de puerto durante las etapas del ciclo anual

Durante la reproducción y muda se observaron cambios entre las colonias de focas de puerto. *Actinobacillus scotiae* fue la bacteria de mayor enriquecimiento en las muestras del EPB durante la

reproducción y muda; sin embargo, la información existente sobre esta especie es escasa. Foster y colaboradores (1998) aislaron esta bacteria de marsopas comunes (*Phocoena phocoena*) varadas que murieron por septicemia.

En las focas de puerto del EPB, durante el periodo de reproducción y muda, destaca el incremento de múltiples rutas de biosíntesis de quinol y quinonas (Figura 16D) que podrían fomentar el crecimiento de bacterias en un periodo de poco aporte nutricional, tanto para las focas como para las bacterias.

Durante el periodo de postmuda se observó una mejor separación entre las muestras del EPB y TS. Estos cambios podrían deberse a diferencias en la dieta entre ambas poblaciones. Entre las rutas con abundancias diferenciales significativas destaca la degradación de condroitina, enriquecida en las focas del EPB (Figura 17D). Esto indicaría un mayor consumo de peces cartilagosos en las focas del EPB en comparación con las de TS. Los resultados coinciden con reportes previos sobre la alimentación de estas colonias, en donde se han encontrado un mayor número de presas cartilaginosas en las muestras fecales de focas del EPB (*Raja binoculata*, *Myliobatis californica* y *Rhinobatos productus*), en comparación con las focas de TS, donde sólo se detectó la especie, *Raja inornata* (Brassea-Pérez et al., 2019; Pacheco-Sandoval et al., 2019).

En las muestras del EPB del periodo de postmuda, destaca la mayor abundancia de la especie *Slackia faecicanis*. Esta bacteria se aisló por primera vez en muestras de heces de perro (Lawson et al., 2005) y no existen reportes de esta bacteria en pinnípedos. La mayor presencia de esta bacteria en las focas del EPB, especialmente en las hembras, podría indicar una transmisión de bacterias entre los perros y las focas. La presencia de perros en el EPB es común, por ser una zona urbana.

2.8.4 Cambios en la composición y función de la microbiota en hembras y machos

En las hembras se observó un incremento de bacterias potencialmente patógenas (*P. damsela* y *Mycoplasma*) durante la etapa de reproducción y muda; sin embargo, también destacó la presencia de bacterias benéficas, como *Romboutsia hominis*. Las especies del género *Romboutsia* están adaptadas a ambientes ricos en aminoácidos y péptidos, como el intestino (Gerritsen et al., 2019). *R. hominis* es capaz de producir biotina, tiamina y vitamina B12 (Gerritsen et al., 2019), las cuales son parte fundamental en el metabolismo de energía. La vitamina B12 es importante para el metabolismo de aminoácidos y ácidos grasos (Allen, 2012). La biotina es necesaria para la síntesis de ácidos grasos y en la gluconeogénesis,

además de ser una coenzima que participa en el catabolismo de azúcares y aminoácidos (Zempleni y Kuroishi, 2012). La tiamina participa en el metabolismo de grasa, proteínas y ácidos nucleicos y es esencial para el crecimiento (Fattal-Valevski, 2011). Esta bacteria podría representar una fuente importante de vitaminas cuando el aporte por la dieta es restringido, como en el periodo de reproducción y muda. Las hembras podrían requerir una mayor abundancia de este tipo de bacterias para cubrir sus requerimientos nutricionales durante el periodo de la crianza.

Las rutas enriquecidas en hembras, en comparación con los machos, están relacionadas con la ganancia de peso y condición corporal. Las rutas de degradación de L-glutamato, D- glucarato y propanoato, se han relacionado con un mayor almacén de grasa visceral en animales (Cheng et al., 2022). El enriquecimiento de aminobutanoato se ha relacionado con un incremento de insulina después de una exigencia alta de glucosa (Sanna et al., 2019). En focas de puerto en rehabilitación, se ha observado un incremento de insulina a medida que el animal gana peso, indicando que la insulina podría tener un papel importante en la lipogénesis (Fowler et al., 2020). En las focas de puerto no existe un dimorfismo sexual marcado, por lo que se pudo haber muestreado hembras con mejor condición corporal que los machos.

2.8.5 Mayor abundancia de bacterias potencialmente patógenas en las hembras de focas de puerto

En las hembras se observó un mayor número de bacterias potencialmente patógenas como *Ureaplasma*, *P. damsela*, *Mycoplasma* spp. y *Cetobacterium ceti*. Algunas especies de *Ureaplasma* se han encontrado en el tracto genital femenino de los seres humanos y causan infecciones e infertilidad, lo que complica el embarazo y el desarrollo del feto (Urszula et al., 2014). En pinnípedos, la detección de *Mycoplasma* (*M. phocicerebrale*, *M. phocae* y *M. phocirhinis*) es más común en fócidos (Haulena et al., 2006) y su presencia se ha reportado en focas de puerto (Ayling et al., 2011). Esta bacteria aumenta los síntomas de neumonía causada por el virus de la influenza en focas de puerto (Geraci et al., 1982) y es conocida por provocar una infección conocida como “dedo de foca” en los humanos, la cual es transmitida por una mordedura de foca (Haulena et al., 2006).

En específico, se observó un incremento de *Mycoplasma*, *P. damsela* y *Cetobacterium ceti* en las hembras durante el periodo de reproducción y muda (Figura 18C). *Photobacterium damsela* es una bacteria patógena que provoca lesiones y septicemia en peces, crustáceos y cetáceos; existen algunos reportes de

muerter de humanos causadas por esta bacteria (Rivas et al., 2013). *Mycoplasma* se han encontrado en focas de puerto durante un evento masivo de mortalidad (Ruhnke y Madoff, 1992).

C. ceti se descubrió en lesiones de cetáceos varados (marsopa común, *Phocoena phocoena* y ballena minke, *Balaenoptera acutorostrata*). La patogenidad de esta especie no es clara, pero su presencia en lesiones indicaría una posible importancia patológica (Foster et al., 1995). Esta bacteria también se ha reportado en delfines nariz de botella (Bik et al., 2016). Recientemente, Agnes y colaboradores (2020) analizaron la microbiota del intestino de lobos finos australianos y propusieron a *C. ceti* como una bacteria indicadora de animales que se alimentan en granjas de salmón, lo que podría indicar una transmisión de esta bacteria entre especies.

La mayor abundancia de estas bacterias potencialmente patógenas representa un riesgo potencial para la conservación de las focas de puerto, debido a que el periodo de reproducción y muda es crucial para la conservación de la especie. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar si estas bacterias son patógenas, oportunistas o comensales en este pinnípedo.

La mayor presencia de estas bacterias potencialmente patógenas durante el periodo de reproducción y muda representa un riesgo para la población humana, porque estas bacterias podrían transmitirse de las focas a los humanos. El periodo de reproducción y muda coincide con el periodo vacacional, cuando hay una mayor presencia de humanos en el EPB (Ruiz-Mar et al., 2022), lo que aumentaría las posibilidades de transmisión de estas bacterias patógenas.

2.9 Conclusión

En las focas de puerto, factores como la localidad y la etapa del ciclo anual, son factores importantes que moldean la composición y funciones de la microbiota del intestino. El sexo es un factor de menor impacto debido a un dimorfismo sexual débil y una alta variabilidad intrasexual. El impacto de la localidad en la microbiota está relacionado con cambios en la dieta entre las colonias de focas y a una exposición diferente de fuentes microbianas. Así mismo, cambios en la composición de la microbiota, relacionados con el ciclo anual, estuvieron relacionados principalmente por diferencias en requerimientos energéticos y periodos de ayuno. Estos hallazgos resaltan la importancia de la microbiota como un componente fundamental en la fisiología de las focas de puerto porque esta micro-comunidad responde a cambios en el metabolismo energético, brindando componentes fundamentales en periodos de escasa alimentación.

La presencia de bacterias potencialmente patógenas, especialmente en las hembras durante el periodo de reproducción y muda, representa una amenaza a la conservación de la especie, así como un posible foco de transmisión de bacterias patógenas de focas a humanos. Son necesarios más estudios y un monitoreo continuo de las poblaciones de focas que permitan comprender la relación de las focas de puerto con estas bacterias y el posible riesgo a la salud humana.

Capítulo 3. La edad

3.1 Introducción

La microbiota materna representa la primera exposición que tiene la cría a los microorganismos (Koenig et al., 2011), y la colonización podría empezar antes del parto, por la presencia de microbios en la placenta y el líquido amniótico (Collado et al., 2016). En humanos se ha observado que, desde el nacimiento, la diversidad microbiana intestinal aumenta y en los primeros 3 - 5 años de vida converge a una comunidad parecida a la presente en adultos (Rodríguez et al., 2015). Antes de este periodo, la microbiota intestinal de los lactantes es inestable y se caracteriza por la presencia de microorganismos presentes en la vagina y en la leche de la madre (Hunt et al., 2011; Knight y Buhler, 2015).

En los estudios realizados en humanos, la microbiota intestinal se caracteriza por: a) una baja diversidad y complejidad en los primeros años de vida y b) poseer una dominancia de los *phyla* Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes (Koenig et al., 2011). Con el crecimiento, la comunidad microbiana del intestino se estabiliza, lo que es fundamental para la homeostasis del huésped (Knight y Buhler, 2015; Koenig et al., 2011).

En pinnípedos, se ha reportado que la edad juega un papel importante en la composición de la microbiota intestinal. Smith y colaboradores (2013) reportaron que las crías del lobo marino de Australia poseen un menor número de miembros microbianos en comparación con los adultos. En general, los perfiles microbianos varían entre clases de edad.

En la foca de puerto sólo se ha caracterizado la composición de la microbiota intestinal en juveniles y adultos (Glad et al., 2010; Numberger et al., 2016; Pacheco-Sandoval et al., 2019). Es necesario ampliar la información actual debido a que las crías de foca de puerto no poseen las mismas capacidades fisiológicas que los adultos (Allen et al., 2011). Además, no existe información sobre cómo la transición de una dieta basada en leche, a una de peces e invertebrados, afecta la composición microbiana del intestino (Smith et al., 2013). A pesar de que entre individuos de la misma especie existen diferencias en la constitución de su microbiota, a lo largo de la vida del organismo se mantiene un grupo de miembros esenciales que son transmitidos de la madre a la cría y perduran hasta la vida adulta (Matamoros et al., 2012).

3.2 Hipótesis

Las crías de foca de puerto tienen una diversidad microbiana menor en comparación con los adultos. Además, el perfil funcional es diferente entre ambos grupos de edad debido a las diferencias en sus requerimientos fisiológicos.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto que tiene la edad del organismo, en específico de crías y adultos, en la composición y función de la microbiota intestinal de la foca de puerto.

3.3.2 Objetivos particulares

- Caracterizar el perfil de la microbiota intestinal de crías y adultos de foca de puerto ubicada en Isla Natividad.
- Comparar la comunidad microbiana de crías y adultos para observar variaciones en la composición de la microbiota intestinal y determinar los microorganismos que tiene un mayor aporte a estos cambios.
- Caracterizar el perfil funcional de las distintas edades para observar cambios en rutas metabólicas.

3.4 Métodos

3.4.1 Colecta de muestras

Se seleccionó la colonia de foca de puerto ubicada en Isla Natividad (Baja California, México) por la presencia de plataformas rocosas planas que facilitan la captura de las crías (Figura 20). La colecta de

muestras se realizó en el mes de marzo y se colectaron heces de focas juveniles o adultas (no es posible diferenciarlas heces según el grupo de edad). Se capturaron crías para obtener muestras del recto con hisopos especiales que permiten la liberación de la muestra en el medio de preservación (Flock swabs®). En total se obtuvieron 32 muestras, 12 de crías y 20 de juveniles/adultos. Además, se obtuvieron dos muestras de heces de crías correspondientes a las muestras Cria2 y Cria4. De la muestra Cria5, se obtuvieron dos muestras de vagina.

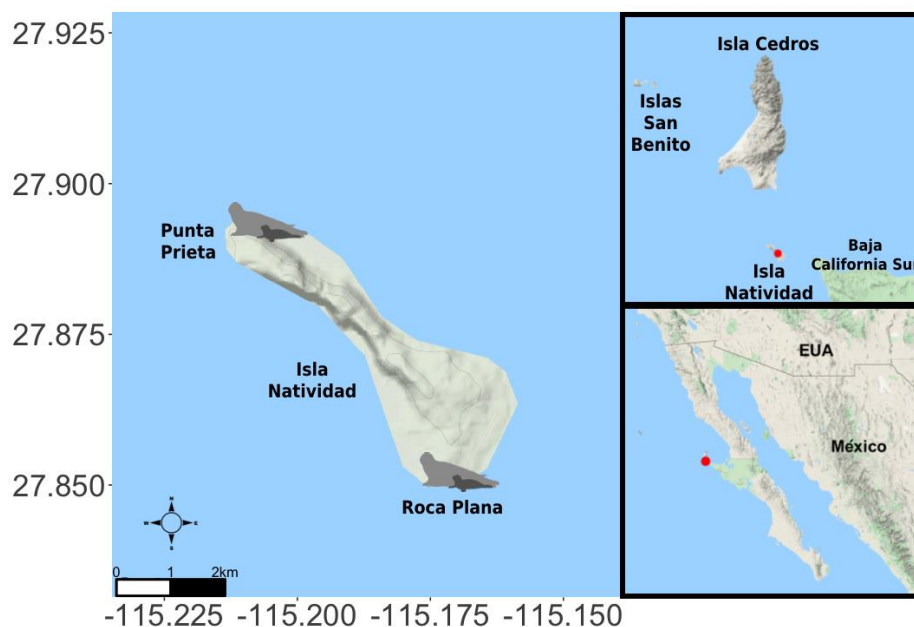


Figura 20. Ubicación geográfica de la colonia de foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*) en Isla Natividad.

Cada muestra fecal de juvenil/adulto se recogió individualmente con una espátula estéril y sólo se tomó la parte interna para evitar la contaminación cruzada con el medio ambiente circundante. Por cada cría capturada, se colectaron dos muestras del recto (hisopo) y se anotó el sexo correspondiente (exploración visual). Ambos tipos de muestras se colocaron en tubos estériles con *RNA/later*® (Sigma-Aldrich) y se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su procesamiento.

3.4.2 Extracción de ADN

Se utilizó el kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)® para extraer el ADN genómico total de las muestras fecales. Las muestras se centrifugaron a 9000 x g durante 5 minutos para poder decantar el *RNA later* en el cual fueron preservadas. De cada muestra se utilizaron aproximadamente 220 mg de materia

fecal. Para las muestras de crías, cada hisopo se enjuagó con una solución de PBS y a cada tubo se le agregó 1 ml de PBS para poder separar las células de interés. Las muestras se centrifugaron a 10 000 g por 15 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante. Para poder detectar microorganismos difíciles de lisar, se utilizó una temperatura de incubación de 95°C, propuesto por el fabricante. La calidad del ADN se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y los productos de extracción se corrieron a 70 V por 45 min. La concentración del ADN se determinó en el fluorómetro Qubit 3.0 (Invitrogen) con 5 µl por muestra utilizando el kit *Qubit® dsDNA BR Assay* (ThermoFisher™).

3.4.3 Sexado genético de las muestras de heces

Se utilizó el protocolo modificado de Robertson y colaboradores (2018), previamente descrito en el capítulo anterior, para determinar el sexo de las muestras de adultos. En las amplificaciones se incluyeron: a) triplicados de las muestras para obtener resultados consistentes, b) controles positivos correspondientes a las muestras de crías de foca de puerto de sexo conocido (una hembra y un macho) y c) controles negativos.

3.4.4 Amplificación del gen 16S ARNr

La amplificación del gen 16S ARNr se realizó con la estrategia y *primers* descritos en el capítulo anterior. El PCR se realizó con 5-10 ng de ADN en una reacción de 25 µl que incluyó: 5 µl de buffer *MyTaq™* (5x), 0.8 µl de primer (concentración 10 µM), 0.156 µl de ADN polimerasa *MyTaq™*, 10 ng de ADN y el volumen de agua necesario para completar 25 µl por reacción. El programa de PCR consistió en una etapa inicial de 95°C x 30s, desnaturalización inicial de 95°C durante 2 minutos, y 30 ciclos (95°C durante 30 s; 55°C x30 s y 72°C x 30 s), con una extensión final a 72°C durante 5 min. Se realizaron triplicados de reacciones de PCR por cada muestra y los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1%. Los triplicados por muestra se mezclaron en un solo tubo de PCR.

3.4.5 Preparación de las librerías

La normalización y preparación de las librerías de secuenciación se realizaron conforme a lo descrito en el capítulo anterior. Además de las muestras, se incluyó un control negativo de PCR (sin ADN agregado). La

concentración final de la librería fue 1153 pM. Se utilizó el kit MiSeq® Reagent V2 de 300 ciclos de Illumina® y se siguió el protocolo para la preparación de librerías metagenómicas 16S ARNr (Illumina®) modificado por la Dra. Jennyfers Chong³. Se agregaron 10 µl del pool (1153 pM) y 10 µl de NaOH (0.2 N) en un tubo tipo Eppendorf y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 20 µl del buffer de hibridación.

Para diluir y desnaturalizar la librería control, se añadió 1 µl de PhiX (10 000 pM) y 1.5 µl de agua para una concentración de 4000 pM. A los 2.5 µl obtenidos se les agregaron 2.5 µl de NaOH (200 mM) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 495 µl del buffer de hibridación (HT1) para obtener una concentración de 20 pM.

Finalmente, la biblioteca de amplicones (16S ARNr) y el PhiX se combinaron añadiendo 675 µl del pool y 75 µl de PhiX. El resultado fue una solución de trabajo final con un volumen de 750 µl, a una concentración de 7.7 pM, con 10% de PhiX.

3.4.6 Secuenciación

Se utilizó una celda de flujo estándar para secuenciar las librerías y se agregaron los *primers* necesarios para realizar la secuenciación. Además, se creó un archivo de texto (*sample sheet*) para indicar la combinación de índices de cada muestra para que al final de la corrida, las muestras se separen en archivos distintos. La secuenciación pareada (*paired-end*) se realizó el equipo MiSeq™ de Illumina® que se encuentra en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

3.4.7 Procesamiento y análisis de las secuencias

El procesamiento inicial de las secuencias se realizó utilizando los mismos métodos descritos en el capítulo anterior. Todos los análisis se realizaron en el programa RStudio v.3.6.2 (R Core Team, 2019). Brevemente, los paquetes y metodología fueron:

³ Técnico del laboratorio de metagenómica del CICESE (B.C, México).

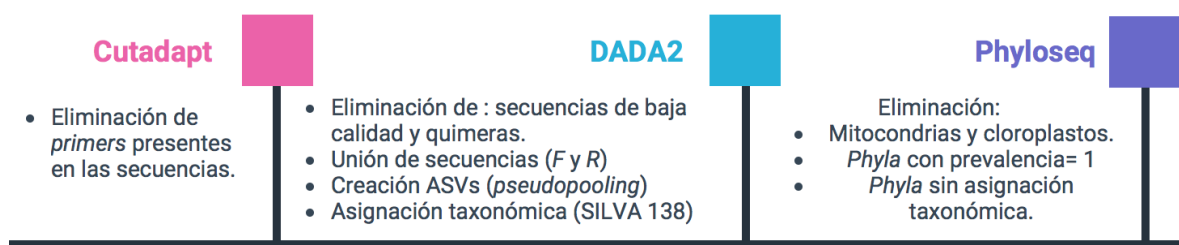


Figura 21. Resumen de los métodos utilizados para procesar y analizar las secuencias del estudio.

El programa *decontam* (Davis et al., 2018) se utilizó para identificar secuencias contaminantes en las muestras y eliminarlas. El método utilizado (*frequency*) se basa en la frecuencia de los ASV y en las secuencias encontradas en el control negativo. La tabla final de resultados incluye: la frecuencia de cada ASV, un valor p ($p < 0.05$) asociado a la probabilidad de que la secuencia sea un contaminante y una columna con valores “verdadero o falso”, basada en la evidencia estadística de que la secuencia excede el umbral de detección previamente establecido ($threshold = 0.1$).

3.4.8 Medidas de riqueza y diversidad filogenética

3.4.8.1 Diversidad alfa

Las estimaciones de diversidad alfa se calcularon con los conteos crudos de ASVs en el programa RStudio con la paquetería phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013), principalmente. Los índices de diversidad alfa calculados fueron: a) Shannon, b) número de especies observadas y c) diversidad filogenética de Faith (PD).

Para determinar diferencias significativas en la diversidad microbiana entre las edades y sexos, se crearon modelos mixtos de las variables de estudio y se utilizaron pruebas de análisis de varianzas (ANOVA)— en los índices con normalidad y homocedasticidad— y la prueba de Kruskal-Wallis para índices sin distribución normal. Las gráficas de los resultados se crearon principalmente en la librería ggplot2 (Wickham, 2016).

3.4.8.2 Diversidad beta

El conteo de ASVs se normalizó en la librería DeSeq2 (Anders et al., 2010) con los métodos descritos en el capítulo 2. Los datos se transformaron con el modelo: $\sim \text{sexo} + \text{edad}$ y se utilizaron en todos los análisis posteriores.

En la exploración de las similitudes entre muestras se utilizó la técnica de ordenación “análisis de componentes principales (PCoA)” y métricas UNIFRAC (Lozupone et al., 2011; Lozupone y Knight, 2005) ponderadas y no ponderadas.

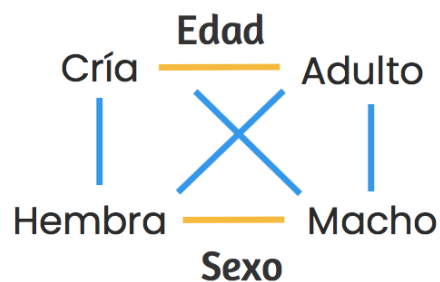


Figura 22. Comparaciones entre los grupos de interés para detectar diferencias en la composición y estructura de la comunidad microbiana de la foca de puerto. Líneas amarillas: Comparaciones generales. Líneas azules: Comparaciones específicas.

Para conocer si las diferencias en las estructuras de las comunidades son estadísticamente significativas entre las variables de estudio, se utilizó la prueba de adonis (ANOVA con permutaciones) con 1000 permutaciones en la librería vegan y para evaluar la dispersión homogénea, se empleó la función betadisper (vegan). Para esta prueba, primero se realizó una comparación general entre las variables de estudio (edad y sexo) y posteriormente se hicieron comparaciones de cada componente de las variables de interés, es decir, se comparó: a) la variable edad en machos y hembras, y b) la variable sexo en crías y adultos. Las comparaciones realizadas se pueden visualizar en la figura 22.

3.4.9 Abundancia diferencial

La librería Deseq2 se utilizó para detectar ASVs cuya abundancia fuera estadísticamente diferente entre los grupos de comparación. En el análisis se eliminaron los ASVs con conteos menores a 4 y prevalencia=1 y se agruparon a nivel de Género. Con el fin de identificar géneros con abundancia diferencial consistente

entre las variables de estudio, se consideró un valor p ajustado < 0.01 y solamente se evaluaron los grupos comparativos que mostraron diferencias estadísticamente significativas en su diversidad beta.

3.4.10 Inferencia funcional

Las muestras se analizaron en el programa PICRUSt2 (Douglas et al., 2020) para predecir la composición funcional de la microbiota de las crías y adultos de foca de puerto. La librería DESeq2 se utilizó para normalizar los conteos de EC obtenidos de PICRUSt2 bajo el modelo: $\sim \text{sexo} + \text{edad}$ — utilizado también en las abundancias de ASV— y se eliminaron aquellos ECs que estuvieran presentes en sólo una muestra. Con el fin de identificar ECs con abundancia diferencial consistente entre las variables de estudio, se consideró un valor p ajustado < 0.01 y un $\log_2 \text{fold change} > 1$ y solamente se evaluaron los grupos comparativos que mostraron diferencias estadísticamente significativas en su diversidad beta.

3.5 Resultados

3.5.1 Extracción de ADN

La concentración de ADN presentó variaciones entre las diferentes muestras de crías. El valor promedio obtenido fue $3 \text{ ng}/\mu\text{l}$ con un rango de $0.2 - 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Los productos de extracción de las muestras de cría pueden observarse en la Figura 23. La concentración promedio de ADN de las muestras de adulto fue $4.408 \text{ ng}/\mu\text{l}$ con un rango de $0.152 - 20.8 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

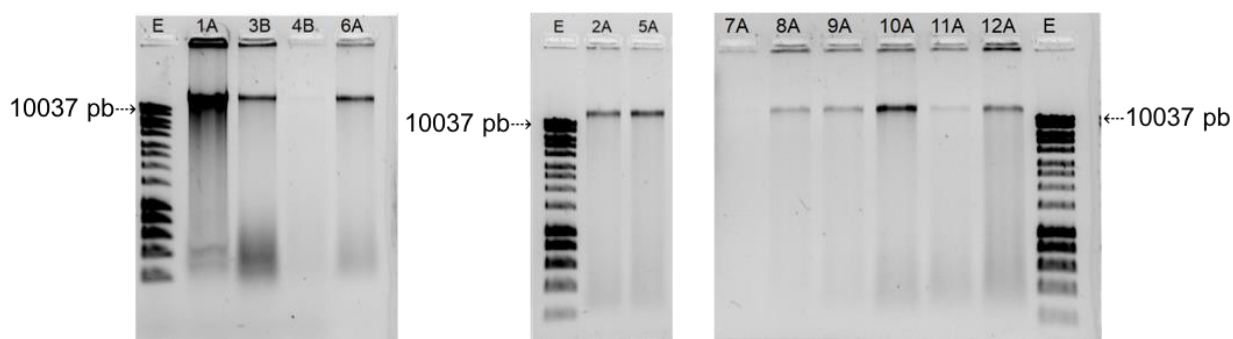


Figura 23. Productos de extracción de ADN de las muestras de crías de focas de puerto de Isla Natividad. E: escalera.

3.5.2 Amplificación del gen 16S ARNr

Todas las muestras de crías y adultos tuvieron amplificaciones exitosas para el gen 16S ARNr, sin embargo, algunas muestras presentaron bandas tenues (Figura 24).

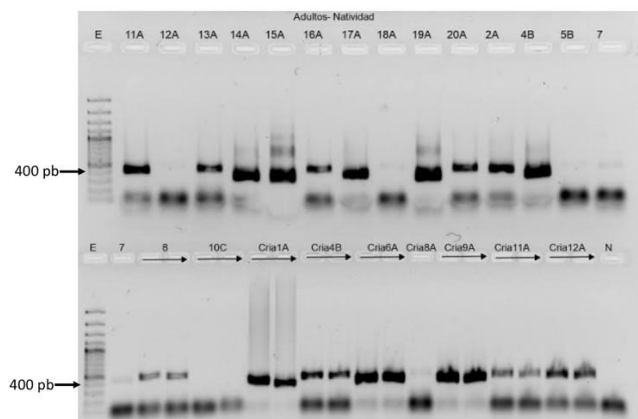


Figura 24. Ejemplos de los productos de PCR de la región V4 del gen 16S ARNr de las muestras de crías y adultos de focas de puerto de Isla Natividad. El tamaño del fragmento esperado es de aprox. 400 pb. E: escalera, N: control negativo.

3.5.3 Sexado genético de las muestras

La amplificación de las regiones **SRY** y **ZFX/ZFY** de las muestras de crías fue exitosa y se obtuvieron los resultados esperados dependiendo del sexo: 1 banda de aproximadamente 168 pb para el caso de hembras, y 2 bandas de 224 pb y 168 pb para machos. La presencia de bandas inespecíficas de menor intensidad podría deberse a la alta formación de estructuras secundarias en los primers (Figura 25). La asignación de sexo fue exitosa en el 90% de las muestras de adultos; el sexo de las muestras Nat7 y Nat10 no pudo identificarse. La proporción final de sexo fue: 7 machos y 5 hembras en las muestras de crías y 11 hembras, 7 machos y 2 indeterminados para las muestras de adulto.

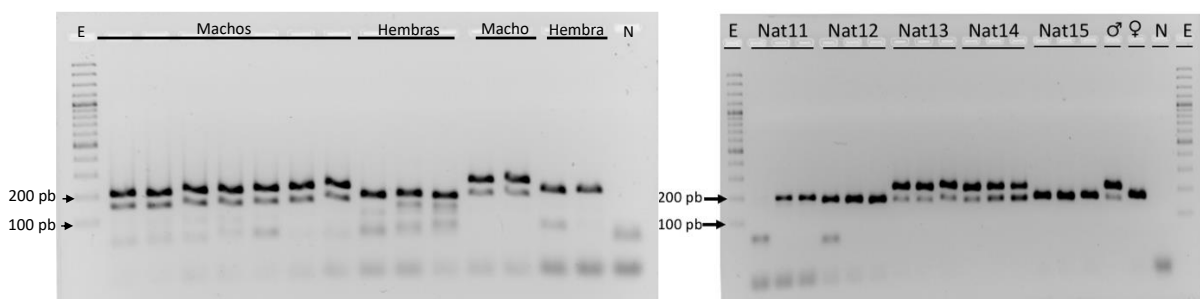


Figura 25. Ejemplos de productos de PCR de los genes **SRY** y **ZFX/ZFY** de las muestras de crías y adultos de la colonia de foca de puerto de Isla Natividad. Nat: Adulto de isla Natividad.

3.5.4 Descripción general del set de datos

Se conservaron un total de 1 840 452 lecturas después del procesamiento de las muestras con DADA2 y de eliminar secuencias no correspondientes a microorganismos, como cloroplastos y mitocondrias. La muestra con el mayor y menor número de lecturas fue Cria10 con 88 926 y Cria1 con 11 782 lecturas, respectivamente. En general, el promedio de lecturas obtenidas fue 57 530. En la gráfica de rarefacción todas las muestras alcanzaron la asíntota, lo que significa que la profundidad de secuenciación fue óptima para muestrear toda la riqueza microbiana por muestra (Figura 26).

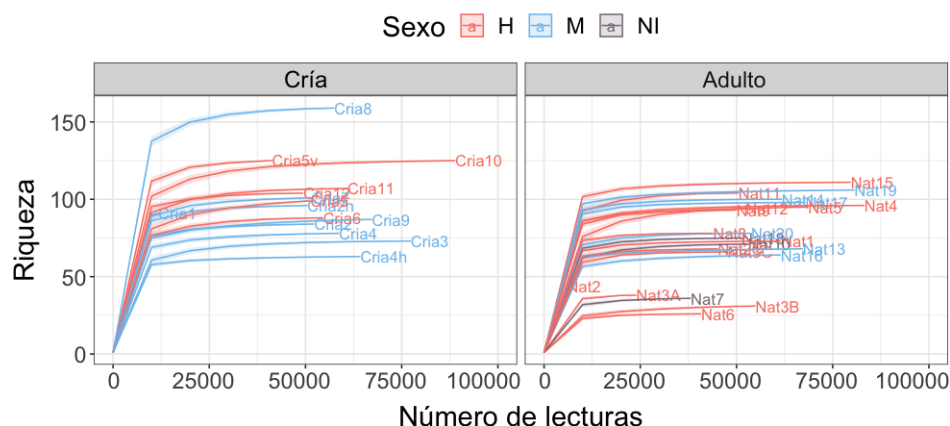


Figura 26. Gráfica de rarefacción de las muestras de estudio agrupadas por edad. H: hembra, M: macho, NI: no identificado.

3.5.5 Composición taxonómica de la muestra de vagina

Se comparó la composición microbiana de las heces y vagina provenientes de la misma cría. La profundidad de secuenciación fue óptima para muestrear la mayor riqueza microbiana de las muestras (Figura 27A). En la muestra de vagina se detectaron 122 ASVs representados por el reino Bacteria, 10 phyla (Anexo F), 22 clases, 47 órdenes, 45 familias y 44 géneros. La estructura de la comunidad microbiana es muy diferente entre las muestras de heces y vagina (Figura 27B). En la microbiota de recto, el phylum y género dominantes fueron Bacteroidota y Alloprevotella, respectivamente, en contraste con la microbiota de vagina, donde Proteobacteria y Psychrobacter fueron más abundantes (Figura 27C-D). En la muestra de vagina se encontró un mayor número de microorganismos totales y únicos, compartiendo 50 ASVs con la muestra de recto (Figura 27E). El grupo núcleo de ambas muestras está compuesto por 37 miembros bacterianos que representan el 70.3% de la abundancia relativa total (Figura 27F).

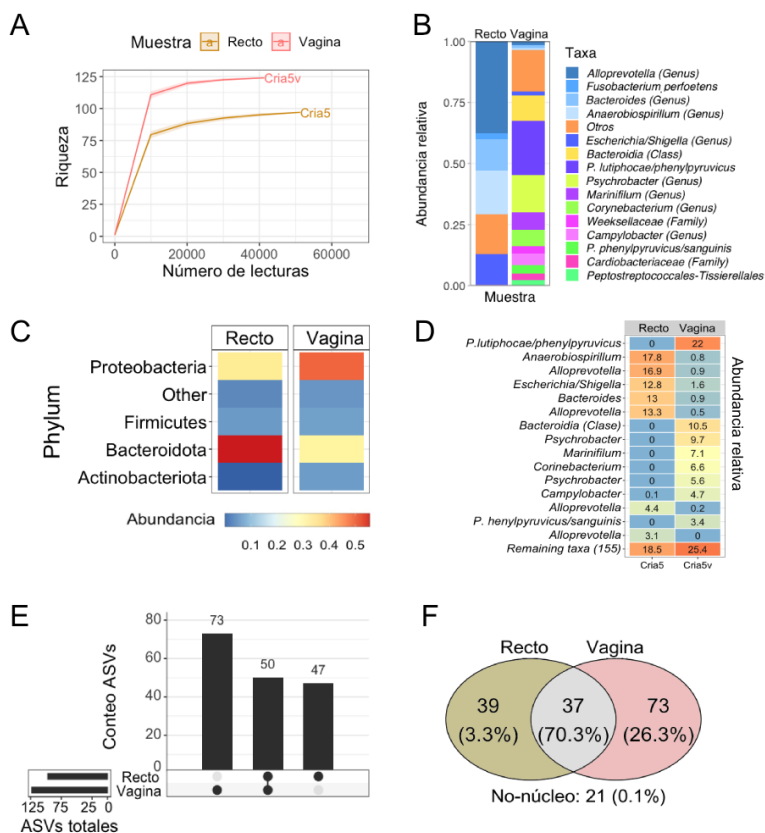


Figura 27. Estructura y diversidad microbiana entre las muestras de heces y vagina de una cría de foca de puerto. A) Gráfica de rarefacción basada en la riqueza de microorganismos. B) Perfiles microbianos clasificados por tipo de muestra (heces y vagina). Sólo se muestran los 15 ASVs más abundantes, el resto se agruparon en la categoría de "Otros". C) *Phyla* con una abundancia relativa > 1%. D) Los 10 ASV más abundantes detectados en el microbioma de crías. E) Número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) en las muestras de heces y vagina. F) El grupo núcleo del microbioma entre las muestras de heces y vagina. El grupo núcleo está formado por ASVs con una prevalencia del 80% y una abundancia relativa $\geq 0.01\%$. El diagrama de Venn muestra el número de ASV y su abundancia relativa en cada muestra.

3.5.6 Composición taxonómica de las muestras de heces y recto de cría

Las muestras de heces y recto de cría mostraron una gran variabilidad intraespecífica en su composición microbiana (Figura 28A). En general, Bacteroidota, Firmicutes y Proteobacteria fueron los *phyla* dominantes (Figura 28B). En las muestras de recto, los géneros Anaerobiospirillum y Bacteroides fueron los más abundantes, mientras que en las muestras de heces, Alloprevotella y Allistipes fueron los más abundantes.

La comunidad microbiana de las muestras de heces y recto está representada por 144 ASVs, de los cuales ambas comparten más de la mitad de ASVs (Figura 28D). El grupo núcleo está constituido por 31 miembros, que representan el 86.9% de la abundancia relativa microbiana.

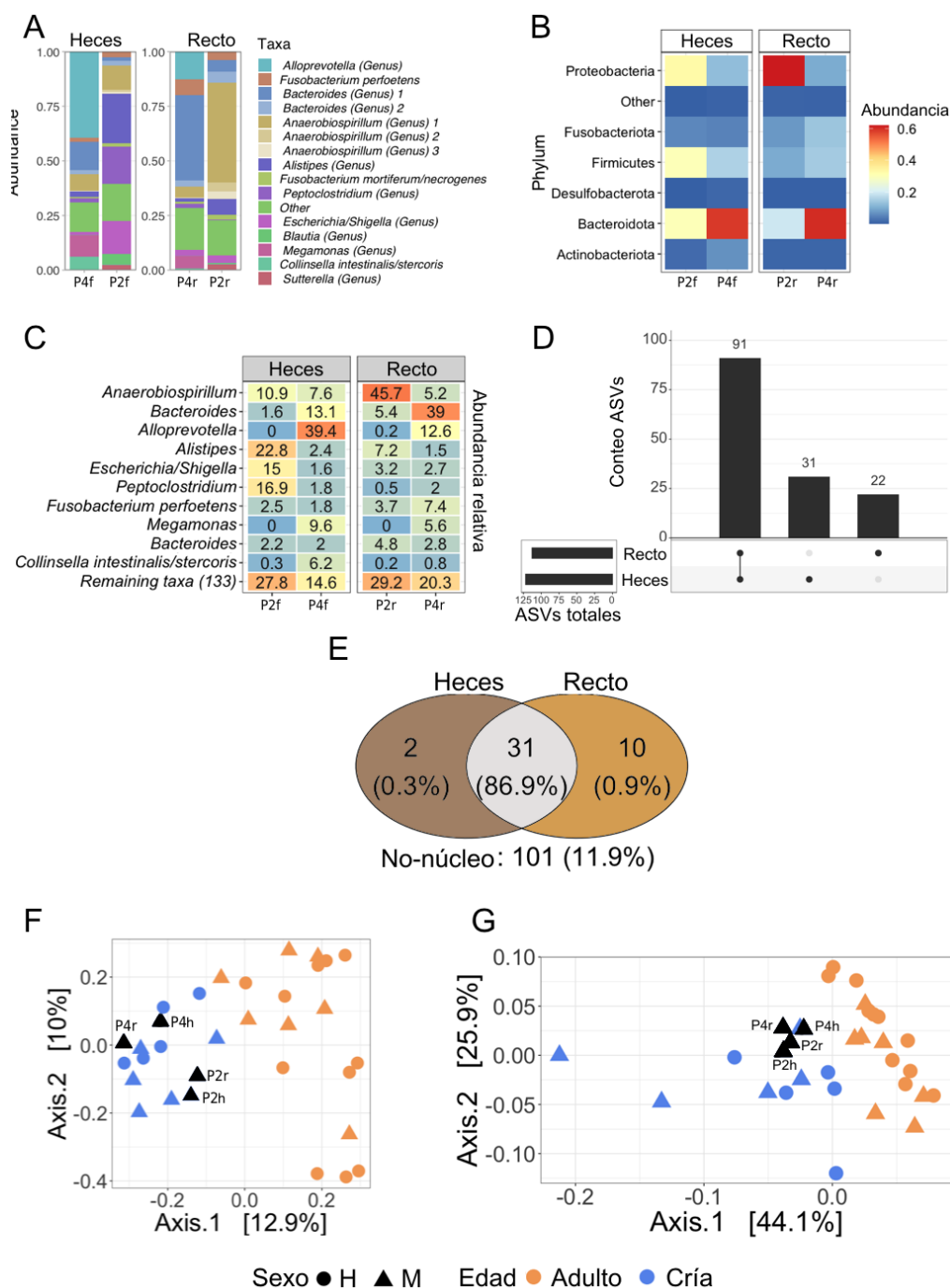


Figura 28. Estructura y diversidad microbiana entre las muestras fecales y rectales de dos crías de foca de puerto. A) Perfiles microbianos de dos crías clasificados por tipo de muestra (heces y recto). Sólo se muestran los 15 ASVs más abundantes, el resto se agruparon en la categoría de "Otros". B) *Phyla* con una abundancia relativa > 1%. C) Los 10 ASV más abundantes detectados en el microbioma de crías. D) Número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) en las muestras de heces y recto. E) El grupo núcleo del microbioma entre las muestras fecales y rectales, conformado por ASVs con una prevalencia del 80% y una abundancia relativa $\geq 0.01\%$. El diagrama de Venn muestra el número de ASV y su abundancia relativa en cada muestra. Análisis de componentes principales (PCoA) basados en distancias UniFrac no ponderadas (F) y ponderadas (G) agrupados por edad. Las muestras de heces (P2h, P4h) y de recto (P2r, P4r) de dos crías están resaltadas en negro.

No existen diferencias significativas entre las muestras de heces y recto relacionadas con la riqueza microbiana ($p= 0.959$) o diversidad filogenética ($p= 0.716$). Sin embargo, las muestras de heces tuvieron una mayor diversidad microbiana que las muestras de recto (Shannon, $p< 0.05$).

Los PCoA basados en distancias UNIFRAC ponderadas y no ponderadas demostraron que, independientemente del tipo de muestra, las muestras pertenecientes a la misma cría se agrupan y permanecen dentro del grupo de crías (Figura 28F-G).

3.5.7 Composición taxonómica y comparación de las muestras de crías y adultos

En la asignación taxonómica de las muestras de heces y recto, se obtuvieron 572 ASVs representados por 2 Reinos (Archaea y Bacteria), 16 *phyla*, 27 clases, 69 órdenes, 98 familias y 128 géneros. Los *phyla*: Chloroflexi, Bdellovibrionota, Deinococcota, Nanoarchaeota, Nitrospinota, Nitrospirota, PAUC34f, TA06, se eliminaron del análisis por estar representados únicamente por una lectura, lo que podrían corresponder a falsos positivos, así como reinos y *phyla* no identificados. De los 16 *phyla* detectados en las muestras de heces (Anexo G), solamente 4 de ellos tuvieron una abundancia $>1\%$. Estos *phyla* fueron: Bacteroidota, Firmicutes, Fusobacteriota y Proteobacteria (Figura 29A); los *phyla* Bacteroidota y Proteobacteria fueron más abundantes en crías que en adultos.

Los géneros bacterianos más frecuentes en adultos fueron *Alloprevotella*, *Fusobacterium perfoetens* y *Bacteroides* y el microbioma de crías estuvo dominado por *Alloprevotella*, *Anaerobiospirillum* y *Escherichia/Shigella* (Figura 29B). Entre las especies más abundantes destaca *Photobacterium damsela*, una bacteria patógena. Los perfiles microbianos revelaron una gran variación intraespecífica entre individuos del mismo grupo de edad (Anexo H), pero en general, el conteo de ASVs totales y únicos fueron mayores en adultos que en crías, compartiendo ambas edades 152 ASVs (Figura 29C).

El grupo núcleo de la microbiota de las crías y los adultos consta de 12 miembros representados por seis géneros y miembros desconocidos de las familias Fusobacteriaceae y Erysipelotrichaceae (Anexo I), con una abundancia relativa del 35.5% (Figura 29D). *Fusobacterium perfoetens* fue la especie más abundante en este núcleo (9.7%). El grupo núcleo de las crías posee más miembros microbianos que el núcleo de los adultos, con 16 miembros que representan el 28.3% de la abundancia relativa, con *Alloprevotella* dominando el núcleo de las crías (14.3%). En contraste, el grupo núcleo de los adultos estuvo conformado

por cinco miembros bacterianos (Figura 29D), que representaban el 2.2% de la abundancia relativa, siendo *Colidextribacter* la bacteria más abundante (Anexo I).

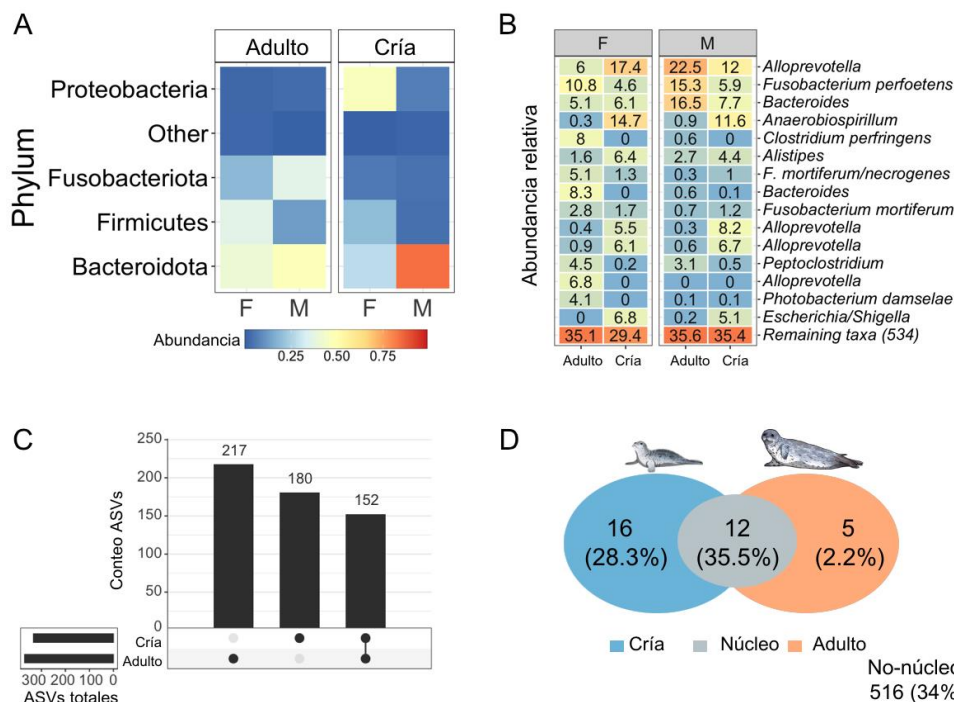


Figura 29. Composición de la microbiota del intestino de crías y adultos de foca de puerto. A) *Phyla* con una abundancia relativa > 1%. B) Los 15 ASV más abundantes detectados en la microbiota. C) Número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) entre edades y sexos. D) El grupo núcleo del microbioma entre crías y adultos consistió en ASVs con una prevalencia del 80% y una abundancia relativa > 0.01%. El diagrama de Venn muestra el número de ASVs y su abundancia relativa en cada grupo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los análisis de alfa diversidad, la riqueza de la microbiota de la foca de puerto difiere entre las edades pero no entre los sexos. El sexo no se correlacionó con los cambios en la diversidad filogenética microbiana ($p=0.430$) ni con la riqueza ($p=0.778$), ya que la comparación entre hembras y machos no fue significativa. Aunque las crías tenían valores medios más altos de riqueza ($p=0.046$) y diversidad filogenética que los adultos ($p=0.002$), su microbiota está dominada por menos miembros microbianos. En cambio, los adultos albergan comunidades bacterianas más diversas (Shannon, $p<0.001$). Sólo el índice de Shannon presentó diferencias relacionadas con el sexo, las focas hembras tuvieron un valor promedio de diversidad mayor que los machos (Shannon, $p<0.001$).

La gráfica de curvas de rango-abundancia muestra que los *taxa* más abundantes en las muestras de crías y adultos representan menos del 25% de la abundancia acumulada (Figura 30). La forma de la curva, con

una pendiente que sube paulatinamente, indica que la comunidad microbiana por edad está dominada por pocas especies en ambos grupos de edad.

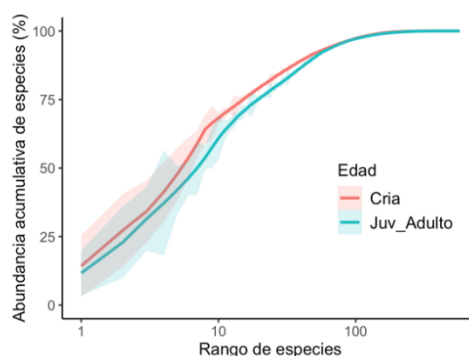


Figura 30. Curva de rango-abundancia de las especies microbianas presentes en las heces de las focas entre las distintas edades de estudio.

3.5.8 Inferencias funcionales de la comunidad microbiana de crías y adultos

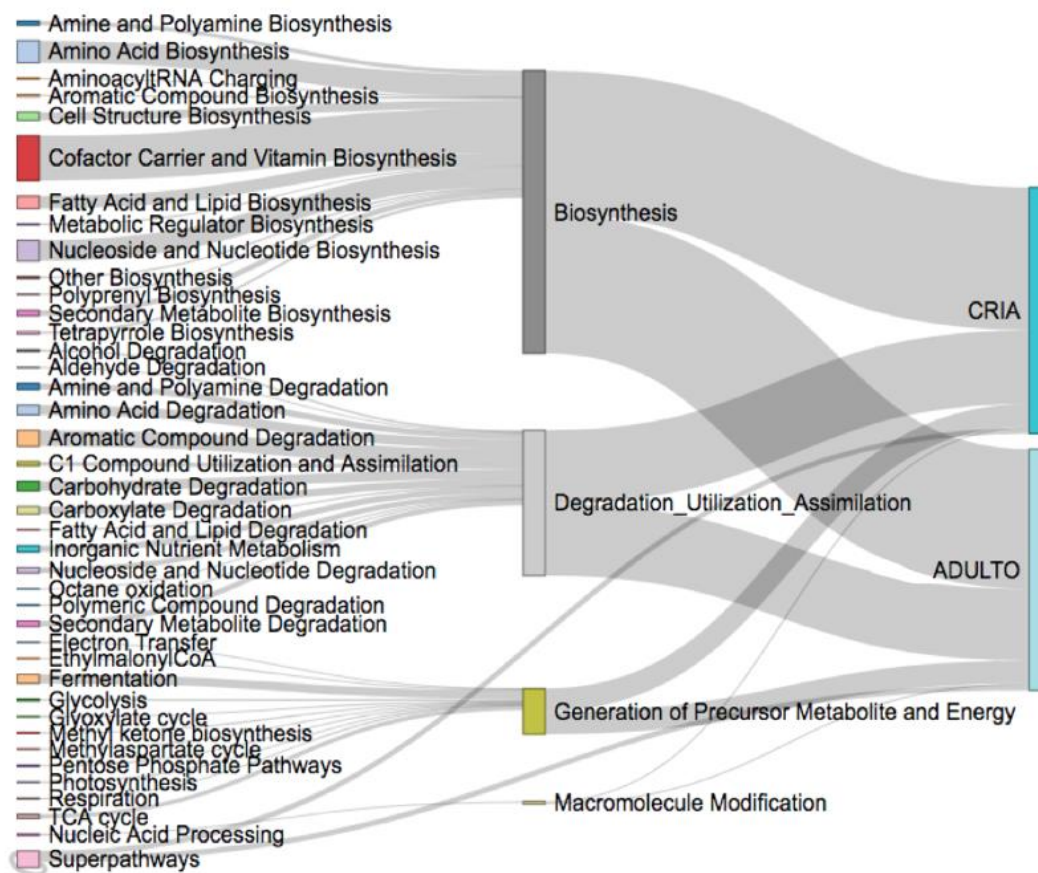


Figura 31. Principales rutas metabólicas del Consorcio Enzimático MetaCyc (EC), encontradas en las muestras de crías y adultos de foca de puerto. El tamaño de la caja simboliza la cantidad de rutas metabólicas encontradas.

En el análisis de inferencia funcional se encontraron 354 vías del Consorcio Enzimático MetaCyc (EC) en las muestras del estudio, las cuales están representadas en 5 tipos de vías metabólicas principales (Figura 31).

3.5.9 El efecto de la edad y el sexo en la estructura de la comunidad microbiana de focas de puerto

La comparación global de la edad y el sexo reveló que la edad explica la mayor parte de las variaciones en la composición de la comunidad microbiana de las focas de puerto. La edad influye en la composición ($R^2 = 0.12$, $p = 0.001$) y en la abundancia ($R^2 = 0.29$, $p = 0.001$) de los microorganismos, como demuestran los resultados del PCoA basados en las distancias UniFrac (Figura 32A-B).

El sexo no afectó la composición microbiana ($R^2 = 0.04$, $p = 0.172$), pero cuando se evaluó la abundancia de los microorganismos (UniFrac ponderado), la interacción entre la edad y el sexo reveló diferencias significativas (Figura 32B). No existieron diferencias significativas entre las categorías de sexo, entre las crías hembras y machos, y entre los adultos hembras y machos (Anexo J).

Los resultados de DESeq2 revelaron 24 géneros responsables de las diferencias observadas en la composición microbiana entre los grupos de edad (Figura 32C) y 21 vías EC (Figura 32D) que difieren entre adultos y crías. Los siguientes taxones fueron identificados como miembros del grupo núcleo de las crías y fueron más abundantes en ellas que en los adultos: *Actinomyces*, *Escherichia/Shigella*, *Odoribacter*, *Anaerobiospirillum*, *Butyricoccus*, *Suterella* y *Alloprevotella*. Los géneros *Blautia* y *Parasuterella* fueron más frecuentes en los adultos que en las crías y forman parte del grupo núcleo de los adultos (Anexo I).

La mayoría de los cambios en las funciones de la microbiota entre las edades están asociados al grupo de vías de Degradación/Utilización/Asimilación. De las vías metabólicas de interés, la biosíntesis de quinol-quinonas y la degradación de quitina, los ácidos grasos y aminoácidos, son significativamente más abundantes en las crías. En contraste, los adultos mostraron una mayor abundancia de rutas metabólicas relacionadas con la degradación de azúcares (Figura 32D).

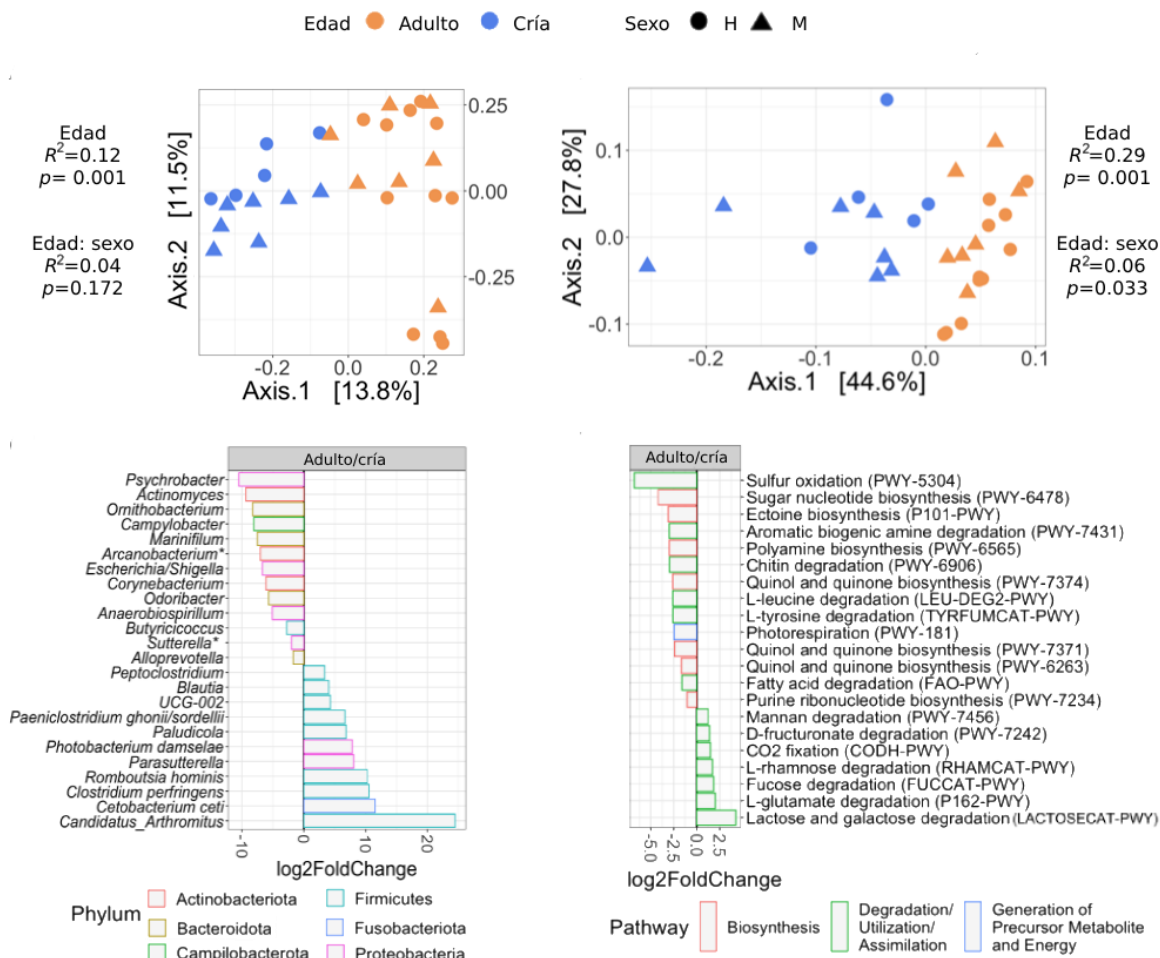


Figura 32. La edad explica las principales diferencias en la diversidad microbiana de focas de puerto. Análisis de coordenadas principales (PCoA) sobre distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B) basadas en grupos de edad y sexo. El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en *taxa* entre adultos y crías (C) y las vías metabólicas (D). Los géneros y vías con un cambio log2-fold > 0 son significativamente más abundantes en los adultos. *Asignación de múltiples especies.

3.5.10 Diferencias en la composición de la microbiota entre hembras y machos adultos con crías

La comparación en la interacción de edad y sexo (PERMANOVA) reveló diferencias en la composición microbiana entre todos los casos comparativos (Anexo K). Sin embargo, se decidió comparar la composición microbiana de los individuos con mayor contacto (hembras adultas y crías) con los que tenían poco o ningún contacto (machos adultos y crías), porque se esperaba que los individuos con mayor interacción tuvieran menos diferencias en sus perfiles microbianos.

Las crías tuvieron más ASVs exclusivos y compartieron más ASVs con las hembras adultas (Figura 33). En general, las ASVs compartidos tienen una abundancia relativa media $< 0.5\%$ (Anexo L). En el grupo núcleo de hembras adultas y crías, los ASV del género *Bacteroides* y bacterias desconocidas de las familias Ruminococcaceae y Oscillospiraceae fueron más abundantes. Este núcleo representa el 1.6% de la abundancia promedio de la microbiota de la foca de puerto. En contraste, los machos adultos tuvieron menos ASVs únicos que las hembras y comparten sólo 15 ASVs con las crías. En general, los adultos tienen más ASVs que las crías, y ambas edades comparten 109 ASVs, lo que representa el 87.9% de la abundancia microbiana promedio en las muestras de foca de puerto (Figura 33).

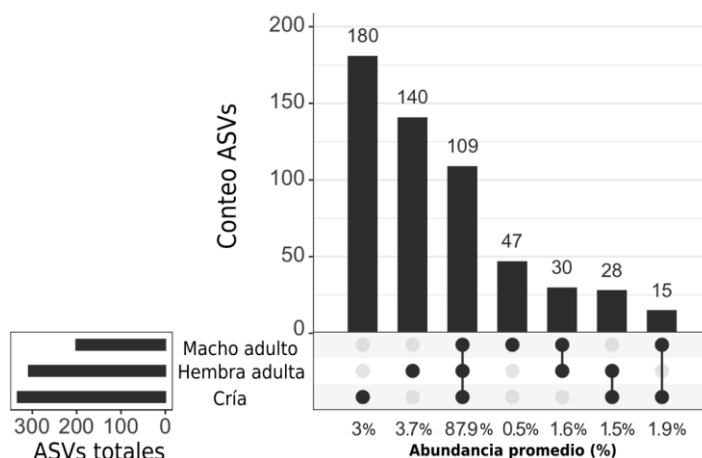


Figura 33. Composición diferencial entre adultos (hembras y machos) y crías. El diagrama de UpSet muestra el número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) entre adultos y crías. Los porcentajes representan la abundancia media de cada grupo.

3.5.11 Diferencias en la composición de la microbiota entre hembras adultas y crías

La composición (Figura 34A) y la abundancia (Figura 34B) de la comunidad microbiana difieren entre las hembras adultas y las crías. La dispersión individual dentro de los grupos fue homogénea, lo que indica que las ordenaciones son fiables. Si solamente se evalúa la presencia/ausencia de microorganismos, se logra una mejor separación entre grupos (UniFrac no ponderado; Figura 34A), pero cuando se incluye la abundancia de microorganismos (UniFrac ponderado; Figura 34B), una mayor fracción de la variación es explicada por los grupos de edad ($R^2 = 0.32$, $p = 0.001$).

En la microbiota de las crías y de las hembras adultas, 18 taxones presentaron abundancias variables (Figura 4C). Los principales cambios en la composición de la microbiota entre las hembras y las crías están

relacionados con el *phylum* Firmicutes, que fue muy abundante en las hembras adultas; de este *phylum*, sólo el género *Butyricoccus* tuvo una mayor abundancia en las crías.

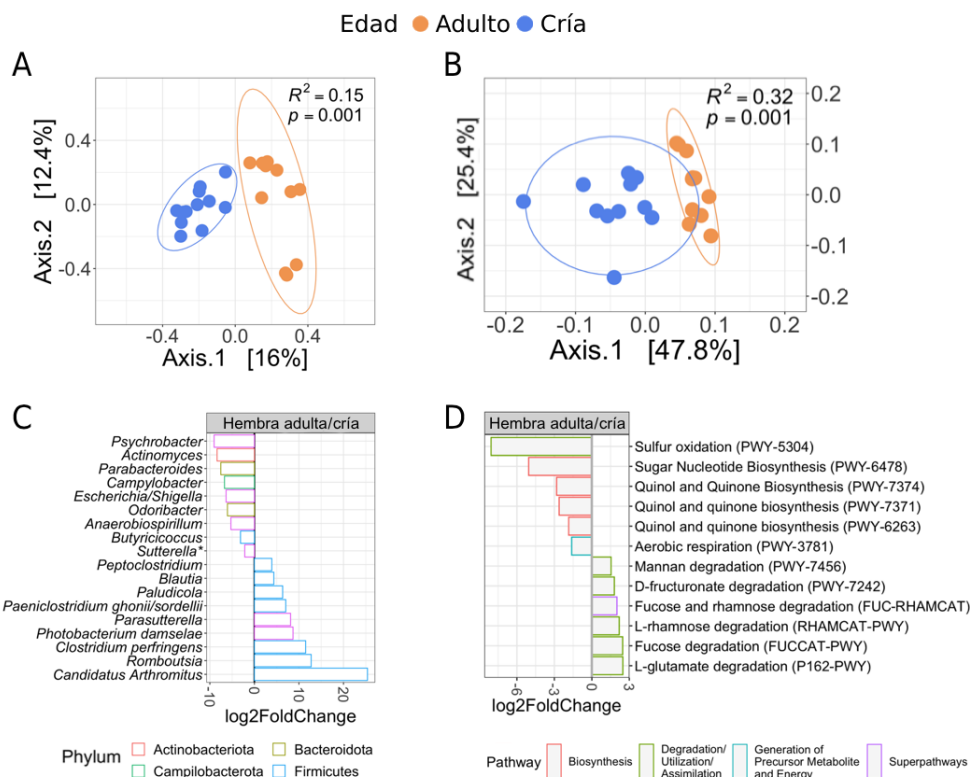


Figura 34. Cambios en la diversidad microbiana entre las hembras adultas y las crías de foca de puerto. Análisis de coordenadas principales (PCoA) sobre distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B); las elipses representan un intervalo de confianza del 90%. El análisis de abundancia diferencial revela cambios entre las hembras adultas y las crías en taxones microbianos (C) y en rutas metabólicas (D). Los géneros y las vías con un cambio log₂-fold > 0 son significativamente más abundantes en las hembras adultas. *Asignación de múltiples especies.

Las hembras adultas tuvieron niveles considerablemente más altos de vías implicadas con la degradación de carbohidratos complejos (manosa), monosacáridos (fucosa y ramnosa), azúcares (D-fructuronato) y aminoácidos (L-glutamato) (Figura 34D).

3.5.12 Diferencias en la composición de la microbiota entre machos adultos y crías

La comparación entre los machos adultos y las crías reveló cambios en la composición (Figura 35A) y la abundancia (Figura 35B) de la comunidad microbiana. La dispersión microbiana entre individuos no mostró variaciones entre las edades al considerar la composición (*betadisper*, $p = 0.900$) y la abundancia

(*betadisper*, $p = 0.257$). Cuando se considera la abundancia de microorganismos, se explica una mayor proporción de la variabilidad entre los grupos ($R^2 = 0.24$, $p = 0.001$).

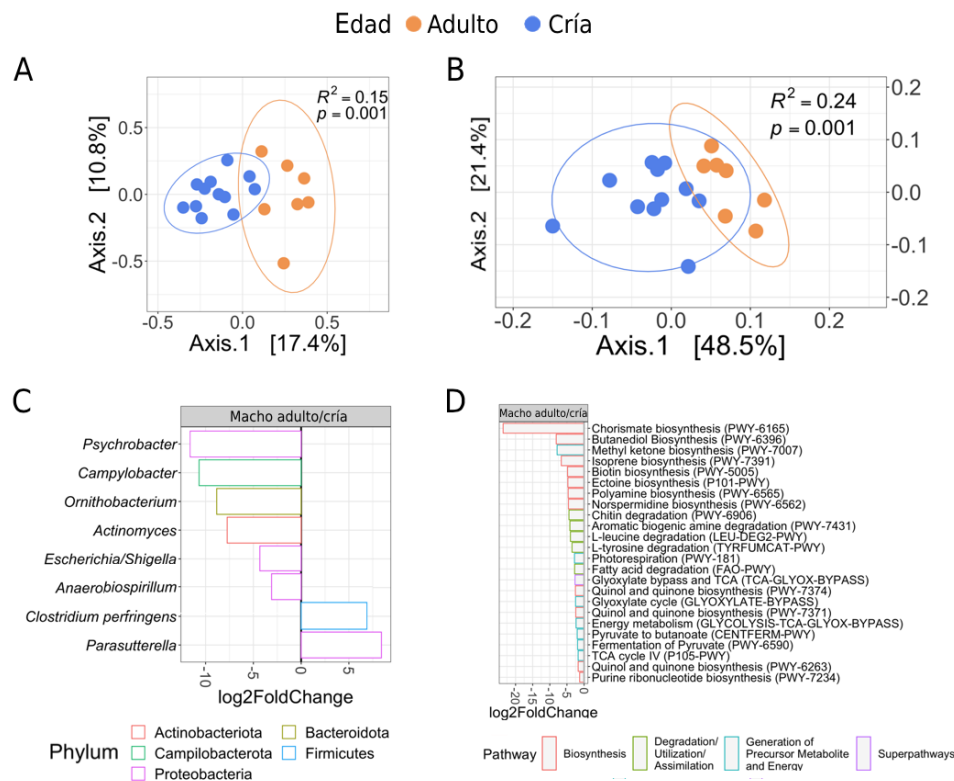


Figura 35. Cambios en la diversidad microbiana entre los machos adultos y de las crías de foca de puerto. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basados en distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B); las elipses representan un intervalo de confianza del 90%. El análisis de abundancia diferencial revela cambios en taxones microbianos entre los machos adultos y las crías (C) y en rutas metabólicas (D). Los géneros y las vías con un cambio $\log_2\text{-fold} > 0$ son significativamente más abundantes en los machos adultos.

Se detectaron algunos cambios en la composición de la microbiota entre los grupos, siendo ocho géneros los que tuvieron abundancias diferenciales (Figura 35C). Los machos adultos tienen una mayor prevalencia de *Clostridium perfringens* y *Parasuterella* que las crías. Como se demostró en la comparación hembras adultas-crías, las crías tienen una mayor abundancia de los géneros *Psychrobacter*, *Campylobacter*, *Anaerobiospirillum*, *Actinomyces* y *Escherichia/Shigella*, siendo los dos últimos miembros del grupo núcleo en las crías.

Un total de 24 vías funcionales difirieron entre los machos adultos y las crías, todas ellas más abundantes en las crías (Figura 35D). La mayoría de los cambios observados en las funciones del microbioma están relacionados con las rutas de biosíntesis. Múltiples vías de degradación de aminoácidos (L-leucina y L-tirosina), ácidos grasos, polisacáridos naturales (quitina) y compuestos aromáticos (aminas) fueron más

abundantes en crías. Independientemente del sexo de los adultos, las rutas EC implicadas en la producción de quinol y quinonas (PWY-7374 y PWY-7371) son más numerosas en las crías.

3.6 Discusión

En este capítulo se analizó la influencia de la edad y el sexo en la composición y las funciones de la microbiota intestinal de las focas de puerto utilizando una estrategia de secuenciación de amplicones de ARNr 16S. La edad explica la mayor parte de las variaciones observadas en la composición microbiana, y las diferencias relacionadas con el sexo entre adultos y crías son más notables cuando se considera la abundancia de microorganismos. Las hembras adultas tienen más ASVs totales y únicos y comparten más ASVs con las crías que los machos adultos con las crías. En general, las hembras tuvieron una mayor diversidad de microorganismos que los machos. A medida que las focas crecen, el grupo núcleo de la microbiota se reduce y la diversidad microbiana aumenta.

3.6.1 Las muestras de recto como alternativa para evaluar la microbiota del intestino en las crías de focas de puerto

Se encontraron similitudes en la estructura de la comunidad de las muestras fecales y rectales de las crías y ambas muestras se agruparon en los gráficos de PCoA (Figura 28). El alto número de ASVs compartidos entre las muestras de heces y recto sugiere que ambos tipos de muestras son útiles para proporcionar una visión de la comunidad bacteriana presente en el intestino grueso de las focas de puerto (Nelson et al., 2013). Las muestras rectales son más útiles y fiables para caracterizar la microbiota intestinal cuando las heces son líquidas y tienen más probabilidades de estar contaminadas con bacterias del entorno, como ocurre con las heces de las crías de foca de puerto.

3.6.2 La edad como factor clave en la estructura de la comunidad bacteriana

Los resultados obtenidos indican que la edad es un factor clave que influye en la composición de la microbiota intestinal de las focas de puerto. Investigaciones anteriores en otros pinnípedos también han identificado a la edad como un factor importante en la composición de la microbiota intestinal (Nelson et al., 2013; Smith et al., 2013; Tian et al., 2020). Los cambios en la estructura microbiana entre las edades

podrían ser el resultado de las diferencias en la dieta. Las crías de foca de puerto se alimentan principalmente de leche y son destetadas después de cuatro a seis semanas (Bigg, 1981; Fernández-Martín et al., 2016; Muelbert & Bowen, 1993), mientras que la dieta de los adultos se basa principalmente en peces bentónicos o demersales y cefalópodos (Brassea-Pérez et al., 2019; Germain et al., 2012; Oates, 2005; Pacheco-Sandoval et al., 2019). Las vías metabólicas enriquecidas por las crías indican que éstas estaban pasando de la lactancia a una dieta sólida. La leche de los pinnípedos es rica en grasa (60%) y en proteínas (10%) y los aminoácidos más abundantes son el glutamato, la prolina y la leucina (Davis et al., 1995). La ruta de degradación de la leucina fue más abundante en las crías que en los adultos, y el glutamato fue más abundante cuando se comparó a las crías con los machos adultos. El enriquecimiento de las rutas relacionadas con la degradación de los ácidos grasos y de algunos aminoácidos abundantes en la leche podría indicar que las crías todavía estaban amamantando en el momento del muestreo.

Sin embargo, el aumento de la degradación de quitina, un compuesto característico del exoesqueleto de los invertebrados, es consistente con el hecho de que las crías se alimentan a un nivel trófico inferior al de los adultos (Germain et al., 2012). Algunos estudios indican que inicialmente las focas crías recién destetadas se alimentan de pequeños crustáceos y peces (Muelbert y Bowen, 1993; Oates, 2005). Los crustáceos desempeñan un papel importante en la dieta de las crías, lo que sugiere que éstas son ineficientes en capturar peces a esta edad (Muelbert y Bowen, 1993). A medida que sus habilidades de búsqueda de alimento y de buceo mejoran, las crías cambian a una dieta adulta, pero la ingesta de alimentos sólidos puede ocurrir mientras la cría todavía está amamantando (Sauvé et al., 2014).

No se ha descrito la temporada de cría de las focas de puerto en la isla Natividad; sin embargo, existe información disponible para la colonia de la isla San Roque, cercana a nuestra área de investigación. Fernández-Martín (2012) estudió la temporada de cría de 2014 en la isla de San Roque y encontró que ésta abarca desde finales de diciembre hasta finales de marzo, con el pico de crías siendo el 7 de febrero y el período de lactancia dura 21 días. La larga temporada de cría (13.43 semanas), en comparación con otras colonias del norte, mostró que las hembras están menos sincronizadas. Si las focas de puertos de la isla Natividad tienen un periodo de reproducción similar al de la isla San Roque, entonces nuestro muestreo se produjo cerca del final de la temporada de cría, lo que es coherente con nuestro hallazgo de la transición de la leche al alimento sólido.

Los estudios sobre la transición del destete han encontrado una mayor abundancia de bacterias anaerobias facultativas, como *Escherichia/Shigella* (Gresse et al., 2017), características de la microbiota de crías de foca de puerto. Además, el mayor número de miembros del grupo núcleo que comparten los

elefantes marinos después del destete (Stoffel et al., 2020) y nuestras muestras de crías apoyan la idea de que las crías de foca de puerto se encontraban al principio del período posterior al destete.

3.6.3 El grupo núcleo de crías y adultos

Se identificaron 12 microorganismos que persisten desde las crías hasta la edad adulta (Figura 28). El mantenimiento de estos microorganismos a lo largo de la vida de las focas sugiere que estas especies pueden proporcionar funciones no relacionadas con la dieta, ya que ésta es muy diferente entre las edades. En cambio, este grupo núcleo podría estar implicado en el desarrollo del sistema inmunitario, y su conservación está asegurada por la transmisión vertical (Nelson et al., 2013). En general, los adultos tienen menos miembros en su microbioma núcleo que las crías, lo que se ha observado en otras especies de focas (Tian et al., 2020).

Los estudios sobre el microbioma de los pinnípedos coinciden en que los géneros *Bacteroides* y *Fusobacterium* y los miembros no identificados de las familias Fusobacteriaceae y Lachnospiraceae, forman parte del grupo núcleo en pinnípedos (Pacheco-Sandoval et al., 2019; Stoffel et al., 2020; Tian et al., 2020; Toro-Valdivieso et al., 2021). Esto sugiere que los géneros mencionados desempeñan un papel esencial en la evolución de los pinnípedos, probablemente relacionado con funciones inmunológicas porque se han mantenido a lo largo de la evolución.

Los estudios disponibles sobre la microbiota de las focas de puerto adultas también han identificado los géneros *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Anaerobiospirillum* como miembros del grupo núcleo (Numberger et al., 2016; Pacheco-Sandoval et al., 2019). Algunas de las bacterias detectadas en el grupo núcleo de las focas adultas, como *F. mortiferum*, *F. perfoetens*, *Colidextribacter*, y un miembro no identificado de la familia Oscillospiraceae, también se han detectado en los microbiomas de elefantes marinos y focas de Weddell adultos (Kim et al., 2020).

Fusobacterium, *Bacteroides*, *Odoribacter*, *Anaerobiospirillum*, *Escherichia/Shigella*, *Phascolarctobacterium* y *Collinsella* forman parte del núcleo microbiano de las crías y también han sido identificados como miembros del microbioma de las crías de elefante marino que habitan en la isla de San Benito (Stoffel et al., 2020), una isla cercana a isla Natividad (Figura 19). Estas bacterias podrían ser importantes en las crías de pinnípedos.

3.6.4 El posible papel de la microbiota del intestino en las crías de foca de puerto

Las crías de foca de puerto, en comparación con otros fócidos, son especialmente precoces al entrar en el mar poco después del nacimiento y nadar con su madre durante todo el periodo de lactancia, en comparación con otros fócidos (Bigg, 1981; Bowen et al., 1999; Jørgensen et al., 2001). La natación requiere un mayor gasto de energía, por lo que el ayuno post-destete es más corto que el de otras especies debido al menor almacenamiento de energía durante la lactancia (Muelbert y Bowen, 1993). Las crías de foca de puerto pierden el 21% de la masa del destete durante las primeras cinco semanas de la etapa posterior al destete y ayunan en promedio de 15 a 17 días. La grasa corporal comprende el 32.8% de la masa corporal al final del destete, pero disminuye al 12% después de 26 días posteriores al destete. Asimismo, el porcentaje de proteína disminuye del 5.5% al nacimiento al 2.5% cerca del destete (Muelbert y Bowen, 1993).

La pérdida drástica de peso y masa corporal se ha relacionado con cambios en la composición de la microbiota intestinal en diferentes especies (Gresse et al., 2017; Ni et al., 2021; Sommer et al., 2016; Stoffel et al., 2020). Un estudio reciente de pacientes con caquexia, una condición corporal caracterizada por la pérdida de peso y el desgaste muscular, encontró una reducción significativa de las vías catabólicas relacionadas con los carbohidratos complejos ("mannan"), derivados de azúcares (glucuronidos, fructuronato), la degradación de los ácidos grasos y aminoácidos (L-glutamato, L-leucina y L-tirosina), en comparación con el grupo sin caquexia (Ni et al., 2021). Estas vías se redujeron significativamente en las crías en comparación con los adultos, lo que valida la idea de que el estrés metabólico en adultos es menor que en las crías durante la temporada de reproducción (Kershaw y Hall, 2016).

Aunque las hembras son susceptibles al estrés metabólico y a la pérdida de peso durante la temporada de reproducción, nuestros resultados sugieren que las crías tienen mayor estrés metabólico y que la fase posterior al destete es crucial para su supervivencia. El pequeño tamaño de las hembras de foca de puerto (comparado con otras focas) impide el ayuno prolongado y la lactancia debido a que tienen menos depósitos de grasa; por lo tanto, las hembras se alimentan durante el periodo de lactancia para recuperar la grasa perdida (Bowen et al., 1992; Thompson et al., 1994). Sin embargo, las crías de foca de puerto crecen lentamente y son más delgadas al destete que otras especies que no nadan antes del destete (Bowen et al., 1992).

Varias vías relacionadas con la biosíntesis de quinol y quinonas se enriquecieron en la microbiota de las crías; estos componentes moderan el transporte respiratorio de electrones y desempeñan un papel clave

en el proceso de generación de energía (Pacífico et al., 2021). Las quinonas también son factores de crecimiento para las bacterias, y los géneros identificados como productores de quinonas: *Suterella*, *Escherichia coli* y *Bacteroides* (Fenn et al., 2017), son abundantes en la microbiota de las crías y también son miembros de su núcleo. A medida que un individuo crece, la diversidad de la microbiota aumenta (Rodríguez et al., 2015); por lo tanto, el papel de estas bacterias en los primeros años de vida es fundamental para promover el crecimiento y la diversificación de otras especies microbianas.

3.6.5 El sexo tiene un efecto mínimo en la estructura de la comunidad microbiana de las focas de puerto

Las diferencias en el índice de Shannon fueron la única evidencia de variaciones relacionadas con el sexo en la microbiota de las focas de puerto, teniendo las hembras una mayor diversidad microbiana que los machos. Las hembras adultas modifican su distribución acuática, la duración del ayuno y la actividad de búsqueda de alimento durante la temporada de cría (Thompson et al., 1994). Estos cambios varían según el tamaño corporal de las hembras y la presencia de crías, siendo las hembras más grandes capaces de ayunar durante períodos más prolongados que las más pequeñas (Thompson et al., 1998). Además, las hembras sin crías no restringen su rango de búsqueda de alimento (Thompson et al., 1994). Al contrario, cuando las hembras comienzan a hacer viajes de búsqueda de alimento, los machos limitan su rango de distribución y se concentran cerca de los lugares de alimentación o de las rutas de tránsito para maximizar el contacto con las hembras en estro (van Parijs et al., 1997). Estos cambios de comportamiento de las hembras pueden ser responsables de la mayor variedad y diversidad observada en la composición microbiana de las hembras adultas, como muestra el mayor número de ASVs detectados en las hembras que en los machos (Figura 33).

Al comparar la diversidad beta entre sexos, no se observaron cambios en la composición de la microbiota entre hembras y machos (independientemente de la edad), como se ha visto en otros fócidos con bajo dimorfismo sexual, como la foca leopardo (Nelson et al., 2013). Se ha informado de cambios en la composición de la microbiota entre hembras y machos en especies de pinnípedos con un alto dimorfismo sexual, como los elefantes marinos, donde las variaciones en la estructura microbiana del intestino se han relacionado con las diferencias en la capacidad de dispersión y las estrategias de forrajeo entre los sexos (Nelson et al., 2013).

Las focas de puerto adultas tienen un dimorfismo sexual menor que otros fócidos, siendo las hembras normalmente más pequeñas que los machos (Bigg, 1981). En esta especie, las diferencias en la dieta, la distribución del área de distribución y el área de forrajeo están relacionadas principalmente con el tamaño y la masa corporal del ejemplar más que con el sexo (Bjorkland et al., 2015; Schwarz et al., 2018; Thompson et al., 1998). La presencia de una considerable variación intrasexual en la dieta y el área de alimentación, indica que las capacidades fisiológicas del animal determinan las diferencias en ambos factores más que el sexo (Bjorkland et al., 2015; Thompson et al., 1998). Por tanto, al igual que en otros fócidos con bajo dimorfismo sexual, el sexo no parece ser un factor importante en la modulación de la diversidad de la comunidad microbiana intestinal en las focas de puerto (Kim et al., 2020; Nelson et al., 2013).

Además, no se observaron diferencias en la composición microbiana entre los sexos de las crías. Algunos estudios han informado que la masa media al nacer, la tasa de pérdida de masa y la duración del ayuno en el periodo posterior al destete, no difieren entre las crías hembras y machos, lo que indica que las capacidades fisiológicas y metabólicas son similares entre las categorías de sexo (Boulva, 1975; Muelbert y Bowen, 1993).

3.6.6 Similitudes en la estructura de la comunidad microbiana entre hembras adultas y crías de foca de puerto

Las hembras adultas y las crías comparten más ASVs que los machos adultos con las crías. Los miembros de la micro-comunidad compartida son relativamente poco abundantes y filogenéticamente diversos, y forman parte de la "biosfera rara" en el intestino de la foca de puerto. Al igual que en los seres humanos, muchos estudios sugieren que los taxones raros son componentes importantes del intestino y podrían contribuir de forma independiente o colectiva a varias funciones metabólicas cruciales para la salud de los individuos (Bhute et al., 2017).

Las hembras adultas y las crías suelen interactuar y compartir más fuentes microbianas potenciales, lo que da lugar a un mayor número de ASV compartidos. Durante la temporada de cría, las hembras y las crías tienden a formar grupos más pequeños y aislados en las zonas preferidas para el parto y la lactancia (Brown y Mate, 1983), y las crías acompañan a su madre durante los viajes de búsqueda de alimento hasta el destete (Bigg, 1981; Thompson et al., 1994). Los machos de foca de puerto tienen poca o ninguna interacción con las crías, ya que no participan en su cuidado y sólo restringen su área de distribución durante la temporada de apareamiento (van Parijs et al., 1997). Los estudios sobre individuos que

cohabitan demostraron que el contacto directo y regular conduce a tener similitudes en la composición microbiana debido a una mayor transmisión bacteriana, lo que mejora el desarrollo del sistema inmunitario (Raulo et al., 2018; Song et al., 2013).

3.6.7 Posibles amenazas en la conservación de la foca de puerto

Dentro del grupo de microorganismos con abundancias diferenciales entre las edades, se detectaron algunos patógenos potenciales, como *Actinomyces*, *Corynebacterium* y *Escherichia/Shigella*, los dos últimos reportados previamente en crías de otros pinnípedos (Gilbert et al., 2018; Higgins, 2000). Los adultos poseen una mayor abundancia de *Photobacterium damsela* y *Cetobacterium ceti* y las crías tienen una mayor abundancia de *Psychrobacter* y *Campylobacter*; éstos se han asociado a focas que se alimentan cerca de granjas de salmón (Agnese et al., 2020). En la isla Natividad existe una sociedad cooperativa de pesca que representa la principal fuente de ingresos económicos de los residentes y se dedica principalmente a criar abulones y pescar langostas.

P. damsela es una bacteria patógena de diversas especies, incluyendo peces, crustáceos y cetáceos, que causa lesiones ulcerosas y septicemia hemorrágica (Rivas et al., 2013). Esta especie afecta a las especies de peces de cultivo y se considera una amenaza para la maricultura y acuicultura, ya que la enfermedad producida por esta bacteria provoca mortalidades (Fouz et al., 2000) y pérdidas económicas. Los seres humanos también son vulnerables a esta especie, que produce graves infecciones, heridas y fascitis necrotizante (Hundenborn et al., 2013). Esta especie podría representar un riesgo para la salud de las focas de puerto y los humanos que viven cerca, porque la transmisión de esta bacteria ocurre del agua a los humanos (Fouz et al., 2000). Es necesario continuar con estudios que permitan determinar si estos microorganismos son especies patógenas o comensales de las focas de puerto y conocer la posible transmisión de estas bacterias del medio ambiente a los humanos.

3.7 Conclusión

La edad es un factor clave en la composición de la comunidad microbiana, y los cambios son impulsados principalmente por la dieta. A medida que las focas crecen, la diversidad de bacterias aumenta mientras que el grupo núcleo disminuye. El sexo parece ser un factor con menor impacto en la estructura de la comunidad microbiana debido a la gran variabilidad intrasexual en el comportamiento y la dieta de las

focas, que depende principalmente del tamaño del animal más que del sexo. El estudio de la microbiota intestinal puede proporcionar información sobre la salud fisiológica del animal y puede ayudar a predecir la etapa de la vida del animal, particularmente en las crías. En este estudio se destaca la importancia de la microbiota en las primeras etapas de la vida y enriquecen nuestra comprensión de las variables que afectan a la comunidad microbiana de las focas de puerto en México. Este trabajo representa el primer reporte sobre la composición microbiana intestinal de las crías de foca de puerto.

Capítulo 4. La filogenia

4.1 Introducción

La microbiota del intestino juega un papel importante en la evolución del hospedero (Hale et al., 2017). La presencia de esta comunidad y los cambios asociados a ella, han permitido que los animales exploten nuevos nichos y dietas y, así evolucionar en respuesta a estos cambios (Ley et al., 2008). Aunque factores externos moldean continuamente la estructura de la microbiota, la comunidad microbiana sigue siendo específica de la especie, como resultado de millones de años de coevolución (Yildirim *et al.*, 2010). Esto sugiere que las características específicas en la historia de vida de la especie promueven la especificidad y codiversificación entre la microbiota y el hospedero (Degnan et al., 2012).

Los efectos que tiene la filogenia en la comunidad microbiana están relacionados con genes del sistema inmune que moldean las interacciones hospedero-microbiota, así como la transmisión vertical de grupos microbianos (Degnan et al., 2012).

El estudio del microbioma de un organismo puede ayudar a detectar diferencias genéticas entre poblaciones. Un estudio realizado en 60 especies de mamíferos determinó que la comunidad microbiana del intestino de individuos conespecíficos es más similar que entre individuos de especies diferentes (Ley et al., 2008). Sin embargo, especies cercanas comparten un mayor número de microorganismos en comparación con especies lejanas, lo que implicaría el mantenimiento de un grupo de microorganismos esenciales durante la evolución.

En organismos de la misma especie, en especial aquellos que pertenecen a una misma población, la composición microbiana posee más similitudes en comparación con organismos de diferentes especies e incluso entre individuos de distintas poblaciones (Yildirim *et al.*, 2010).

Estudios de la microbiota intestinal en focas del océano Antártico determinaron que especies cercanas poseen microbiomas similares, sin embargo, cada especie mantiene un grupo específico de microorganismos (Nelson et al., 2013). Incluso en situaciones adversas (cautiverio), donde la microbiota intestinal pierde diversidad, la comunidad específica de la especie se mantiene (Kohl et al., 2017). Estos

resultados se han observado en otras especies de animales, como lagartijas, primates, ballenas, entre otros (Bik et al., 2016; Hale et al., 2017; Kohl et al., 2017; Sanders et al., 2015).

A pesar de las diferencias en la dieta que existen entre los fócidos, se ha mantenido un grupo núcleo como resultado de la historia evolutiva de este grupo, el cual es transferido de las madres a las crías (Nelson et al., 2013).

4.2 Antecedentes

La microbiota del intestino de focas adultas en México ha sido previamente caracterizada y su composición se relacionó con la dieta (Pacheco-Sandoval et al., 2019). En este estudio, se determinó que el valor lipídico de las presas moldea la estructura y funciones de la microbiota del intestino en focas de puerto silvestres.

Stoffel y colaboradores (2020) caracterizaron la microbiota rectal de crías de elefante marino en Isla San Benito, donde se observó una pronta diferenciación de la microbiota con respecto al sexo. Además, la composición del grupo núcleo varió a medida que los animales crecían. Los *phyla* predominante en las muestras fueron Bacteroides, Firmicutes, Fusobacteria y Proteobacteria, los cuales también se han identificado en otras especies de pinnípedos (Nelson et al., 2013; Pacheco-Sandoval et al., 2019; Tian et al., 2020; Toro-Valdivieso et al., 2021).

La microbiota del intestino de lobos marinos de California en México se ha caracterizado previamente. Ramírez-Delgado y colaboradores (2022) caracterizaron la microbiota de crías de lobos marinos del golfo de California, en donde encontraron que los *phyla* más predominantes fueron Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria y Epsilonbacteraeota. Además, en esta investigación se encontraron cambios a nivel de diversidad alfa en las diferentes colonias de estudio. Hasta la fecha no existen registros de la microbiota del intestino de lobos finos de Guadalupe ni de lobos marinos de California del Pacífico mexicano.

4.3 Hipótesis

Las interacciones interespecíficas moldean y enriquecen la comunidad microbiana del intestino al haber una mayor transferencia de microorganismos. Sin embargo, cada especie mantiene un grupo específico

de microorganismos que permiten diferenciarlas de las demás especies. Debido a las interacciones que existen entre estas especies, se espera que compartan un mayor número de microorganismos en contraste con otras colonias donde no existe este tipo de interacción. Se espera que la composición microbiana entre las especies de estudio sea más similar entre fócidos y entre otáridos.

4.4 Objetivos

4.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto que tiene la filogenia en la composición y conservación de microorganismos del intestino de la foca de puerto.

4.4.2 Objetivos particulares

- Caracterizar el perfil de la microbiota del intestino de las especies de pinnípedos de Baja California: foca de puerto del Pacífico (*Phoca vitulina richardii*), elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*), lobo fino de Guadalupe (*Arctocephalus philippii townsendii*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*).
- Comparar la comunidad microbiana de las especies de estudio para observar variaciones en la composición de la microbiota del intestino y determinar los microorganismos que tiene un mayor aporte a estas diferencias.
- Caracterizar el perfil funcional de todas las especies para observar variaciones en rutas metabólicas relacionadas con la historia de vida y la dieta.
- Determinar el grupo núcleo de la microbiota de los pinnípedos de México.

4.5 Métodos

4.5.1 Colecta de muestras

Se seleccionaron las Islas San Benito (Figura 36) por ser las únicas islas de México en donde habitan las cuatro especies de pinnípedos en México. Sin embargo, no fue posible el muestreo de la foca de puerto debido a la pandemia, por lo que se utilizaron muestras de una colonia cercana, Isla Natividad (Figura 36). Los muestreos se realizaron en la época en donde pudieran encontrarse la mayor cantidad de organismos por especie en tierra, con la finalidad de colectar la mayor cantidad de heces posible. Cada muestra se colectó individualmente con una espátula estéril y sólo se tomó la parte interna para evitar la contaminación cruzada con el ambiente circundante. De cada muestra se tomaron en promedio tres réplicas, se colocaron en tubos estériles con *RNAlater*® (Sigma-Aldrich) y se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su procesamiento.

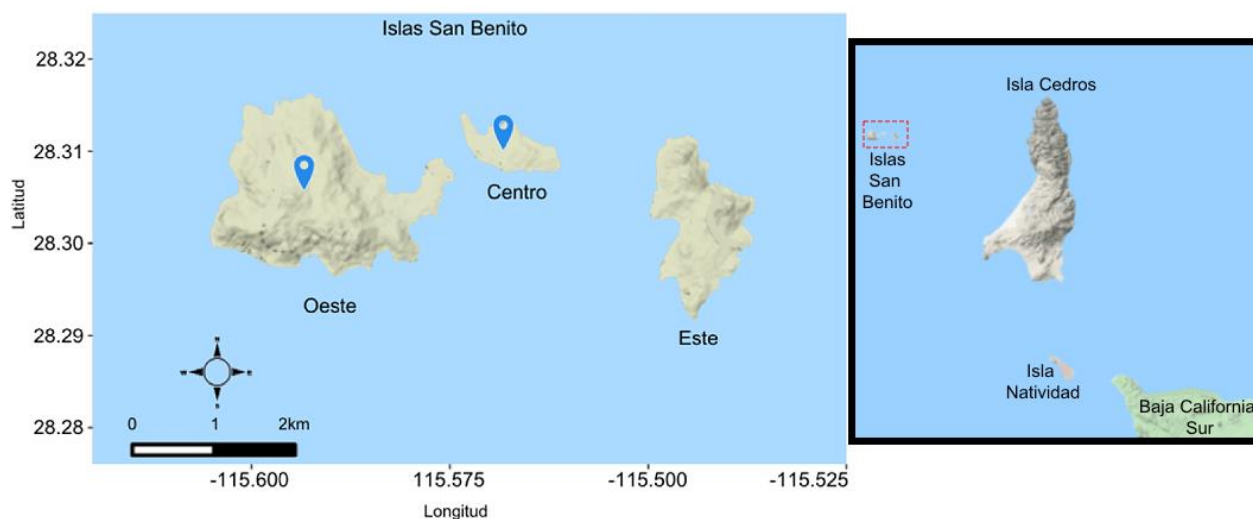


Figura 36. Ubicación geográfica de las Islas San Benito e Isla Natividad, lugar de muestreo de heces de las cuatro especies de pinnípedos en México.

4.5.1.1 Elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*)

El muestreo de heces de elefante marino se realizó en el mes de enero del año 2020 que corresponde a la temporada de reproducción e incluye las etapas de nacimiento, crianza y cópula de la especie. En esta época es posible encontrar individuos de ambos sexos, crías y destetados. En total se colectaron 24

muestras en la isla del Centro y además durante este muestreo fue posible coleccionar 5 muestras de heces de lobos marinos de California.

4.5.1.2 Lobo marino de California (*Zalophus californianus*) y lobo fino de Guadalupe (*Arctocephalus philippii townsendi*)

El muestreo de estas especies se realizó en el mes de julio del año 2020, que corresponde al periodo reproductivo de ambos pinnípedos; en esta época es posible encontrar machos y hembras con crías. Los muestreos se realizaron en las islas Benito del Oeste y Centro (Figura 36). En total se coleccionaron 32 muestras de heces de lobos marinos de California, de las cuales, 10 fueron de crías. De lobo fino de Guadalupe se coleccionaron 22 muestras, todas encontradas en la isla del Oeste.

4.5.1.3 Foca de puerto del Pacífico (*Phoca vitulina richardii*)

El muestreo programado para recolectar heces de focas de puerto para este capítulo se canceló por motivo de la pandemia de COVID-19. Para el análisis y las comparaciones, se utilizaron las muestras de adultos del capítulo 3 (La edad) que fueron coleccionadas en Isla Natividad, una isla muy próxima a Islas San Benito (Figura 19). Por lo tanto, se espera que la localidad no sea un factor que influya en las diferencias en la composición de la microbiota.

4.5.2 Extracción de ADN

Se utilizó el kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)[®] para extraer el ADN genómico total de las muestras fecales. Las muestras se centrifugaron a 9000 x g durante 10 minutos para poder decantar el *RNA later* en el cual fueron preservadas. De cada muestra se utilizaron 250-350 mg de materia fecal.

Para poder detectar microorganismos difíciles de lisar, se utilizó una temperatura de incubación de 95°C, propuesto por el fabricante. La concentración del ADN se determinó en el fluorómetro Qubit 3.0 (Invitrogen) con 5 µl por muestra utilizando el kit *Qubit[®] dsDNA BR Assay* (ThermoFisher[™]). Además de las muestras, se incluyeron dos controles negativos de extracción (sin ADN agregado).

4.5.3 Amplificación del gen 16S ARNr

La región hipervariable V4 del gen 16S ARNr se amplificó con la estrategia de doble indexado propuesta por Kozich y colaboradores (2013). La reacción y el programa de PCR se realizaron de acuerdo a lo descrito en el capítulo anterior. En resumen, se utilizaron de 5-15 ng de ADN en una reacción de 25 µl utilizando los *primers* 515Y y 806R, específicos para la región V4 del gen 16S ARNr, propuestos por Klindworth y colaboradores (2013). Se realizaron triplicados de reacciones de PCR por cada muestra y los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1% y los triplicados por muestra se mezclaron en un solo tubo de PCR. En el caso de que las muestras que no tuvieran amplificaciones exitosas, el ADN se limpió con el kit *DNeasy PowerClean Pro Cleanup* (QIAGEN®) para eliminar inhibidores de la reacción de PCR.

4.5.4 Preparación de las librerías

La normalización y preparación de las librerías de secuenciación se realizaron conforme a lo descrito en el capítulo anterior. La concentración final de la librería fue 1153 pM. Se utilizó el kit MiSeq® Reagent V2 de 300 ciclos de Illumina® y se siguió el protocolo para la preparación de librerías metagenómicas 16S ARNr (Illumina®) modificado por la Dra. Jennyfers Chong⁴. Se agregaron 10 µl del pool (1153 pM) y 10 µl de NaOH (0.2 N) en un tubo tipo Eppendorf y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 20 µl del buffer de hibridación.

Para diluir y desnaturalizar la librería control, se añadió 1 µl de PhiX (10 000 pM) y 1.5 µl de agua para una concentración de 4000 pM. A los 2.5 µl obtenidos se les agregaron 2.5 µl de NaOH (200 mM) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 495 µl del buffer de hibridación (HT1) para obtener una concentración de 20 pM.

Finalmente, la biblioteca de amplicones (16S ARNr) y el PhiX se combinaron añadiendo 675 µl del pool y 75 µl de PhiX. El resultado fue una solución de trabajo final con un volumen de 750 µl, a una concentración de 7.7 pM, con 10% de PhiX.

⁴ Técnico del laboratorio de metagenómica del CICESE (B.C, México).

4.5.5 Secuenciación

Se utilizó una celda de flujo estándar para secuenciar las librerías y se agregaron los *primers* necesarios para realizar la secuenciación. Además, se creó un archivo de texto (*sample sheet*) para indicar la combinación de índices de cada muestra para que al final de la corrida, las muestras se separen en archivos distintos. La secuenciación pareada (*paired-end*) se realizó en el equipo MiSeq™ de Illumina® que se encuentra en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE).

4.5.6 Procesamiento y análisis de las secuencias

El procesamiento inicial de las secuencias se realizó utilizando los mismos métodos descritos en el capítulo anterior (Figura 21) y todos los análisis se realizaron en el programa RStudio v.3.6.2 (R Core Team, 2019). Se utilizó la paquetería *decontam* (N. M. Davis et al., 2018) con el método de frecuencias (*frequency*) para identificar y eliminar secuencias contaminantes con base en los controles negativos de extracción.

4.5.7 Medidas de riqueza y diversidad filogenética

4.5.7.1 Diversidad alfa

Las estimaciones de diversidad alfa se calcularon de acuerdo a lo descrito en el capítulo anterior. Se estimaron los índices de diversidad de Shannon, especies observadas y diversidad filogenética de Faith (PD) con la matriz de conteos crudos de ASVs.

Para determinar diferencias significativas en la diversidad microbiana entre las especies y familias (Phocidae, Otariidae) de estudio, se crearon modelos mixtos con estas variables y se utilizaron pruebas de análisis de varianzas (ANOVA)— en los índices con normalidad y homocedasticidad— y la prueba de Kruskal-Wallis para índices sin distribución normal.

Para el análisis del grupo núcleo entre especies y familias se consideraron aquellos ASVs que tuvieran una prevalencia igual o mayor al 80% y no se consideró una abundancia relativa mínima. Para conocer en

general el número de ASVs exclusivos, totales y compartidos entre ambos grupos de estudio (por especie o familia), se crearon gráficas UpSet.

4.5.7.2 Diversidad beta

El conteo de ASVs se normalizó en la librería *DeSeq2* (Anders et al., 2010) con los métodos descritos en el capítulo anterior. Los datos se transformaron con el modelo “~Especie” (se considera la especie como el único factor en el modelo), y se utilizaron en todos los análisis posteriores. Para explorar la similitud de la comunidad microbiana entre especies, se utilizó la técnica de ordenación “análisis de componentes principales (PCoA)” y la métrica UNIFRAC no ponderada (Lozupone et al., 2011; Lozupone y Knight, 2005). Para evaluar si la dispersión entre las muestras era homogénea, se empleó la función *betadisper* (*vegan*) y en caso de cumplirse con el supuesto de homogeneidad, se utilizó la prueba de *adonis* (ANOVA con permutaciones) con 1000 permutaciones.

4.5.8 Abundancia diferencial

Se utilizó la librería *DeSeq2* para detectar ASVs con abundancias diferenciales significativas entre las especies de pinnípedos. Se eliminaron aquellos ASVs cuyos conteos fueran menores a 30 y se detectaran en menos de 2 muestras. Los ASVs se agruparon a nivel de género y se consideró un valor de *p* ajustado < 0.01 para identificar géneros bacterianos con abundancia diferencial entre las especies de estudio.

4.5.9 Inferencia funcional

Las secuencias se analizaron en el programa PICRUSt2 (Douglas et al., 2020) para predecir la composición funcional de la microbiota de las especies de pinnípedos. La librería *DESeq2* se utilizó para normalizar los conteos de EC obtenidos de PICRUSt2 bajo el modelo “~Especie” — utilizado también en las abundancias de ASV— y se eliminaron aquellos ECs que estuvieran presentes en menos de dos muestras y tuvieran conteos menores a 100. Con el fin de identificar ECs con abundancia diferencial consistente entre las especies de estudio, se consideró un valor *p* ajustado < 0.01 y un *log₂fold change* > 1.

4.6 Resultados

4.6.1 Extracción de ADN

La concentración de ADN presentó variaciones entre cada muestra y especie. El valor de concentración promedio de ADN obtenido fue 4.34 ng/μl con un rango de 0.2 – 15.5 ng/μl para las muestras de elefante marino y 2.9 ng/μl con un rango de 0.1 – 9.84 ng/μl para las muestras de lobo fino. En general, las muestras de crías de lobo marino de California tuvieron un promedio mayor de concentración de ADN (10.08, rango 0.64-22 ng/μl) que las muestras de adultos (5.68, rango 0.1-12.7 ng/μl).

4.6.2 Amplificación del gen 16S ARNr

4.6.2.1 Elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*)

Las 24 muestras de elefante marino tuvieron amplificaciones exitosas para el gen 16S ARNr (Figura 37).

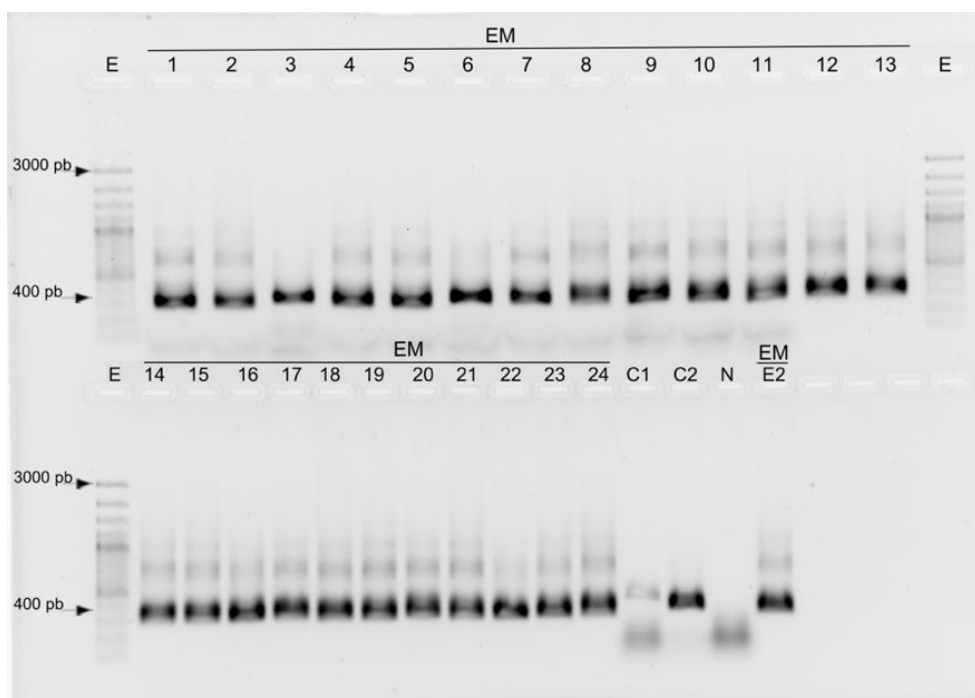


Figura 37. Productos de PCR de la región V4 del gen 16S ARNr de las muestras de elefante marino (EM) de la Isla Benito Centro. El tamaño del fragmento esperado es de aprox. 400 pb. E= escalera, C= control positivo y N= control negativo.

4.6.2.2 Lobo fino de Guadalupe (*Arctocephalus philippii townsendi*)

Las 22 muestras de heces de lobo fino de Guadalupe tuvieron amplificaciones exitosas para el gen 16S ARNr, en cinco de ellas fue necesario utilizar el kit *DNeasy PowerClean Pro Cleanup* para eliminar inhibidores de PCR y poder amplificar las muestras (Figura 38).

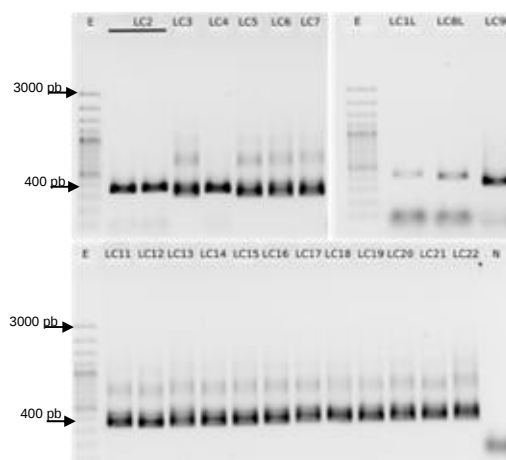


Figura 38. Productos de PCR de la región V4 del gen 16S ARNr de las muestras de lobo fino de Guadalupe (LF) de la Isla San Benito Oeste. El tamaño del fragmento esperado es de aprox. 400 pb. E= escalera y N= control negativo.

4.6.2.3 Lobo marino de California (*Zalophus californianus*)

Las 32 muestras de heces de lobo marino de California tuvieron amplificaciones exitosas para el gen 16S ARNr, en cinco de ellas fue necesario utilizar el kit *DNeasy PowerClean Pro Cleanup* para eliminar inhibidores de PCR y poder amplificar las muestras (Figura 39).

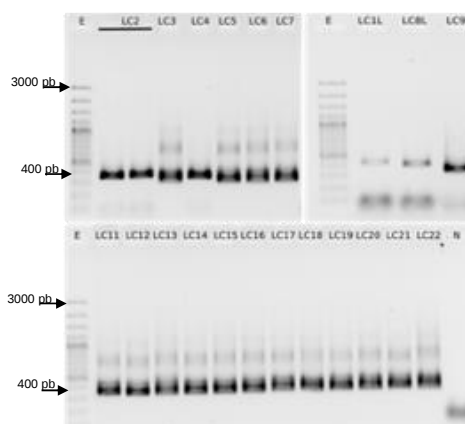


Figura 39. Productos de PCR de la región V4 del gen 16S ARNr de las muestras de lobo marino de California (LC) de la Islas Benito Oeste y Centro. El tamaño del fragmento esperado es de aprox. 400 pb. E= escalera y N= control negativo.

4.6.3 Descripción general del set de datos

Se conservaron un total de 6 532 133 de lecturas después del procesamiento de las muestras con DADA2. En general, el promedio de lecturas obtenidas fue 75 082 (Figura 40A). El set final de datos incluyó, 24 muestras de elefante marino (EM), 22 muestras de lobo fino de Guadalupe (LF) 21 muestras de lobo marino de California (LC), y 20 muestras de foca de puerto (FP); éstas últimas corresponden a las muestras de adulto del capítulo anterior. El número de lecturas obtenidas por especie coincidió con el número de muestras, siendo mayor para las muestras de elefante marino (Figura 40B).

A pesar de que las muestras de foca de puerto tuvieron un menor número de lecturas, la gráfica de rarefacción indica que todas las muestras alcanzaron la asíntota, lo que significa que la profundidad de secuenciación fue óptima para muestrear toda la riqueza microbiana por muestra. (Figura 40C).

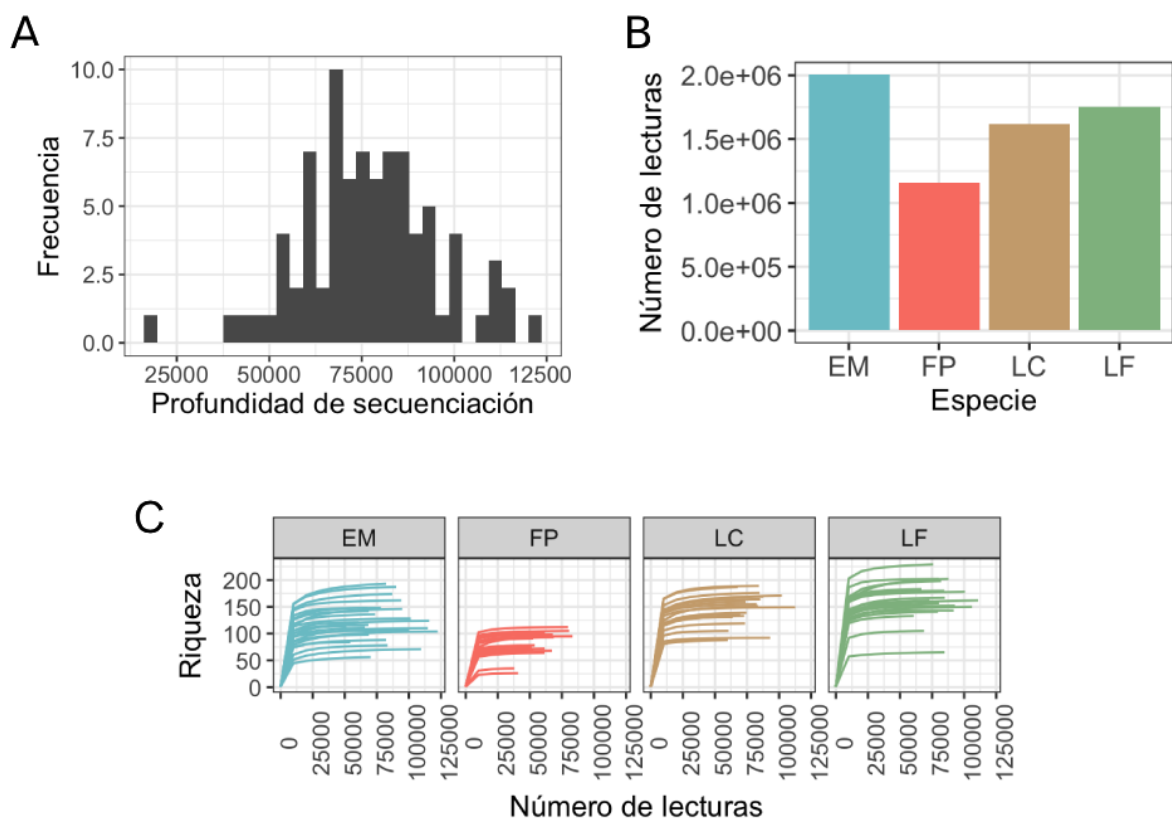


Figura 40. Descripción general del set de datos. A) Histograma del número de secuencias por muestra. B) Cantidad de lecturas obtenidas por especie. C) Gráfica de rarefacción de las muestras agrupada especie. EM= elefante marino del norte, FP= foca de puerto, LC= lobo marino de California, LF= lobo fino de Guadalupe.

4.6.4 Composición taxonómica de las muestras de heces

4.6.4.1 Análisis general de las especies

Se obtuvieron 1440 taxones representados en 17 *phyla* (Anexo M), de los cuales Actinobacteria, Bacteroidota, Firmicutes, Fusobacteriota y Proteobacteria tuvieron un alto número de conteos, siendo Firmicutes el *phylum* de mayor abundancia. En la figura 41A, se observa que el *phylum* Proteobacteria fue más abundante en las muestras de lobo fino de Guadalupe (LF), mientras que el Fusobacteriota tuvo una mayor representación en la microbiota intestinal de elefantes marinos (EM) y lobos marinos de California (LC).

Dentro de los 15 ASVs más abundantes entre las especies de pinnípedos, *Fusobacterium perfoetens* fue la especie más abundante en las comunidades microbianas (Figura 41B). Entre estos ASVs, destaca la presencia de *Photobacterium damseale*, una bacteria patógena detectada principalmente en las muestras de focas de puerto y lobos finos de Guadalupe.

Los elefantes marinos y focas de puerto fueron los pinnípedos con la mayor y menor riqueza de ASVs, respectivamente (Figura 41C). Sin embargo, los lobos marinos de California tuvieron la menor cantidad de ASVs exclusivos y todos los pinnípedos compartieron 104 ASVs.

El grupo núcleo de los pinnípedos en México está compuesto por cuatro miembros bacterianos: *F. perfoetens*, *F. mortiferum/necrogenes*, *Colidextribacter* y *F. mortiferum* (Figura 41D). Los LF tuvieron el grupo núcleo más numeroso, en comparación con las FP, cuyo grupo núcleo fue el menos abundante (Anexo N).

La gráfica de curvas de rango-abundancia (del inglés: *rank abundance curve*) muestra que, en general, los *taxa* más abundantes en las muestras de heces de los pinnípedos representan menos del 25% de la abundancia acumulada (Figura 42). La forma de la curva, una pendiente que sube paulatinamente, indica que las comunidades microbianas del intestino están dominadas por pocas especies bacterianas.

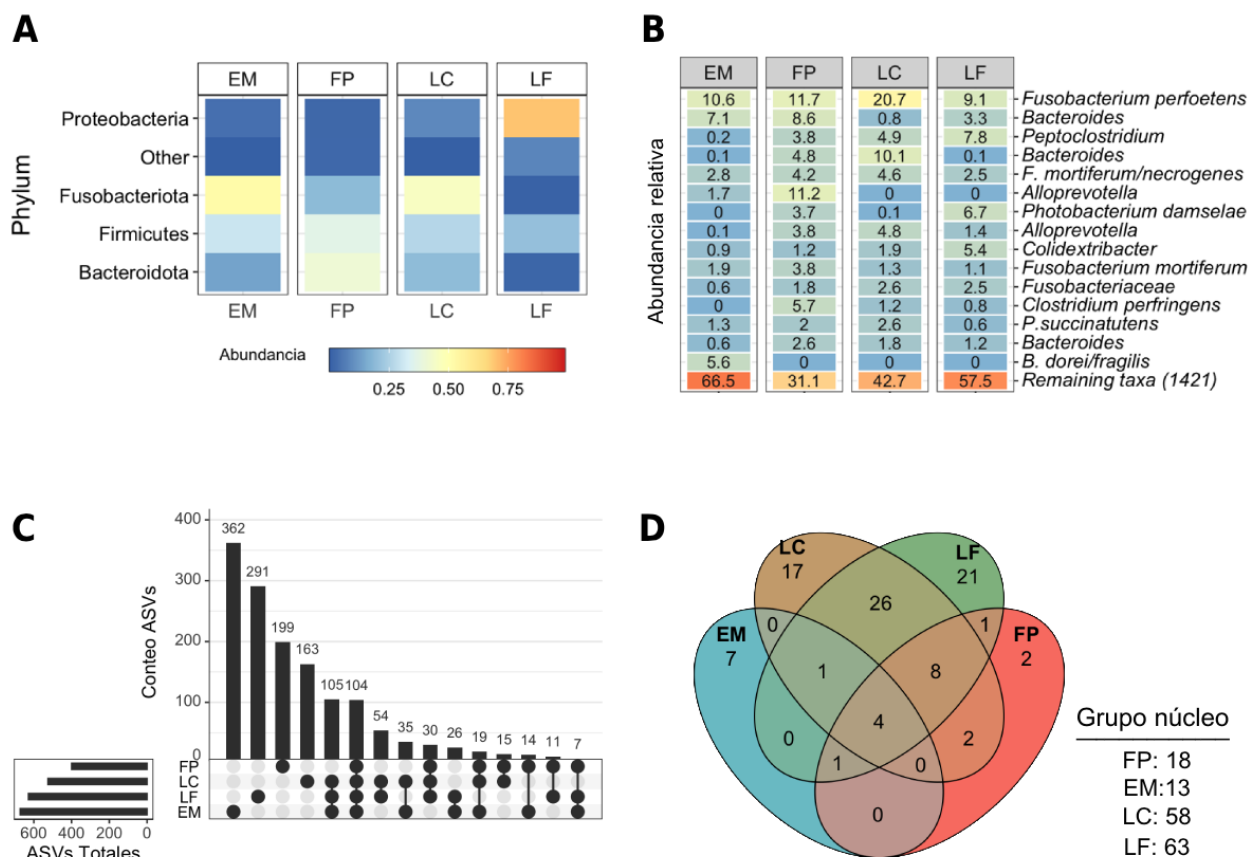


Figura 41. Composición de la microbiota del intestino de los pinnípedos de México. A) *Phyla* con una abundancia relativa > 1%. B) Los 15 ASV más abundantes detectados en las heces de las especies de estudio. C) Número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) entre las especies de pinnípedos. D) El grupo núcleo del microbioma entre especies consistió en ASVs con una prevalencia del 80%. El diagrama de Venn muestra el número de ASVs en cada núcleo. EM= elefante marino del norte, FP= foca de puerto, LC= lobo marino de California y LF= lobo fino de Guadalupe.

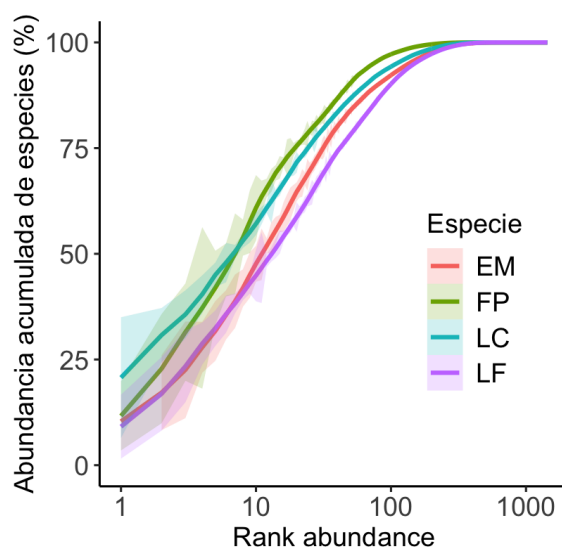


Figura 42. Curva de rango-abundancia de las especies microbianas presentes en las heces de pinnípedos en México. EM= elefante marino del norte, FP= foca de puerto, LC= lobo marino de California y LF= lobo fino de Guadalupe.

4.6.4.2 Análisis general por familia

El análisis de la composición taxonómica por familia de pinnípedos (Otariidae: lobo marino de California y lobo fino de Guadalupe, y Phocidae: foca de puerto del Pacífico y elefante marino del norte) reveló que el *phylum* Proteobacteria está más representado en los otáridos, mientras que los fócidos poseen más miembros bacterianos del *phylum* Fusobacteriota (Figura 43A). El género *Fusobacterium* fue el más abundante en ambas familias y se observaron algunos cambios en la abundancia relativa entre los géneros de mayor abundancia (Figura 43B).

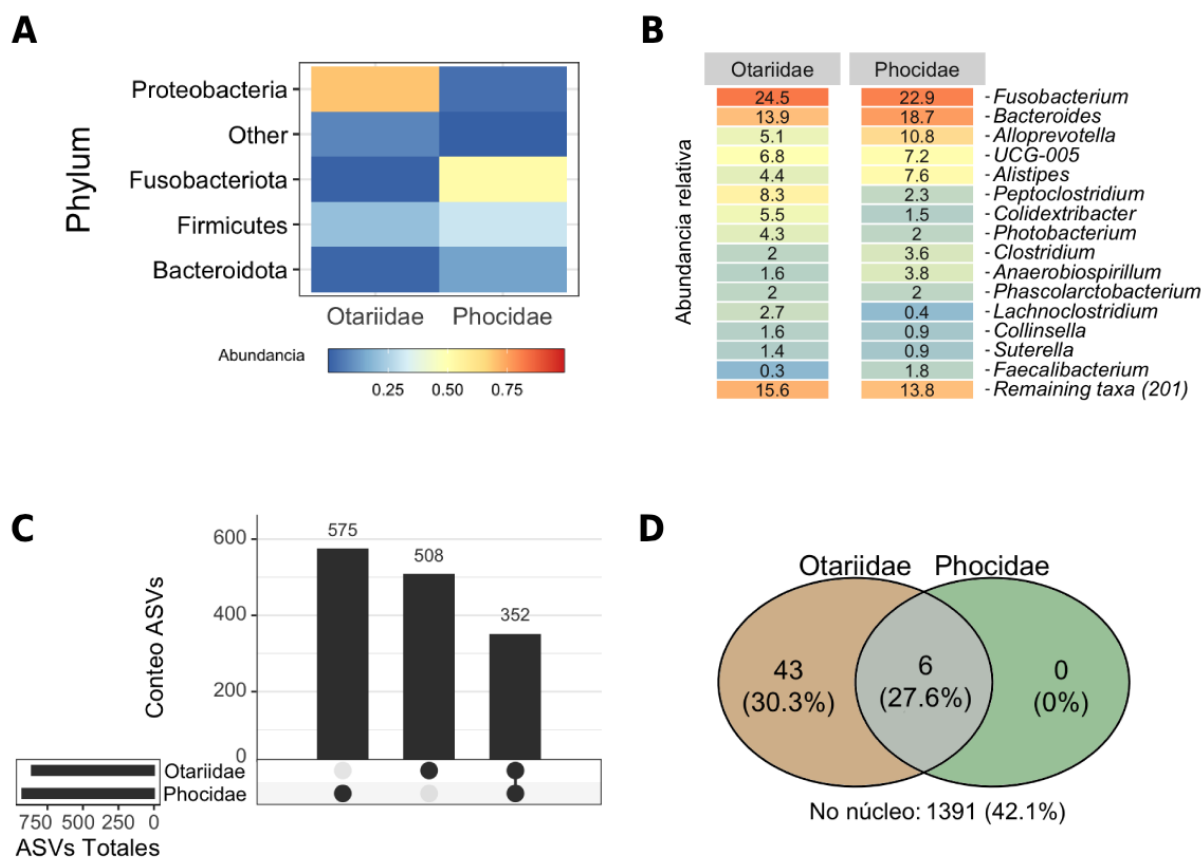


Figura 43. Composición de la microbiota del intestino de los pinnípedos de México agrupados por familia. A) *Phyla* con una abundancia relativa > 1%. B) Los 15 ASV más abundantes detectados. C) Número de ASV únicos (punto), compartidos (puntos conectados) y totales (barras horizontales) entre las familias de pinnípedos. D) El grupo núcleo del microbioma entre familias consistió en ASVs con una prevalencia del 80%. El diagrama de Venn muestra el número de ASVs en cada núcleo.

En comparación con los otáridos, los fócidos tuvieron una mayor riqueza de ASVs tanto totales como exclusivos y ambas familias compartieron 352 ASVs (Figura 43C). Sin embargo, al analizar el grupo núcleo de las familias de pinnípedos, los otáridos compartieron un mayor número de miembros exclusivos,

mientras que en los fócidos no existió un grupo núcleo exclusivo (Figura 43D). Ambas familias comparten 6 miembros bacterianos que forman parte del grupo núcleo de los pinnípedos en México, representado por *F. perfoetens*, *Bacteroides*, *F. mortiferum/necrogenes*, *Colidextribacter*, *F. mortiferum* y una bacteria no identificada de la familia Fusobacteriaceae (Anexo O).

4.6.4.3 Elefante marino del norte

Las muestras de elefante marino presentaron una alta variabilidad intraespecífica (Figura 44A) y *Fusobacterium perfoetens* fue la especie de mayor dominancia en la microbiota del intestino. En total se detectaron 122 géneros bacterianos, de los cuales *Fusobacterium* fue el más abundante, seguido de *Bacteroides* y *Alistipes* (Figura 44B). En los elefantes marinos se detectaron el mayor número de géneros bacterianos (121).

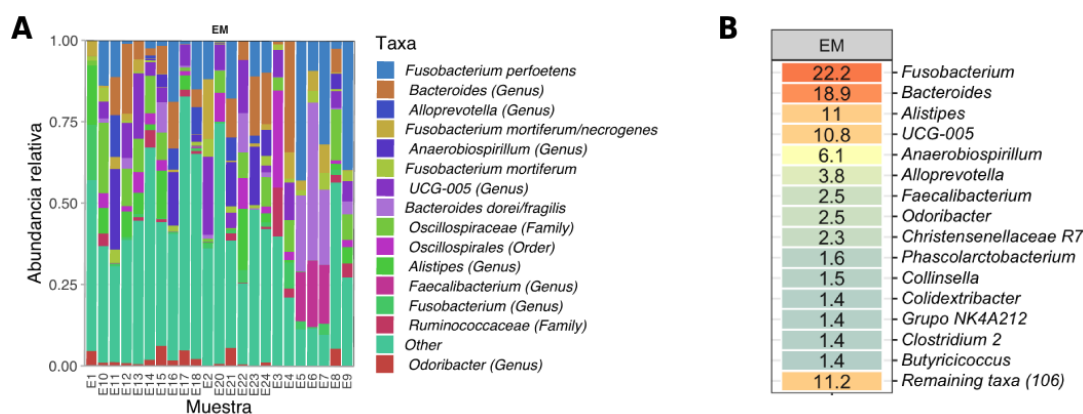


Figura 44. Composición taxonómica de la microbiota intestinal de elefantes marinos del norte (EM). A) *Phyla* de mayor abundancia (>1%). *Taxa* con abundancias menores al 1% se encuentran agrupados en la categoría de “otros”. B) Los 15 ASV más abundantes detectados en las heces.

4.6.4.4 Lobo fino de Guadalupe

Las muestras de lobo fino de Guadalupe presentaron una gran variabilidad intraespecífica, en donde destaca una alta presencia de bacterias patógenas, como *P. damsela* y *Vibrio* (Figura 45A). En la microbiota del intestino se detectaron 116 géneros bacterianos. Los géneros *Fusobacterium*, *Bateroides* y *Peptoclostridium* fueron los de mayor dominancia (Figura 45B).

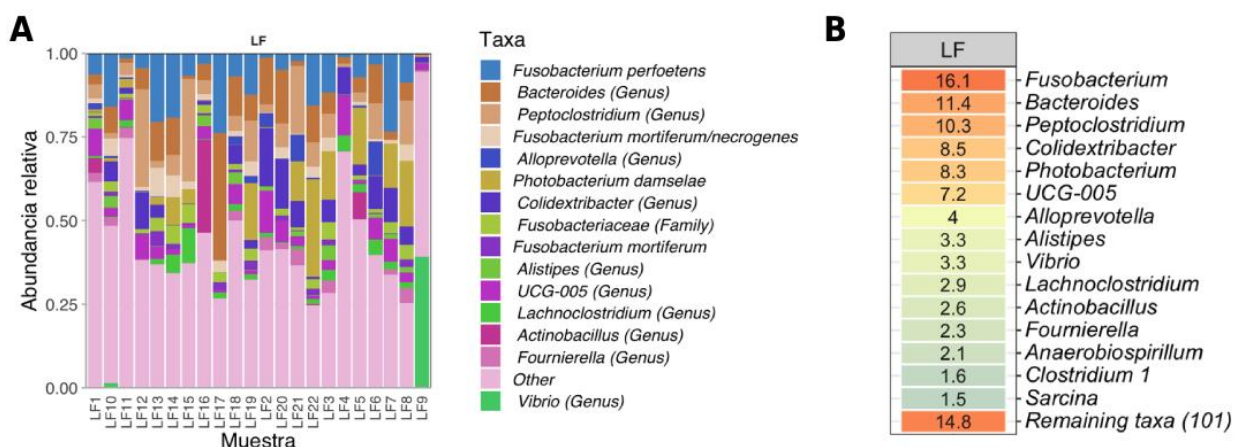


Figura 45. Composición taxonómica de la microbiota intestinal del lobo fino de Guadalupe (LF). A) *Phyla* de mayor abundancia (>1%). *Taxa* con abundancias menores al 1% se encuentran agrupados en la categoría de “otros”. B) Los 15 ASV más abundantes detectados en las heces.

4.6.4.5 Lobo marino de California

Las muestras de lobo marino de California presentaron la menor variabilidad intraespecífica respecto a los demás pinnípedos (Figura 45A) y *Fusobacterium perfoetens* fue la especie dominante. En comparación con los demás pinnípedos, en los lobos marinos se detectaron el menor número de géneros bacterianos con *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *UCG-005*, *Alloprevotella* y *Peptoclostridium* siendo los más abundantes (Figura 45B).

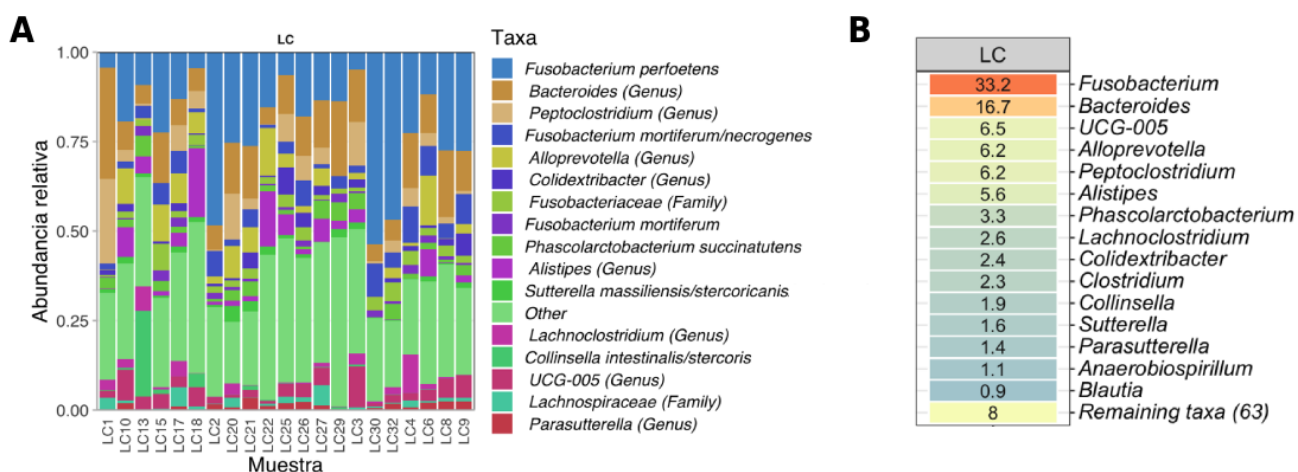


Figura 46. Composición taxonómica de la microbiota intestinal del lobo marino de California (LC). A) *Phyla* de mayor abundancia (>1%). *Taxa* con abundancias menores al 1% se encuentran agrupados en la categoría de “otros”. B) Los 15 ASV más abundantes detectados en las heces.

4.6.4.6 Foca de puerto

Las muestras de foca de puerto, analizadas en el capítulo anterior y procedentes de Isla Natividad, mostraron una variabilidad intraespecífica en la composición de su microbiota del intestino (Figura 47A). En esta especie, los géneros bacterianos más abundantes fueron *Fusobacterium*, *Alloprevotella* y *Bacteroides* (Figura 47B). Al igual que en las muestras de lobo fino de Guadalupe, resalta la presencia de bacterias potencialmente patógenas (*P. damsela*).

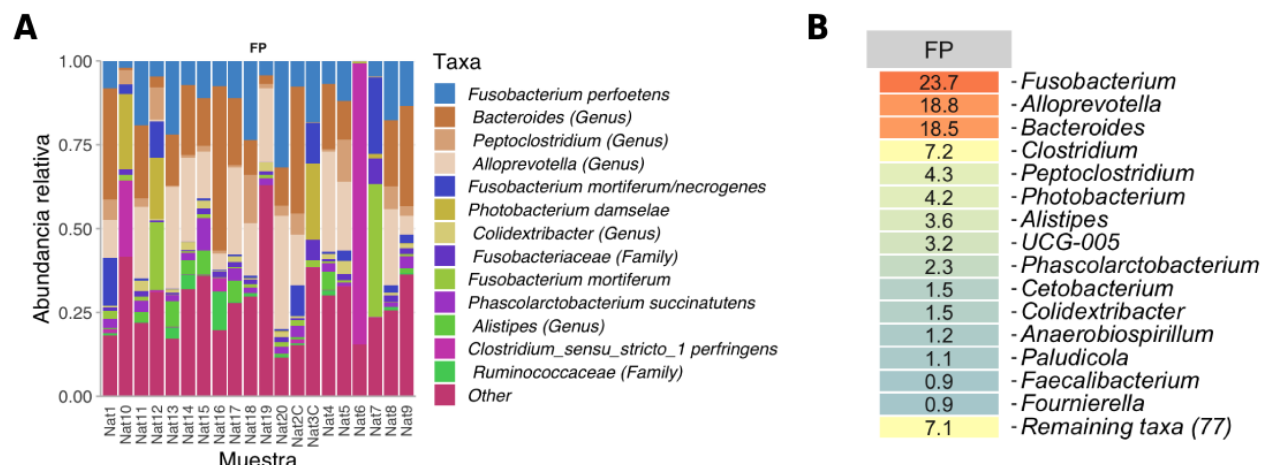


Figura 47. Composición taxonómica de la microbiota intestinal de focas de puerto (FP). A) *Phyla* de mayor abundancia (>1%). *Taxa* con abundancias menores al 1% se encuentran agrupados en la categoría de “otros”. B) Los 15 ASV más abundantes detectados en las heces.

4.6.5 Análisis de diversidad alfa

La mayoría de los índices utilizados para estimar la diversidad alfa de las muestras no mostraron normalidad, pero todos tuvieron homogeneidad de varianzas. El índice de *taxa* observados fue el único que presentó una distribución normal ($p=0.403$). La media de los *taxa* observados fue menor en las muestras de focas de puerto en comparación con los demás pinnípedos (Figura 48A). Sin embargo, entre LC-EM ($p=0.153$) y LF-LC ($p=0.237$) no existieron diferencias entre el número de microorganismos observados. Además, no se detectaron diferencias en la diversidad filogenética (PD) de la microbiota intestinal de los pinnípedos de estudio ($p=0.139$).

En general, las muestras de foca de puerto tuvieron un valor promedio menor del índice de Shannon en comparación con los otros pinnípedos. Además, la microbiota de las focas de puerto está compuesta por un menor número de microorganismos y su diversidad es menor, en comparación con los otros

pinnípedos. La microbiota de los fócidos es diferente entre ellos, en contraste con los otáridos, cuya riqueza y diversidad microbiana es similar (Figura 48A).

En el análisis de la diversidad alfa entre familias, se observó que los otáridos poseen una mayor riqueza de *taxa* y que la diversidad de los microorganismos del intestino es mayor en comparación con los fócidos (Figura 48B). Sin embargo, no se observaron diferencias a nivel de filogenia (índice PD, $p = 0.282$).

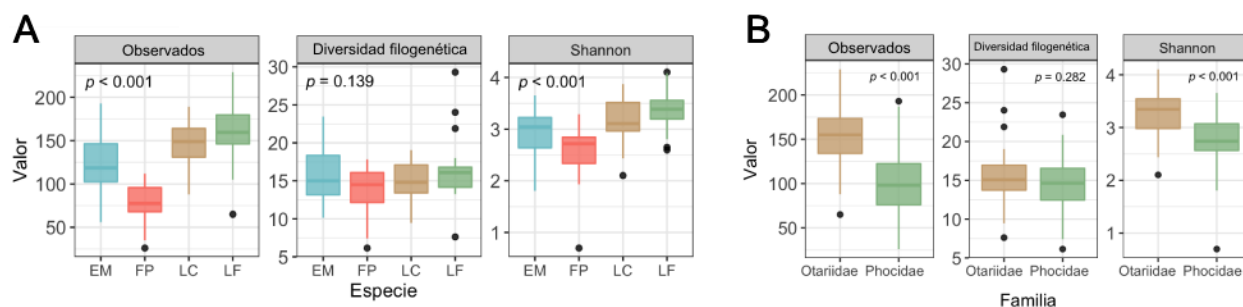


Figura 48. Comparación de la diversidad alfa en las muestras de heces de los pinnípedos de estudio, entre especies (A) y familias (B). Se muestra el valor de significancia (p) de cada índice (. EM= elefante marino del norte, FP= foca de puerto, LC= lobo marino de California y LF= lobo fino de Guadalupe).

4.6.6 Diversidad beta

4.6.6.1 Análisis general de las especies

En el análisis de la diversidad beta se observó que la dispersión de la comunidad microbiana entre los individuos varió en las diferentes especies de pinnípedos, tanto al considerarse la presencia (UniFrac no ponderado; Figura 49A) como la abundancia de los microorganismos (UniFrac no ponderado; Figura 49B). Por lo tanto, al no tener una dispersión homogénea, no se pudo realizar un PERMANOVA.

En las distancias UniFrac no ponderado, las muestras de focas de puerto tuvieron la mayor distancia promedio a la mediana (0.593), seguido de las muestras de elefante marino (0.559), indicando que otros factores podrían tener una mayor influencia en la composición de la microbiota de estas especies. Sin embargo, entre las especies de la misma familia no se observaron diferencias en la dispersión individual de las muestras (*betadisper-p*: FP-EM= 0.157, LC-LF: 0.229).

En la gráfica de PCoA basado en distancias no ponderadas, se observa una clara separación de las muestras de elefante marino (Figura 49A); sin embargo, las muestras de los demás pinnípedos no mostraron una separación evidente. En contraste, al considerarse la abundancia de microorganismos (UniFrac ponderado), no se observó una clara separación de las muestras por especie (Figura 49B), aunque el porcentaje de variabilidad explicado fue mayor (30.8%).

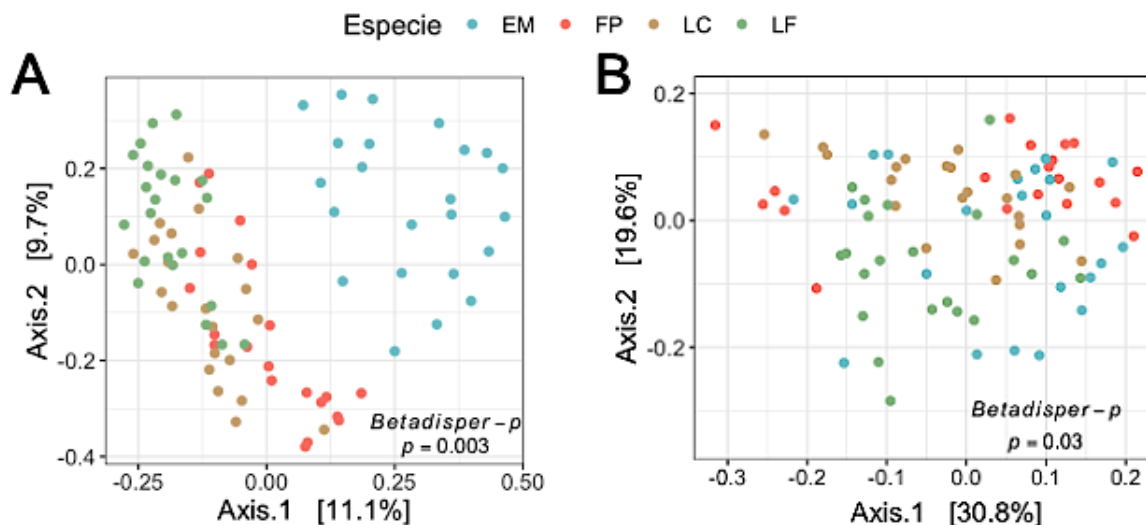


Figura 49. Comparación de la comunidad microbiana de intestino entre las especies de pinnípedos. Análisis de coordenadas principales (PCoA) sobre distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B). EM= elefante marino del norte, FP= foca de puerto, LC= lobo marino de California y LF= lobo fino de Guadalupe.

4.6.6.2 Análisis general por familia

La dispersión de la comunidad microbiana entre los individuos varió en las diferentes especies de pinnípedos al considerarse la presencia de los microorganismos (UniFrac no ponderado). En la gráfica de ordenación se observa una mayor dispersión de las muestras de fócidos en comparación con las de otáridos (Figura 50A). Sin embargo, cuando se consideró la abundancia de microorganismos, no existieron variaciones en la dispersión individual de las muestras (*betadisper-p*= 0.136) y la ordenación por familias no fue significativa (Figura 50B). Por lo tanto, la filogenia no es un factor significativo cuando se considera la abundancia de especies microbianas.

El análisis de abundancias diferenciales reveló cambios en la composición microbiana entre las familias de pinnípedos, donde el mayor número de cambios ocurrió en miembros del *phylum* Firmicutes (18). En total, se detectaron 27 ASVs con abundancias distintas entre las familias, en donde resalta la presencia de

bacterias potencialmente patógenas, como *Vibrio* y *Helicobacter*, con mayor abundancia en otáridos, y *Mycoplasma*, con mayor abundancia en fócidos (Figura 50C).

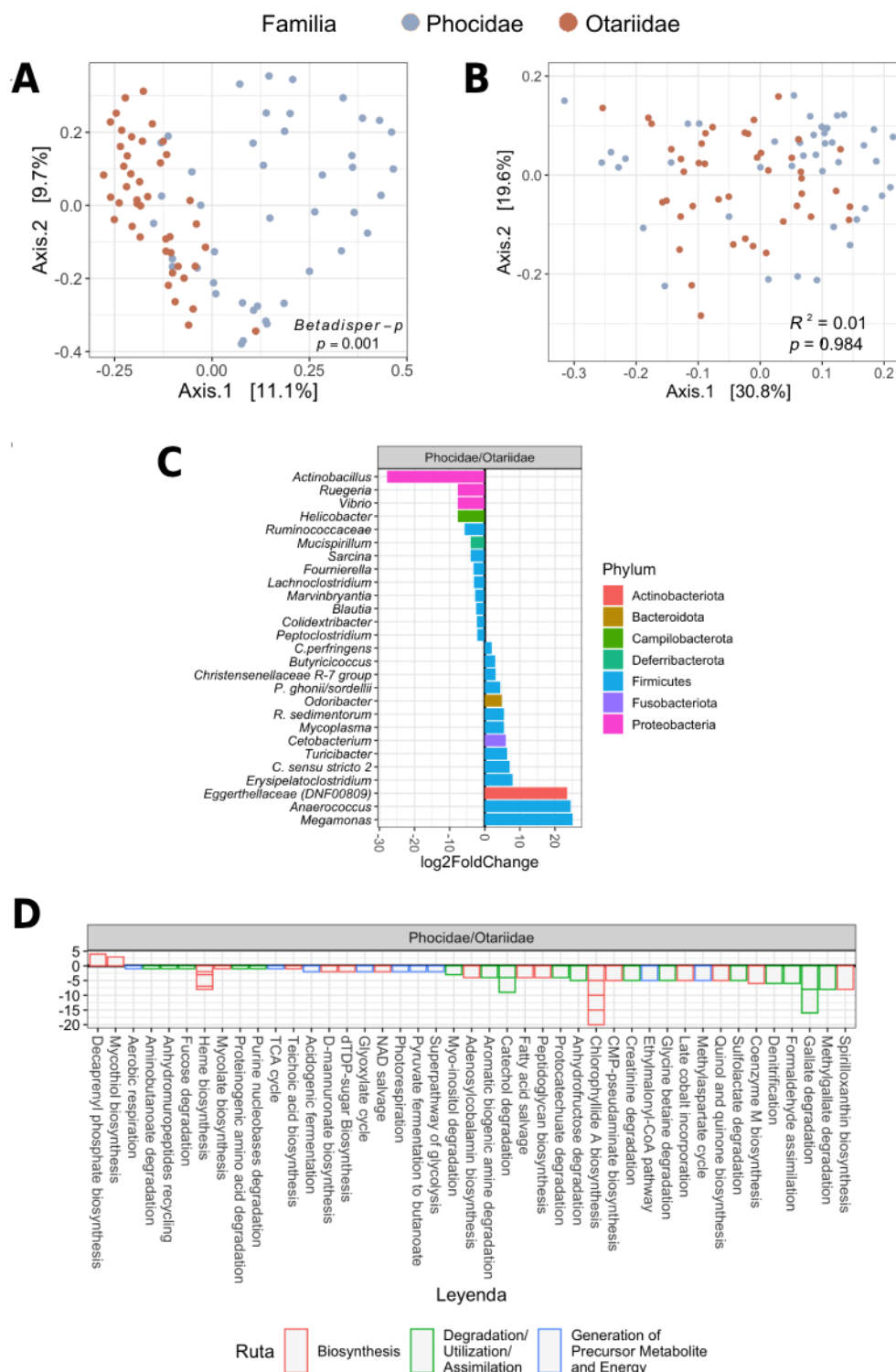


Figura 50. Cambios en la diversidad microbiana entre las familias de pinnípedos en México. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basados en distancias UniFrac no ponderadas (A) y ponderadas (B). El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en *taxa* (C) y vías metabólicas (D) entre familias. Los géneros y vías con un cambio log2-fold > 0 son significativamente más abundantes en fócidos.

Se observaron múltiples cambios en las funciones de los microorganismos, donde los mayores cambios estuvieron relacionados con la biosíntesis de cofactores y vitaminas, siendo más abundantes en las muestras de otáridos (Figura 50D). Únicamente dos rutas metabólicas estuvieron enriquecidas en fócidos, relacionados con componentes de la pared celular de bacterias.

4.6.7 Comparación de la comunidad microbiana del intestino entre las especies de pinnípedos

4.6.7.1 Foca de puerto vs foca elefante

A pesar de pertenecer a la misma familia, se observaron múltiples cambios a nivel de composición y función entre los fócidos. En total se detectaron 29 ASVs con abundancias diferenciales entre focas de puerto y elefantes marinos, con mayores cambios en miembros del *phylum* Firmicutes (Figura 51A). En este análisis, resalta la mayor presencia en las muestras de focas de puerto de *P. damsela*, así como *F. perfoetens*, la bacteria de mayor presencia en las muestras de pinnípedos.

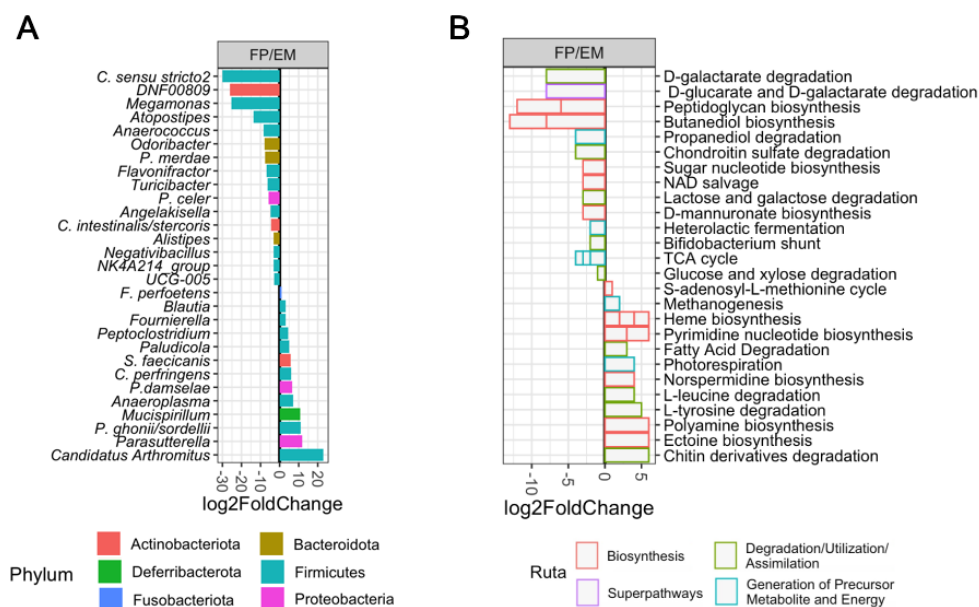


Figura 51. Cambios en la diversidad microbiana entre focas de puerto (FP) y elefantes marinos (EM). El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en *taxa* (A) y vías metabólicas (B) entre fócidos. Los géneros y vías con un cambio log2-fold > 0 son significativamente más abundantes en focas de puerto.

Se detectaron 33 rutas metabólicas con abundancias diferenciales entre fócidos, la mayoría relacionada con la biosíntesis de compuestos. En este análisis, destaca la presencia de la degradación de componentes

relacionados con la dieta: el enriquecimiento de degradación de condroitina en las muestras de elefantes marinos y de degradación de quitina, enriquecida en las muestras de focas de puerto (Figura 51B).

4.6.7.2 Foca de puerto vs lobo marino de California

La comparación entre la composición y funciones de la microbiota del intestino entre focas de puerto y lobos marinos de California reveló el menor número de cambios entre las especies de pinnípedos. Se detectaron 11 ASVs con abundancias distintas, donde el mayor número de cambios fue en miembros del *phylum* Firmicutes (Figura 52A). En este análisis destaca la presencia de bacterias patógenas, como *Helicobacter*, de mayor abundancia en lobos marinos de California y *Mycoplasma* y *P. damsela*, más abundantes en las muestras de focas de puerto.

Se detectaron 16 rutas metabólicas con abundancias diferenciales entre estas especies de pinnípedos, siendo las rutas relacionadas con biosíntesis de compuestos las de mayores cambios. Entre éstas destacan la presencia de rutas relacionadas con degradación de compuestos de la dieta, como la degradación de ácidos grasos y quitina, enriquecidas en las muestras de focas de puerto (Figura 52B), así como la oxidación de compuestos derivados de hidrocarburos (*octane oxidation*).

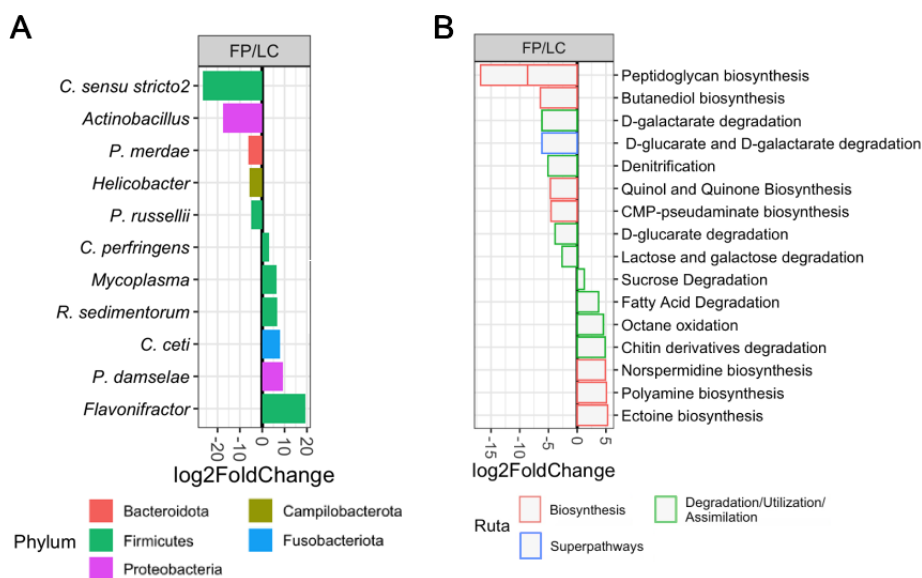


Figura 52. Cambios en la diversidad microbiana entre focas de puerto (FP) y lobos marinos de California (LC). El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en *taxa* (A) y vías metabólicas (B) entre estas especies. Los géneros y vías con un cambio log2-fold > 0 son significativamente más abundantes en focas de puerto.

4.6.7.3 Foca de puerto vs lobo fino de Guadalupe

La comparación en la estructura y funciones de la comunidad microbiana del intestino entre focas de puerto y lobos finos de Guadalupe reveló el mayor número de cambios entre las focas de puerto y las demás especies de pinnípedos. En total se detectaron 28 ASVs diferenciales, con el mayor número de cambios en el *phylum* Firmicutes (Figura 53A). En este análisis destaca la presencia de bacterias potencialmente patógenas más abundantes en las muestras de lobo fino de Guadalupe, como *Vibrio* y *Helicobacter*.

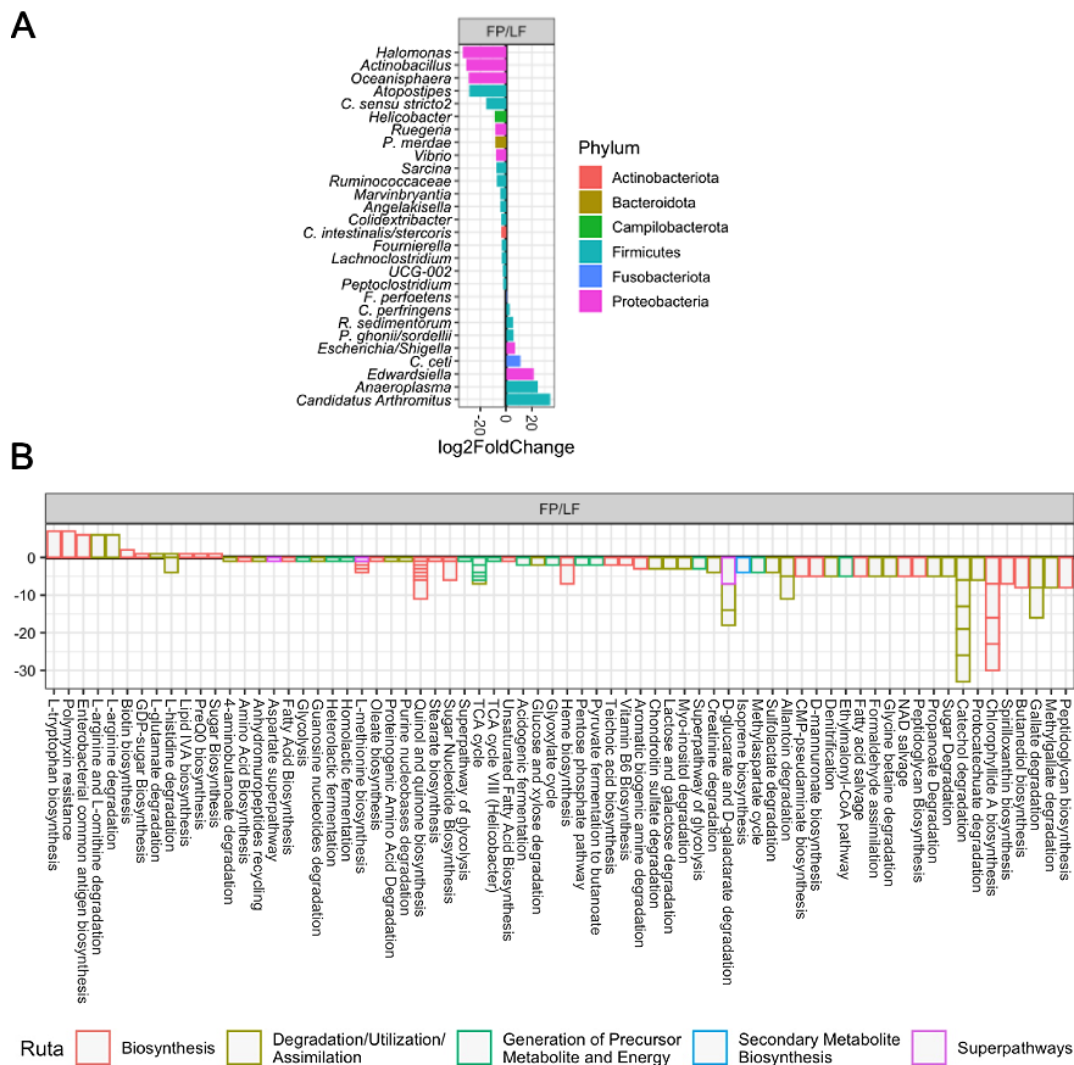


Figura 53. Cambios en la diversidad microbiana entre focas de puerto (FP) y lobos finos de Guadalupe (LF). El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en *taxa* (A) y vías metabólicas (B) entre estas especies. Los géneros y vías con un cambio log2-fold > 0 son significativamente más abundantes en focas de puerto.

Con respecto a las funciones de la microbiota, se detectaron 100 rutas con abundancias diferenciales entre ambas especies de pinnípedos. El mayor número de cambios se observaron en rutas de biosíntesis de compuestos (Figura 53B). Destaca la presencia de degradación de condroitina, de degradación de

creatinina y biosíntesis de vitamina B6 en lobos finos y la presencia de rutas relacionadas a resistencia antimicrobiana (*Polymyxin resistance*), enriquecidas en las muestras de focas de puerto.

4.6.7.4 Elefante marino del norte vs lobo fino de Guadalupe

El análisis de la comparación en la composición y funciones de la microbiota del intestino entre elefantes marinos y lobos finos de Guadalupe reveló el mayor número de cambios entre las especies de pinnípedos en México. En total se detectaron 35 ASVs con abundancias distintas, siendo los mayores cambios en el *phylum* Firmicutes (20), en especial en la clase Clostridia (14).

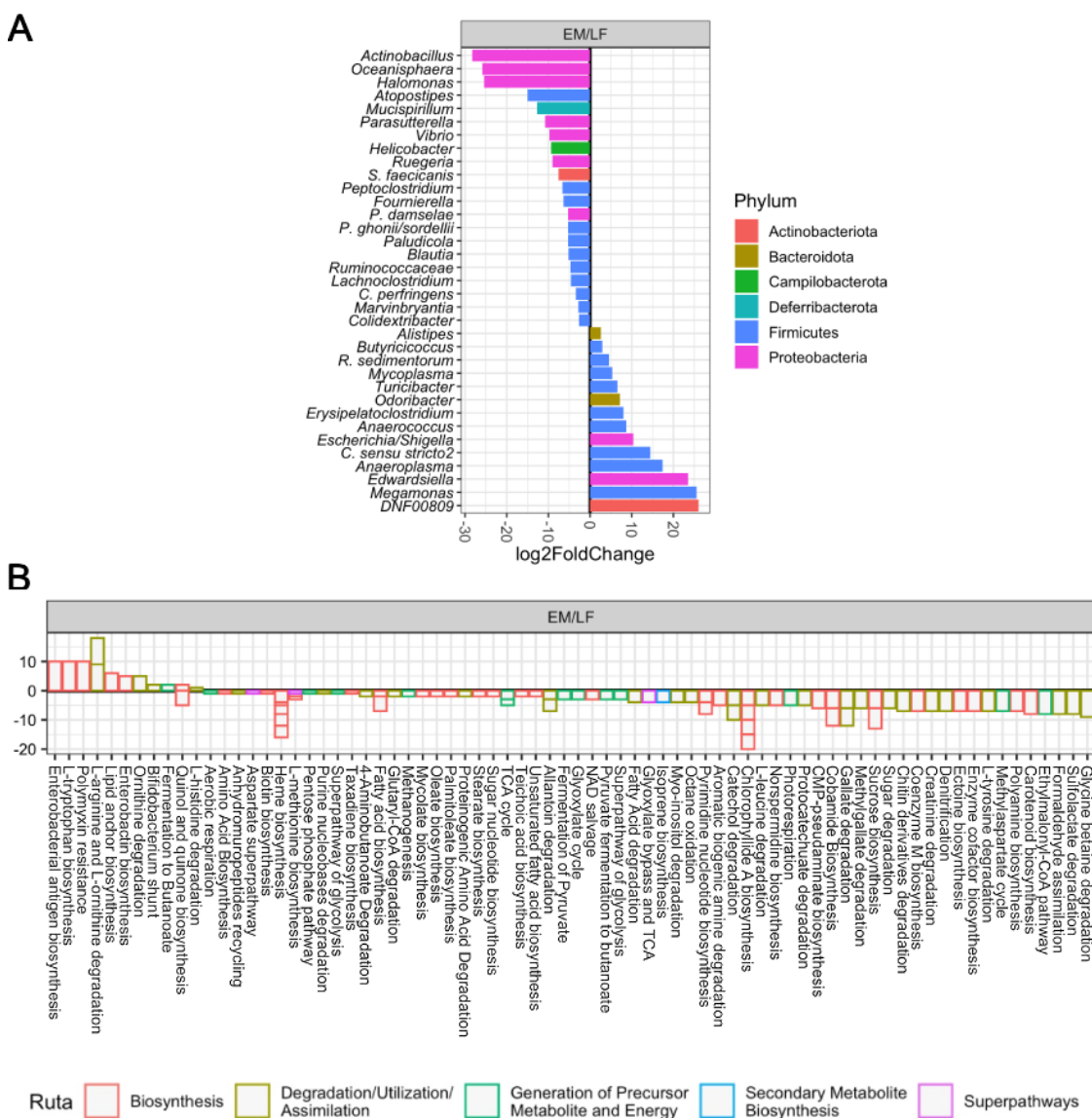


Figura 54. Cambios en la diversidad microbiana entre elefantes marinos (EM) y lobos finos de Guadalupe (LF). El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en *taxa* (A) y vías metabólicas (B) entre estas especies. Los géneros y vías con un cambio log2-fold > 0 son significativamente más abundantes en elefantes marinos.

4.6.7.5 Elefante marino del norte vs lobo marino de California

En la comparación de la composición de la microbiota entre los elefantes marinos y lobos marinos de California se detectaron 29 ASVs con abundancias diferenciales, en donde se observaron mayores cambios en el *phylum* Firmicutes (20), en específico en la clase Clostridia (Figura 55A). En este análisis destaca la presencia de bacterias potencialmente patógenas, como *Mycoplasma* y *Helicobacter*, con mayor abundancia en elefantes marinos y lobos marinos de California, respectivamente.

Con respecto a las funciones de la microbiota, se encontraron 36 rutas metabólicas con abundancias diferenciales, la mayoría relacionadas con la degradación, uso o asimilación de compuestos (Figura 55B). Destaca la degradación de creatinina y fucosa (más abundantes en lobos marinos de California) y la biosíntesis de vitamina B6 en elefantes marinos.

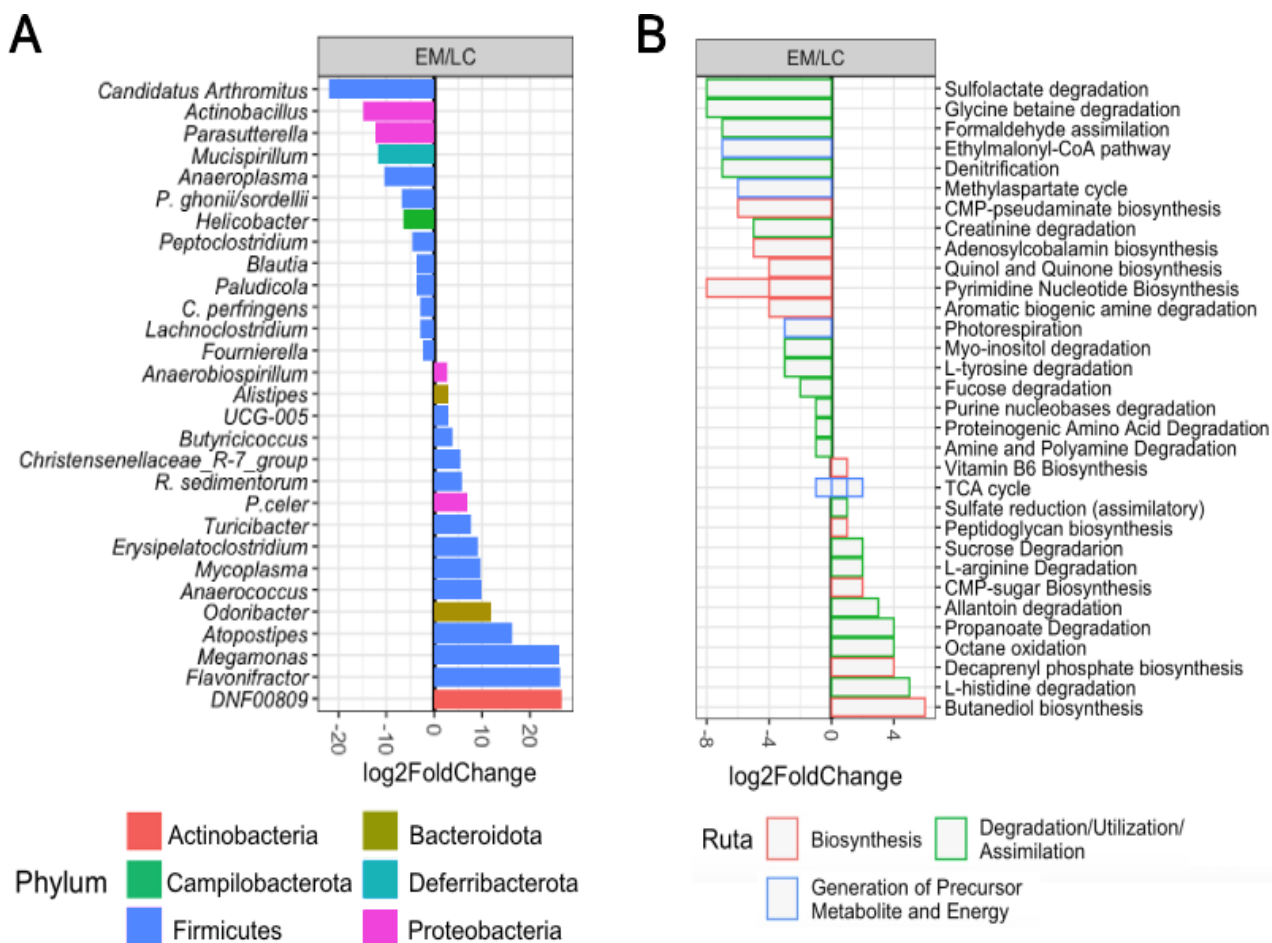


Figura 55. Cambios en la diversidad microbiana entre elefantes marinos (EM) y lobos marinos de California (LC). El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en *taxa* (A) y vías metabólicas (B) entre estas especies. Los géneros y vías con un cambio log2-fold > 0 son significativamente más abundantes en elefantes marinos.

4.6.7.6 Lobo fino de Guadalupe vs lobo marino de California

En la comparación de la microbiota de las especies de otáridos, se detectaron 20 ASVs con abundancias diferenciales, con mayores cambios en el *phylum* Firmicutes (10), seguido de Proteobacteria (Figura 56A). Destaca la mayor abundancia de bacterias potencialmente patógenas en la microbiota de lobos finos de Guadalupe, como *P. damsela* y *Vibrio*.

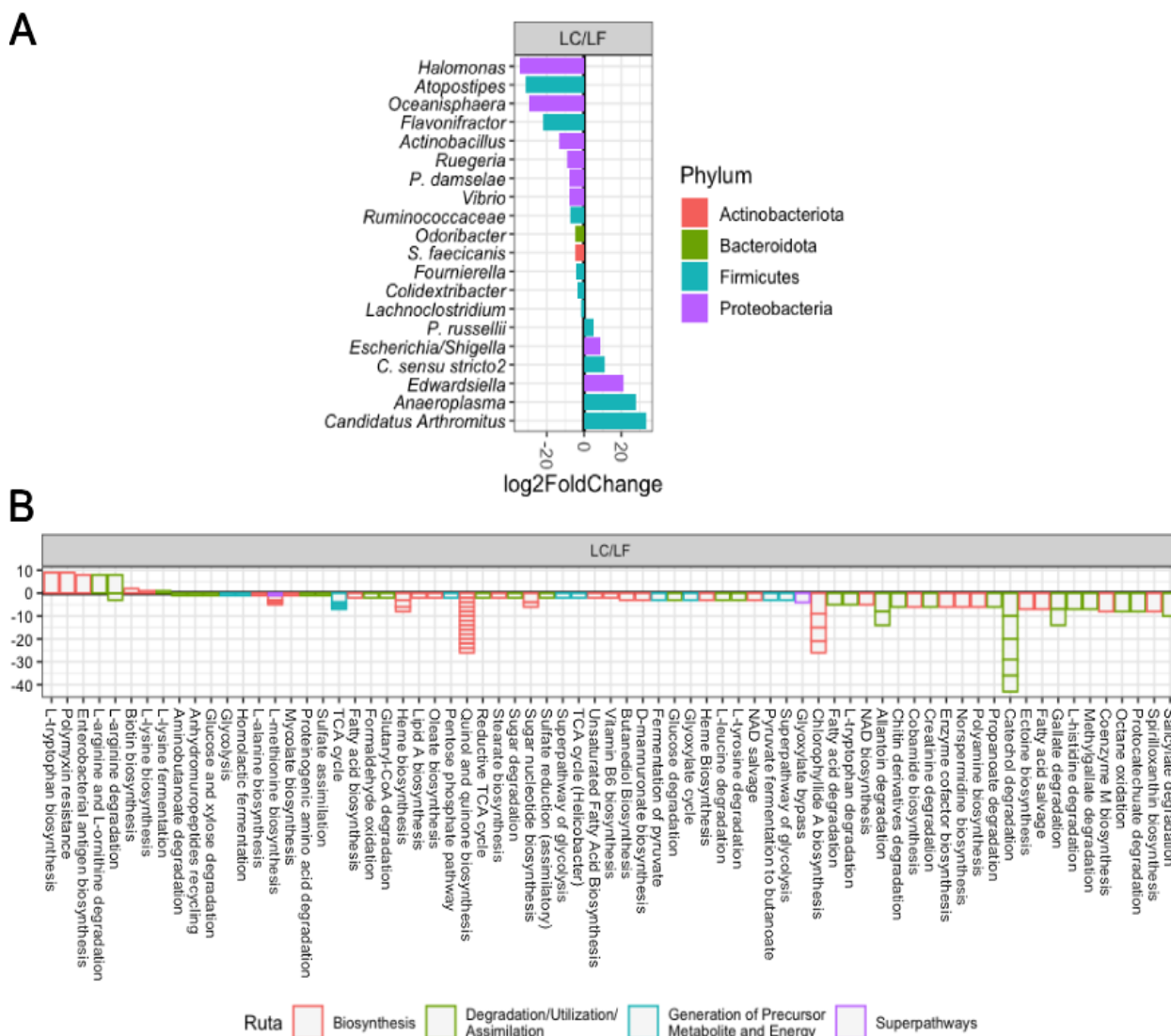


Figura 56. Cambios en la diversidad microbiana entre lobos marinos de California (LC) y lobos finos de Guadalupe (EM). El análisis de abundancia diferencial revela cambios significativos en *taxa* (A) y vías metabólicas (B) entre estas especies. Los géneros y vías con un cambio log2-fold > 0 son significativamente más abundantes en lobos marinos de California.

A pesar de tener pocos cambios en la composición de su microbiota, se observó el mayor número de cambios en las funciones de los microorganismos entre los otáridos, encontrándose 104 rutas metabólicas con abundancias distintas (Figura 56B). En este análisis se detectaron la presencia de rutas relacionadas con la dieta, como la degradación de quitina, ácidos grasos, aminoácidos y carbohidratos (mayor abundancia en lobos finos) y resistencia a compuestos antimicrobianos (*Polymyxin resistance*), enriquecida en las muestras de lobos marinos de California.

4.6.8 Resumen de resultados

A) Composición taxonómica

- La composición de la microbiota del intestino de los otáridos es más parecida entre sí que entre los fócidos.
- Se detectaron un menor número de cambios en la estructura de la comunidad microbiana del intestino entre las focas de puerto y los lobos marinos de California.
- Se observó el mayor número de cambios en la composición de la microbiota intestinal entre los elefantes marinos y los lobos finos de Guadalupe.
- Mayor abundancia de *Rombustia sedimentorum*, *Cetobacterium ceti* y *Megamonas* y menor abundancia de *Actinobacillus* y *Helicobacter* en focas de puerto en comparación con otáridos.
- Los géneros bacterianos potencialmente patógenos *Helicobacter* y *Vibrio* fueron más abundantes en otáridos. *Mycoplasma* fue más abundante en fócidos.
- Mayor abundancia de *Clostridium perfringens* y menor abundancia de *Clostridium sensu stricto* 2 y *Parabacteroides merdae* en focas de puerto en comparación con el resto de pinnípedos.
- Las bacterias *Megamonas*, *DNF00809*, *Odoribacter*, *Anaerococcus*, *Turicibacter* tuvieron una mayor abundancia en la microbiota de elefantes marinos en comparación con los demás pinnípedos.
- En la microbiota intestinal de los lobos finos de Guadalupe, los siguientes géneros fueron más abundantes: *Halomonas*, *Atopostipes*, *Ruegeria*, *Vibrio*, *Ruminococacceae*, *Colidextribacter*, *Fournierella* y *Lachnoclostridium*.
- No se detectaron bacterias que tuvieran una mayor abundancia en lobos marinos de California en comparación con las demás especies de pinnípedos.
- *Photobacterium damsela* fue más abundante en las muestras de focas de puerto y lobos fino de Guadalupe.

b) Inferencia funcional

- Las focas de puerto tuvieron el menor número de diferencias en las funciones de su microbiota cuando se compararon con los lobos marinos de California.
- En los lobos finos de Guadalupe se observó el mayor número de diferencias en las funciones de la microbiota., en comparación con los otros pinnípedos.
- En comparación con las demás especies de pinnípedos, en las focas de puerto se observó una disminución en las siguientes rutas metabólicas: biosíntesis de peptidoglicanos y butaneidol, degradación de D-galacturonato, D-glucarato y degradación de lactosa y galactosa.
- Se detectaron rutas metabólicas enriquecidas relacionadas directamente con la dieta en las muestras de focas de puerto y en los lobos finos de Guadalupe, como degradación de quitina y de ácidos grasos.
- La degradación de condroitina estuvo enriquecida en las muestras de lobos finos y elefantes marinos, en comparación con las otras especies de pinnípedos.
- En comparación con los demás pinnípedos, en los lobos marinos de California no se detectó ninguna ruta metabólica que estuviera exclusivamente enriquecida o disminuida.
- En las muestras de elefante marino tampoco se detectaron rutas metabólicas exclusivamente enriquecidas; sin embargo, las rutas de fotorespiración y degradación de L-tirosina estuvieron disminuidas.
- Las muestras de lobo fino de Guadalupe presentaron el mayor número de rutas metabólicas exclusivamente enriquecidas (22), las cuales se clasifican en:
 - Rutas de degradación de los siguientes compuestos: *creatinine, sugars, proteinogenic amino acids, L-histidine, methylgallate, gallate, protocatechuate, catechol y allantoin*.
 - Rutas de biosíntesis de los siguientes compuestos: *chlorophyllide A, sugar nucleotides, stearate, oleate, fatty acids, L-methionine, heme, quinol and quinone*.

- Rutas relacionadas con: *formaldehydes*, *glyoxylate cycle*, *TCA cycle*, *glycolysis* y *pentose phosphate*.
- Las siguientes rutas estuvieron exclusivamente disminuidas en las muestras de lobo fino de Guadalupe: *L-arginine and L-ornithine degradation*, *polymyxin resistance* y *L-tryptophan biosynthesis*.

4.7 Discusión

En este capítulo se analizaron la composición y funciones de la microbiota del intestino de las cuatro especies de pinnípedos que habitan en México: foca de puerto (*P. v. richardii*), elefante marino del norte (*M. angustirostris*), lobo marino de California (*Z. californianus*) y lobo fino de Guadalupe (*A. p. townsendi*). En general, la microbiota de los otáridos es más parecida entre sí y presentaron una mayor diversidad de microorganismos en comparación con los fócidos (Figura 48B). Así mismo, el grupo núcleo de los otáridos tuvo más miembros bacterianos, mientras que en los fócidos no se detectaron bacterias que fueran exclusivas de ellos (Figura 43D). Las muestras de foca de puerto tuvieron el menor promedio de riqueza y diversidad de microorganismos de todas las especies de estudio (Figura 48A).

Los géneros de mayor abundancia, así como las rutas metabólicas de mayor prevalencia en las muestras de pinnípedos, podrían relacionarse con su dieta. *F. mortiferum*, *F. perfringens*, *Psychrobacter*, *Blautia* y *Faecalibacterium* se han catalogado como bacterias de alta abundancia en peces (Egerton et al., 2018). Así mismo, otras bacterias como *Vibrio* y *Mycoplasma* son abundantes en cefalópodos (Kang et al., 2022; Kaufman et al., 1998). Todos los pinnípedos de estudio, en mayor o menor abundancia consumen peces y cefalópodos: las focas de puerto se alimenta principalmente de peces y calamares (Allen et al., 2011c; Brassea-Pérez et al., 2019), los lobos marinos de California prefieren el consumo de peces (Allen et al., 2011a; Espinosa de los Reyes, 2007), los lobos finos de Guadalupe son teutófagos especialistas (Allen et al., 2011b; Esperón Rodríguez, 2008; J. P. Gallo-Reynoso & Esperón-Rodríguez, 2013) y los elefantes marinos son más plásticos en su dieta, se alimentan principalmente de presas de zonas profundas (Hindell, 2009; Stewart, 1997). La presencia de las bacterias previamente mencionadas podrían ser resultado de la ingesta de peces y cefalópodos.

Entre las rutas principales relacionadas con la degradación de compuestos en la dieta destacaron la degradación de condroitina, compuesto abundante en el cartílago de rayas y tiburones (Zhou et al., 2020).

Esta ruta estuvo enriquecida en los elefantes marinos que se alimentan de peces cartilaginosos (Allen et al., 2011d). Así mismo, la degradación de quitina, compuesto abundante en cefalópodos y otros invertebrados, estuvo enriquecida en las muestras de focas de puerto y lobos finos de Guadalupe. Estos pinnípedos tienen un mayor aporte de estos invertebrados en su dieta (Brassea-Pérez et al., 2019; Esperón Rodríguez, 2008).

4.7.1 La microbiota de los fócidos difiere debido a ciclos de vida contrastantes

A pesar de pertenecer a la misma familia, los elefantes marinos y las focas de puerto no tuvieron un grupo núcleo exclusivo (Figura 43D) y se observaron múltiples cambios significativos, tanto en la composición (Figura 51A) como en la función de su microbiota intestinal (Figura 51B). Los resultados obtenidos en el análisis de diversidad beta indicaron que las muestras de estas especies varían en su diversidad (Figura 50 A-B). En estos pinnípedos, la filogenia parece ser un factor de menor impacto en la estructura de la microcomunidad del intestino, por lo que otros factores tendrían una mayor influencia.

Múltiples diferencias en la biología e historia de vida de ambas especies serían un factor determinante que provocaría que las microbiotas no tengan tantas similitudes. Estas disimilitudes explicarían el mayor patrón de dispersión de las muestras de los fócidos en comparación con los otáridos (Figura 50 A-B). Las focas de puerto son animales más costeros y de menor tamaño que los elefantes marinos, quienes realizan largas migraciones para alimentarse (Stewart, 1997). Así mismo, el dimorfismo sexual es más acentuado en los elefantes marinos que en las focas de puerto. El sexo es un factor importante que moldea la composición de la microbiota (Nelson et al., 2013), en específico en animales con alto dimorfismo sexual, como los elefantes marinos. Diferencias entre las hembras y machos están relacionadas con cambios en la dieta y dispersión entre los individuos (Stewart, 1997).

Estudios previos han determinado que la microbiota de elefantes marinos se diferencia desde etapas tempranas de vida, en respuesta a necesidades fisiológicas distintas (Stoffel et al., 2020). Sin embargo, en las focas de puerto no se observaron cambios en la microbiota entre crías hembras y machos (Capítulo 3).

La dieta de las focas de puerto y elefantes marinos también es diferente. Las focas de puerto se alimentan principalmente de peces bentónicos e invertebrados (Brassea-Pérez et al., 2019), mientras que los elefantes marinos consumen presas de aguas profundas como peces, rayas, tiburones y calamares (Allen et al., 2011d).

Estas diferencias en la dieta también se reflejaron en cambios en las funciones de la microbiota, los elefantes marinos tuvieron un incremento de rutas de degradación de condroitina, un compuesto abundante en peces cartilaginosos, como tiburones y rayas (Zhou et al., 2020). En contraste, las focas de puerto tuvieron un enriquecimiento de degradación de quitina, compuesto abundante en invertebrados. Estos resultados coinciden con las preferencias alimentarias de cada especie.

Los elefantes marinos y las focas de puerto también tienen diferencias en sus estrategias reproductivas. Durante la etapa de reproducción, los elefantes marinos adultos ayunan de 5-12 semanas (dependiendo del sexo y edad) (Allen et al., 2011d; Stewart, 1997). Sin embargo, debido a su tamaño, las hembras de focas de puerto ayunan un corto periodo y realizan viajes de alimentación con su cría para poder recuperar el peso perdido (Allen et al., 2011c; Burns, 2009). Los machos, por su lado, restringen brevemente su alimentación durante el periodo de reproducción para poder defender su territorio (van Parijs et al., 1997). Por lo tanto, los elefantes marinos sufren cambios más drásticos en su composición corporal durante esta etapa.

El género *Turicibacter*, con mayor abundancia en elefantes marinos, se ha asociado con alteraciones en la dieta y peso corporal al modificar el metabolismo de lípidos y ácidos biliares (Lynch et al., 2022). Este género se ha correlacionado con dietas altas en lípidos y con mayor contenido de grasa en los hospederos (Lynch et al., 2022). De todos los pinnípedos del estudio, los elefantes marinos son los más grandes y pesados. El enriquecimiento de *Turicibacter* en los elefantes marinos podría relacionarse con la importancia que posee esta bacteria de promover y regular el uso de lípidos durante las fases de alimentación y ayuno de este pinnípedo.

Un estudio realizado en niños con peso normal y obesidad encontró un incremento significativo del género *Megamonas* en niños obesos. En comparación con los demás pinnípedos, esta bacteria estaba enriquecida en la microbiota del intestino de elefantes marinos. Por lo tanto, los géneros *Turicibacter* y *Megamonas* podrían tener papeles fundamentales en el almacenamiento de grasa. Al igual que lo reportado por Stoffel y colaboradores (Stoffel et al., 2020), *Fusobacterium* y *Bacteroides* fueron los géneros más abundantes en la microbiota del intestino de los elefantes marinos.

Entre las bacterias con abundancias diferenciales entre fócidos y otáridos, destaca el aumento significativo de *Odoribacter*, especialmente en las muestras de elefante marino. Un aumento en la abundancia de este género se ha relacionado con personas y ratones obesos (Gomez-Arango et al., 2016; Yuan et al., 2021). Así mismo, esta bacteria es abundante en el intestino de otro mamífero de gran peso, los hipopótamos

(Dutton et al., 2021). Yuan y colaboradores (2021) encontraron un aumento significativo del género *Odoribacter* en niños obesos metabólicamente sanos en comparación con niños obesos metabólicamente enfermos. Esta bacteria podría tener un papel importante en el almacenamiento de grasa y en promover un metabolismo sano en los elefantes marinos.

En comparación con los otáridos, en los fócidos hubo un enriquecimiento significativo del género *Mycoplasma*, en especial en las muestras de elefantes marinos. Esta bacteria se ha reportado como abundante en cefalópodos oceánicos y de gran tamaño (Kang et al., 2022), lo que podría estar relacionado con la preferencia que tienen los elefantes marinos por consumir cefalópodos de mayores tallas, como *Dosidicus gigas* (Hindell, 2009).

Algunas rutas metabólicas enriquecidas en personas obesas, relacionadas con la generación de energía (TCA), degradación de carbohidratos (D-glucarate) y biosíntesis de NAD (Nie et al., 2020), también estuvieron enriquecidas en las muestras de elefante marino. Entre las rutas con mayores cambios entre las especies de fócidos destaca la degradación de butaneidol, un producto de la fermentación de glucosa (Markowiak-Kopeć y Śliżewska, 2020).

Estas múltiples diferencias entre elefantes marinos y focas de puerto podrían explicar por qué estas especies de fócidos no comparten miembros exclusivos del grupo núcleo (Figura 43D). La microbiota de los elefantes marinos está enriquecida en microorganismos que promueven un mayor almacenamiento y generación de energía, por lo tanto, cambios en la dieta entre estas especies de pinnípedos fomentan la diferenciación de la microbiota hacia bacterias que permitan degradar su alimento.

4.7.2 Similitudes en la microbiota de los otáridos son el resultado de historias de vida parecidas

A diferencia de los fócidos, el grupo núcleo de los otáridos estuvo representado por múltiples miembros bacterianos (Figura 43D); sin embargo, el número de ASVs exclusivos de este grupo fue menor (Figura 43C). Las mayores similitudes en la composición de la microbiota entre los otáridos podrían ser el resultado de historias de vida similares.

Ambos otáridos poseen un dimorfismo sexual marcado (Allen et al., 2011b, 2011a), los lobos marinos de California son ligeramente más grandes (2.5 m. vs 2.19 m) y pesados (Allen et al., 2011a) que los lobos

finos de Guadalupe (250 kg vs 170 kg) (Gallo-Reynoso & Figueroa-Carranza, 1996). La estrategia de reproducción en ambas especies es la poliginia (S. G. Allen et al., 2011b, 2011a) y las hembras realizan viajes de alimentación durante el periodo de lactancia (Gallo-Reynoso & Figueroa-Carranza, 2010). En los lobos marinos de California la lactancia dura de 11 meses a 1 año (López Alvirde, 2014), mientras que en los lobos finos de Guadalupe dura 9 meses aproximadamente (Gallo-Reynoso & Figueroa-Carranza, 2010). Sin embargo, las hembras de lobo marino de California realizan viajes de alimentación más cortos (1 a 3 días) y se mantienen con sus crías durante dos días (Bonnes y Bowen, 1996). En contraste, las hembras de lobo fino de Guadalupe realizan los viajes de alimentación más largos entre los otáridos (hasta 3 semanas); al regresar, alimentan a su cría y se mantienen con ella aproximadamente 5 días (Gallo-Reynoso et al., 2008).

A pesar de poseer un grupo núcleo numeroso, se observaron múltiples cambios a nivel de composición y función en la microbiota de los otáridos (Figura 56), esto podría deberse principalmente a diferencias en su dieta. El consumo de peces en la población de lobos marinos de California en isla San Benito representa el 83.81% y de calamares 16.9% y está representado por las especies *Merluccius angustimanus*, *Argentina sialis* y *Sebastes spp.* y *Loligo opalescens* (Espinosa de los Reyes, 2007). En comparación, los lobos finos de Guadalupe son considerados teutófagos especialistas (Amador-Capitanachi et al., 2017; Esperón Rodríguez, 2008). Estos cambios en la dieta también se reflejaron en diferencias en las funciones de su microbiota. Rutas relacionadas con la degradación de quitina estuvieron enriquecidas en las muestras de los lobos finos de Guadalupe (Figura 56B), lo que significaría un mayor consumo de invertebrados, en especial de cefalópodos, por este pinnípedo.

El género bacteriano de mayor cambio entre otáridos y fócidos fue *Actinobacillus*. Este género se ha detectado como abundante en delfines y en muestras orales - gástricas de lobos marinos de California (Bik et al., 2016). Además, entre los géneros con abundancias significativamente diferentes destacan *Helicobacter* y *Vibrio*, bacterias potencialmente patógenas. La presencia de *Vibrio* en lobos marinos de California se ha reportado previamente (Bik et al., 2016). *Vibrio* es un género muy abundante en cefalópodos y se ha reportado en la especie *Loligo opalescens* (Kaufman et al., 1998), presa de mayor importancia en los otáridos de este estudio.

Helicobacter también tuvo una mayor abundancia en otáridos que en fócidos. Este género puede ser patógeno o comensal (Simmons et al., 2000). Oaxley & McKay (2004) reportaron la presencia de esta bacteria en dos especies de otáridos en cautiverio, en lobos marinos de Australia (*Neophoca cinerea*) y en lobos finos de Australia (*Arctocephalus pusillus doriferus*). De las muestras analizadas y positivas para

Helicobacter, sólo un animal presentó síntomas de infección, lo que indicaría que es una bacteria comensal. La presencia de *Helicobacter* en los individuos analizados no se relacionó con su estado de cautiverio (Oxley y McKay, 2004).

4.7.3 Las focas de puerto y los lobos marinos de California comparten una microbiota similar debido a dietas parecidas

Estudios previos realizados en lobos marinos de California coinciden en que los *phyla* Bacteroides, Firmicutes y Fusobacteria son los más abundantes en la microbiota del intestino (Bik et al., 2016). Así mismo se ha observado una disminución en miembros del phylum Proteobacteria. Al igual que en este estudio, se detectó la presencia de *C. perfringens*, *Helicobacter* y *Campylobacter* como géneros abundantes en la microbiota del intestino (Bik et al., 2016).

En las poblaciones del Pacífico de México se ha reportado que los lobos marinos de California consumen en su mayoría peces demersales (Espinosa de los Reyes, 2007). Además se ha observado que la dieta cambia dependiendo del sexo, clase de edad y temporada. Los machos no se alimentan durante el periodo reproductivo y al final de esta etapa migran al norte para alimentarse de presas epipelágicas, como sardinas, anchovetas y calamares (Melin et al., 2018).

Los lobos marinos de California y las focas de puerto presentaron el menor número de diferencias significativas en su microbiota, tanto a nivel de composición como de función. Esto podría deberse a las similitudes en el comportamiento y la dieta de estas especies durante el periodo reproductivo, en especial en las hembras. Durante el periodo de reproducción (verano, que fue el periodo de muestreo en este trabajo), las hembras adultas de lobo marino de California se mantienen más cerca de los sitios de reproducción y se alimentan principalmente de presas bentónicas (Villegas-Amtmann et al., 2011). Las principales presas de las focas de puerto son peces bentónicos e invertebrados (Brassea-Pérez et al., 2019; Pacheco, 2017).

A pesar de las similitudes mencionadas, también se encontraron algunas diferencias. En ambas especies se encontraron bacterias abundantes en peces pero con abundancias diferenciales, como *Actinobacillus* y *C. perfringens*, de mayor abundancia en lobos marinos de California y focas de puerto, respectivamente.

Entre las rutas con abundancias diferenciales, relacionadas con la dieta, destaca el enriquecimiento de degradación de quitina y ácidos grasos en las muestras de focas de puerto. Lo anterior corresponde con un mayor aporte de invertebrados en la dieta de las focas de puerto en comparación con los lobos marinos de California.

4.7.4 La microbiota de los lobos finos de Guadalupe, un reflejo de su dieta especialista

Con respecto a las demás especies de pinnípedos, los lobos finos de Guadalupe presentaron el mayor número de cambios significativos, tanto a nivel de composición como en funciones en su microbiota. Estas diferencias podrían ser el resultado de una dieta más restringida. Múltiples estudios han determinado que los lobos finos se alimentan principalmente de cefalópodos costeros y pelágicos (Allen et al., 2011b; Amador-Capitanachi et al., 2017; Esperón Rodríguez, 2008; J. P. Gallo-Reynoso & Esperón-Rodríguez, 2013). Este grupo constituye el principal componente de la dieta de los lobos finos (80%-96%), donde las especies más importantes son *Onychoteuthis banksii* y *Loligo opalescens* (J. P. Gallo-Reynoso y Esperón-Rodríguez, 2013).

La baja diversidad de presas de lobos finos de Guadalupe se ha asociado con limitaciones aeróbicas en el buceo de esta especie (Gallo-Reynoso, 1994). El rango de distribución de las presas en islas San Benito va de los 0-500 m y en general estos pinnípedos no realizan inmersiones profundas cuando forrajea (promedio 16.9 m) (Gallo-Reynoso et al., 2008). Así mismo se ha determinado que en San Benito los individuos realizan buceos menos profundos en comparación con los que habitan en Isla Guadalupe (Gallo-Reynoso & Esperón-Rodríguez, 2013).

Estudios realizados en la población de lobos finos en islas San Benito han reportado que los animales de esta población se alimentan principalmente de cefalópodos (Amador-Capitanachi et al., 2017; Esperón Rodríguez, 2008), y la especie *Loligo opalescens* es la presa más consumida por los adultos (Esperón Rodríguez, 2008). La microbiota de los cefalópodos está compuesta en su mayoría por miembros de los *phyla* Proteobacteria y Tenericutes. El mayor porcentaje de Proteobacteria en las muestras de lobos finos podría indicar un aporte importante de la dieta a la microbiota de esta especie.

Los géneros más comunes encontrados en la microbiota de los cefalópodos son: *Vibrio*, *Mycoplasmata* y *Photobacterium* (Kang et al., 2022; Kaufman et al., 1998). Especies de cefalópodos oceánicos y de mayor

tamaño poseen más *Mycoplasma* mientras que cefalópodos costeros y de menor talla poseen una mayor abundancia de *Photobacterium* (Kang et al., 2022). El enriquecimiento de *Vibrio* en las muestras de lobo fino de Guadalupe en comparación con las demás especies, coincide con la mayor preferencia que tienen los lobos finos de consumir cefalópodos costeros. A pesar de que también se ha detectado *D. gigas* en las muestras de adultos, en la población de islas San Benito se ha considerado que *D. gigas* es una presa incidental para los adultos (Esperón Rodríguez, 2008).

El enriquecimiento significativo de degradación de quitina, tanto en lobos finos como en focas de puerto, sugiere un mayor aporte de invertebrados, entre ellos cefalópodos, en la dieta de estas especies en comparación con los demás pinnípedos. El consumo de invertebrados por focas de puerto se ha documentado previamente usando metagenómica (Brassea-Pérez et al., 2019; Pacheco-Sandoval et al., 2019); sin embargo, los estudios disponibles sobre la dieta de lobo fino provienen de análisis de estructuras duras en excretas (Esperón Rodríguez, 2008; J. P. Gallo-Reynoso y Esperón-Rodríguez, 2013), donde sólo los cefalópodos son detectados por la presencia de picos, pero los demás invertebrados no dejan restos identificables en las heces, por lo que se desconoce la importancia de otros invertebrados en la dieta de este pinnípedo.

En las focas de puerto y en los lobos finos de Guadalupe se encontraron un mayor número y abundancia de bacterias potencialmente patógenas. Destaca la presencia de *Photobacterium damsela*, una bacteria patógena de peces y con reportes de septicemia en humanos (Hundenborn et al., 2013). Esta especie puede representar un peligro para las poblaciones humanas cercanas, ya que puede ocurrir la transmisión de patógenos desde el agua a los humanos (Fouz et al., 2000). Es necesario continuar con los estudios de la microbiota de focas de puerto y de lobos finos de Guadalupe para determinar si estos microorganismos son especies patógenas o comensales y abordar la posible transmisión de estas bacterias del medio ambiente a los humanos. Además, el lobo fino de Guadalupe es una especie que está en peligro de extinción (Allen et al., 2011b; J. P. Gallo-Reynoso, 1994), por lo que el aumento de bacterias patógenas pondría en peligro la conservación y recuperación de esta especie.

4.8 Conclusión

La naturaleza anfibia de los pinnípedos ha promovido el desarrollo de adaptaciones fisiológicas únicas que permiten adecuarse a una vida marina y terrestre. Las bacterias han coevolucionado con estos animales y responden a cambios energéticos drásticos y a la necesidad de almacenar energía para utilizarla durante

periodos de ayuno y estrés metabólico. En los pinnípedos se ha conservado un grupo núcleo que es transmitido de las madres a las crías y cuyas funciones faltan por conocer.

La filogenia es un factor importante en la estructura de la microbiota del intestino; sin embargo, similitudes en la dieta o en el ciclo anual conllevan a tener una microbiota similar. En la dieta se transmiten bacterias de las presas a los animales y, mediante el estudio de la composición y funciones de la microbiota, es posible conocer la preferencia alimentarias de los pinnípedos.

El sexo es un factor importante en la composición de la microbiota en animales con un alto dimorfismo sexual, como los elefantes marinos. Cambios entre sexos están relacionados con diferencias en la dieta, cambios energéticos y patrones de dispersión distintos.

En este estudio resalta la presencia de bacterias potencialmente patógenas en focas de puerto y lobos finos de Guadalupe, por lo que es necesario un monitoreo continuo de las poblaciones de estos pinnípedos que permita determinar el papel de estas bacterias.

Literatura citada

- Agnese, E. D., Mclaughlin, R., Lea, M., Soto, E., Smith, W., Bowman, J., y Agnese, E. D. 2020. Comparative microbial community analysis of fur seals and salmon aquaculture in Tasmania. Authorea. doi: 10.22541/au.160253843.32636436/v1
- Alaman, R. 2014. Hábitos Alimentarios de la foca de puerto, *Phoca vitulina richardsi*, en la Bahía Todos Santos, Baja California, México. Tesis de maestría en Ciencias. Universidad de Baja California, 79.
- Allen, L. H. 2012. Vitamin B-12. *Advances in Nutrition*, 3(1), pp. 54–55. doi: 10.3945/an.111.001370.intrinsic
- Allen, S. G., Mortenson, J., y Webb, S. 2011a. California Sea Lion. En *Field Guide to Marine Mammals of the Pacific Coast: Baja, California, Oregon, Washington, British Columbia*. University of California Press, London, England. doi: 10.2307/j.ctv2nrzvgv.5
- Allen, S. G., Mortenson, J., y Webb, S. 2011b. Guadalupe fur seal. En *Field Guide to Marine Mammals of the Pacific Coast : Baja, California, Oregon, Washington, British Columbia*. University of California Press, London, England. doi: 10.2307/j.ctv2nrzvgv.5
- Allen, S. G., Mortenson, J., y Webb, S. 2011c. Harbor seal. En *Field Guide to Marine Mammals of the Pacific Coast : Baja, California, Oregon, Washington, British Columbia*. University of California Press, London, England.
- Allen, S. G., Mortenson, J., y Webb, S. 2011d. Northern elephant seal. En *Field Guide to Marine Mammals of the Pacific Coast : Baja, California, Oregon, Washington, British Columbia*. University of California Press, London, England.
- Amador-Capitanachi, M. J., Moreno-Sánchez, X. G., Juárez-Ruiz, A., Ferretto, G., y Elorriaga-Verplancken, F. R. 2017. Trophic variation between the two existing Guadalupe fur seal colonies on Guadalupe Island and the san benito Archipelago, Mexico. *Aquatic Mammals*, 43(1), 14–25. doi: 10.1578/AM.43.1.2017.14
- Amato, K. R. 2013. Co-evolution in context: The importance of studying gut microbiomes in wild animals. *Microbiome Science and Medicine*, 1(1), 10–29. doi: 10.2478/micsm-2013-0002
- Anders, S., Huber, W., Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T. R., Gu, Z., Eils, R., Schlesner, M., Huber, W., Carey, V. J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B. S., Bravo, H. C., Davis, S., Gatto, L., Girke, T., Gottardo, R., Hahne, F., Hansen, K. D., Irizarry, R. A., Lawrence, M., Love, M. I., MacDonald, J., Obenchain, V., Oleš, A. K., Pagès, H., Reyes, A., Shannon, P., Smyth, G. K., Tenenbaum, D., Waldron, L., Morgan, M., Liao, Y., Smyth, G. K., Shi, W., Love, M. I., Huber, W., Anders, S., Narayana, A., Mathew, M., Tam, M., Kannan, R., Madden, K. M., Golfinos, J. G., Parker, E. C., Ott, P. A., Pavlick, A. C., Saeidipour, B., y Bakhshi, S. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 7(10), 2803–2809. doi: <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
- Arias-Del Razo, A., Schramm, Y., Heckel, G., Milanés-Salinas, Á., García-Capitanachi, B., Lubinsky-Jinich, D., y Franco-Ortiz, M. 2017. Distribution of four pinnipeds (*Zalophus californianus*, *Arctocephalus philippii townsendi*, *Phoca vitulina richardii*, and *Mirounga angustirostris*) on Islands off the west

- coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Aquatic Mammals*, 43(1), 40–51. doi: 10.1578/AM.43.1.2017.40
- Ayling, R. D., Bashiruddin, S., Davison, N. J., Foster, G., Dagleish, M. P., y Nicholas, R. A. J. 2011. The occurrence of *Mycoplasma phocicerebrale*, *Mycoplasma phocidae*, and *Mycoplasma phocirhinis* in grey and common seals (*Halichoerus grypus* and *Phoca vitulina*) in the United Kingdom. *Journal of Wildlife Diseases*, 47(2), 471–475. doi: 10.7589/0090-3558-47.2.471
- Bahrndorff, S., Alemu, T., Alemneh, T., y Lund Nielsen, J. 2016. The Microbiome of Animals: Implications for Conservation Biology. *International Journal of Genomics*, 2016. doi: 10.1155/2016/5304028
- Barbera, P., Kozlov, A. M., Czech, L., Morel, B., Darriba, D., Flouri, T., y Stamatakis, A. 2019. EPA-ng: Massively Parallel Evolutionary Placement of Genetic Sequences. *Systematic Biology*, 68(2), 365–369. doi: 10.1093/sysbio/syy054
- Bhute, S. S., Ghaskadbi, S. S., y Shouche, Y. S. 2017. Rare Biosphere in Human Gut: A Less Explored Component of Human Gut Microbiota and Its Association with Human Health. En V. C. Kalia, Y. Shouche, H. J. Purohit, & P. Rahi (Eds.), *Mining of Microbial Wealth and MetaGenomics*. Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore. doi: 10.1007/978-981-10-5708-3
- Bigg, M. A. 1981. Harbour seal: *Phoca vitulina* and *P. largha*. En Ridgeway SH, Harrison RJ (eds), *Handbook of marine mammals*, vol. 2. Academic Press, London.
- 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., y Relman, D. A. 2016. Marine mammals harbor unique microbiotas shaped by and yet distinct from the sea. *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7. doi: 10.1038/ncomms10516
- Bjorkland, R. H., Pearson, S. F., Jeffries, S. J., Lance, M. M., Acevedo-Gutiérrez, A., y Ward, E. J. 2015. Stable isotope mixing models elucidate sex and size effects on the diet of a generalist marine predator. *Marine Ecology Progress Series*, 526, 213–225. doi: 10.3354/meps11230
- Bonnes, D. J. y Bowen, W. D. 1996. The evolution of maternal care in Pinnipeds. *BioScience*, 46(9), 645–654. doi: 10.2307/1312894
- Boulva, J. 1975. Temporal variations in birth period and characteristics of newborn harbour seals. *Rapports et Procès-Verbaux, Reunions Du Conseil International Pour l'Exploration de La Mer*, 169, 405–408.
- Bowen, W. D., Boness, D. J., y Iverson, S. J. 1999. Diving behaviour of lactating harbour seals and their pups during maternal foraging trips. *Canadian Journal of Zoology*, 77(6), pp. 978–988. doi: 10.1139/z99-065
- Bowen, W., Oftedal, O., y Boness, D. 1992. Mass and Energy Transfer during Lactation in a Small Phocid, the Harbor Seal (*Phoca vitulina*). *Physiological Zoology*, 65(4), 844–866. doi: 10.1086/physzool.65.4.30158543
- Brassea-Pérez, E., Schramm, Y., Heckel, G., Chong-Robles, J., y Lago-Lestón, A. 2019. Metabarcoding analysis of the Pacific harbor seal diet in Mexico. *Marine Biology*, 166(106). doi: 10.1007/s00227-019-3555-8

- Brown, R. F. y Mate, B. R. 1983. Abundance, movements, and feeding habits of harbor seals, *Phoca vitulina*, at Netarts and Tillamook Bays, Oregon. *Fishery Bulletin*, 81(2), 291–301.
- Burns, J. J. 2009. Harbor Seal and Spotted Seal. En W. F. Perrin, B. Würsig, & J. G. M. Thewissen (Eds.), *Encyclopedia of Marine Mammals* (2 a. ed). Academic Press, Amsterdam. doi: 10.1186/1472-6785-7-1
- Callahan, B. J., Mcmurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., y Holmes, S. P. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869
- Cheng, J., Wang, W., Zhang, D., Zhang, Y., Song, Q., Li, X., Zhao, Y., Xu, D., Zhao, L., Li, W., Wang, J., Zhou, B., Lin, C., y Zhang, X. 2022. Distribution and Difference of Gastrointestinal Flora in Sheep with Different Body Mass Index. *Animals*, 12(7). doi: 10.3390/ani12070880
- Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., y Salminen, S. 2016. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), 23129. doi: 10.1038/srep23129
- Cronin, M., Gregory, S., y Rogan, E. 2014. Moulting phenology of the harbour seal in southwest Ireland. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 94(6), 1079- 1086.
- Czech, L., Barbera, P., y Stamatakis, A. 2020. Genesis and Gappa: Processing, analyzing and visualizing phylogenetic (placement) data. *Bioinformatics*, 36(10), 3263–3265. doi: 10.1093/bioinformatics/btaa070
- Davis, N. M., Proctor, D. M., Holmes, S. P., Relman, D. A., y Callahan, B. J. 2018. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome*. *Microbiome*, 6(226). doi: 10.1101/221499
- Davis, T. A., Nguyen, H. v., Costa, D. P., y Reeds, P. J. 1995. Amino acid composition of pinniped milk. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, 110(3), 633–639. doi: 10.1016/0305-0491(94)00162-N
- de Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Zitoun, C., Duchampt, A., Bäckhed, F., y Mithieux, G. 2016. Microbiota-produced succinate improves glucose homeostasis via intestinal gluconeogenesis. *Cell Metabolism*, 24(1), 151–157. doi: 10.1016/j.cmet.2016.06.013
- Degnan, P. H., Pusey, A. E., Lonsdorf, E. v, Goodall, J., Wroblewski, E. E., Wilson, M. L., Rudicell, R. S., Hahn, B. H., y Ochman, H. 2012. Factors associated with the diversification of the gut microbial communities within chimpanzees from Gombe National Park. *PNAS*, 109(32), 13034–13039. doi: 10.1073/pnas.1110994109
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., y Langille, M. G. I. 2020. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, 38(6), 685–688. doi: 10.1038/s41587-020-0548-6
- Duan, R., Guan, X., Huang, K., Zhang, Y., Li, S., Xia, J., y Shen, M. 2021. Flavonoids from Whole-Grain Oat Alleviated High-Fat Diet-Induced Hyperlipidemia via Regulating Bile Acid Metabolism and Gut Microbiota in Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(27), 7629–7640. doi: 10.1021/acs.jafc.1c01813

- Durazo, R. P. 2015. Variación espacio-temporal de los hábitos alimentarios de la foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*) en México. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California, 108 pp.
- Dutton, C. L., Subalusky, A. L., Sanchez, A., Estrela, S., Lu, N., Hamilton, S. K., Njoroge, L., Rosi, E. J., y Post, D. M. 2021. The meta-gut: community coalescence of animal gut and environmental microbiomes. Scientific Reports. Nature Publishing Group UK, 11(1), 1–14. doi: 10.1038/s41598-021-02349-1
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., y Ross, R. P. 2018. The gut microbiota of marine fish. Frontiers in Microbiology, 9(MAY), 1–17. doi: 10.3389/fmicb.2018.00873
- Esperón Rodríguez, M. 2008. Estado actual del lobo fino de Guadalupe (*Arctocephalus townsendi* Merriam, 1897) en el Archipiélago de San Benito, Baja California: tamaño de la población, biología reproductiva y alimentación. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, 56.
- Espinosa de los Reyes, A. 2007. Variabilidad espacial de la dieta del lobo marino de California (*Zalophus californianus californianus*, Lesson 1828). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 175 pp.
- Fattal-Valevski, A. 2011. Thiamine (vitamin B1). Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine, 16(1), 12–20. doi: 10.1177/1533210110392941
- Feltz, E. T. y Fay, F. H. 1966. Thermal requirements in vitro of epidermal cells from seals. Cryobiology, 3(3), pp. 261–264. doi: 10.1016/S0011-2240(66)80020-2
- Fenn, K., Strandwitz, P., Stewart, E. J., Dimise, E., Rubin, S., Gurubacharya, S., Clardy, J., y Lewis, K. 2017. Quinones are growth factors for the human gut microbiota. Microbiome. Microbiome, 5(1), 161. doi: 10.1186/s40168-017-0380-5
- Fernández-Martín, E. M. 2018. Fenología de los nacimientos, estado de salud de las crías, y estructura genética poblacional de *Phoca vitulina richardii* en México. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/bitstream/20.500.12930/42/1/ENS088547.pdf>
- Fernández-Martín, E. M., Heckel, G., Schramm, Y., y García-Aguilar, M. C. 2016. The timing of pupping and molting of the Pacific harbor seal, *Phoca vitulina richardii*, at Punta Banda Estuary, Baja California, Mexico. Ciencias Marinas, 42(3), 195–208. doi: 10.7773/cm.v42i3.2615
- Fernández-Martín, E.-M. 2012. Fenología de los nacimientos y de la muda de *Phoca vitulina richardsi* (Gray, 1864) en el Estero de Punta Banda, B.C., México. Tesis de Maestría en Ciencias. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 94.
- Foster, G., Ross, H. M., Naylor, R. D., Collins, M. D., Ramos, C. P., Garayzabal, F. F., y Reid, R. J. 1995. *Cetobacterium ceti* gen. nov., sp. nov., a new Gram-negative obligate anaerobe from sea mammals. Letters in Applied Microbiology, 21, 202–206. doi: 10.1111/j.1472-765X.1995.tb01041.x
- Foster, G., Ross, H. M., Patterson, I. A. P., Hutson, R. A., y Collins, M. D. 1998. *Actinobacillus scotiae* sp. nov., a new member of the family Pasteurellaceae Pohl (1979) 1981 isolated from porpoises (*Phocoena phocoena*). International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 929–933.

- Foster, K. R., Schluter, J., Coyte, K. Z., y Rakoff-Nahoum, S. 2017. The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash. *Nature*, 548(7665), 43–51. doi: 10.1038/nature23292
- Fouz, B., Toranzo, A. E., Milan, M., y Amaro, C. 2000. Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3), 531–535. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00992.x
- Fowler, M. A., Sirpenski, G., y Romano, T. A. 2020. Insulin and blubber deposition in rehabilitating harbor seal (*Phoca vitulina*) pups. *Aquatic Mammals*, 46(3), 243–253. doi: 10.1578/AM.46.3.2020.243
- Gallo-Reynoso, J. y Figueroa-Carranza, A. 1996. Size and weight of Guadalupe fur seals. *Marine Mammal Science*, 12(2), 318–321. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1996.tb00584.x>
- Gallo-Reynoso, J. P. 1994. Factors affecting the population status of Guadalupe fur seal, *Arctocephalus townsendi* (Merriam, 1897), at Isla De Guadalupe, Baja California, Mexico. Tesis de Doctorado en Filosofía. Universidad de California, 199.
- Gallo-Reynoso, J. P. y Esperón-Rodríguez, M. 2013. Diet composition of the Guadalupe fur seal (*Arctocephalus townsendi*). Where and what do they eat? *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 46(6), 455–467. doi: 10.1080/10236244.2013.849400
- Gallo-Reynoso, J. P., Figueroa-Carranza, A. L., y LeBoeuf, B. J. 2008. Foraging behavior of lactating Guadalupe fur seal females. *Avances En El Estudio de Los Mamíferos de México*, 2, pp. 595–614.
- Gallo-Reynoso, J.-P. y Figueroa-Carranza, A.-L. 2010. Pup growth of the guadalupe fur seal, *Arctocephalus townsendi*. *Therya*, 1(1), pp. 75–90. doi: 10.12933/therya-10-8
- Geraci, J. R., Aubin, D. J. S., Barker, I. K., Webster, R. G., Hinshaw, V. S., Bean, W. J., Ruhnke, H. L., Prescott, J. H., Early, G., Baker, A. S., Madoff, S., y Schooley, R. T. 1982. Mass mortality of harbor seals: Pneumonia associated with influenza A virus. *Science*, 215, pp. 1129–1131. doi: 10.1126/science.7063847
- Germain, L. R., McCarthy, M. D., Koch, P. L., y Harvey, J. T. 2012. Stable carbon and nitrogen isotopes in multiple tissues of wild and captive harbor seals (*Phoca vitulina*) off the California coast. *Marine Mammal Science*, 28(3), pp. 542–560. doi: 10.1111/j.1748-7692.2011.00516.x
- Gerritsen, J., Hornung, B., Ritari, J., Paulin, L., Rijkers, G. T., Schaap, P. J., de Vos, W. M., y Smidt, H. 2019. A comparative and functional genomics analysis of the genus *Romboutsia* provides insight into adaptation to an intestinal lifestyle. *BioRxiv*. doi: 10.1101/845511
- Glad, T., Fam Kristiansen, V., Nielsen, K. M., Brusetti, L., Wright, A.-D. G., y Sundset, M. A. 2010. Ecological characterisation of the colonic microbiota in Arctic and sub-Arctic seals. *Microbiology Ecology*, 60(2), pp. 320–330. doi: 10.1007/s00248-010-9690-x
- Gomez-Arango, L. F., Barrett, H. L., McIntyre, H. D., Callaway, L. K., Morrison, M., y Dekker Nitert, M. 2016. Increased Systolic and Diastolic Blood Pressure is Associated with Altered Gut Microbiota Composition and Butyrate Production in Early Pregnancy. *Hypertension*, 68(4), pp. 974–981. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07910

- González-Soltero, R., Bailén, M., de Lucas, B., Ramírez-Goercke, M. I., Pareja-Galeano, H., y Larrosa, M. 2020. Role of oral and gut microbiota in dietary nitrate metabolism and its impact on sports performance. *Nutrients*, 12(3611), pp. 1–14. doi: 10.3390/nu12123611
- Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M. A., van de Wiele, T., Forano, E., y Blanquet-Diot, S. 2017. Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, 25(10), pp. 851–873. doi: 10.1016/j.tim.2017.05.004
- 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., y Davidson, M. K. 2006. Lesions associated with a novel *Mycoplasma* sp. in California sea lions (*Zalophus californianus*) undergoing rehabilitation. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(1), pp. 40–45. doi: 10.7589/0090-3558-42.1.40
- Hindell, M. A. 2009. Elephant Seals. En W. F. Perrin, B. Wursig, & Thewissen (Eds.), *Encyclopedia of Marine Mammals* (Academic P). Academic Press. doi: 10.2307/2265844
- Holeček, M. 2020. Why are branched-chain amino acids increased in starvation and diabetes? *Nutrients*, 12(3087). doi: 10.3390/nu12103087
- Hughes, S. N., Greig, D. J., Miller, W. A., Byrne, B. A., Gulland, F. M. D., y Harvey, J. T. 2013. Dynamics of *Vibrio* with Virulence Genes Detected in Pacific Harbor Seals (*Phoca vitulina richardii*) Off California: Implications for Marine Mammal Health. *Microb Ecol*, 65(4), pp. 982–994. doi: 10.1007/s00248-013-0188-1
- Hundenborn, J., Thurig, S., Kommerell, M., Haag, H., y Nolte, O. 2013. Severe Wound Infection with *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* and *Vibrio harveyi*, following a laceration injury in marine environment: A case report and review of the literature. *Case Reports in Medicine*, 2013. doi: 10.1155/2013/610632
- Hunt, K. M., Foster, J. A., Forney, L. J., Schü Tte, U. M. E., Beck, D. L., Abdo, Z., Fox, L. K., Williams, J. E., Mcguire, M. K., y Mcguire, M. A. 2011. Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. *PLoS ONE*, 6(6), pp. e21313. doi: 10.1371/journal.pone.0021313
- Huxtable, R. J. 1992. Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews*, 72(1), pp. 101–163.
- Jørgensen, C., Lydersen, C., Brix, O., y Kovacs, K. M. 2001. Diving development in nursing harbour seal pups. *Journal of Experimental Biology*, 204(22), pp. 3993–4004. doi: 10.1242/jeb.204.22.3993
- Kang, W., Kim, P. S., Tak, E. J., Sung, H., Shin, N.-R., Hyun, D.-W., Whon, T. W., Kim, H. S., Lee, J.-Y., Yun, J.-H., Jung, M.-J., y Bae, J.-W. 2022. Host phylogeny, habitat, and diet are main drivers of the cephalopod and mollusk gut microbiome. *Animal Microbiome*. BioMed Central, 4(1). doi: 10.1186/s42523-022-00184-x
- Kaufman, M. R., Ikeda, Y., Patton, C., van Dykhuizen, G., y Epel, D. 1998. Bacterial symbionts colonize the accessory nidamental gland of the squid *Loligo opalescens* via horizontal transmission. *Biological Bulletin*, 194(1), pp. 36–43. doi: 10.2307/1542511
- Kershaw, J. L. y Hall, A. J. 2016. Seasonal variation in harbour seal (*Phoca vitulina*) blubber cortisol - A novel indicator of physiological state? *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(21889). doi: 10.1038/srep21889

- Kim, M., Cho, H., y Lee, W. Y. 2020. Distinct gut microbiotas between southern elephant seals and Weddell seals of Antarctica. *Journal of Microbiology*, 58(12), pp. 1018–1026. doi: 10.1007/s12275-020-0524-3
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., y Glöckner, F. O. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), pp. 1–11. doi: 10.1093/nar/gks808
- Knight, R. y Buhler, B. 2015. Follow Your Gut: The Enormous Impact of Tiny Microbes. En *Frontiers in Microbiology*. Simon and Schuster/ TED.
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L. T., Ley, R. E., y Klaenhammer, T. R. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Science*, 108, pp. 4578–4585. doi: 10.1073/pnas.1000081107
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., y Schloss, P. D. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), pp. 5112–5120. doi: 10.1128/AEM.01043-13
- Lawson, P. A., Greetham, H. L., Gibson, G. R., Giffard, C., Falsen, E., y Collins, M. D. 2005. *Slackia faecicanis* sp. nov., isolated from canine faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, pp. 1243–1246. doi: 10.1099/ijs.0.63531-0
- Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R., y Gordon, J. I. 2008. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), pp. 776–778. doi: 10.1038/nrmicro1978
- López Alvirde, S. B. 2014. Variación de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en vibrisas de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) y su relación con el periodo de lactancia. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional, 76 pp.
- Louca, S. y Doebeli, M. 2018. Efficient comparative phylogenetics on large trees. *Bioinformatics*, 34(6), pp. 1053–1055. doi: 10.1093/bioinformatics/btx701
- Lozupone, C. y Knight, R. 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), pp. 8228–8235. doi: 10.1128/AEM.71.12.8228–8235.2005
- Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., y Knight, R. 2011. UniFrac: An effective distance metric for microbial community comparison. *ISME Journal*. Nature Publishing Group, 5(2), pp. 169–172. doi: 10.1038/ismej.2010.133
- Lubinsky-Jinich, D. 2019. Abundancia y movimientos de la foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*) en Baja California, Mexico. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 53 pp.
- Lubinsky-Jinich, D., Pardo, M. A., Heckel, G., y Schramm, Y. 2019. Temporal variations in terrestrial counts of Pacific harbor seals in the southern California Current System. *Marine Mammal Science*. doi: 10.1111/mms.12579

- Lubinsky-Jinich, D., Schramm, Y., y Heckel, G. 2017. The Pacific Harbor Seal's (*Phoca vitulina richardii*) Breeding Colonies in Mexico: Abundance and Distribution. *Aquatic Mammals*, 43(1), pp. 73–81. doi: 10.1578/AM.43.1.2017.73
- Lynch, J. B., Gonzalez, E. L., Choy, K., Faull, K. F., Jewell, T., Arellano, A., Liang, J., Yu, K. B., Paramo, J., y Hsiao, E. Y. 2022. *Turicibacter* modifies host bile acids and lipids in a strain-specific manner. *BioRxiv*. Recuperado el 24 de agosto de 2022, a partir de <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.06.27.497673v1%250>
- Markowiak-Kopeć, P. y Śliżewska, K. 2020. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome. *Nutrients*, 12(4). doi: 10.3390/nu12041107
- Matamoros, S., Gras-Leguen, C., le Vacon, F., Potel, G., y de La Cochetiere, M.-F. 2012. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in Microbiology*, 21(4), pp. 167–173. doi: 10.1016/j.tim.2012.12.001
- Mcfall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C., Carey, H. v., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert, S. F., Hentschel, U., King, N., Kjelleberg, S., Knoll, A. H., Kremer, N., Mazmanian, S. K., Metcalf, J. L., Nealson, K., Pierce, N. E., Rawls, J. F., Reid, A., Ruby, E. G., Rumpho, M., Sanders, J. G., Tautz, D., y Wernegreen, J. J. 2013. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(9), pp. 3229–3236. doi: 10.1073/pnas.1218525110
- McMurdie, P. J. y Holmes, S. 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4). doi: 10.1371/journal.pone.0061217
- McMurdie, P. J. y Holmes, S. 2014. Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Computational Biology*, 10(R106). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531>
- Melin, S. R., Trillmich, F., y Aurióles-Gamboa, D. 2018. California, Galapagos, and Japanese Sea Lions. En B. Wursig, J. G. M. Thewissen, & K. M. Kovacs (Eds.), *Encyclopedia of Marine Mammals* (3.a). American Press, London. doi: 10.1016/b978-0-12-804327-1.00003-0
- Moffatt, B. A. y Ashihara, H. 2002. Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book*. doi: 10.1199/tab.0018
- Moore, S. E. 2008. Marine mammals as ecosystem sentinels. *Journal of Mammalogy*, 89(3), pp. 534–540. doi: 10.1644/07-MAMM-S-312R1.1
- Muelbert, M. M. C. y Bowen, W. D. 1993. Duration of lactation and postweaning changes in mass and body composition of harbour seal, *Phoca vitulina*, pups. *Canadian Journal of Zoology*, 71(7), pp. 1405–1414. doi: 10.1139/z93-194
- Nelson, T. M., Rogers, T. L., Carlini, A. R., y Brown, M. v. 2013. Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic seals: a comparison of wild and captive animals. *Environmental Microbiology*, 15(4), pp. 1132–1145. doi: 10.1111/1462-2920.12022
- Ni, Y., Lohinai, Z., Heshiki, Y., Dome, B., Moldvay, J., Dulka, E., Galffy, G., Berta, J., Weiss, G. J., Sommer, M. O. A., y Panagiotou, G. 2021. Distinct composition and metabolic functions of human gut microbiota are associated with cachexia in lung cancer patients. *ISME Journal*. Springer US, 15(11), pp. 3207–3220. doi: 10.1038/s41396-021-00998-8

- Nie, X., Chen, J., Ma, X., Ni, Y., Shen, Y., Yu, H., Panagiotou, G., y Bao, Y. 2020. A metagenome-wide association study of gut microbiome and visceral fat accumulation. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. The Author(s), 18, pp. 2596–2609. doi: 10.1016/j.csbj.2020.09.026
- Numberger, D., Herlemann, D. P. R., Jürgens, K., Dehnhardt, G., y Schulz-Vogt, H. 2016. Comparative analysis of the fecal bacterial community of five harbor seals (*Phoca vitulina*). *MicrobiologyOpen*, 5(5), pp. 782–792. doi: 10.1002/mbo3.369
- Oates, S. C. 2005. Survival, movements, and diet of juvenile harbor seals along central California. Tesis de Maestría en Ciencias. San Jose State University, 228 pp.
- Oxley, A. P. A. y McKay, D. B. 2004. Fecal shedding of *Helicobacter* spp. by co-housed Australian sea lions (*Neophoca cinerea*) and Australian fur seals (*Arctocephalus pusillus doriferus*). *Veterinary Microbiology*, 101(4), pp. 235–243. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.03.022
- Pacheco, A. 2017. El microbioma intestinal de la foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*) y su relación con la dieta: caracterización mediante secuenciación masiva. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 83 pp.
- Pacheco-Sandoval, A., Schramm, Y., Heckel, G., Brassea-Pérez, E., Martínez-Porchas, M., y Lago-Lestón, A. 2019. The Pacific harbor seal gut microbiota in Mexico: Its relationship with diet and functional inferences. *PlosOne*, 14(8). doi: 10.1371/journal.pone.0221770
- Pacífico, C., Petri, R. M., Ricci, S., Mickdam, E., Wetzels, S. U., Neubauer, V., y Zebeli, Q. 2021. Unveiling the bovine epimural microbiota composition and putative function. *Microorganisms*, 9(2), pp. 1–23. doi: 10.3390/microorganisms9020342
- Paterson, W., Sparling, C. E., Thompson, D., Pomeroy, P. P., Currie, J. I., y McCafferty, D. J. 2012. Seals like it hot: Changes in surface temperature of harbour seals (*Phoca vitulina*) from late pregnancy to moult. *Journal of Thermal Biology*. Elsevier, 37, pp. 454–461. doi: 10.1016/j.jtherbio.2012.03.004
- Pitcher, K. W. 1986. Variation in Blubber Thickness of Harbor Seals. *The Journal of Wildlife Management*, 50(3), pp. 463–466.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., y Glöckner, F. O. 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41, pp. 590–596. doi: 10.1093/nar/gks1219
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Recuperado el 22 de marzo de 2019, a partir de <https://www.r-project.org/>
- Ramirez-Delgado, D., Cicala, F., Gonzalez-Sanchez, R. A., Avalos-Tellez, R., Solana-Arellano, E., y Licea-Navarro, A. 2022. Multi-locus evaluation of gastrointestinal bacterial communities from *Zalophus californianus* pups in the Gulf of California , México. *PeerJ*, PeerJ 10:e, pp. 1–22. doi: 10.7717/peerj.13235
- RAMSAR. 2021. The List of Wetlands of International Importance. Recuperado el 14 de julio de 2019, a partir de <https://medwet.org/wp-content/uploads/2017/11/sitelist-wetlands-of-Med-countries-23-Nov-2017.pdf>

- Raulo, A., Ruokolainen, L., Lane, A., Amato, K., Knight, R., Leigh, S., Stumpf, R., White, B., Nelson, K. E., Baden, A. L., y Tecot, S. R. 2018. Social behaviour and gut microbiota in red-bellied lemurs (*Eulemur rubriventer*): In search of the role of immunity in the evolution of sociality. *Journal of Animal Ecology*, 87(2), pp. 388–399. doi: 10.1111/1365-2656.12781
- Rivas, A. J., Lemos, M. L., y Osorio, C. R. 2013. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans. *Frontiers in Microbiology*, 4, pp. 1–6. doi: 10.3389/fmicb.2013.00283
- Robertson, K. M., Lauf, M. L., y Morin, P. A. 2018. Genetic sexing of pinnipeds: a real-time, single step qPCR technique. *Conservation Genetics Resources*. Springer Netherlands, 10(2), pp. 213–218. doi: 10.1007/s12686-017-0759-4
- Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M. C., Marchesi, J. R., y Collado, M. C. 2015. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 26(26050). doi: 10.3402/mehd.v26.26050
- Ruhnke, H. L. y Madoff, S. 1992. *Mycoplasma phocidae* sp. nov., isolated from harbor seals (*Phoca vitulina* L.). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(2), pp. 211–214. doi: 10.1099/00207713-42-2-211
- Ruiz-Mar, M. G., Heckel, G., Solana-Arellano, E., Schramm, Y., García-Aguilar, M. C., y Arteaga, M. C. 2022. Human activities disturb haul out and nursing behavior of Pacific harbor seals at Punta Banda Estuary, Mexico. *PLoS ONE*, 17(7), pp. e0270129. doi: 10.1371/journal.pone.0270129
- Ruth, L. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R., y Gordon, J. I. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320(5883), pp. 1647–1651. doi: 10.1126/science.1155725
- Sanna, S., van Zuydam, N. R., Mahajan, A., Kurilshikov, A., Vila, A., Vösa, U., Mujagic, Z., Masclee, A. A. M., Jonkers, D., Oosting, M., Joosten, L., Netea, M., Franke, L., Zhernakova, A., Fu, J., Wijmenga, C., y McCarthy, M. I. 2019. Causal relationships between gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *Nature Genetics*, 51(4), pp. 600–605. doi: 10.1038/s41588-019-0350-x.Causal
- Sauvé, C. C., van de Walle, J., Hammill, M. O., Arnould, J. P. Y., y Beauplet, G. 2014. Stomach temperature records reveal nursing behaviour and transition to solid food consumption in an unweaned mammal, the harbour seal pup (*Phoca vitulina*). *PLoS ONE*, 9(2). doi: 10.1371/journal.pone.0090329
- Schwarz, D., Spitzer, S. M., Thomas, A. C., Kohnert, C. M., Keates, T. R., y Acevedo-Gutiérrez, A. 2018. Large-scale molecular diet analysis in a generalist marine mammal reveals male preference for prey of conservation concern. *Ecology and Evolution*, 8(19), pp. 9889–9905. doi: 10.1002/ece3.4474
- Simmons, J. H., Riley, L. K., Besch-Williford, C. L., y Franklin, C. L. 2000. *Helicobacter mesocricetorum* sp. nov., a novel *Helicobacter* isolated from the feces of Syrian hamsters. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(5), pp. 1811–1817. doi: 10.1128/jcm.38.5.1811-1817.2000
- Smith, S. C., Chalker, A., Dewar, M. L., y Arnould, J. P. Y. 2013. Age-related differences revealed in Australian fur seal *Arctocephalus pusillus doriferus* gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol*, 86(2), pp. 246–255. doi: 10.1111/1574-6941.12157

- Soares-Castro, P., Araújo-Rodrigues, H., Godoy-Vitorino, F., Ferreira, M., Covelo, P., López, A., Vingada, J., Eira, C., y Santos, P. M. 2019. Microbiota fingerprints within the oral cavity of cetaceans as indicators for population biomonitoring. *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–15. doi: 10.1038/s41598-019-50139-7
- Sommer, F., Ståhlman, M., Ilkayeva, O., Newgard, C. B., Arnemo, J. M., Kindberg, J., Josefsson, J., Newgard, C. B., Fröbert, O., y Bäckhed, F. 2016. The gut microbiota modulates energy metabolism in the hibernating brown bear *Ursus arctos*. *Cell Reports*, 14, pp. 1655–1661. doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.026
- Song, S. J., Lauber, C., Costello, E. K., Lozupone, C. A., Humphrey, G., Berg-Lyons, D., Gregory Caporaso, J., Knights, D., Clemente, J. C., Nakielnny, S., Gordon, J. I., Fierer, N., y Knight, R. 2013. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *ELife*, 2013(2), pp. 1–22. doi: 10.7554/eLife.00458
- Stewart, B. S. 1997. Ontogeny of differential migration and sexual segregation in northern elephant seals. *Journal of Mammalogy*, 78(4), pp. 1101–1116. doi: 10.2307/1383053
- Stoffel, M. A., Acevedo-Whitehouse, K., Morales-Durán, N., Grosser, S., Chakarov, N., Krüger, O., Nichols, H. J., Elorriaga-Verplancken, F. R., y Hoffman, J. I. 2020. Early sexual dimorphism in the developing gut microbiome of northern elephant seals. *Molecular Ecology*, 29(11), pp. 2109–2122. doi: 10.1111/mec.15385
- Tapia-Harris, C., Heckel, G., Schramm, Y., y Fernández-Martín, E. M. 2017. Molting phenology of the Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardii*) on two islands off the Baja California Peninsula, Mexico. *Marine Mammal Science*, 33(3), pp. 817–829. doi: 10.1111/mms.12400
- Thompson, P. M., Mackay, A., Tollit, D. J., Enderby, S., y Hammond, P. S. 1998. The influence of body size and sex on the characteristics of harbour seal foraging trips. *Canadian Journal of Zoology*, 76(6), pp. 1044–1053. doi: 10.1139/z98-035
- Thompson, P. M., Miller, D., Cooper, R., y Hammond, P. S. 1994. Changes in the Distribution and Activity of Female Harbour Seals During the Breeding Season: Implications for their Lactation Strategy and Mating Patterns. *The Journal of Animal Ecology*, 63(1), pp. 24. doi: 10.2307/5579
- Tian, J., Du, J., Han, J., Song, X., y Lu, Z. 2020. Age-related differences in gut microbial community composition of captive spotted seals (*Phoca largha*). *Marine Mammal Science*, 36(4), pp. 1231–1240. doi: 10.1111/mms.12728
- Toro-Valdivieso, C., Toro, F., Stubbs, S., Castro-Nallar, E., y Blacklaws, B. 2021. Patterns of the fecal microbiota in the Juan Fernández fur seal (*Arctocephalus philippii*). *MicrobiologyOpen*, 10(4), pp. 1–19. doi: 10.1002/mbo3.1215
- Trevelline, B. K., Fontaine, S. S., Hartup, B. K., y 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(1895). doi: 10.1098/rspb.2018.2448
- Tsukinowa, E., Karita, S., Asano, S., Wakai, Y., Oka, Y., Furuta, M., y Goto, M. 2008. Fecal microbiota of a dugong (*Dugong dugong*) in captivity at Toba Aquarium. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54(1), pp. 25–38.

- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-liggett, C., Knight, R., y Gordon, J. I. 2007. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature*, 449(7164), pp. 804–810. doi: 10.1038/nature06244.
- Urszula, K., Joanna, E., Marek, E., Beata, M., y Magdalena, S. B. 2014. Colonization of the lower urogenital tract with *Ureaplasma parvum* can cause asymptomatic infection of the upper reproductive system in women: A preliminary study. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 289(5), pp. 1129–1134. doi: 10.1007/s00404-013-3102-7
- van Parijs, S. M., Thompson, P. M., Tollit, D. J., y Mackay, A. 1997. Distribution and activity of male harbour seals during the mating season. *Animal Behaviour*, 54(1), pp. 35–43. doi: 10.1006/anbe.1996.0426
- Villegas-Amtmann, S., Simmons, S. E., Kuhn, C. E., Huckstadt, L. A., y Costa, D. P. 2011. Latitudinal range influences the seasonal variation in the foraging behavior of marine top predators. *PLoS ONE*, 6(8). doi: 10.1371/journal.pone.0023166
- Wickham, H. 2009. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. 3 a. ed. Springer, New York. doi: 10.1007/978-0-387-98141-3
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F. D., y Lewis, J. D. 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334, pp. 105–108. doi: 10.1126/science.1208344
- Ye, Y. y Doak, T. G. 2009. A Parsimony Approach to Biological Pathway Reconstruction/Inference for Genomes and Metagenomes. *PLoS Comput Biol*, 5(8), pp. e1000465. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000465
- Yokogoshi, H. y Oda, H. 2002. Dietary taurine enhances cholesterol degradation and reduces serum and liver cholesterol concentrations in rats fed a high-cholesterol diet. *Amino Acids*, 23(4), pp. 433–439. doi: 10.1007/s00726-002-0211-1
- Yuan, X., Chen, R., McCormick, K. L., Zhang, Y., Lin, X., y Yang, X. 2021. The role of the gut microbiota on the metabolic status of obese children. *Microbial Cell Factories*. BioMed Central, 20(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s12934-021-01548-9
- Zempleni, J. y Kuroishi, T. 2012. Biotin. *Advances in Nutrition*, 3(2), pp. 213–214. doi: 10.3945/an.111.001305.213
- Zhou, C., Mi, S., Li, J., Gao, J., Wang, X., y Sang, Y. 2020. Purification, characterisation and antioxidant activities of chondroitin sulphate extracted from *Raja porosa* cartilage. *Carbohydrate Polymers*, 241(April), pp. 1–8. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116306

Anexo A. *Phyla* detectados en las muestras de heces de foca de puerto del Estero de Punta Banda e Isla Todos Santos (Cap. 2)

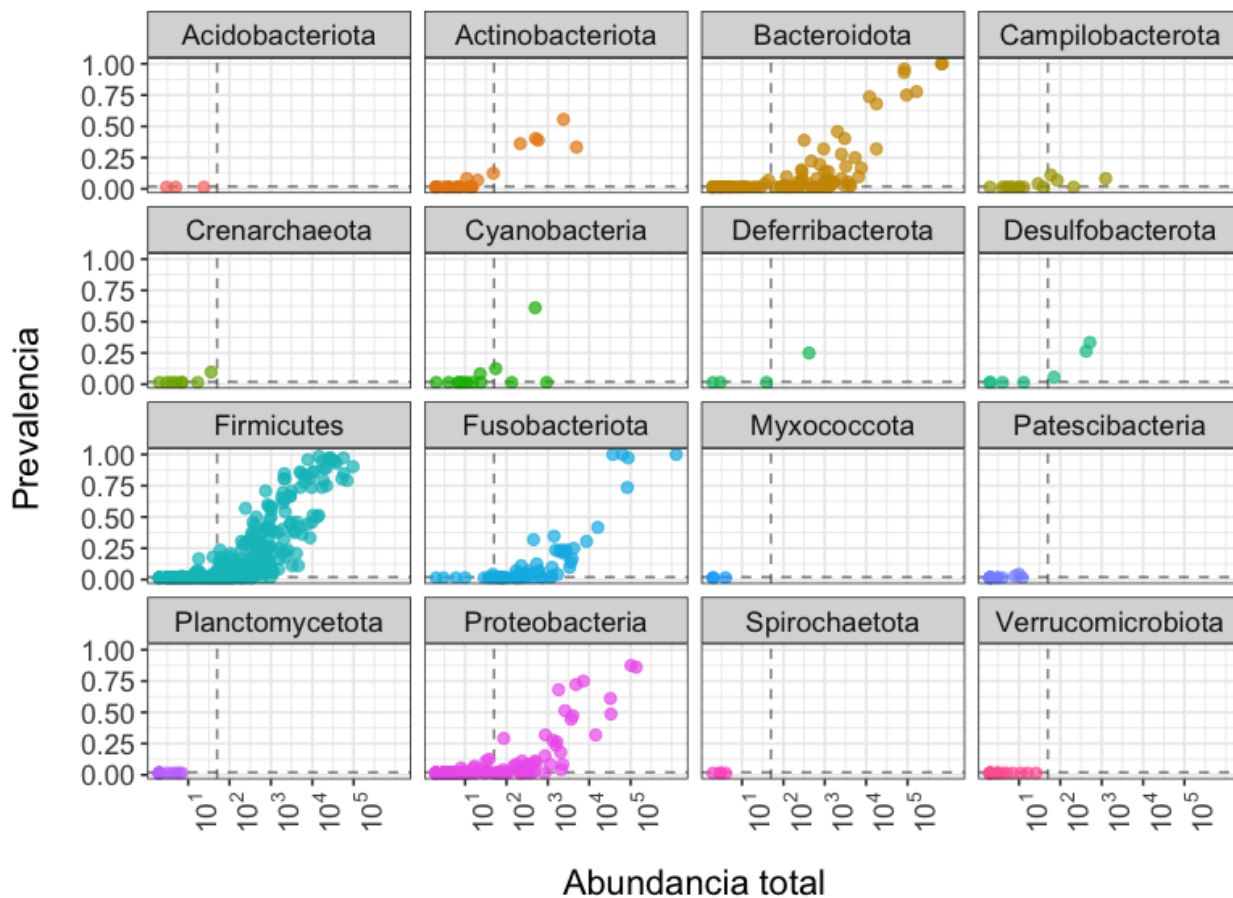


Figura 57. *Phyla* detectados en las muestras de heces de foca de puerto del Estero de Punta Banda e Isla Todos Santos (Capítulo 2). La línea punteada indica un umbral de prevalencia igual al 5%.

Anexo B. Grupo núcleo de focas de puerto durante las etapas de estudio (Cap. 2)

Tabla 3. Comparación del grupo núcleo de las focas de puerto durante las etapas de rep-muda y postmuda.

Variable	Grupo núcleo	Taxa*	Abundancia relativa promedio
Etapa	Rep-muda	Sin taxa detectados	
	Postmuda	<i>Alloprevotella</i>	9.1%
		<i>Alloprevotella</i>	5.2%
		<i>UCG-005</i>	2.5%
		Oscillospiraceae (Familia)	3.3%
		<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	2.1%
		Oscillospiraceae (Familia)	0.7%
		<i>Christensenellaceae_R-7_group</i>	0.5%
		<i>NK4A214_group</i>	0.6%
		<i>Alistipes</i>	0.5%
		Oscillospiraceae (Familia)	0.4%
		<i>UCG-002</i>	0.4%
		<i>Negativibacillus</i>	0.3%
		<i>Anaerobiospirillum</i>	0.2%
		<i>UCG-005</i>	0.3%
		Ruminococcaceae (Familia)	0.3%
		Ruminococcaceae (Familia)	0.1%
		<i>Lachnoclostridium</i>	0.1%
	Compartidos	<i>Fusobacterium perfoetens</i>	34.2%
		<i>Bacteroides</i>	17.8%
		<i>Alloprevotella</i>	17.4%
		<i>Parasutterella</i>	2.8%
		<i>Clostridium perfringens</i>	2.4%
		<i>Fusobacterium mortiferum/necrogenes</i>	2.5%
		<i>Bacteroides</i>	2.1%
		<i>Alistipes</i>	2.2%
		<i>Fusobacterium</i>	1.8%
		<i>Faecalibacterium</i>	1.6%
		<i>UCG-005</i>	1.1%
		Fusobacteriaceae (Familia)	1.0%
		Ruminococcaceae (Familia)	1.0%
		<i>Peptoclostridium</i>	0.9%
		<i>Colidextribacter</i>	0.7%
		<i>UCG-005</i>	0.7%
		<i>Clostridium perfringens/thermophilus</i>	0.6%
		<i>Fournierella</i>	0.5%
		Lachnospiraceae (Familia)	0.4%
		Erysipelotrichaceae (Familia)	0.2%
		<i>Fournierella</i>	0.1%

* Se muestra la última asignación taxonómica alcanzada

Anexo C. Grupo núcleo de focas de puerto del EPB y TS (Cap. 2)

Tabla 4. Comparación del grupo núcleo de las focas de puerto del Estero de Punta Banda (EPB) y Todos Santos (TS).

Variable	Grupo núcleo	Taxa*	Abundancia relativa promedio
Colonia	EPB	<i>Alloprevotella</i>	10.9%
		<i>Parasutterella</i>	4.8%
		<i>Alloprevotella</i>	5.8%
		UCG-005	3.7%
		Oscillospiraceae (Familia)	3.7%
		<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	2.5%
		<i>Burkholderiales</i> (Orden)	2.0%
		<i>Christensenellaceae_R-7_group</i>	0.7%
		<i>Alistipes</i>	0.5%
		UCG-002	0.6%
		<i>Ruminococcaceae</i>	0.1%
	TS	<i>Romboutsia hominis</i>	21.9%
		<i>Blautia</i>	14.3%
	Compartidos	<i>Fusobacterium perfoetens</i>	33.5%
		<i>Bacteroides</i>	17.5%
		<i>Alloprevotella</i>	17.1%
		<i>Clostridium perfringens</i>	2.3%
		<i>Fusobacterium mortiferum/necrogenes</i>	2.5%
		<i>Bacteroides</i>	2.1%
		<i>Alistipes</i>	2.2%
		<i>Fusobacterium mortiferum</i>	1.7%
		<i>Faecalibacterium</i>	1.6%
		UCG-005	1.1%
		Fusobacteriaceae (Familia)	1.0%
		Ruminococcaceae (Familia)	0.9%
		<i>Peptoclostridium</i>	0.8%
		<i>Colidextribacter</i>	0.7%
		UCG-005	0.7%
		Oscillospiraceae (Familia)	0.6%
		<i>Clostridium perfringens/thermophilus</i>	0.5%
		<i>Fournierella</i>	0.5%
		Lachnospiraceae (Familia)	0.4%
		Oscillospiraceae (Familia)	0.3%
		Erysipelotrichaceae (Familia)	0.2%
		UCG-005	0.2%
		<i>Fournierella</i>	0.1%

* Se muestra la última asignación taxonómica alcanzada

Anexo D. Grupo núcleo de hembras y machos de focas de puerto (Cap. 2)

Tabla 5. Comparación del grupo núcleo de hembras y machos de focas de puerto.

Variable	Grupo núcleo	Taxa*	Abundancia relativa promedio
Sexo	Hembras	Sin taxa	
	Machos	<i>Alistipes</i>	7.9%
		<i>UCG-005</i>	5.1%
		Oscillospiraceae (Familia)	3.8%
		<i>Phascolarctobacterium</i>	4.7%
		Oscillospiraceae (Familia)	1.8%
		<i>Christensenellaceae_R-7_group</i>	1.3%
		<i>Alistipes</i>	0.9%
		Oscillospiraceae (Familia)	0.7%
		<i>UCG-002</i>	0.7%
		<i>UCG-005</i>	0.7%
		<i>Blautia</i>	0.5%
		<i>Fournierella</i>	0.3%
	Compartidos	<i>Fusobacterium perfoetens</i>	36.8%
		<i>Bacteroides</i>	19.3%
		<i>Alloprevotella</i>	18.2%
		<i>Parasutterella</i>	3.0%
		<i>Clostridium perfringens</i>	2.6%
		<i>Fusobacterium mortiferum/necrogenes</i>	2.7%
		<i>Bacteroides</i>	2.3%
		<i>Fusobacterium</i>	1.9%
		<i>Faecalibacterium</i>	1.7%
		<i>UCG-005</i>	1.1%
		Fusobacteriaceae (Familia)	1.1%
		Ruminococcaceae (Familia)	1.0%
		<i>Peptoclostridium</i>	0.9%
		<i>Colidextribacter</i>	0.8%
		<i>UCG-005</i>	0.8%
		<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	0.6%
		<i>Fournierella</i>	0.5%
		Lachnospiraceae (Familia)	0.4%
		Erysipelotrichaceae (Familia)	0.2%

* Se muestra la última asignación taxonómica alcanzada

Anexo E. Diversidad beta de las variables del Capítulo 2 con resultados estadísticamente no significativos

Diversidad beta entre hembras y machos durante el periodo de postmuda

Las hembras y los machos mostraron homogeneidad de dispersión en ambas matrices de distancia (UniFrac no ponderado, *betadisper*: $p=0.383$ y UniFrac ponderado, *betadisper*: $p=0.589$). Sin embargo, las variaciones en la composición de la microbiota entre ambos sexos no fueron significativas (Figura 58 A-B).

Diversidad beta de las hembras en el Estero de Punta Banda e Isla todos Santos

Las muestras de las hembras de las colonias del EPB y TS tuvieron homogeneidad de dispersión en ambas matrices de distancia (UniFrac no ponderado, *betadisper*: $p=0.702$ y UniFrac ponderado, *betadisper*: $p=0.940$). Sin embargo, las variaciones en la composición de la microbiota entre estas muestras no fueron significativas (Figura 58 C-D).

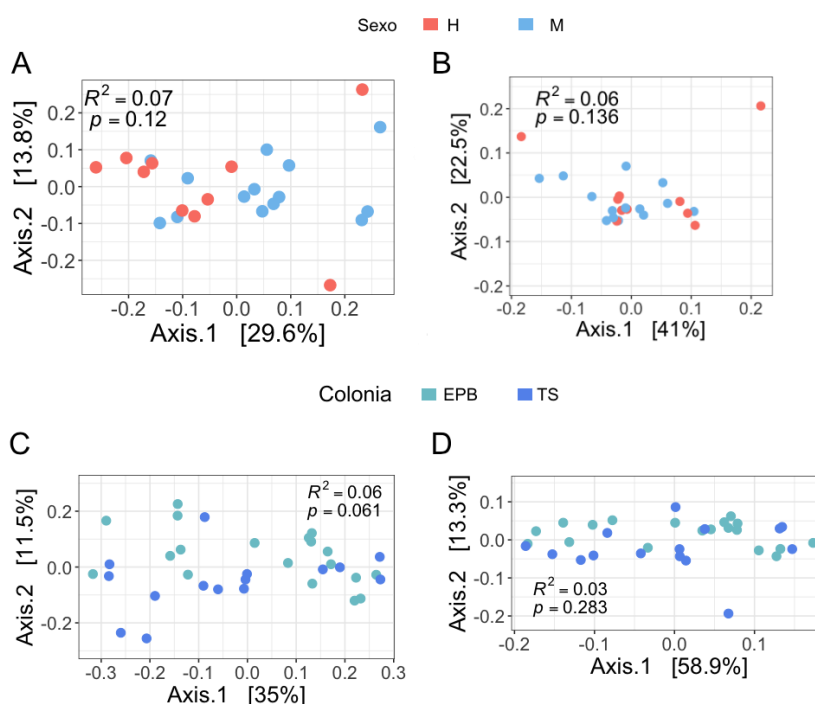


Figura 58. No se observaron cambios significativos en la diversidad microbiana entre hembras y machos de focas de puerto durante la etapa de postmuda (A-B), ni entre las hembras del Estero de Punta Banda e isla Todos Santos (C-D). Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las matrices de distancias UniFrac no ponderadas (A, C) y ponderadas (B, D). H= hembra, M= macho, TS=Isla Todos Santos, EPB= Estero de Punta Banda.

Anexo F. Diversidad de *phyla* en la muestra de vagina (Cap. 3)

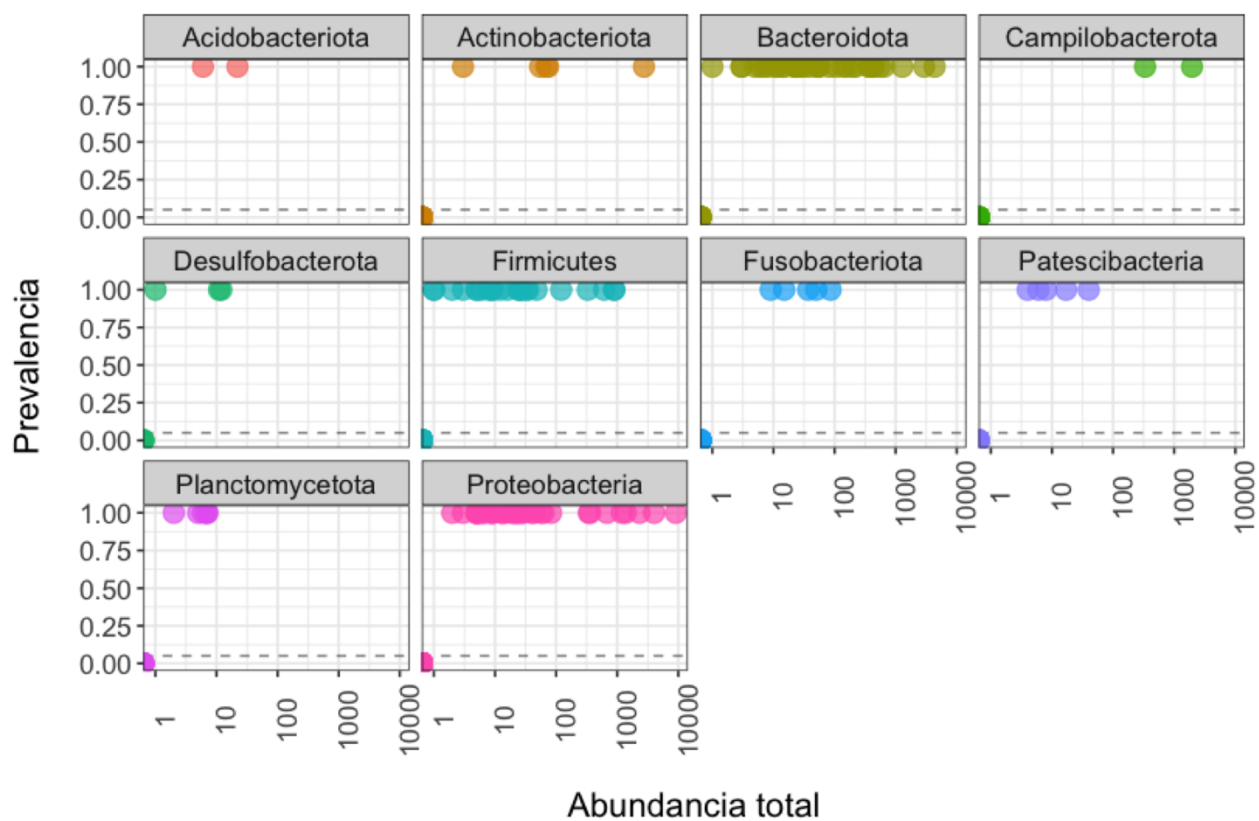


Figura 59. *Phyla* detectados en la muestra de vagina de foca de puerto de Isla Natividad (Capítulo 3). La línea punteada indica un umbral de prevalencia igual al 5%.

Anexo G. Diversidad de *phyla* en las muestras de crías y adultos de foca de puerto (Cap. 3)

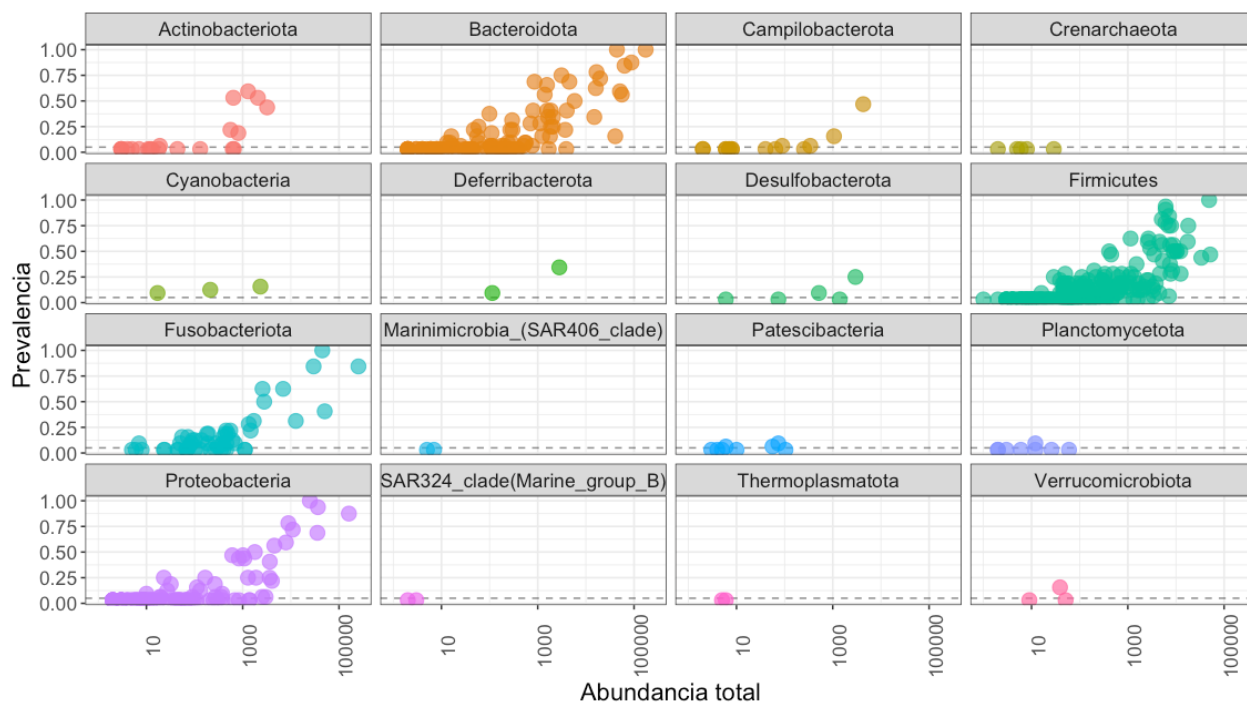


Figura 60. *Phyla* detectados en las muestras de crías y adultos de foca de puerto de Isla Natividad (Capítulo 3). La línea punteada indica un umbral de prevalencia igual al 5%.

Anexo H. Perfiles taxonómicos de las muestras del Capítulo 3

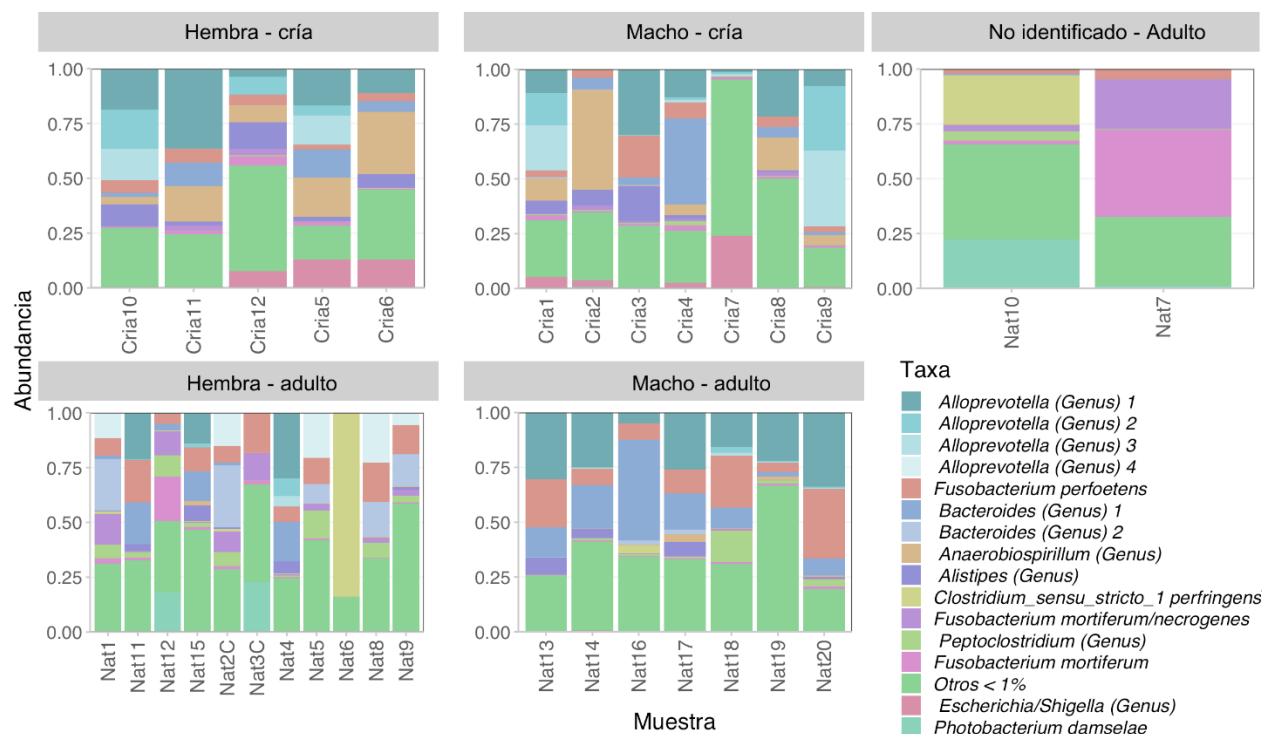


Figura 61. *Phyla* de mayor abundancia (>1%) identificado en las heces de crías y focas adultas de Natividad. *Taxa* con abundancias menores al 1% se encuentran agrupados en la categoría de “otros”.

Anexo I. Grupo núcleo de crías y adultos de focas de puerto (Cap. 3)

Tabla 6. Comparación del grupo núcleo de crías y adultos de focas de puerto.

Variable	Grupo núcleo	Taxa*	Abundancia relativa promedio
Edad	Crias	<i>Alloprevotella</i>	14.266
		<i>Alistipes</i>	5.240
		<i>Alloprevotella</i>	6.429
		<i>Escherichia/Shigella</i>	5.816
		<i>Sutterella</i>	1.776
		<i>massiliensis/stercoricanis/wadsworthensis</i>	
		<i>Alistipes</i>	1.629
		<i>Butyricoccus</i>	0.936
		<i>Fournierella</i>	0.356
		<i>Odoribacter</i>	0.682
		<i>Butyricoccus</i>	0.394
		<i>Anaerobiospirillum</i>	0.292
		<i>Collinsella intestinalis/stercoris</i>	0.158
		<i>Lachnoclostridium</i>	0.264
		<i>Actinomyces</i>	0.328
		Desulfovibrionaceae (Familia)	0.105
		<i>Butyricoccus</i>	0.164
	Adultos	<i>Colidextribacter</i>	1.346
		Lachnospiraceae (Familia)	0.818
		<i>Parasutterella</i>	0.756
		<i>Blautia</i>	0.565
		Oscillospiraceae (Familia)	0.474
	Compartidos	<i>Fusobacterium perfoetens</i>	9.692
		<i>Bacteroides</i>	8.561
		<i>Anaerobiospirillum</i>	5.490
		<i>Fusobacterium mortiferum/necrogenes</i>	2.378
		<i>Peptoclostridium</i>	2.541
		<i>Fusobacterium mortiferum</i>	1.730
		<i>Bacteroides</i>	2.214
		<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	1.578
		Fusobacteriaceae (Familia)	1.219
		<i>Fusobacterium</i>	0.337
		<i>Lachnoclostridium</i>	0.332
		Erysipelotrichaceae (Familia)	0.271

* Se muestra la última asignación taxonómica alcanzada

Anexo J. Diversidad beta de las variables del Capítulo 3 con resultados estadísticamente no significativos

Diversidad beta entre sexos

Las hembras y los machos mostraron homogeneidad de dispersión en ambas matrices de distancia (UniFrac no ponderado, *betadisper*: $p=0.648$ y UniFrac ponderado, *betadisper*: $p=0.503$). Sin embargo, no existieron diferencias significativas en la composición de la microbiota entre hembras y machos de focas de puerto (Figura 62 A-B).

Diversidad beta entre los sexos de las crías

Cuando no se tuvo en cuenta el número de microorganismos, la variación individual en la estructura de la comunidad fue mayor para las crías macho que para las hembras (UniFrac no ponderado, prueba de *betadisper*: $p=0.025$). La dispersión individual fue homogénea cuando se evaluó la abundancia de microorganismos (*betadisper*: $p=0.665$); sin embargo, las diferencias en la composición de la microbiota entre los sexos de las crías no fueron significativas (Figura 62 C-D).

Diversidad beta entre los sexos de los adultos

Las hembras y los machos adultos mostraron homogeneidad de dispersión en ambas matrices de distancia (UniFrac no ponderado, *betadisper*: $p=0.233$ y UniFrac ponderado, *betadisper*: $p=0.982$). Sin embargo, las variaciones en la composición de la microbiota entre las hembras y los machos adultos no fueron significativas (Figura 62 E-F).

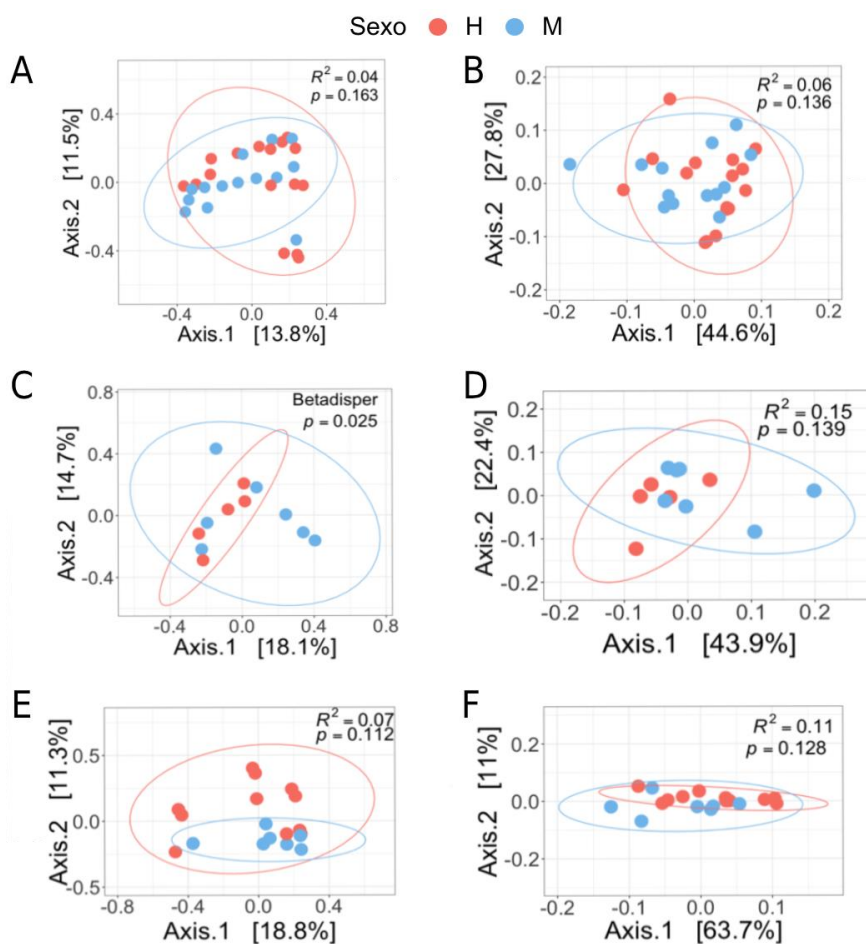


Figura 62. No se observaron cambios significativos en la diversidad microbiana entre los sexos de las focas de puerto (A-B), entre crías hembras y machos (C-D), o entre hembras y los machos adultos (E-F). Análisis de coordenadas principales (PCoA) basados en matrices de distancias UniFrac no ponderadas (A, C, E) y ponderadas (B, D, F). Las elipses representan un intervalo de confianza del 90%. H= hembra, M= macho.

Anexo K. Comparaciones de las variables edad y sexo (Cap. 3)

Tabla 7. Comparaciones por pares de la prueba PERMANOVA entre las interacciones de edad y sexo, basadas en las matrices de distancia UNIFRAC.

Distancia	Variables	Sums of Sqs	F. Model	R ²	p-valor	p-ajustado
Unweigthed UNIFRAC	Cría macho vs cría hembra	0.307	1.089	0.098	0.35	1
	Macho adulto vs hembra adulta	0.443	1.284	0.074	0.138	0.828
	Cría macho vs hembra adulta	0.948	2.742	0.146	0.001	0.006*
	Cría macho vs Macho adulto	0.764	2.481	0.171	0.001	0.006*
	Cría hembra vs hembra adulta	0.791	2.387	0.146	0.001	0.006*
	Cría hembra vs macho adulto	0.620	2.213	0.181	0.004	0.024*
Weigthed UNIFRAC	Cría macho vs cría hembra	0.064	1.690	0.145	0.114	0.684
	Macho adulto vs hembra adulta	0.037	1.957	0.109	0.129	0.774
	Cría macho vs hembra adulta	0.274	9.854	0.381	0.001	0.006*
	Cría macho vs macho adulto	0.204	6.530	0.352	0.001	0.006*
	Cría hembra vs hembra adulta	0.159	7.314	0.343	0.001	0.006*
	Cría hembra vs macho adulto	0.084	3.574	0.263	0.007	0.042*

*Diferencias significativas

Anexo L. ASVs compartidos entre adultos (hembras/machos) y crías (Cap. 3)

Tabla 8. ASVs compartidos entre hembras adultas- crías y entre machos adultos -crías

Comparación	Taxa*	Abundancia relativa promedio
Hembra adulta vs cría	Ruminococcaceae (Familia)	0.454%
	<i>Psychrobacter</i>	0.417%
	<i>Bacteroides dorei/fragilis</i>	0.332%
	<i>Anaeroplasma</i>	0.194%
	<i>Anaerobiospirillum</i>	0.242%
	<i>NK4A214_group</i>	0.154%
	<i>Psychrobacter lutiphocae/phenylpyruvicus</i>	0.159%
	<i>Photobacterium damsela</i>	0.067%
	<i>Anaerobiospirillum</i>	0.068%
	<i>Alloprevotella</i>	0.041%
	<i>Fusobacterium</i>	0.025%
	<i>Tuzzerella</i>	0.025%
	Oscillospiraceae (Familia)	0.017%
	<i>Alloprevotella</i>	0.022%
	<i>Bacteroides</i>	0.017%
	<i>Bacteroides</i>	0.007%
	<i>Helicobacter</i>	0.007%
	Anaerovoracaceae (Familia)	0.004%
	<i>Bacteroides</i>	0.004%
	Oscillospiraceae (Familia)	0.005%
	Ruminococcaceae (Familia)	0.003%
	Oscillospiraceae (Familia)	0.003%
	<i>Campylobacter insulaenigrae</i>	0.003%
	<i>Streptococcus marimammalium</i>	0.004%
	<i>SM1A02</i>	0.002%
	<i>Marinobacter</i>	0.002%
	<i>Porphyromonas</i>	0.001%
	Clostridia_UCG-014 (Orden)	0.001%
Macho adulto vs cría	Rikenellaceae (Familia)	0.912%
	<i>Odoribacter</i>	0.445%
	<i>Alloprevotella</i>	0.346%
	<i>Megamonas</i>	0.303%
	<i>Fusobacterium</i>	0.274%
	Gastranaerophilales (Orden)	0.149%
	<i>Alloprevotella</i>	0.146%
	Oscillospiraceae (Familia)	0.048%
	<i>A. phocae/phocisimile/pinnipediorum/wilhelmae</i>	0.072%
	<i>Alistipes</i>	0.039%
	<i>Bacteroides</i>	0.027%
	Bacteroidales (Orden)	0.019%
	<i>Flavonifractor</i>	0.006%
	Ruminococcaceae (Familia)	0.005%
	<i>Intestinimonas</i>	0.005%

* Se muestra la última asignación taxonómica alcanzada

Anexo M. Diversidad de *phyla* detectados en la muestras de heces de los pinnípedos en México (Cap. 4)

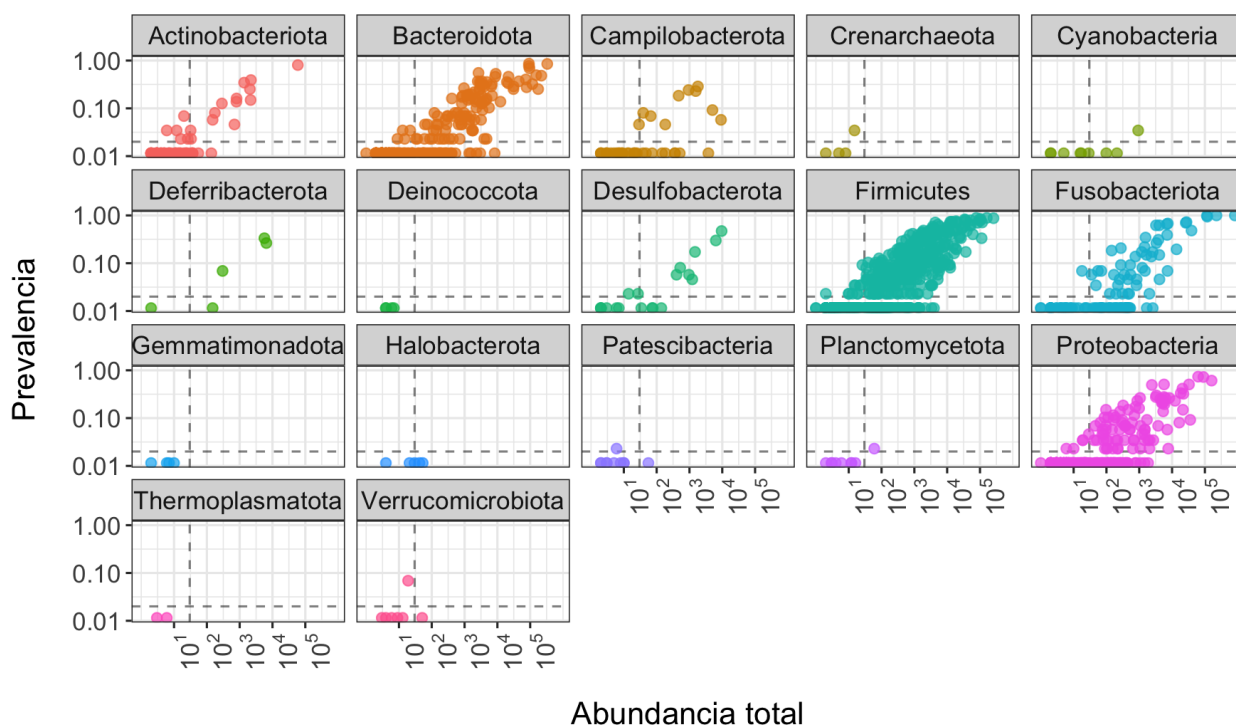


Figura 63. *Phyla* detectados en las muestras de los pinnípedos en México (Capítulo 4). La línea punteada indica un umbral de 30 conteos y una prevalencia igual a 2.

Anexo N. Grupo núcleo de microorganismos en las muestras de heces de las especies de pinnípedos en México (Cap. 4)

Tabla 9. Grupo núcleo de microorganismos del intestino por especie.

Variable	Grupo núcleo	Taxa*	Variable	Grupo núcleo	Taxa*
Especie	FP	<i>Fusobacterium</i>	Especie	LF	<i>P. damsela</i>
		Ruminococcaceae			<i>Bacteroides</i> (5)
	EM	Oscillospiraceae			<i>Negativibacillus</i>
		<i>Alistipes</i>			UCG-005 (3)
		<i>Fusobacterium</i>			Ruminococcaceae
		<i>Clostridium sensu stricto 2</i>			<i>Anaerobiospirillum</i>
		<i>Odoribacter</i>			<i>Colidextribacter</i>
		<i>Tuzzerella</i>			<i>Parabacteroides</i>
		<i>Negativibacillus</i>			<i>Fusobacterium</i> (2)
	LC	<i>Bacteroides</i> (3)			<i>Lachnoclostridium</i>
		<i>Alloprevotella</i> (3)			<i>Ruegeria</i>
		<i>Clostridium sensu stricto 1</i>			Oscillospiraceae (2)
		<i>Fournierella</i> (2)			Rhizobiaceae
		<i>Butyricoccus</i>		Core	<i>F. perfoetens</i>
		UCG-005 (2)			<i>F. mortiferum/necrogenes</i>
		<i>Phascolarctobacterium</i>			<i>Colidextribacter</i>
		<i>Sutterella</i>			<i>F. mortiferum</i>
		<i>Parasutterella</i>			
		Ruminococcaceae			

* Se muestra la última asignación taxonómica alcanzada

Anexo O. Grupo núcleo de microorganismos en las muestras de heces de las familias de pinnípedos en México (Cap. 4)

Tabla 10. Grupo núcleo de microorganismos del intestino por familia de pinnípedo.

Variable	Grupo núcleo	Taxa*	Variable	Grupo núcleo	Taxa*
Familia	Core	<i>F. perfoetens</i>	Familia	Otariidae	<i>C. intestinalis/ stercoris</i>
		<i>Bacteroides</i>			Lachnospiraceae
		<i>F. mortiferum/ necrogenes</i>			<i>Blautia</i>
		<i>Colidextribacter</i>			UCG-002
		Fusobacteriaceae			<i>Fusobacterium</i> (5)
		<i>F. mortiferum</i>			<i>Tuzzerella</i>
	Phocidae	Sin grupo núcleo			<i>Paludicola</i>
	Otariidae	<i>Peptoclostridium</i>			<i>NK4A214_group</i>
		<i>Alloprevotella</i>			<i>Marvinbryantia</i>
		<i>Photobacterium</i>			<i>Negativibacillus</i>
		<i>Phascolarctobacterium</i>			Erysipelotrichaceae
		<i>Alistipes</i> (2)			Oscillospiraceae (2)
		<i>Bacteroides</i> (2)			<i>Fournierella</i>
		Oscillospirales			<i>Peptoclostridium</i> (3)
		UCG-005 (7)			<i>Anaerobiospirillum</i>
		<i>S. massiliensis</i> <i>/stercoricanis/</i> <i>wadsworthensis</i>			Ruminococcaceae
		<i>C. perfringens</i>			<i>Colidextribacter</i>
		<i>Lachnoclostridium</i>			Fusobacteriaceae

* Se muestra la última asignación taxonómica alcanzada