

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



**Maestría en Ciencias en
Ciencias de la Vida
con orientación en Biotecnología marina**

El microbioma intestinal de la foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*) y su relación con la dieta: caracterización mediante secuenciación masiva

Tesis

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

Presenta:

Arlette Marimar Pacheco Sandoval

Ensenada, Baja California, México

2017

Tesis defendida por

Arlette Marimar Pacheco Sandoval

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. María Asunción Lago Lestón
Directora de tesis

Dra. Yolanda Schramm Urrutia

Dra. Gisela Heckel Dziendzielewski

Dr. Axayácatl Rocha Olivares



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Arlette Marimar Pacheco Sandoval © 2017

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Arlette Marimar Pacheco Sandoval** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología marina.

El microbioma intestinal de la foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*) y su relación con la dieta: caracterización mediante secuenciación masiva

Resumen aprobado por:

Dra. María Asunción Lago Lestón

Directora de tesis

La microbiota intestinal es considerada la comunidad microbiana más diversa del cuerpo y la dieta es uno de los principales factores que afectan su composición. A pesar del importante papel que desempeña esta comunidad en la megafauna, su diversidad en pinnípedos ha sido poco estudiada. El objetivo del presente estudio consistió en la caracterización del microbioma intestinal de cinco colonias de la foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*), ubicadas en Baja California, y su relación con la dieta mediante la secuenciación de la región V4 del gen 16S ARNr y de regiones específicas (16S ADNmt y 18S ARNr) para la detección de presas de la colonia del Estero de Punta Banda. Las librerías se generaron mediante un protocolo de dos pasos de PCR y la secuenciación se realizó en el equipo MiSeq de Illumina®. En el análisis del microbioma se utilizó el software QIIME con la base de datos SILVA 123 como referencia, y en la caracterización de la dieta se realizó un BLASTn con la base de datos de nucleótidos de NCBI. Se utilizó el programa PICRUST para inferir las funciones que ejerce la microbiota intestinal en la foca de puerto. Los resultados mostraron que los filo de mayor abundancia fueron Firmicutes (42%), Bacteroidetes (37%) y Fusobacteria (14%); la dominancia del filo Firmicutes podría relacionarse con la necesidad que tienen las focas de almacenar grasa para la termorregulación. De 181 géneros identificados, once estuvieron presentes en todas las colonias, los cuales pueden considerarse el grupo núcleo de la microbiota intestinal de la foca de puerto. De éstos, el género *Bacteroides* presentó una alta abundancia, que es característica de una dieta alta en proteínas. La presencia de miembros de la familia Ruminococcaceae se ha relacionado con dietas altas en grasas poliinsaturadas encontradas en peces que almacenan grasas en el músculo en altas concentraciones. En el análisis funcional no se detectaron componentes relacionados con un alto consumo de invertebrados (p. ej. quitinasas, trehalasas), estos organismos tuvieron un consumo incidental en la colonia del EPB. Además, la mayoría de las colonias presentaron rutas relacionadas con la degradación de contaminantes ambientales persistentes. Los resultados demuestran que el estudio del microbioma intestinal sirve como un indicador de dietas a largo plazo, del estado de salud del organismo, y podría posicionar a la foca de puerto como un centinela ambiental en Baja California.

Palabras clave: *Phoca vitulina richardii*, microbiota intestinal, dieta, secuenciación masiva, predicción funcional, Baja California.

Abstract of the thesis presented by **Arlette Marimar Pacheco Sandoval** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology.

**Relation between gut microbiome and diet in the harbor seal (*Phoca vitulina richardii*):
Characterization using high-throughput DNA sequencing**

Abstract approved by:

Dra. María Asunción Lago Lestón

Thesis Director

Gut microbiota is considered the most diverse microbial community of the body, and diet is one of the main factors that affect its composition. Despite the critical role that this community has in megafauna, little is known about its diversity in pinnipeds. The objective of the present study was to characterize and relate the gut microbiome of five colonies of the Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardii*) located in Baja California with their diet, by sequencing the V4 region of the prokaryote 16S rRNA gene and specific regions (16S mtDNA y 18S RNAr) for prey detection of the colony at Punta Banda Estuary (PBE). Libraries were generated using a two-step PCR protocol and were sequenced on an Illumina MiSeq equipment. Microbiome analysis was carried out with QIIME software and SILVA 123 as the reference database. For diet characterization, a BLASTn was performed with the NCBI nucleotide database. PICRUSt software was used to infer the functions that microbiota exerts in the harbor seal. Results showed that dominant phyla were: Firmicutes (42%), Bacteroidetes (37%) and Fusobacteria (14%). The dominance of the phylum Firmicutes in harbor seals may confer a predisposition towards body fat accumulation for thermoregulation. From 181 genera identified, eleven were present in all colonies, which can be seen as the core members of the harbor seal's gut microbiota. Of these, the genus *Bacteroides* showed a great abundance, which is characteristic of a high protein-rich diet. The presence of members of the Ruminococcaceae family has been related to diets high in polyunsaturated fats found in fishes that stores fats in muscle at high concentrations. In the functional analysis, there were no components associated with a high consumption of invertebrates (e.g., chitinases, trehalases). This kind of organisms had an incidental consumption in the PBS's colony. Also, most of the colonies presented routes related to the degradation of persistent environmental pollutants. These results show that gut microbiome studies may be useful as an indicator of long-term diet and health status of the organism, and may place the harbor seal as an environmental sentinel in Baja California.

Keywords: *Phoca vitulina richardii*, gut microbiota, diet, next-generation sequencing, functional prediction, Baja California

Dedicatoria

A mi familia, por enseñarme que lo importante en esta vida es
creer en uno mismo y que todo obstáculo lo
podemos superar si estamos juntos.
Los llevo en el corazón en todo momento.

*“La oscuridad se disipaba y finalmente volvía la claridad y Dios
permanecía en un punto de luz que brillaba en mi corazón.
Y yo, seguía amando.”*
La vida de Pi

Agradecimientos

Gracias a CONACYT por la beca otorgada con número de registro 589142 durante el periodo 2015-2017, a CICESE por haberme aceptado en el posgrado de Ciencias de la Vida y por el apoyo económico en los últimos meses.

SEMARNAT por los permisos de colecta otorgados: SGPA/DGVS/12269/13 y SGPA/DGVS/08370/14.

Dra. María Asunción Lago Lestón, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por la confianza que me tuvo a lo largo del trabajo de tesis, gracias por el apoyo, por el tiempo dedicado y sobre todo por creer en mí.

A los miembros de mi comité, por ser una parte importante de esta tesis que fue toda una aventura. Gracias porque desde el principio creyeron en mí y me apoyaron en cada uno de los avances, por sus invaluable correcciones, consejos y preguntas que complementaron este trabajo.

Dra. Yolanda Schramm Urrutia, por significar mi regreso al estudio de los mamíferos marinos, gracias por esa primera entrevista y por proponerme este trabajo de tesis, que unió los temas que me apasionan. Gracias por invitarme a formar parte de ICMME.

Dra. Gisela Heckel Dziendzielewski, por la confianza que ha tenido en mí desde la materia de “Ecología y conservación de mamíferos marinos”, por estar al pendiente de mis avances y por el buen trato en todo momento.

Dr. Axayácatl Rocha Olivares, por sus invaluable comentarios que complementaron este trabajo, por el tiempo dedicado y por el apoyo que me brindó.

Dra. Jennyfers Chong Robles, por toda la ayuda en las preparaciones de las librerías, gracias por la paciencia y el tiempo extra dedicado a este trabajo. Por preocuparte en que entendiera cada paso del proceso, por creer en mí y fomentarme a ser mejor estudiante. Gracias, sobre todo, por ser mi amiga.

Dr. Dante Alberto Magdaleno Moncayo, por el curso intensivo de QIIME que impartió y por resolver las múltiples dudas que surgieron en el camino.

M. en C. Elizabeth Brassea Pérez, por ser el antecedente de este trabajo, gracias por compartir tus datos y muestras, por el apoyo en la identificación de otolitos y en múltiples aspectos de esta tesis. Por estar al pendiente de mis avances y por brindarme tu amistad.

A mis amigos de la maestría que me apoyaron en una de las etapas más difíciles de mi vida, porque hicieron que tuviera confianza en mí y por hacerme reír en todo momento. A mis amigas Erika y Adriana, que estuvieron siempre al pendiente de mí, por el apoyo invaluable, por escucharme y aguantar mis locuras. Gracias a todos ustedes porque me hicieron comprender lo importante de la amistad, gracias por su ayuda.

A Edgar, por su ayuda con el programa R, pero en especial por todo lo que hemos pasado.

A una amiga muy especial, que me hizo creer en mí y tomar el coraje para salir adelante, si este trabajo se finalizó es gracias a su apoyo incondicional, a su comprensión y por hacerme ver que hay cosas en esta vida que uno no puede evitar, pero sí afrontar.

Finalmente, este trabajo no se habría concluido de no ser por el pilar de mi vida, mi familia. A ustedes les debo mis éxitos y mis alegrías. Gracias por no dejar que me rindiera y por los ánimos en estos años para continuar con mis sueños, sé que el camino a veces no ha sido fácil, pero estando unidos todo es mejor. No hay palabras que expresen mi agradecimiento y amor. Ustedes son y serán, el motivo que me impulse a ser mejor persona.

Tabla de contenido

| | Página |
|---|-----------|
| Resumen en español..... | ii |
| Resumen en inglés..... | iii |
| Dedicatoria | iv |
| Agradecimientos | v |
| Lista de figuras..... | x |
| | |
| Capítulo 1. Introducción | 1 |
| 1.1 Antecedentes | 4 |
| 1.2 Justificación | 8 |
| 1.3 Hipótesis..... | 9 |
| 1.4 Objetivos | 9 |
| 1.4.1 Objetivo general..... | 9 |
| 1.4.2. Objetivos específicos..... | 9 |
| | |
| Capítulo 2. Metodología..... | 11 |
| 2.1 Colección de muestras | 11 |
| 2.2 Extracción de ADN..... | 11 |
| 2.3 Preparación de las bibliotecas de secuenciación | 12 |
| 2.3.1 Microbioma | 12 |
| 2.3.2 Dieta de la colonia del Estero de Punta Banda | 12 |
| 2.4 Purificación, normalización y cuantificación | 14 |
| 2.4.1 Microbioma | 14 |
| 2.4.2 Dieta | 15 |
| 2.5 Desnaturalización y preparación de la solución de carga | 16 |
| 2.5.1 Microbioma | 16 |
| 2.5.2 Dieta | 17 |
| 2.6 Secuenciación..... | 17 |
| 2.7 Procesamiento y análisis de las lecturas del microbioma..... | 18 |

| | |
|--|-----------|
| 2.8 Análisis de la diversidad microbiana | 19 |
| 2.9 Análisis de la dieta de la colonia del Estero de Punta Banda | 20 |
| 2.9.1 Análisis estadístico | 21 |
| 2.10 Identificación de presas por restos sólidos | 22 |
| 2.11 Relación dieta- microbioma | 22 |
| 2.11.1 Análisis funcional..... | 22 |
| 2.11.1.2 Análisis estadístico | 23 |
| Capítulo 3. Resultados | 24 |
| 3.1 Extracción de ADN de las muestras de la colonia del EPB | 24 |
| 3.2 Amplificación del ADN..... | 24 |
| 3.2.1 Microbioma | 24 |
| 3.2.2 Dieta | 25 |
| 3.3 Cuantificación..... | 26 |
| 3.4 Secuenciación..... | 26 |
| 3.5 Análisis de la diversidad bacteriana de <i>P. v. richardii</i> , por colonia, basada en la secuenciación del gen 16S ARNr..... | 27 |
| 3.5.1 Colonia del Estero de Punta Banda | 30 |
| 3.5.2 Colonia de la Isla Todos Santos | 31 |
| 3.5.3 Colonia de la Isla San Jerónimo | 32 |
| 3.5.4 Colonia de la Isla Natividad | 33 |
| 3.5.5 Colonia de la Isla San Roque..... | 34 |
| 3.6 Diversidad bacteriana general de <i>P. v. richardii</i> basada en la secuenciación del gen 16S ARNr | 35 |
| 3.7 Comparación de las comunidades bacterianas fecales de las distintas colonias de foca de puerto..... | 39 |
| 3.8 Análisis de la dieta de la colonia del EPB..... | 42 |
| 3.8.1 Comparación de los métodos de identificación de presas | 46 |
| 3.9 Relación dieta-microbioma | 47 |
| 3.9.1 Análisis funcional del microbioma de la foca de puerto | 47 |

| | |
|--|----|
| Capítulo 4. Discusión | 52 |
| 4.1 Cambios en la composición microbiana: producto de variaciones en los factores naturales que moldean a la comunidad intestinal..... | 52 |
| 4.2 La estructura de la comunidad microbiana intestinal difiere entre las colonias de foca de puerto..... | 53 |
| 4.3 La dieta como factor clave en la composición de la comunidad microbiana intestinal | 56 |
| 4.4 El estudio del microbioma intestinal revela posibles enfermedades en la foca de puerto | 60 |
| 4.5 Alta riqueza de especies presa en la colonia del Estero de Punta Banda | 61 |
| 4.6 La foca de puerto como centinela ambiental | 64 |
| | |
| Capítulo 5. Conclusiones | 67 |
| Literatura citada | 69 |
| Anexo A | 79 |
| Anexo B | 80 |
| Anexo C | 81 |
| Anexo D | 82 |
| Anexo E | 83 |

Lista de figuras

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Imagen ilustrativa de una foca de puerto (<i>Phoca vitulina</i>)..... | 1 |
| 2 | Ubicación geográfica de las distintas colonias de estudio de <i>P. vitulina richardii</i> en la costa occidental de la península de Baja California | 11 |
| 3 | Estrategia de dos PCRs (<i>Two-step PCR Approach</i>) | 14 |
| 4 | Productos de PCR de la región 16S ARNr..... | 25 |
| 5 | Productos del segundo paso de PCR (indexado) de los amplicones de cefalópodos (Ce), cordados (Ch) y Eucariotas (Euk) de las muestras del Estero de Punta Banda..... | 26 |
| 6 | Promedio de la abundancia relativa de los principales fila bacterianos encontrados en las distintas colonias de focas de puerto. | 28 |
| 7 | Fila bacteriana dominante encontrada en las distintas muestras de las colonias de focas de puerto. | 29 |
| 8 | Géneros bacterianos dominantes encontrados en las distintas muestras de las colonias de focas de puerto. | 30 |
| 9 | Composición porcentual de la comunidad microbiana fecal, a nivel de género, de la colonia de focas de puerto del Estero de Punta Banda basado en los resultados de secuenciación masiva..... | 31 |
| 10 | Composición porcentual de la comunidad microbiana fecal, a nivel de género, de la colonia de focas de puerto de la Isla Todos Santos Sur basado en los resultados de secuenciación masiva..... | 32 |
| 11 | Composición porcentual de la comunidad microbiana fecal, a nivel de género, de la colonia de focas de puerto de la Isla San Jerónimo basado en los resultados de secuenciación masiva..... | 33 |
| 12 | Composición porcentual de la comunidad microbiana fecal, a nivel de género, de la colonia de focas de puerto de la Isla Natividad basado en los resultados de secuenciación masiva. | 34 |
| 13 | Composición porcentual de la comunidad microbiana fecal, a nivel de género, de la colonia de focas de puerto de la Isla San Roque basado en los resultados de secuenciación masiva | 35 |
| 14 | Composición porcentual de la comunidad microbiana fecal de las 5 colonias de focas de puerto a nivel de filo basado en los resultados de secuenciación masiva. | 36 |
| 15 | Enriquecimiento del filo Firmicutes en la colonia de focas de Todos Santos en comparación con la colonia de San Roque. | 36 |
| 16 | Composición porcentual de la comunidad microbiana fecal de las 5 colonias de focas de puerto a nivel de género basado en los resultados de secuenciación masiva | 37 |

| | | |
|----|---|----|
| 17 | Composición porcentual del grupo núcleo bacteriano de las 5 colonias de focas de puerto a nivel de género..... | 38 |
| 18 | Número de OTUs, nivel género, únicos y compartidos entre las 5 colonias de focas de puerto del estudio..... | 39 |
| 19 | Curva de rarefacción por muestra, basado la cantidad de especies observadas (OTUs). | 40 |
| 20 | Riqueza microbiana en las diferentes colonias de focas de puerto..... | 40 |
| 21 | Diversidad microbiana en la microbiota intestinal de cada colonia. | 41 |
| 22 | Análisis de coordenadas principales de la comunidad microbiana fecal de las colonias de foca de puerto basadas en la matriz de distancias filogenéticas Unifrac. | 42 |
| 23 | Número total de especies presa encontradas por muestra. | 43 |
| 24 | Curva de acumulación de especies obtenidas y esperadas (Chao2). | 43 |
| 25 | Gráfico porcentual de los principales grupos de presas consumidas en la colonia de focas de puerto del Estero de Punta Banda. | 44 |
| 26 | Consumo de presas por grupo basado en el porcentaje de frecuencia de ocurrencia (%FO) | 45 |
| 27 | Dendrograma derivado del índice de Jaccard basado en la matriz de datos de presencia/ausencia de presas..... | 46 |
| 28 | Comparación de la riqueza de especies presa obtenida en ambos métodos de detección... | 47 |
| 29 | Categorías funcionales encontradas en los microbiomas de la foca de puerto | 48 |
| 30 | Análisis de componentes principales de la comunidad microbiana de las colonias de foca de puerto basado en los datos del perfil funcional obtenidos en PICRUST | 48 |
| 31 | Rutas metabólicas enriquecidas entre las colonias de focas de puerto. | 50 |
| 32 | Rutas enriquecidas en algunas colonias de foca de puerto relacionadas con enfermedades. | 51 |
| 33 | Principales factores que moldean la composición microbiana intestinal en la foca de puerto | 52 |
| 34 | Diferentes modelos de microbiomas núcleos propuestos | 55 |
| 35 | Características observadas en el microbioma de personas obesas y delgadas..... | 57 |
| 36 | Principales efectos que ejercen la dieta, el ambiente y la salud, en la microbiota intestinal de la foca de puerto presente en Baja California. | 66 |
| 37 | Número de presas únicas y compartidas entre las 5 colonias de focas de puerto del estudio | 82 |

Lista de tablas

| Tablas | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Comparación entre las distintas técnicas disponibles para el análisis de la dieta | 5 |
| 2 | <i>Primers</i> utilizados para la identificación de las presas y del microbioma de <i>P. v. richardii</i> | 13 |
| 3 | Resultados de la cuantificación del ADN obtenido de las muestras fecales de la colonia del EPB | 24 |
| 4 | Condiciones para la amplificación de las regiones de interés..... | 79 |
| 5 | Condiciones para el segundo paso de PCR..... | 79 |
| 6 | Fila bacteriana encontrada en el microbioma intestinal de la foca de puerto | 80 |
| 7 | Especies presa encontradas en las muestras fecales de las focas de puerto del EPB.. | 81 |
| 8 | Especies presa de la colonia de focas de puerto del EPB detectadas por medio del análisis de restos sólidos. Además, se incluye la comparación del %FO obtenido de cada presa con los distintos métodos de caracterización de la dieta. | 83 |

Capítulo 1. Introducción

Los mamíferos marinos comprenden un grupo polifilético de especies agrupados en tres órdenes: Cetacea, Sirenia y Carnivora. A pesar de formar un grupo relativamente pequeño (Pompa *et al.*, 2011), poseen gran importancia global al ser considerados “centinelas ambientales”, por su habilidad para detectar y responder rápidamente a los cambios en su entorno (Moore, 2008).

En el orden Carnivora se encuentran clasificadas tres familias de pinnípedos (organismos con extremidades en forma de aleta): Otariidae (lobos marinos y lobos finos), Odobenidae (morsas) y Phocidae (focas) (Rice, 2007). Los miembros de la familia Phocidae se caracterizan por la ausencia de pabellón auditivo y por tener extremidades posteriores dirigidas hacia atrás que no son funcionales para la locomoción terrestre (Hammill, 2009). Esta familia está conformada por 19 especies agrupadas en dos subfamilias: Monachinae, focas del hemisferio sur con 9 especies, y Phocinae, focas del hemisferio norte, que incluye las 10 especies restantes (Higdon *et al.*, 2007).

Reino: Animalia
Filo: Chordata
Clase: Mammalia
Orden: Carnivora
Superfamilia: Pinnipedia
Familia: Phocidae
Subfamilia: Phocinae
Nombre científico:
Phoca vitulina



Figura 1. Imagen ilustrativa de una foca de puerto (*Phoca vitulina*). Modificado de: Gene Barclift (2014).

La foca de puerto (*Phoca vitulina*) posee un cuerpo fusiforme pequeño (1.8 m de longitud, aproximadamente) con manchas oscuras de diferentes tamaños y formas. La coloración del pelaje varía con la latitud y entre individuos, desde tonos café claro y blancos, hasta negros (Fig. 1). El dimorfismo sexual es poco notorio, los machos son ligeramente más grandes que las hembras, el grosor del cuello es mayor y la abertura genital se encuentra justo debajo del abdomen (Allen *et al.*, 2011).

De todos los pinnípedos, la foca de puerto (*Phoca vitulina*) es la especie con la distribución más amplia. Se localiza en aguas costeras del Hemisferio Norte, desde el Ártico (78°N) hasta el Trópico de

Cáncer (26°N) (Allen *et al.*, 2011). Actualmente se reconocen tres subespecies: *P. v. vitulina*, *P. v. mellonae* y *P. v. richardii* que se distribuyen en el Océano Atlántico, en lagos de la Península Ungava (Canadá) y en el Océano Pacífico, respectivamente (Committee on Taxonomy, 2016). La población más sureña se encuentra en la Isla Asunción, Baja California Sur, México (Lubinsky, 2010).

En México, *P. v. richardii* se localiza en algunas zonas de la costa de Baja California y en nueve islas: Coronado, Todos Santos, San Martín, San Benito, Cedros, Asunción, San Jerónimo, Natividad y San Roque, siendo estas tres últimas islas las que presentan la mayor abundancia poblacional (Lubinsky, 2010).

Debido a su amplia distribución, *P. vitulina* se encuentra en una gran variedad de ambientes, por lo que el tipo de presas que consume varía entre colonias (Burns, 2007). Esta especie, que ocupa un nivel alto en la red trófica, se considera un depredador oportunista y se alimenta de especies bentónicas y pelágicas, principalmente de peces y calamares. Los sitios de alimentación de la foca de puerto se encuentran cerca de sus zonas de descanso (Burns, 2007).

Si bien se distribuye en una gran variedad de hábitats, tanto terrestres como marinos, presenta una clara fidelidad por áreas específicas durante las temporadas de reproducción y muda, lo que la hace altamente vulnerable a cualquier cambio en su entorno. Sin embargo, en zonas urbanizadas que poseen una alta abundancia de alimento, son capaces de tolerar la presencia humana con el fin de aumentar las oportunidades de alimentación (Jansen *et al.*, 2015). En algunos casos, como en el Estero de Punta Banda, Baja California, evaden con mucha frecuencia a las actividades humanas, lo cual interrumpe actividades de importancia biológica, como la lactancia (Ruiz Mar, 2016).

El continuo estrés al que puede estar sometida la foca de puerto por causas antropogénicas (p. ej. pérdida del hábitat, falta de alimento, exposición a químicos) deprime su sistema inmunológico y provoca que sea altamente vulnerable a patógenos como bacterias, hongos y virus (Ross *et al.*, 1996). Un estudio realizado recientemente por Nelson *et al.* (2015), sugiere que el conocimiento del microbioma puede ser un buen indicador del estado de salud, tanto del individuo como de la población, porque durante el transcurso de una enfermedad la composición de la microbiota se altera después de haberse expuesto a un agente patógeno en particular.

El estudio del microbioma del organismo no sólo sirve como un indicador de salud del individuo, además, podría ayudar a detectar diferencias genéticas entre poblaciones. La comunidad microbiana puede ser específica de la especie, como resultado de millones de años de coevolución. 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).

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 desde el nacimiento, donde la colonización microbiana comienza en el canal de parto, hasta la vida adulta. La presencia de estos microorganismos no es una mezcla aleatoria, sino más bien, una comunidad microbiana que coexiste y que, en circunstancias ideales, es benéfica para el huésped (Matamoros *et al.*, 2012) .

La mayoría de los estudios sobre la microbiota se enfocan en la comunidad presente en el intestino y se han realizado en organismos modelo (Wilson y Blitchington, 1996). Se ha demostrado que los microorganismos poseen un papel importante en la regulación del sistema inmune, en la maduración celular, en la angiogénesis e incluso la microbiota del intestino juega un rol primordial en el almacenamiento de energía, en el control de organismos patógenos y provee al hospedero de una amplia variedad de funciones metabólicas de las cuales carece (Leser y Mølbak, 2009).

Si bien la composición microbiana intestinal de los organismos está influenciada por el tipo de dieta que poseen, en particular el tipo de presas que consuman, su composición también dependerá de: las interacciones entre individuos, del genotipo del huésped, la salud, la edad, la anatomía intestinal, así como de los cambios en el ambiente circundante (Nelson *et al.*, 2013). Debido a que múltiples factores influyen en la estructura de la microbiota, es difícil estudiar la contribución aislada de cada uno de ellos por la naturaleza altamente dinámica de la comunidad microbiana (Degnan *et al.*, 2012).

Para estudiar la microbiota intestinal se utilizan muestras fecales en las cuales se pueden detectar microorganismos, principalmente de la zona distal del intestino grueso, que han sido arrastrados junto a la materia fecal. Esta metodología tiene la ventaja de no ser invasiva y si bien, existen diferencias en la composición microbiana del intestino delgado y grueso, éstas son mínimas cuando se comparan con las diferencias encontradas a nivel individual (Knight y Buhler, 2015).

Actualmente existen dos metodologías para estudiar la composición de la comunidad microbiana que consisten en el estudio del gen que codifica para la subunidad pequeña ribosomal (ARNr); la subunidad 16S ARNr de bacterias y archaeas, y la subunidad 18S de eucariotas. Estas metodologías permiten

caracterizar la comunidad microbiana sin la necesidad de realizar cultivos (Hamady y Knight, 2009). Además, tienen un potencial mayor en la detección de microorganismos poco abundantes, no cultivables y que no son detectados utilizando técnicas tradicionales (Illumina, 2013).

El gen 16S ARNr es el más utilizado en estudios de filogenia y taxonomía de procariotas, especialmente en bacterias (Rodicio y Mendoza, 2004); se encuentra altamente conservado y presenta algunas áreas comunes con otros organismos. Se trata de una molécula muy antigua cuya estructura y función ha permanecido constante. Así mismo, posee un tamaño largo que minimiza los problemas estadísticos, es una estructura fácil de secuenciar y actualmente existen bases de datos amplias de este gen (Rodicio y Mendoza, 2004).

Anteriormente, se realizaban técnicas de clonación y secuenciación del gen 16S ARNr mediante el uso de *primers* conservados. Sin embargo, la aparición de la secuenciación masiva permitió la secuenciación directa de los productos de PCR sin la necesidad de ser clonados. Uno de los pasos críticos de esta tecnología es la elección de los *primers*, pues un mal diseño, puede conllevar a una representación baja de especies. En el caso de la tecnología Illumina, una de sus mayores ventajas es la reducción del costo por base (Klindworth *et al.*, 2013).

La dieta del organismo posee una gran influencia en la composición de la microbiota intestinal y es considerada una de las principales vías de colonización microbiana (Nelson *et al.*, 2015). La identificación de las presas es fundamental para correlacionar el tipo de presas que consume el organismo de estudio, con la presencia de grupos microbianos particulares. Existen diversos métodos para evaluar la dieta de un organismo. Las ventajas y desventajas de cada método se describen en la Tabla I.

1.1 Antecedentes

Los conocimientos sobre la microbiota en mamíferos marinos provienen principalmente de especies en cautiverio. Nelson *et al.* (2013) demostraron por primera vez que existen diferencias significativas en la composición de la microbiota entre organismos en cautiverio y de vida libre al analizar la comunidad microbiana de dos especies de pinnípedos, *Mirounga leonina* (elefante marino del sur) e *Hydrurga leptonyx* (foca leopardo), por medio de pirosecuenciación del gen 16S ARNr. Sus resultados determinaron que, el comportamiento, la fisiología, la dieta, e incluso las características fisicoquímicas del intestino del organismo, contribuyen a tener una composición bacteriana similar. Además, observaron que tanto en

especies en cautiverio como en organismos sociales (*M. leonina*), existe una mayor diversidad microbiana debido al aumento en las relaciones intra e interespecíficas (contacto con humanos).

Así mismo, demostraron que el elefante marino, que posee un dimorfismo sexual acentuado, presenta diferencias en la composición microbiana entre hembras y machos, posiblemente porque se alimentan de diferentes presas debido a que poseen sitios de alimentación distintos (Lewis *et al.*, 2006).

Tabla 1. Comparación entre las distintas técnicas disponibles para el análisis de la dieta

| Característica | Secuenciación masiva ¹ | Métodos moleculares | | Método tradicional |
|-----------------------|--|--|--|--|
| | | Clonación ² | Análisis ADN de presas ³ | Morfológica (heces/contenido estomacal) ⁴ |
| Cobertura | Mejor representación del ADN, depende de la calidad del <i>primer</i> | Limitado por el número de clonas seleccionadas, depende del <i>primer</i> | Selección de fragmentos, depende de la digestión de la presa | Limitado a presas que dejen remanentes sólidos después de su digestión |
| Resolución | Alta, los resultados pueden compararse con bases de datos, identificación a nivel de especie | | | Media, posible identificación a nivel de especie |
| Cuantificación | | Diversidad de presas, no abundancia | | Número de taxa, porcentaje en volumen |
| Precisión | | No se requiere de un taxónomo o de una persona especializada para la identificación, menor sesgo | | Se requiere de una persona especializada |
| Costo | Bajo costo por secuencia | Caro, por el proceso de clonación | Depende del número de fragmentos a secuenciar | Bajo, uso de pocos materiales y reactivos |

Modificado de: Razgour *et al.* (2011). ¹Thomas (2015); Brassea (2016). ² Glad *et al.* (2010), ³Deagle *et al.* (2005). ⁴ Alamán (2014); Durazo (2015).

Por medio de la generación de librerías de clonas del gen 16S ARNr, Glad y colaboradores, (2010) determinaron que la microbiota de la foca de puerto del Atlántico, de una colonia ubicada al norte de Noruega, está representada principalmente por dos *fila*: Firmicutes (50%), Bacteroidetes (49%) y en menor abundancia Fusobacteria (1%). En comparación con otros fócidos, estas librerías de *P. vitulina* no contenían Proteobacterias, sin embargo, comparte con la foca gris (*Halichoerus grypus*) y con la foca de capucha (*Cystophora cristata*) representantes de los *fila* Firmicutes y Bacteroidetes.

Sin embargo, un estudio reciente (Numberger *et al.*, 2016) reportó la presencia de Proteobacterias en muestras fecales obtenidas de 5 focas de puerto emparentadas mediante la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH). Estos investigadores determinaron que la composición microbiana fecal estaba compuesta principalmente por Firmicutes (19–43%), Bacteroidetes (22–36%), Fusobacteria (18–32%) y Proteobacteria (5–17%), siendo 21 miembros bacterianos los que contribuyen con el $93.7 \pm 8.7\%$ de la abundancia relativa en la comunidad microbiana fecal total. Además, contrario a lo esperado, la composición de la microbiota fue más similar entre individuos no emparentados.

A pesar de las diferencias en la dieta que existen entre fócidos, se ha mantenido un núcleo de microorganismos específico, como resultado de relaciones simbióticas o coevolutivas, el cual es transferido de las madres a las crías (Nelson *et al.*, 2013).

La dieta del organismo es una de las principales vías de colonización bacteriana y su composición dependerá, de entre otros factores, del tipo de presas que el organismo consuma (Nelson *et al.*, 2013). Los hábitos alimentarios de las colonias de estudio de la subespecie *P. v. richardii*, ubicadas a lo largo de la costa occidental de la Península de Baja California, en: 1) Isla de Todos Santos, 2) Estero Punta Banda, 3) Isla San Jerónimo, 4) Isla Natividad e 5) Isla San Roque (Figura 1), han sido previamente caracterizados mediante la identificación de estructuras duras en excretas, como otolitos sagitta y picos de cefalópodos (Alamán, 2014; Durazo, 2015) y además por secuenciación masiva (Brassea, 2016).

Alamán (2014), caracterizó la dieta de *P. v. richardii* en dos sitios de descanso, Isla Todos Santos (TS) y el Estero de Punta Banda (EPB), ubicados en la Bahía de Todos Santos, Baja California. A pesar de que estos dos sitios se encuentran separados por sólo aproximadamente 16 km, existen diferencias significativas entre las presas que ambas colonias consumen. Se determinó que la dieta de las focas de esta zona está basada principalmente en peces y cefalópodos, siendo el lagarto lucio (*Synodus lucioceps*) la especie de mayor importancia (46%, 22% en EPB y TS, respectivamente). La colonia de EPB posee un alto consumo de cefalópodos, del pulpo anillado (*Octopus bimaculatus*) y el calamar californiano (*Loligo*

opalescens) con el 30% y 13% de preferencia, respectivamente; mientras que la colonia de la ITS consume rocote (*Sebastes spp.*) y calamar californiano con el 38% y 21% de preferencia, respectivamente. Las diferencias en las dietas sugieren que las colonias poseen sitios de alimentación distintos (Alamán, 2014).

Durazo (2015), caracterizó la dieta de 4 colonias de *P. v. richardii*, ubicadas en las Islas: Todos Santos (TS), San Jerónimo (ISJ), Natividad (IN) y San Roque (ISR), durante tres temporadas distintas (crías, muda y descanso). En ITS, las especies más abundantes fueron el lagarto lucio y los rocotes durante la temporada de muda y de cría. En IN, el consumo del lenguado *Citharichthys sordidus* varió entre la temporada de cría y de muda (30% y 45%). En contraste, en ISJ el consumo de presas fue diferente entre temporadas, siendo el calamar de California y el lagarto lucio (26% y 18%), los organismos más importantes durante la temporada de muda, y los rocotes y pulpos (*Octopus spp.*), durante la temporada de cría (21% y 18%). Finalmente, la colonia de ISR mostró diferencias en las preferencias de presas entre las distintas temporadas, siendo *C. sordidus* y el sapo cabezón (*Porichthys notatus*) las presas más abundantes durante la temporada de muda y de descanso, respectivamente.

Por medio de un análisis metagenómico Brassea (2016), quien utilizó las muestras de Durazo (2015), caracterizó la dieta de 4 colonias de focas de puerto (TS, SJ, N y SR) y comparó los resultados obtenidos con los previamente descritos utilizando los métodos tradicionales (Alamán, 2014; Durazo, 2015). En comparación con las demás colonias, en Natividad y Todos Santos se presentó el mayor consumo de peces teleósteos (85%) y de invertebrados (29%), respectivamente. Sin embargo, el análisis estadístico indicó que no existen diferencias significativas entre el consumo de peces e invertebrados en las colonias. Las diferencias observadas en la dieta, dependen de la frecuencia con que una especie es consumida. Así mismo se determinó que las colonias de N y SR son los sitios donde se compartieron el mayor número de presas (47%). Además, demostró que por medio de secuenciación masiva es posible detectar un mayor número de presas en comparación con los métodos tradicionales.

Mediante el análisis cuantitativo de ácidos grasos (QFASA), Bromaghin *et al.* (2013) examinaron la dieta de una colonia de *P. v. richardii* ubicada en las Islas de San Juan, EUA. Confirmaron la importancia de especies de salmón en la dieta de la foca de puerto y además determinaron que especies de peces roca pueden representar una parte importante de la dieta de la foca en comparación con reportes anteriores. Además, reportaron que la composición de la dieta de *P. v. richardii* varía de manera espacial y demográfica.

Por medio de la combinación del análisis de heces y del uso de isótopos estables, Elorriaga-Verplancken *et al.* (2013) determinaron que la dieta de la colonia de focas de puerto ubicada en la Isla Natividad, es principalmente piscívora. El 93% de su dieta está basada en seis especies: *Achirus mazatlanus*, *Octopus rubescens*, *Strongy exilis*, *Citharichthys xanthostigma*, *Sardinops sagax*, y *Scomberomus sierra*.

Thomas (2015) mediante secuenciación masiva, analizó el ADN proveniente de muestras fecales de ejemplares de *P. vitulina* en cautiverio con una dieta controlada: *Mallotus villosus* (40%), *Clupea pallasii* (30%), *Scomber japonicus* (15%), y *Loligo opalescens* (15%) para conocer si la cantidad de lecturas obtenidas por presa podía utilizarse como un dato para cuantificar la dieta de la foca. Utilizó un marcador 16S mitocondrial específico para cordados y los productos del PCR se secuenciaron en el equipo Ion Torrent PGM. Concluyó que las proporciones de las secuencias obtenidas de las presas no pueden relacionarse directamente con sus proporciones en la dieta (p.ej. *M. villosus*: 20% lecturas vs. 40% dieta) porque la cantidad de secuencias depende de varios factores técnicos (p. ej. filtros de calidad). El uso de la secuenciación masiva como una nueva herramienta para estimar la dieta del organismo de estudio, así como las diversas ventajas que ofrece en comparación con los métodos tradicionales y moleculares se describen en Pompanon *et al.* (2012).

El objetivo del presente estudio consistió en caracterizar, por medio de secuenciación masiva, la composición microbiana de cinco colonias de *P. v. richardii* ubicadas en la costa occidental de la península de Baja California y establecer los hábitos alimentarios de la colonia localizada en el Estero de Punta Banda para finalmente determinar si la dieta, en especial el tipo de presa que se consumen en las distintas colonias de la foca de puerto, influye en la composición de su microbiota intestinal.

1.2 Justificación

A pesar del importante papel que desempeña la microbiota intestinal en la megafauna (p. ej. desarrollo del sistema inmune, asimilación de nutrientes), su diversidad en pinnípedos ha sido poco estudiada. La mayoría de los estudios se basan en el uso de métodos tradicionales que están limitados a la identificación de microorganismos cultivables. A diferencia de estos métodos, la secuenciación masiva permite detectar microorganismos que no pueden ser cultivados.

La dieta del organismo posee una gran influencia en la composición microbiana y la identificación de las presas es fundamental para correlacionar el tipo de presas que consume el organismo de estudio

con la presencia de grupos microbianos particulares. Los métodos comunes para la identificación de presas se basan principalmente en el estudio del contenido estomacal o en la detección de restos duros de organismos en las heces (otolitos y picos de cefalópodos). Las técnicas de secuenciación masiva no están sesgadas a presas de cuerpo duro y poseen un mayor potencial de identificar con éxito una gran variedad de presas de cuerpo blando o pequeño, que no son visibles en las heces, y de revelar componentes no comunes en la dieta.

1.3 Hipótesis

El tipo de dieta, en particular el tipo de presas que consuma cada colonia de *P. v. richardii*, influye en la composición del microbioma intestinal. Además, el uso de secuenciación masiva permite la identificación de presas de consumo esporádico y de aquellas que no dejan restos visibles en las heces de la colonia de *P. v. richardii* localizada en el Estero de Punta Banda.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Caracterizar, por medio de secuenciación masiva, la composición microbiana de cinco colonias de *P. v. richardii* ubicadas en la costa occidental de la península de Baja California para relacionar el tipo de presas consumidas en cada colonia de estudio, con la presencia de grupos microbianos particulares.

1.4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar el microbioma intestinal de cinco colonias de *P. v. richardii* ubicadas a lo largo de la costa occidental de la Península de Baja California en: Isla Todos Santos, Estero Punta Banda, Isla San Jerónimo, Isla Natividad e Isla San Roque, mediante secuenciación masiva del gen 16S ARNr procariota.

- Describir la composición y estructura de la dieta de la colonia *P. v. richardii* ubicada en el Estero de Punta Banda, Ensenada, B.C., por medio de secuenciación masiva.

- Predicción funcional del microbioma intestinal de la foca de puerto.
- Comparar la composición microbiana intestinal de cada colonia y correlacionar las diferencias observadas con el tipo de dieta.
- Comparar los datos de la dieta de la colonia de *P. v. richardii*, ubicada en el Estero de Punta Banda, con los datos de la composición de la dieta previamente reportados de las demás colonias de la Península de Baja California.
- Identificar los restos duros de las muestras fecales de la colonia del EPB y comparar los resultados con los obtenidos utilizando la técnica de secuenciación masiva del gen 16S ARNr procariota.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Colección de muestras

Las muestras fecales utilizadas en este trabajo proceden de 5 colonias de *P. v. richardii* ubicadas a lo largo de la península de Baja California: 1) Estero Punta Banda, 2) Isla Todos Santos, 3) Isla San Jerónimo, 4) Isla Natividad 5) Isla San Roque (Fig.2). Estas muestras se colectaron durante la temporada de muda del año 2014; las condiciones y características del muestreo se describen en el trabajo de Durazo (2015).

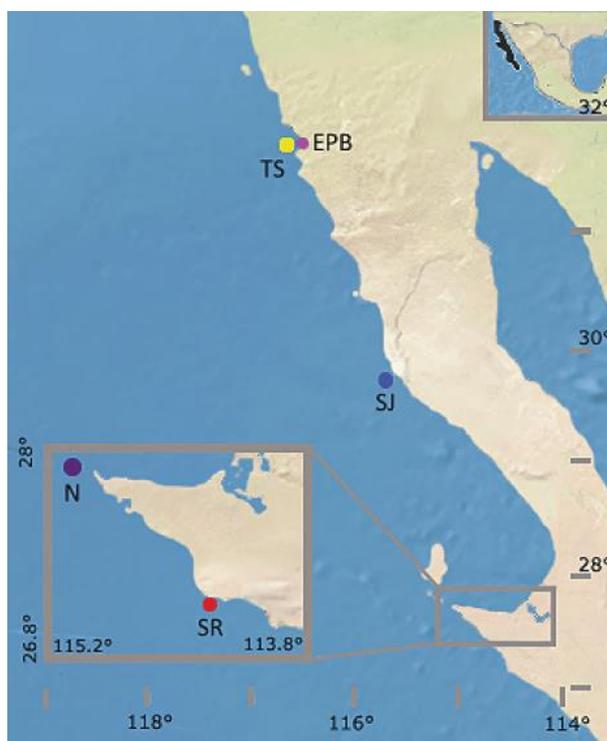


Figura 2. Ubicación geográfica de las distintas colonias de estudio de *P. v. richardii* en la costa occidental de la península de Baja California. Estero de Punta Banda (EPB), Todos Santos (TS), San Jerónimo (SJ), Natividad (N) y San Roque (SR).

2.2 Extracción de ADN

Se utilizó el kit *QIAamp® DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN) para extraer el ADN genómico total de 6 muestras fecales de distintos individuos pertenecientes a la colonia del Estero de Punta Banda. Las muestras se

centrifugaron a 20 000 x g durante 3 minutos para poder decantar el *RNA later* en el cual fueron preservadas. Se determinó el peso húmedo de cada muestra y se utilizó el protocolo del kit ligeramente modificado, como describe Brassea (2016). Las muestras se concentraron en una centrifuga de vacío a 60 °C por 15 minutos. La cuantificación del ADN genómico (260 nm) se determinó en el espectrofotómetro Nanodrop® (Thermo Fisher). Los productos obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa al 0.8% y se corrieron a 60 V por 45 min. Para las demás colonias se utilizaron las mismas muestras del trabajo de Brassea (2016). El ADN de las colonias de TS, SJ, N y SR, fue extraído en el trabajo previamente mencionado y se empleó en el presente estudio.

2.3 Preparación de las bibliotecas de secuenciación

2.3.1 Microbioma

Para caracterizar la diversidad microbiana de *P. v. richardii* de las colonias de estudio, se generaron librerías del gen 16S ARNr procarionta. En las colonias de TS, SJ, N y SR, se utilizaron 4 muestras por colonia y, para la colonia del EPB, se usaron 6 muestras. Todas las muestras (22) corresponden a individuos diferentes. Por medio de la técnica de PCR se amplificó la región hipervariable V4 de dicho gen (Tabla 2). Las condiciones del PCR se describen en el Anexo A. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2%.

2.3.2 Dieta de la colonia del Estero de Punta Banda

Se generaron 3 librerías distintas para identificar las presas de *P. v. richardii* consumidas en la colonia EPB, las cuales se enfocaron en la identificación de peces, cefalópodos y otros organismos distintos a los anteriormente mencionados (eucariotas) (Deagle *et al.*, 2009). En el caso de los peces y cefalópodos se utilizó el gen 16S mitocondrial y en el último se usó la región hipervariable V9 del gen 18S ARNr de eucariotas (Amaral-Zettler *et al.*, 2009). Las características de los *primers* que se utilizaron se describen en la Tabla 2 y las condiciones para cada uno de los PCR en el Anexo A. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2%.

Es importante mencionar que, al extraer el ADN proveniente de una muestra fecal, la relación del ADN de interés en comparación con el ADN del organismo de estudio es baja. Con la finalidad de incrementar esta relación y limitar la amplificación del ADN de *P. v. richardii*, se utilizó un *primer* bloqueador de cordados que minimiza la amplificación de mamíferos (Gilbert *et al.*, 2014).

Los *primers* bloqueadores (Amaral-Zettler *et al.*, 2009; Deagle *et al.* 2009) se agregaron a una concentración mayor en comparación con la añadida de los demás *primers*. (Deagle *et al.*, 2009). El *primer* bloqueador posee un espaciador C3 modificado en el extremo 3', que únicamente limita la extensión del ADNmt del organismo de estudio durante el PCR (Vestheim y Jarman, 2008).

Tabla 2. *Primers* utilizados para la identificación de las presas y del microbioma de *P. v. richardii*

| <i>Primer</i> * | Gen blanco | Referencia |
|-----------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 16S_F | 16S ARNr: Región hipervariable V4 | Klindworth <i>et al.</i> (2013) |
| 16S_R | | |
| Chord_16S_F | ADNmt 16S: Peces | Deagle <i>et al.</i> (2013) |
| Chord_16S_R | | |
| Ceph_16S_F | ADNmt 16S: Cefalópodos | Deagle <i>et al.</i> (2009) |
| Ceph_16S_R | | |
| Euk_F | 18S ARNr: Región hipervariable V9 | Amaral-Zettler <i>et al.</i> (2009) |
| Euk_R | | |

*F, *forward*; R, *reverse*

Para la construcción de ambas bibliotecas, se utilizó el protocolo *Two-step PCR Approach* (Microsynth AG, 2015) que permite procesar hasta 324 muestras en paralelo, por la combinación de 16 *primers forward* y 24 *reverse*. Generalmente, en el primer PCR se amplifica la región de interés pero en este estudio además se agregaron los *primers* bloqueadores (Deagle *et al.*, 2013; Gilbert *et al.*, 2014) para minimizar la presencia del ADN de la foca de puerto.

Posteriormente, los amplicones del primer PCR se utilizaron como plantillas y se incluyeron los índices y adaptadores de Illumina (Fig. 3). Para el segundo paso de PCR, se utilizó una combinación de índices única para cada muestra (indexado). Una de las ventajas de esta metodología es que el costo por secuenciación se reduce y es posible secuenciar diferentes regiones del ADN en una misma reacción (Microsynth AG, 2015). Las condiciones del segundo paso de PCR se describen en el Anexo A. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2%.

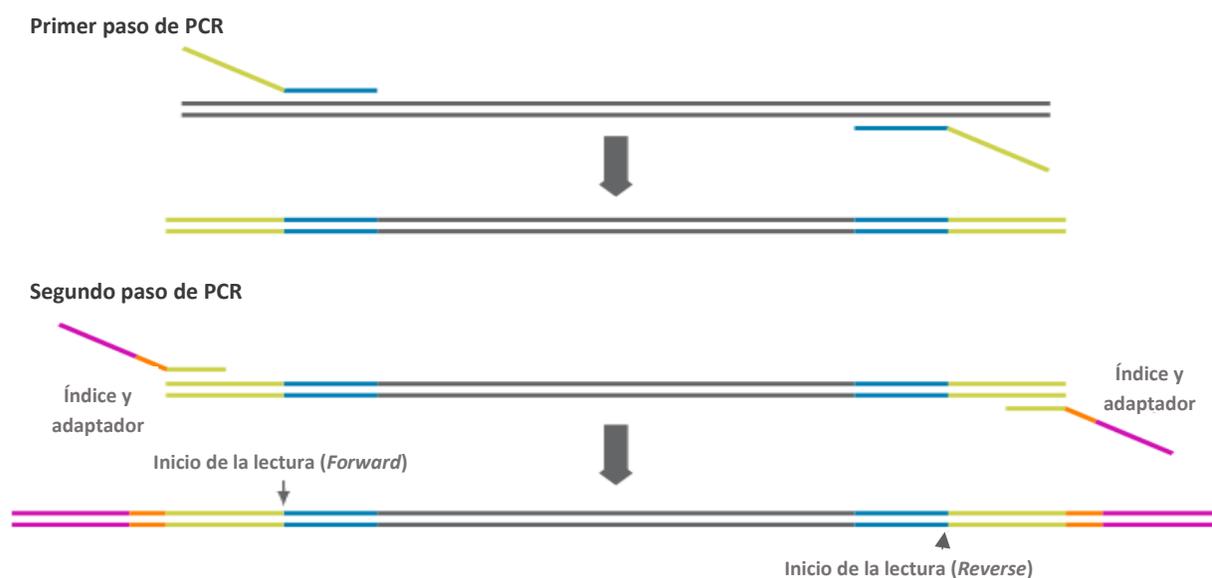


Figura 3. Estrategia de PCR de dos pasos (*Two-step PCR Approach*). Vista general de la estrategia utilizada en el protocolo de *Two-step PCR Approach* de Illumina. El resultado final es la amplificación de la secuencia genómica de interés (barra gris) con índices (barra naranja) y adaptadores (barra morada) particulares. Modificado de Microsynth AG (2015).

2.4 Purificación, normalización y cuantificación

2.4.1 Microbioma

Para la normalización de las librerías correspondientes al microbioma (16S ARNr), se utilizó el kit *SeqalPrep™ Normalization Plate* (96) que permite obtener una concentración final de 1- 2 ng/μl. Se siguió el protocolo propuesto por el fabricante.

De manera aleatoria se cuantificó el 40% de las muestras. La cuantificación se realizó en el equipo Qubit® 3.0 de Invitrogen™ con 2 µl por muestra, siguiendo el protocolo del kit *Qubit® dsDNA BR Assay* de Molecular Probes® (Invitrogen™).

Para la creación del *pool* final del microbioma, se crearon 3 metamuestras con base en la concentración aproximada de ADN observada en el gel de agarosa. La primera metamuestra contenía las muestras del EPB, la segunda, muestras de TS y SJ, y la tercera, muestras de N y SR. Se añadieron 10 µl de cada muestra, a excepción de la muestra TS39 (se agregó todo el volumen disponible debido a la baja concentración que presentaba), y se cuantificaron.

Para determinar la concentración de las muestras y de cada metamuestra en nM, se utilizó el tamaño final del amplicón del segundo paso de PCR (451 pb) en la fórmula:

$$[nM] = \frac{\frac{ng}{\mu l}}{660 \text{ g mol} \times \text{número de pares de bases del amplicón}} 1 \times 10^6 \quad (1)$$

Posteriormente los valores se pasaron a pM:

$$1 \text{ nM} = 1000 \text{ pM} \quad (2)$$

Para la creación del *pool* final se tomaron 10 µl de cada metamuestra y se llevó a una concentración de 1100 pM para su posterior desnaturalización con base en el kit *Nextera MiSeq® Reagent V2* de 300 ciclos de Illumina®.

2.4.2 Dieta

Para la normalización de los amplicones de cefalópodos, cordados y eucariotas, se siguió el mismo protocolo utilizado en la creación de la librería del microbioma. Se utilizaron 10 µl de cada muestra por amplicón para crear las metamuestras correspondientes a cada grupo. Posteriormente cada metamuestra se cuantificó en el equipo Qubit® 3.0 de Invitrogen™. Para determinar la concentración obtenida en nM, se utilizó el tamaño final del amplicón del segundo paso de PCR.

Las metamuestras se llevaron a concentraciones equimolares, a partir de la concentración más baja obtenida. La relación de volúmenes de las metamuestras de: cefalópodos, cordados y eucariotas en el *pool* final, fue 1: 1: 1.2, respectivamente. Se aumentó el volumen de la metamuestra de eucariotas debido a que se esperan más lecturas de este amplicón por la mayor variedad de especies que puede detectar. Para la secuenciación, el *pool* se llevó a una concentración final de 1000 pM con base en el kit Nextera *MiSeq*[®] *Reagent V2* de 300 ciclos de Illumina[®].

2.5 Desnaturalización y preparación de la solución de carga

2.5.1 Microbioma

Para que las muestras puedan ser secuenciadas, es necesario desnaturalizarlas (separación de las dobles cadenas a hebras simples). 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 Chong, descrito a continuación. Se agregaron 10 µl del *pool* 16S ARNr (1100 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 980 µl del buffer de hibridación a los 20 µl del *pool* desnaturalizado.

Como control de secuenciación, se utilizó la librería *PhiX* (comúnmente 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 4 000 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 445 µl del buffer de hibridación (HT1) para obtener una concentración de 20 pM.

Para la secuenciación, es necesario combinar la librería de amplicones (16S ARNr) con el control *PhiX*; cada uno se llevó a una concentración de 5 pM. Para preparar el *PhiX* a dicha concentración, se añadieron 225 µl del *PhiX* (20 pM) a 745 µl del buffer de hibridación y de la metamuestra se agregaron 465 µl (11 pM) a 535 µl del buffer de hibridación. Finalmente, la metamuestra y el *PhiX* se combinaron añadiendo 950 µl del *pool* y 50 µl de *PhiX*, para obtener una solución de trabajo final con un volumen de 1000 µl, a una concentración de 5 pM con 5% de *PhiX*.

2.5.2 Dieta

Al igual que la preparación de la metamuestra del microbioma, se utilizó el kit *MiSeq® Reagent V2* de 300 ciclos de Illumina® y se siguió el protocolo para la preparación de librerías metagenómicas de Illumina® modificado por la Dra. Jennyfers Chong con algunas variaciones en los volúmenes previamente descritos. Se agregaron 10 µl del *pool* final (1000 pM) y 10 µl de NaOH en un tubo tipo Eppendorf y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se tomaron 10 µl del *pool* desnaturalizado (500 pM) y se añadieron 990 µl del buffer de hibridación para obtener una concentración final de 5 pM.

Para diluir y desnaturalizar la librería control (*PhiX*), se añadieron 1 µl de *PhiX* (10 000 pM) y 1.5 µl de agua para una concentración de 2 000 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, a esta solución se le adicionaron 445 µl del buffer de hibridación para obtener un volumen final de 500 µl a 20 pM.

Se añadieron 250 µl del *PhiX* (previamente preparado) a 750 µl del buffer de hibridación para obtener el *PhiX* a 5 pM. Finalmente, la metamuestra y el *PhiX* se combinaron añadiendo 950 µl del *pool* (5 pM) y 50 µl de *PhiX* (5 pM) para obtener una solución de trabajo final con un volumen de 1000 µl, a una concentración de 5 pM y con 5% de *PhiX*.

2.6 Secuenciación

Las muestras de microbioma y de la dieta se corrieron por separado en celdas de flujo nano (capacidad para generar 1×10^6 lecturas), con una concentración de 5 pM y 5% de *PhiX*. Se creó una *Sample sheet* para indicar la combinación de índices de cada muestra. Ambas secuenciaciones se llevaron a cabo en el equipo MiSeq de Illumina® que se encuentra en CICESE.

2.7 Procesamiento y análisis de las lecturas del microbioma

Las medidas para el control de calidad inicial, necesarias para asegurar la fidelidad de las secuencias, incluyeron la remoción de: a) secuencias con nucleótidos indeterminados, b) secuencias cortas (< 100 bp) y c) secuencias sin complementariedad perfecta con el *primer* 5'.

Los *primers* y adaptadores fueron eliminados y las secuencias se demultiplexaron por la combinación de índices. Los archivos generados por el secuenciador fueron descargados de la nube BaseSpace™. Estos archivos contienen el valor de calidad asignado a cada nucleótido (*Q-score*), que es una predicción de la probabilidad de que una base haya sido mal asignada. Por ejemplo, un valor de calidad alto ($\geq Q30$) implica que existe una probabilidad de 1 en 1000 de que una base se haya asignado erróneamente. Para filtrar las secuencias con un *Q-score* mayor a 28, se utilizó la herramienta de Galaxy en línea para la manipulación de datos FASTQ (Blankenberg *et al.*, 2010).

Después del control de calidad, los datos de la secuenciación se convirtieron a archivos FASTA y se analizaron en el software QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (Caporaso *et al.*, 2010). Las Unidades Taxonómicas Operativas (OTU, por sus siglas en inglés) se seleccionaron con una base de datos de referencia (*close-reference*) y se definieron en el programa UCLUST (Edgar, 2010) con una identidad del 97%. Representantes de las OTU resultantes, derivados de la base de referencia, fueron taxonómicamente identificados con la base taxonómica SILVA 123 (Quast *et al.*, 2013). Además, para minimizar el efecto de errores en la secuenciación y optimizar los análisis estadísticos, se eliminaron todas aquellas secuencias que se presentaran una sola vez (*singleton*).

Para la identificación y eliminación de quimeras se utilizó el algoritmo de Uchime (Edgar *et al.* 2011) con los parámetros por defecto y la base de datos de secuencias 16S ARNr "*gold*" como base de datos de referencia, disponible en Microbiome Utilities del Instituto Broad (<https://sourceforge.net/projects/microbiomeutil/files/>).

2.8 Análisis de la diversidad microbiana

La cobertura de la comunidad microbiana original, basada en el número de lecturas obtenidas, se evaluó con un análisis de rarefacción. Posteriormente, el número de lecturas asignado a cada OTU se normalizó con el número máximo de secuencias obtenidas por todas las muestras. Este número refleja un balance entre retener el mayor número de secuencias posibles sin excluir a aquellas muestras con un bajo número de secuencias.

Los índices de diversidad alfa, como Shannon (diversidad) y Chao1 (riqueza bacteriana), se calcularon en QIIME utilizando la matriz de datos normalizados. Para conocer si existen diferencias significativas entre el número de especies esperadas (Chao1) con las observadas, se utilizó una prueba t de Student y para la diversidad (Shannon) por colonia, se utilizaron las pruebas de ANOVA y Tukey para comparaciones múltiples. En ambos casos, se empleó el programa *GraphPad Prism 7*.

Para poder observar similitudes y diferencias en la composición microbiana de las diferentes colonias de estudio y poder proyectar cada muestra de acuerdo a su composición microbiana en un gráfico de dos dimensiones, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA). Este análisis se llevó a cabo a partir de la matriz de distancias filogenéticas ponderada generada por el método de UniFrac, que representa la abundancia relativa de secuencias en las diferentes colonias (cuantitativa), y no ponderada (cualitativo), basada en la presencia/ausencia de organismos (Lozupone *et al.*, 2010).

Los géneros que fueron compartidos entre los organismos de las diferentes colonias, se estableció a partir de microorganismos cuya abundancia relativa fuera $\geq 0.5\%$; para visualizar los resultados se creó un gráfico *UpSet* en la plataforma de R (R Core Team, 2017) con el paquete *UpSetR* (Gehlenborg, 2016). En este tipo de gráfico es posible observar claramente las intersecciones de los conjuntos, los tamaños y otras propiedades en tamaños de muestra grandes, en comparación con los diagrama de Venn (Conway *et al.*, 2017). Para determinar el grupo núcleo de OTUs se tomaron aquellos que estuvieran presentes en todas las colonias y que tuvieran una abundancia $\geq 0.5\%$.

2.9 Análisis de la dieta de la colonia del Estero de Punta Banda

Para el análisis de la dieta se emplearon herramientas para la edición de secuencias disponibles en la plataforma de Galaxy en línea (<https://usegalaxy.org>). El software FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects>) se utilizó para visualizar la calidad de las secuencias. Las secuencias obtenidas de los amplicones de cefalópodos y cordados tuvieron una baja calidad en las últimas 30 pares de bases de la secuencia, por lo tanto, se utilizó la herramienta *Trimmomatic* para cortar las secuencias hasta una longitud de 120 pares de bases.

Las secuencias del amplicón de eucariotas tuvieron una buena calidad a lo largo de toda la secuencia, por lo que no fue necesario recortarlas. Posteriormente, las secuencias *forward* y *reverse* se unieron usando la versión en línea de *FastQ joiner* disponible en Galaxy. El 100% de las secuencias de todos los amplicones se unieron. La longitud del fragmento final fue de 240 pares de bases, para cefalópodos y cordados, y de 302 pb para eucariotas. Las secuencias idénticas se colapsaron usando la herramienta Collapser del software *FASTX-toolkit*.

Como base de datos de referencia, se empleó la base de nucleótidos (NT) de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Se llevó a cabo un BLASTn remoto con los comandos del paquete de BLAST+. Como criterios iniciales, se determinó un E-value < 1e-20, una longitud de alineamiento mayor o igual a 100 pares de bases y un porcentaje de identidad mayor al 96%. Estos criterios evitan la asignación taxonómica de quimeras (Thomas, 2015).

Se creó una matriz de datos con la incidencia de cada especie presa, por muestra, en donde se excluyeron: a) especies que no se distribuyeran en la zona de estudio, b) cualquier contaminante identificado u organismo que no sea presa potencial (animales terrestres, microorganismos) y c) secuencias de foca de puerto. La remoción de estas secuencias se realizó de manera manual. La principal base de datos de referencia que se utilizó para determinar la distribución y hábitos de las presas identificadas, fue *FishBase* (<http://www.fishbase.org/search.php>). Además se utilizaron los recursos electrónicos de *Sea life base* (<http://www.sealifebase.org/>) y el inventario de Pro Esteros del Estero de Punta Banda (<http://proesteros.org/inventarios/humedales/PuntaBanda>).

2.9.1 Análisis estadístico

Para describir la dieta de la colonia del Estero de Punta Banda, se utilizaron cuatro índices: 1) Chao 2, para estimar la riqueza total de especies que se obtendrían con un esfuerzo ilimitado y compararla con la riqueza observada, 2) la frecuencia de ocurrencia (%FO), que es una medida del porcentaje de muestras fecales en las que se presentó un taxón de presa, 3) la riqueza de especies, basada en el número de especies presentes en cada muestra, y 4) el índice de Jaccard, para conocer las similitudes de la dieta entre colonias. Los índices previamente mencionados se calcularon en el software Primer7 (Clarke y Gorley, 2015).

Todos los índices utilizados se basaron en la presencia o ausencia de un taxón en una muestra fecal. Esto corresponde a una medida relativa de la incidencia de presas, debido a que las proporciones de las secuencias obtenidas por presa, no pueden relacionarse directamente con su proporción en la dieta.

El consumo de las presas se categorizó como preferencial ($\geq 80\%$), secundario ($\geq 40\%$ y $\leq 60\%$) e incidental ($\leq 40\%$), con base en el valor de frecuencia de ocurrencia obtenido. Así mismo, se catalogaron las presas en dos grandes grupos, vertebrados e invertebrados, y se calculó el %FO.

Para detectar diferencias significativas en la diversidad de presas de las focas de puerto del EPB encontradas por muestra, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis con corrección de Dunn, en el software Graph Pad Prism 7. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Las similitudes en la dieta entre colonias, se visualizaron en un dendrograma derivado del índice de Jaccard. Como criterio de agrupamiento se utilizó el método conocido como *average linkage* (enlace promedio) en donde, para cuantificar las diferencias entre muestras, se toma como referencia el promedio de las disimilitudes entre dos muestras. Se escogió este método de agrupamiento por ser el que mejor explicaba las agrupaciones de las muestras (coeficiente de correlación cofenético próximo a 1). Los datos sobre las presas consumidas en las colonias de TS, SJ, N y SR se obtuvieron de Brassea (2016).

2.10 Identificación de presas por restos sólidos

Se identificaron los restos sólidos, previamente tamizados, encontrados en las muestras. Las presas se identificaron hasta el taxón más bajo posible. Se utilizó un microscopio estereoscópico para magnificar y visualizar cada detalle. Cada otolito fue comparado con distintos catálogos, entre los que destaca el catálogo de la NOAA de presas de *Zalophus californianus* (Lowry, 2011), entre otros (Fitch, 1964; Murillo Díaz, 2007). Los picos de cefalópodos se compararon con el catálogo de Wolff, (1984) y el recurso electrónico de Cowles (2005). Al igual que en la metodología metagenómica, se calculó la frecuencia de ocurrencia de cada presa encontrada. Para comparar la riqueza de especies obtenida con ambos métodos (metagenómica y restos sólidos), se realizó una prueba T en el software Prism7.

2.11 Relación dieta- microbioma

Con la finalidad de detectar relaciones entre la dieta, específicamente del tipo de presa consumida (vertebrado o invertebrado), con la composición del microbioma intestinal de las distintas colonias de estudio, se realizó un análisis que consistió en la predicción funcional de la comunidad microbiana. Lo anterior para conocer si existe un enriquecimiento de genes que participan en rutas relacionadas con el metabolismo de compuestos presentes en las presas.

2.11.1 Análisis funcional

Para predecir los perfiles funcionales de la microbiota de la foca de puerto, se utilizó el software PICRUSt (*Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*). Este programa se basa en el uso de un modelo evolutivo para predecir metagenomas con datos del gen 16S ARNr presentes en la base de datos Greengenes (Langille *et al.*, 2013).

Este software emplea un algoritmo para estimar el contenido genético funcional de bacterias o arqueas, para las cuales, no existe un genoma disponible. El modelo evolutivo predice, en las muestras de estudio, el número de copias de cada familia de genes con base en las relaciones filogenéticas que tengan con genomas de microorganismos secuenciados (Lesser *et al.*, 2016).

Para este estudio, se utilizó la versión en línea de PICRUSt disponible en Galaxy (<http://galaxy.morganlangille.com/>). Esta aplicación consta de tres pasos principales: normalización de los datos, predicción de metagenomas y categorización por función. En estos dos últimos pasos se empleó la base de datos de KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), la cual es una colección de vías funcionales que resultan de las representaciones gráficas de interacciones moleculares y las relaciones con productos de genes (proteínas, enzimas), responsables de distintas funciones celulares (Kanehisa y Goto, 2000).

Debido a que las predicciones cuantitativas dependen del modelaje exacto de la abundancia de los miembros de la comunidad, así como de la variación del número de copias del gen 16S ARNr, es necesario que los datos estén normalizados (división de la abundancia de cada microorganismo entre el número de copias que posee del gen 16S ARNr). Además, se calculó el índice de taxones secuenciados más cercano (NSTI, por sus siglas en inglés), el cual mide la relación entre las muestras del estudio con genomas secuenciados (Langille *et al.*, 2013). Un valor bajo de NSTI (<0.17) indica que las predicciones de PICRUSt son confiables.

2.11.1.2 Análisis estadístico

Para conocer si alguna categoría funcional estaba enriquecida en las distintas colonias de la foca de puerto, se utilizó la base de datos KEGG en los tres niveles de agrupamiento disponibles y los datos se analizaron en el software STAMP: *Statistical Analysis of Metagenomic Profiles* (Parks *et al.*, 2014). Así mismo, este programa se empleó para encontrar diferencias significativas en las comunidades microbianas entre las distintas colonias de focas de puerto.

En ambos análisis, tanto en el taxonómico (a nivel de filo y género) como en el funcional, se realizó un ANOVA y se utilizó la prueba Storey FDR para controlar la tasa de descubrimientos falsos. Para identificar las colonias que difieren una de otra en su perfil funcional, se empleó la prueba *post-hoc* de Games-Howell, que está diseñada para estudios donde los grupos poseen tamaños distintos (Parks *et al.*, 2014). Para observar similitudes en los perfiles funcionales de la comunidad microbiana de las diferentes colonias de estudio y poder proyectar cada muestra en un gráfico de dos dimensiones, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) a partir de la matriz de datos obtenida de PICRUSt. El objetivo de este análisis es representar la mayor variación posible de las muestras en los primeros dos ejes o componentes con la finalidad de observar similitudes entre muestras (Abdi y Williams, 2010).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Extracción de ADN de las muestras de la colonia del EPB

La concentración de ADN tuvo variaciones entre cada muestra, el valor promedio obtenido fue 36.53 ng/ μ l con un rango de 24.25 – 50.55 ng/ μ l (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de la cuantificación del ADN obtenido de las muestras fecales de la colonia del EPB

| Muestra | A260/280 | Concentración (ng/ μ l) |
|---------|----------|-----------------------------|
| 3A | 1.7 | 24.25 |
| 6A | 1.89 | 24.2 |
| 7A | 1.88 | 50.55 |
| 8A | 1.93 | 40.4 |
| 9A | 1.7 | 33.35 |
| 11A | 1.79 | 46.45 |

3.2 Amplificación del ADN

3.2.1 Microbioma

Todas las muestras de la colonia del Estero de Punta Banda se amplificaron exitosamente al usar el *primer* 16S ARNr para la región hipervariable V4, obteniéndose el tamaño del fragmento esperado (353 pb). Sin embargo, la muestra 9A mostró una banda tenue en el gel de electroforesis, por lo que se decidió aumentar la cantidad de ADN en la reacción de PCR (Fig. 4a). En el segundo paso de PCR, todas las muestras se lograron indexar, por lo que el tamaño del fragmento aumentó, de 353 a 451 pb (Fig. 4b). El tamaño del fragmento esperado se confirmó en un gel de agarosa al 2%.

En las muestras de las demás colonias, se pudo amplificar la región de interés a excepción de la muestra TS39, que en trabajos previos, ya presentaba una cantidad baja de ADN (Brassea, 2016). En el segundo paso de PCR las muestras se indexaron exitosamente. La muestra SR16b presentó un doble bandeo; sin embargo, al secuenciarse no se observaron problemas debido a lo anterior (Fig. 4c).

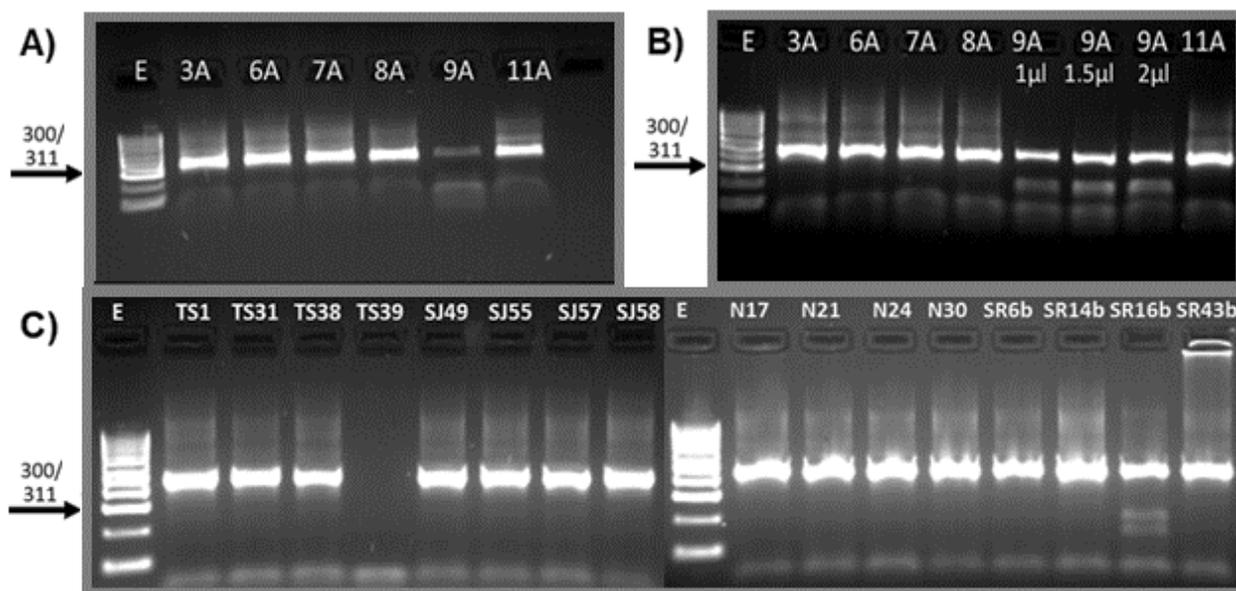


Figura 4. Productos de PCR de la región 16S ARNr A) Productos del primer (amplificación de la región 16S) y del B) segundo paso de PCR (indexado) de las muestras del EPB. El tamaño del fragmento esperado es de 353 pb y 451, respectivamente. C) Productos del segundo paso de PCR para las muestras de las colonias de Todos Santos (TS), San Jerónimo (SJ), Natividad (N) y San Roque (SR). Se obtuvieron los tamaños esperados para la región 16S de interés después del indexado (451 pb). Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 2% (100 V por 25 min).

3.2.2 Dieta

En la mayoría de las muestras del Estero de Punta Banda, se obtuvieron productos de PCR de las diversas zonas de interés al usar cada uno de los *primers*. La muestra 9A no mostró amplificación para el *primer* de cefalópodos. En el segundo paso de PCR, todas las muestras tuvieron el tamaño del fragmento esperado después del indexado: 287, 331 y 411 pb para los amplicones de cordados, eucariotas y cefalópodos, respectivamente (Fig. 5).

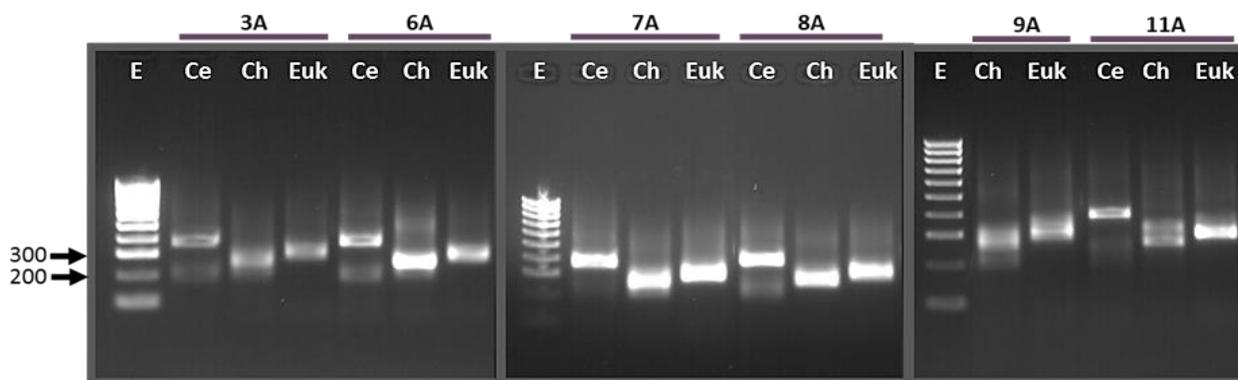


Figura 5. Productos del segundo paso de PCR (indexado) de los amplicones de cefalópodos (Ce), cordados (Ch) y Eucariotas (Euk) de las muestras del Estero de Punta Banda. Se obtuvieron los tamaños esperados para cada uno de las regiones de interés después del indexado. Gel de agarosa 2%, condiciones de la electroforesis: 100 V por 25 min.

3.3 Cuantificación

El valor del *pool* final del microbioma (16S ARNr) fue de 0.323 ng/ μ l, que corresponde a 1085 pM. La concentración picomolar de las metamuestras de cefalópodos, cordados y eucariotas fueron de 1800, 2200 y 1800, respectivamente.

3.4 Secuenciación

En la secuenciación del microbioma, se generaron un total de 1,182,315 lecturas, de las cuales el 94.7% pasaron el control de calidad inicial (\geq Q30) realizado por la plataforma de Illumina®. La muestra con el mayor número de lecturas obtenidas fue EPB9A con 133,756, mientras que la muestra TS39 obtuvo un total de 1,314 lecturas, por lo cual no fue incluida en el estudio. Con respecto a la secuenciación de la dieta de la colonia del EPB, un total de 403,290 lecturas pasaron el filtro de calidad. Las muestras con el mayor y menor número de lecturas fueron la 11A del amplicón de cordados y la muestra 7A del amplicón de cefalópodos, respectivamente. La muestra EPB9A no se incluyó en el estudio debido a que mostraba signos de contaminación (presencia de bacterias del suelo en una alta proporción).

3.5 Análisis de la diversidad bacteriana de *P. v. richardii*, por colonia, basada en la secuenciación del gen 16S ARNr

La diversidad filogenética microbiana de 5 colonias de *P. v. richardii*, presentes a lo largo de la costa occidental de la Península de Baja California, se analizó con el programa QIIME y la base de datos SILVA 123. Se obtuvieron un total de 451 941 secuencias de la región V4 del gen 16S ARNr, lo que resultó en 1041 OTUs con un 97% de identidad en su secuencia, la mayoría pudiéndose clasificar a nivel de género.

La muestra con el mayor número de lecturas fue N21 (33,968) mientras que SR43b presentó la menor cantidad (11,123). Sin embargo, fueron las muestras 3A y N17, las que presentaron el mayor y menor número de observaciones únicas, 352 y 153, respectivamente.

Un total de 17 fila bacterianos fueron encontrados en las muestras fecales de las focas de puerto (Anexo B), de los cuales 16 pertenecen al dominio Bacteria y 1 al dominio Archaea (Thaumarchaeota). Sólo 5 fila tuvieron una abundancia relativa mayor al 1%.

En la colonia de Todos Santos, a diferencia de las demás colonias, los fila Firmicutes y Actinobacteria se encuentran en mayor proporción y los fila Fusobacteria (4%) y Proteobacteria (2%) se encuentran menos representados. La colonia de San Jerónimo posee un mayor número de representantes del filo Bacteroidetes y es en esta colonia, como en Natividad, donde el filo Actinobacteria tuvo una abundancia relativa menor al 1%. En San Roque, el filo Fusobacteria tuvo la mayor abundancia, al compararse con las demás colonias (Fig.6).

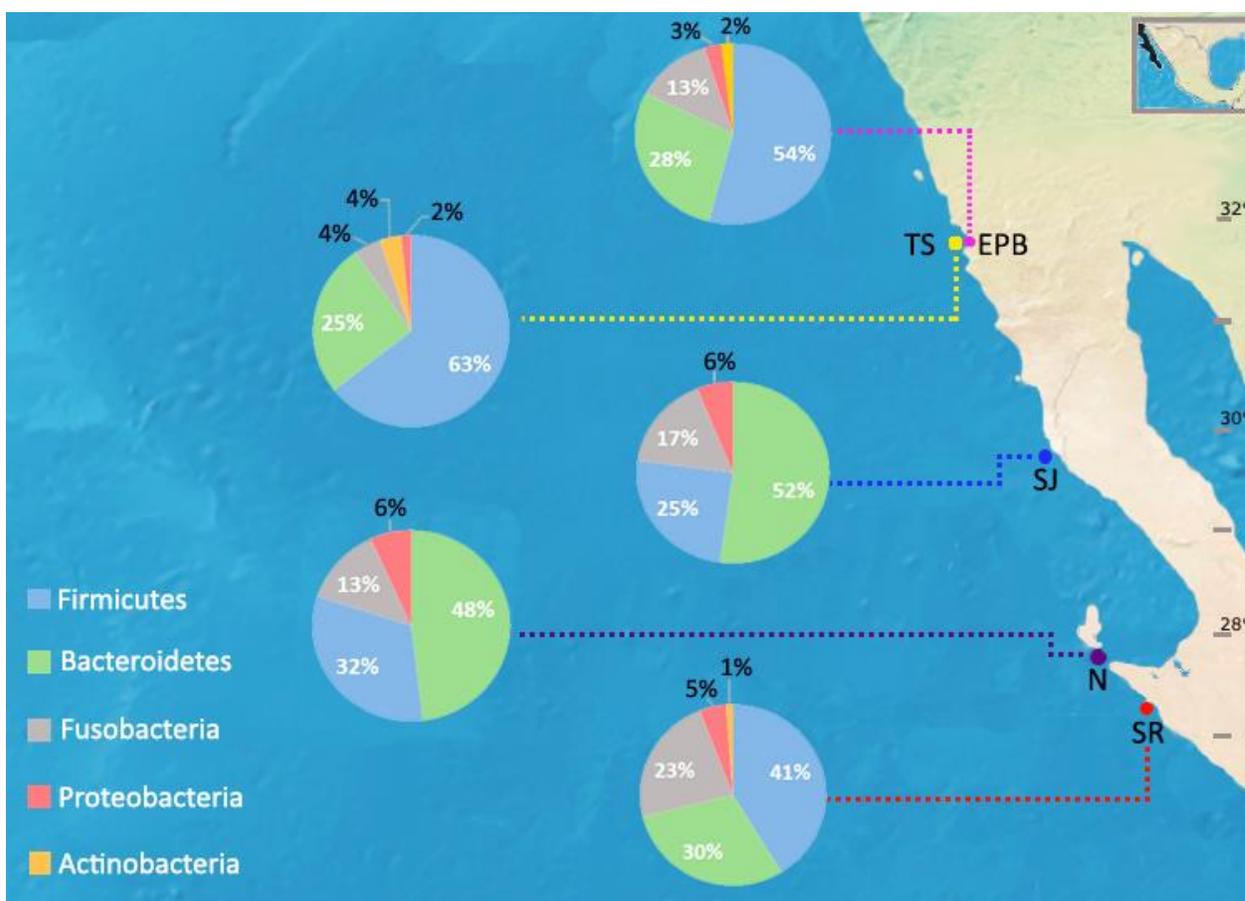


Figura 6. Promedio de la abundancia relativa de los principales fila bacterianos encontrados en las distintas colonias de focas de puerto. En el gráfico se muestran los fila con una abundancia relativa mayor al 1% (5). Estero de Punta Banda (EPB), Todos Santos (TS), San Jerónimo (SJ), Natividad (N) y San Roque (SR).

Las muestras más homogéneas, en la distribución de fila dominantes, fueron aquellas pertenecientes a la colonia de San Jerónimo. En las demás colonias, al menos una muestra difería en la composición de su fila microbiana. En las muestras TS31, el filo Tenericutes se encontró mayormente representado (0.5%). Las muestras SR16b y SR14b presentan la abundancia relativa más alta de los fila Fusobacteria y Deferribacteres, respectivamente (Fig. 7).

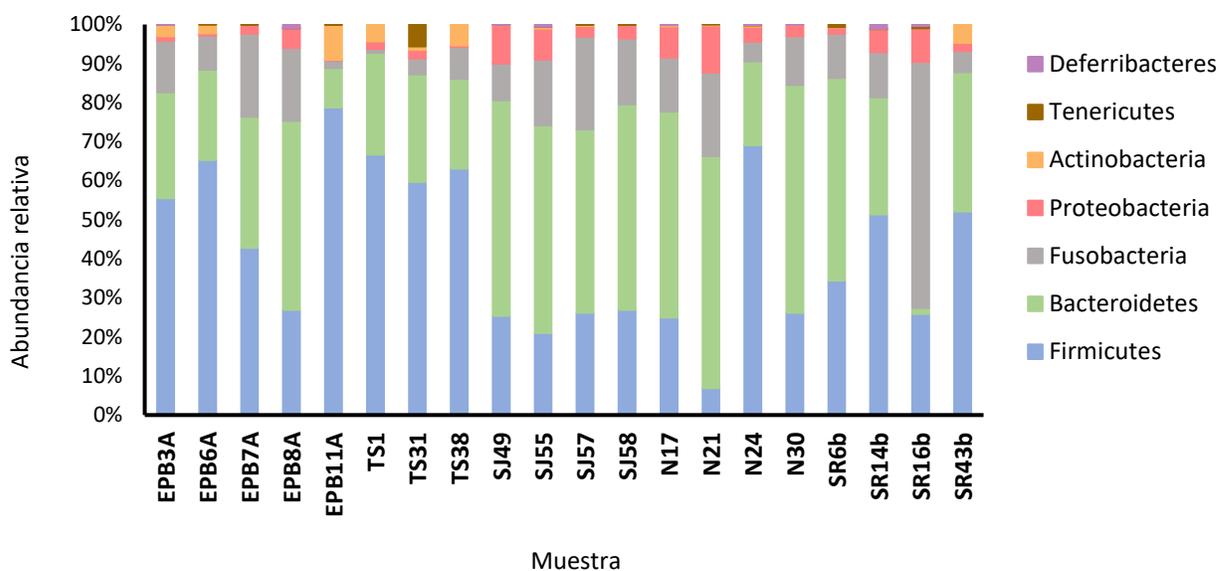


Figura 7. Fila bacteriana dominante encontrada en las distintas muestras de las colonias de focas de puerto. Sólo se muestran los fila con una abundancia relativa mayor al 0.01%.

Un total de 181 géneros microbianos fueron identificados en las muestras fecales de las focas de puerto. Al igual que en los resultados del filo, las muestras EPB11A, TS31, N24 y SR16b, presentaron una mayor diferencia en la abundancia relativa de géneros, en comparación con muestras de la misma colonia. Las muestras TS1 y SR16b presentan la menor y mayor abundancia relativa del género *Fusobacterium* (1% y 62%, respectivamente). Además, en la muestra SR16b, el género *Bacteroides* sólo posee una abundancia relativa del 1%. Un representante de la familia Christensenellaceae se encuentra altamente representado en la muestra N24 (Fig.8).

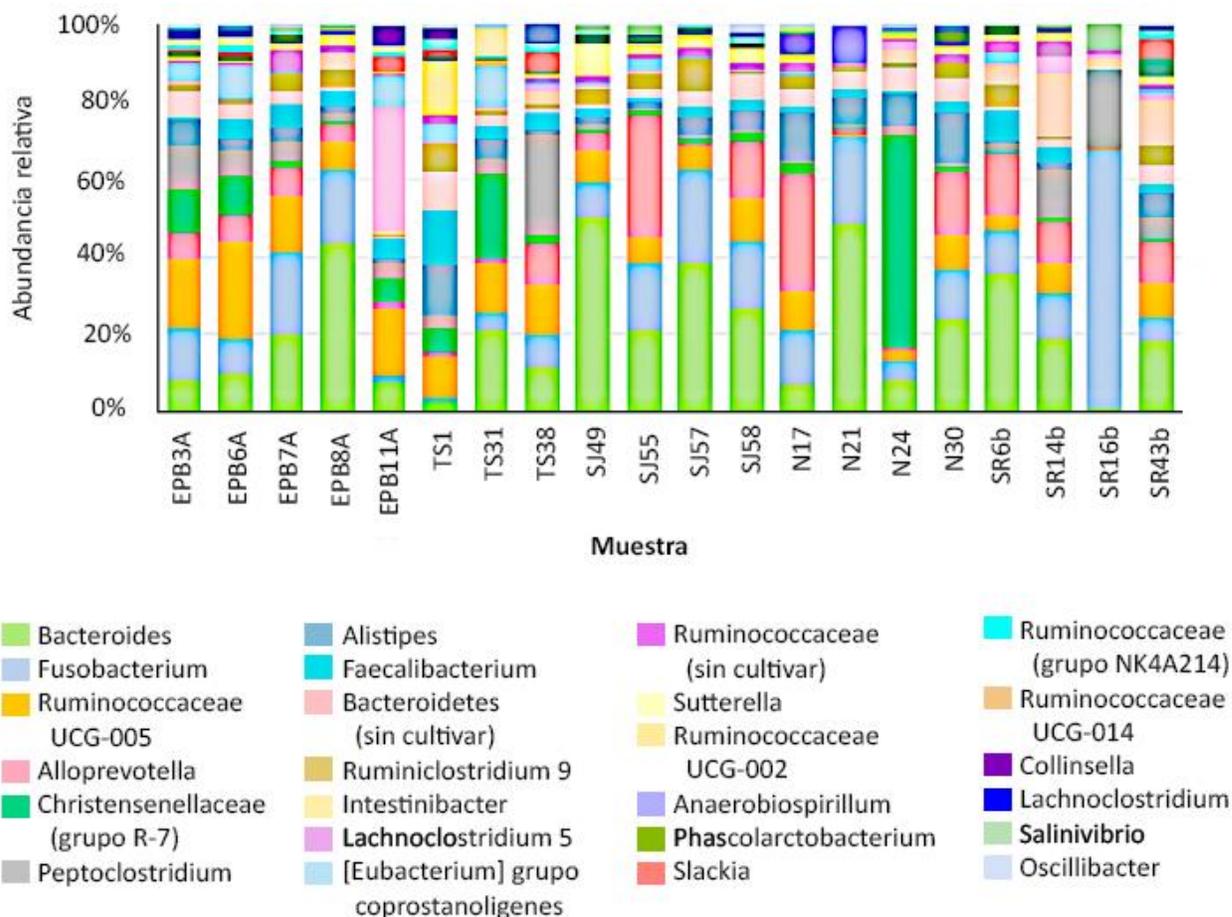


Figura 8. Géneros bacterianos dominantes encontrados en las distintas muestras de las colonias de focas de puerto. Un total de 181 géneros fueron identificados, de los cuales sólo 13 de ellos presentaron una abundancia relativa mayor al 1%. En el gráfico sólo se muestran los géneros con una abundancia mayor al 1%. Estero de Punta Banda (EPB), Todos Santos (TS), San Jerónimo (SJ), Natividad (N) y San Roque (SR).

3.5.1 Colonia del Estero de Punta Banda

En la colonia del EPB, el género *Bacteroides* fue el más abundante (17%) seguido de un miembro de la familia Ruminococcaceae. El género catalogado como *Lachnoclostridium* 5, obtuvo la mayor representación en esta colonia (6%). Veintiún géneros contribuyen, en promedio, con el 95% de la abundancia relativa microbiana en esta colonia (Fig.9).

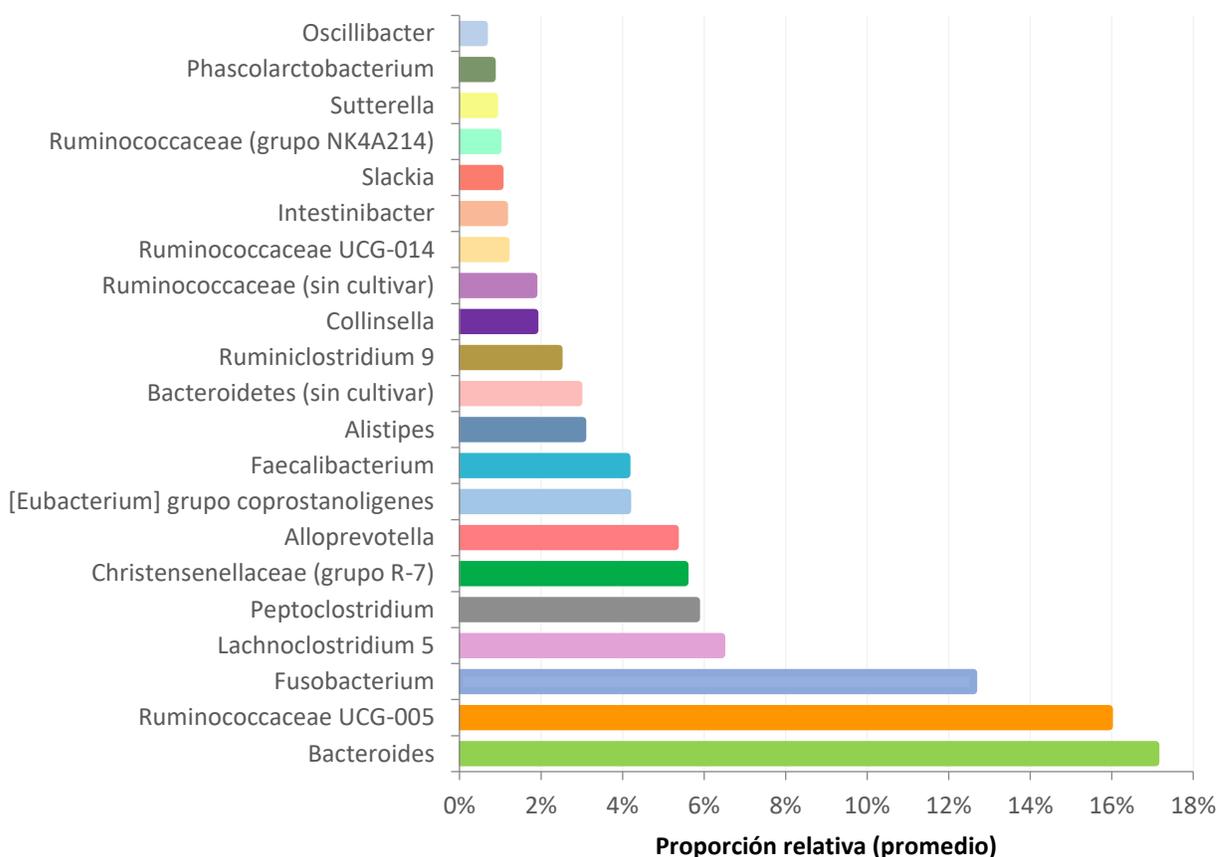


Figura 9. Composición porcentual de la comunidad microbiana fecal, a nivel de género, de la colonia de focas de puerto del Estero de Punta Banda basado en los resultados de secuenciación masiva. Sólo se muestran los géneros cuya abundancia fue mayor al 1% (21 géneros).

3.5.2 Colonia de la Isla Todos Santos

Las muestras de la Isla Todos Santos, presentaron una composición microbiana diferente al resto de las demás colonias. Mientras que en las otras colonias el género *Fusobacterium* presentó una alta abundancia relativa (13%- 22%), en las focas de TS este género sólo representó el 4%, siendo dos géneros los de mayor abundancia: un representante de la familia Ruminococcaceae (12%) y *Bacteroides* (11%).

Los géneros *Peptoclostridium* y *Faecalibacterium* tuvieron la mayor abundancia relativa en esta colonia. Además, es sólo en esta colonia donde un miembro de la clase Mollicutes (RF9) posee una abundancia relativa $\geq 1\%$. Veintitrés géneros contribuyen, en promedio, con el 96% de la abundancia relativa microbiana (Fig. 10).

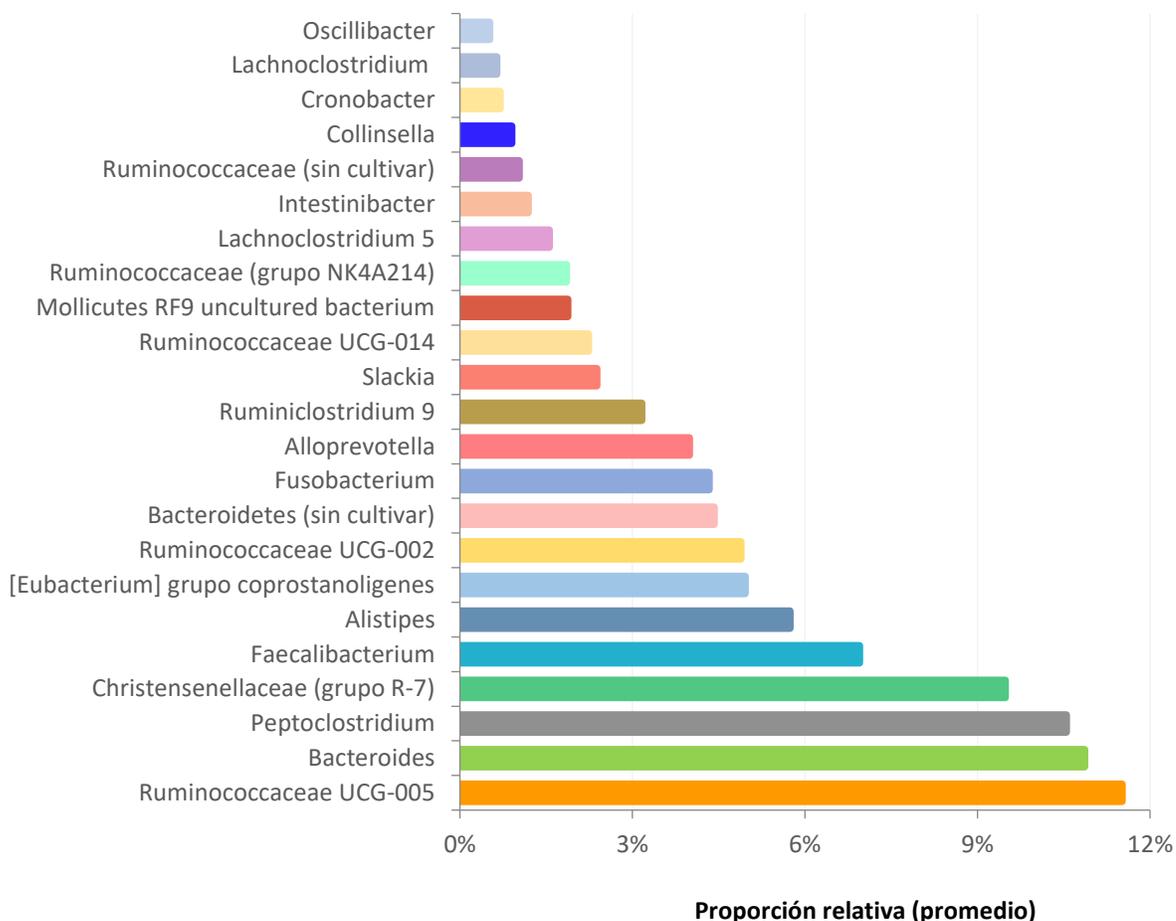


Figura 10. Composición porcentual de la comunidad microbiana fecal, a nivel de género, de la colonia de focas de puerto de la Isla Todos Santos, basado en los resultados de secuenciación masiva. Sólo se muestran los géneros cuya abundancia fue mayor al 1% (23 géneros).

3.5.3 Colonia de la Isla San Jerónimo

El género de mayor abundancia en la colonia de San Jerónimo fue *Bacteroides* (33%), con la abundancia relativa más alta en comparación con las demás colonias, seguido de *Fusobacterium* (17%). Dieciocho géneros contribuyen, en promedio, con el 95% de la abundancia relativa microbiana en las focas de puerto de esta colonia (Fig.11).

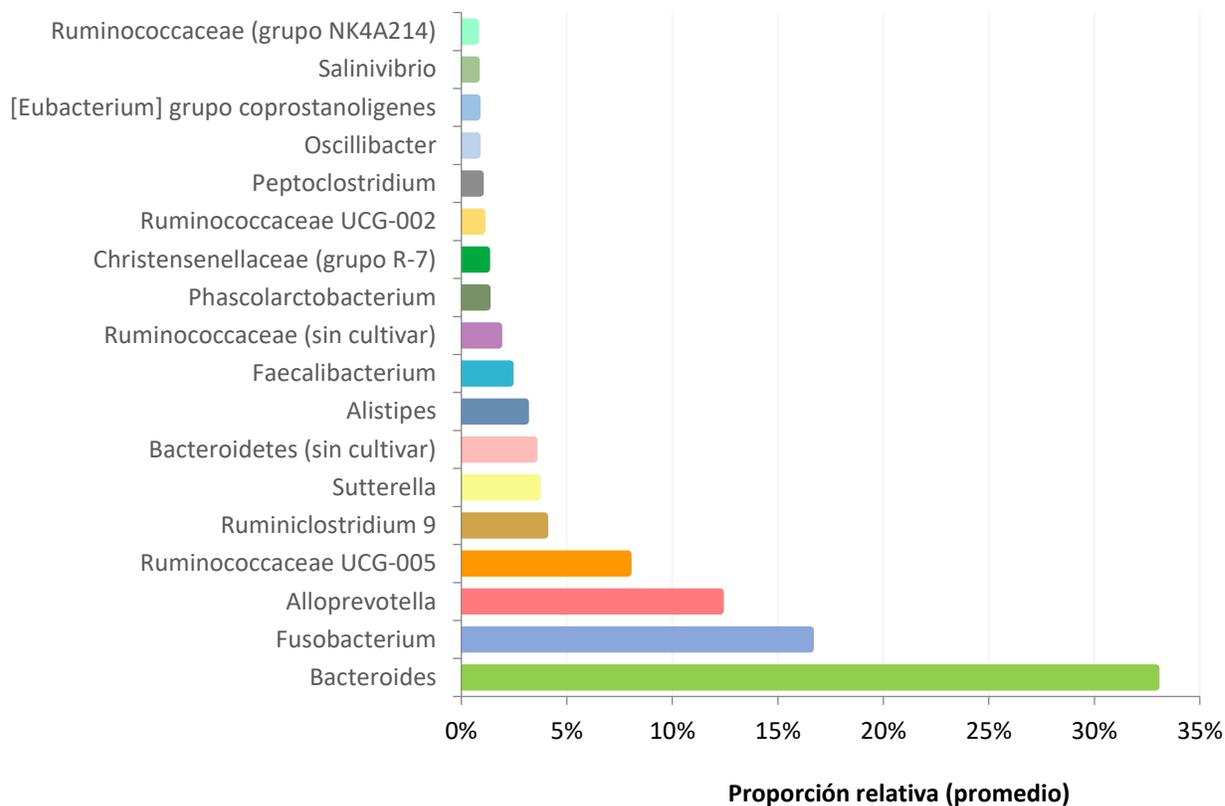


Figura 11. Composición porcentual de la comunidad microbiana fecal, a nivel de género, de la colonia de focas de puerto de la Isla San Jerónimo basado en los resultados de secuenciación masiva. Sólo se muestran los géneros cuya abundancia fue mayor al 1% (18 géneros).

3.5.4 Colonia de la Isla Natividad

En las focas de esta colonia el género de mayor abundancia fue *Bacteroides* (21%) seguido de un miembro de la familia Christensenellaceae (grupo R-7). Es sólo en esta colonia donde el género *Desulfovibrio* tuvo una abundancia relativa $\geq 1\%$ y *Alistipes* la mayor abundancia. Veinte géneros contribuyen, en promedio, con el 96% de la abundancia relativa microbiana en las focas de puerto de esta isla (Fig. 12).

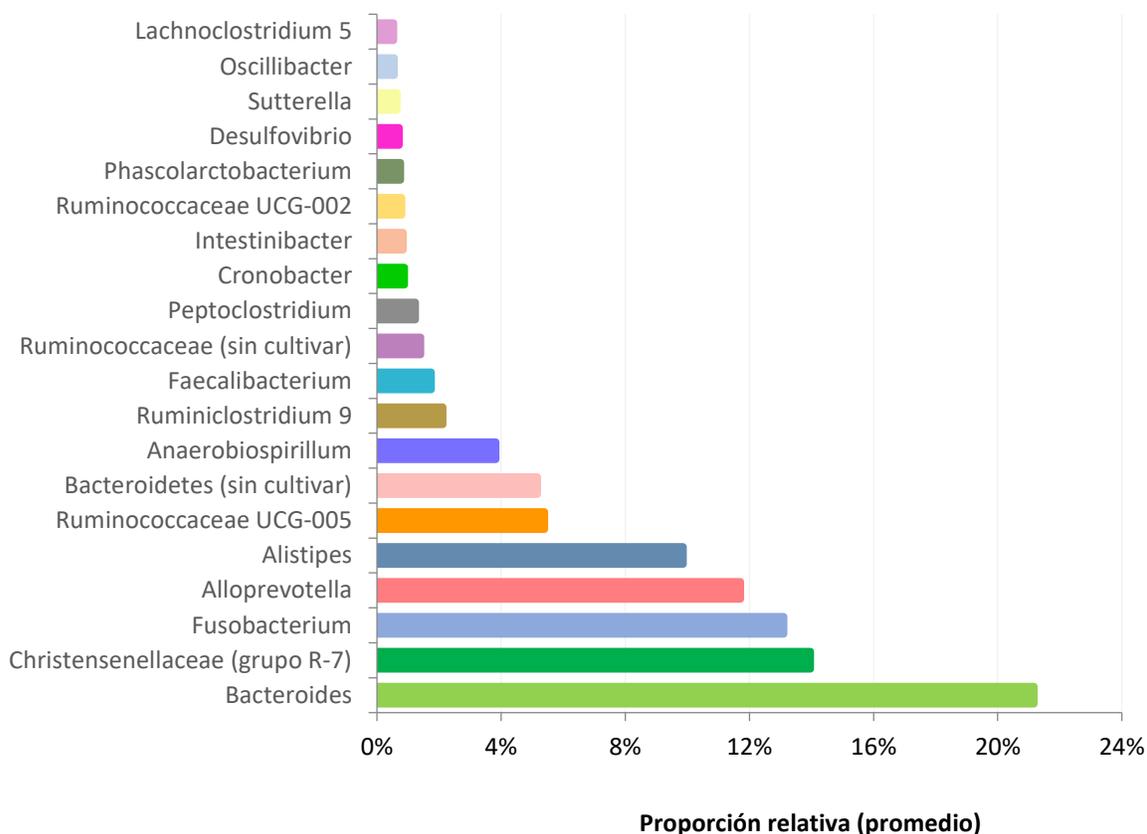


Figura 12. Composición porcentual de la comunidad microbiana fecal, a nivel de género, de la colonia de focas de puerto de la Isla Natividad basado en los resultados de secuenciación masiva. Sólo se muestran los géneros cuya abundancia fue mayor al 1% (20 géneros).

3.5.5 Colonia de la Isla San Roque

De todas las colonias de estudio, fue en la colonia más sureña donde el género *Fusobacterium* presentó la mayor abundancia (22%). El segundo género más abundante fue *Bacteroides* (17%). A diferencia de las demás colonias, SR presentó un género candidato, *Stoquefichus*, con una abundancia relativa del 1%. Así mismo, fue en SR donde los géneros *Dorea* y *Coprobacillus* presentaron una abundancia relativa $\geq 1\%$. Veinte géneros contribuyen, en promedio, con el 93% de la abundancia relativa microbiana en las focas de puerto de esta isla (Fig. 13).

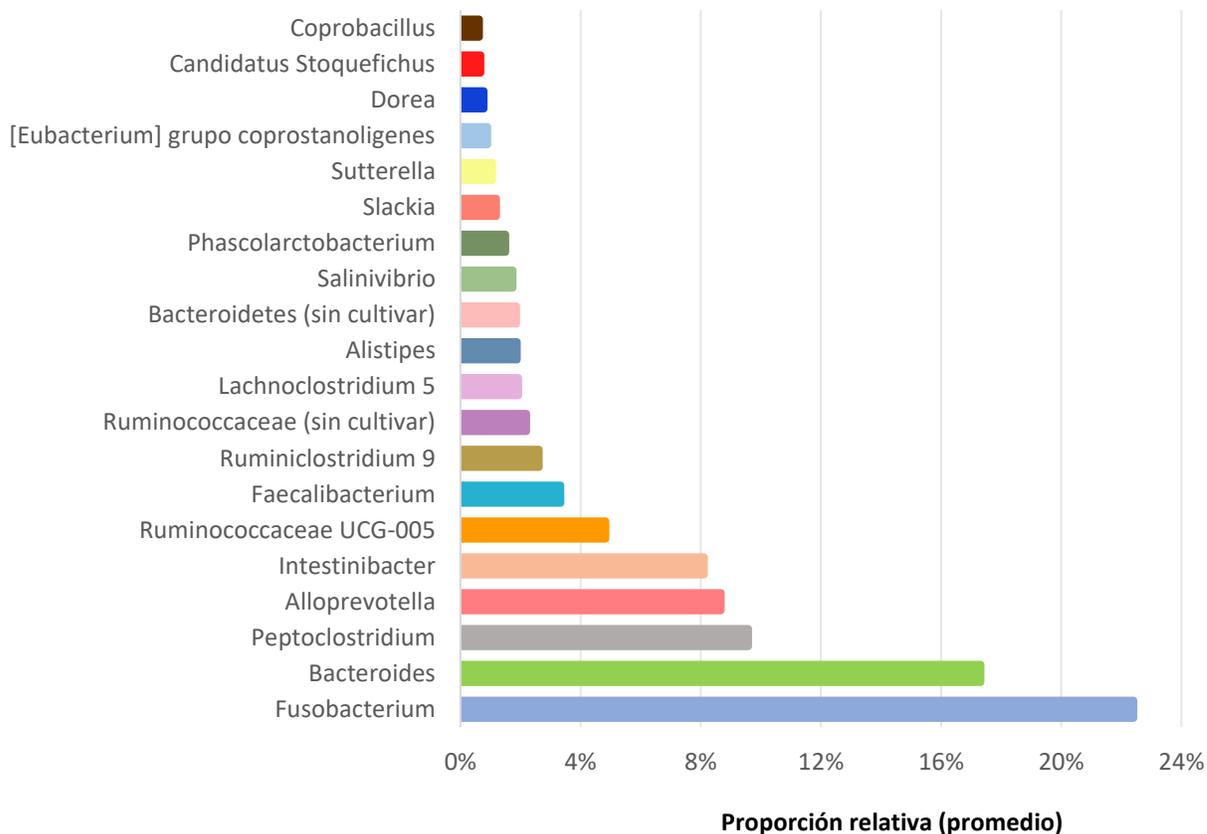


Figura 13. Composición porcentual de la comunidad microbiana fecal, a nivel de género, de la colonia de focas de puerto de la Isla San Roque basado en los resultados de secuenciación masiva. Sólo se muestran los géneros cuya abundancia fue mayor al 1% (20 géneros).

3.6 Diversidad bacteriana general de *P. v. richardii* basada en la secuenciación del gen 16S ARNr

De los 17 fila bacterianas encontrados en las muestras fecales de las colonias de estudio (Anexo B), sólo 5 de ellos poseen una abundancia relativa mayor al 1% y contribuyen con el 99% de la microbiota fecal total, siendo los fila: Firmicutes (42%), Bacteroidetes (37%) y Fusobacteria (14%) los más dominantes (Fig. 14). Entre los fila con una abundancia relativa < 1% se encuentra 1 filo de archaeas: Thaumarchaeota.

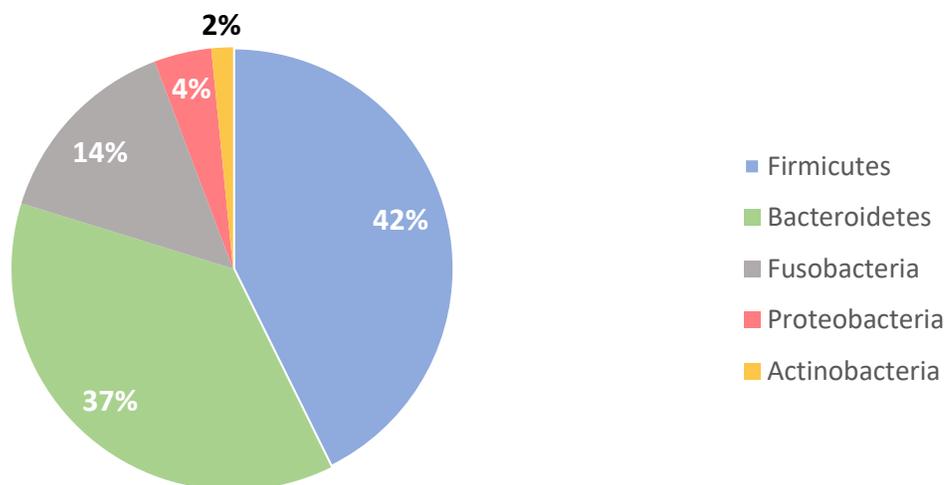


Figura 14. Composición porcentual de la comunidad microbiana fecal de las 5 colonias de focas de puerto a nivel de filo basado en los resultados de secuenciación masiva. Se muestran los filo con una abundancia relativa mayor al 1%

La comparación, a nivel de filo, entre las distintas colonias de focas de puerto demuestra que únicamente existe un enriquecimiento significativo de miembros del filo Firmicutes en las muestras de la colonia de TS en comparación con la colonia de focas de SJ (Fig. 15). En los demás filo, no se observaron diferencias significativas.

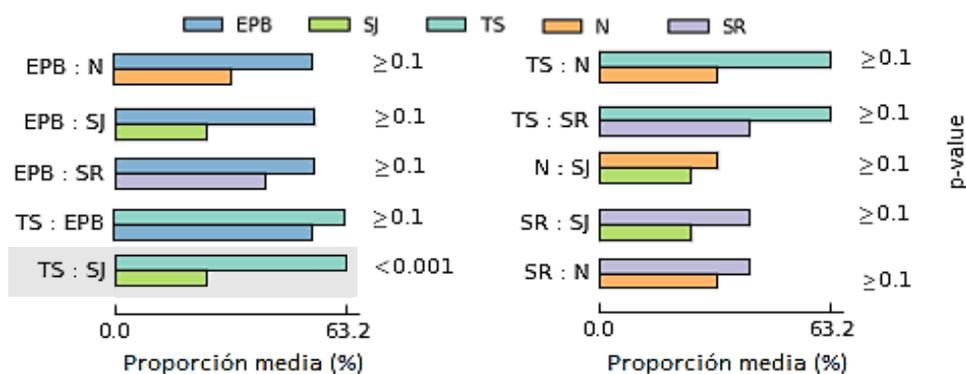


Figura 15. Enriquecimiento del filo Firmicutes en la colonia de focas de Todos Santos en comparación con la colonia de San Jerónimo. Diagrama *post hoc* donde se muestra la proporción promedio de secuencias en cada colonia y el valor de p.

Un total de 181 géneros fueron identificados, de los cuales 25 tuvieron una abundancia relativa mayor al 1% (Fig. 16). El género dominante dentro del filo Fusobacteria fue *Fusobacterium* (14%), presente en todas las colonias. Los principales representantes del filo Firmicutes fueron: miembros de la familia *Ruminococcaceae* (16%), un género de la familia *Christensenellaceae* (6%), *Peptoclostridium* (5%), *Faecalibacterium* (4%), *Ruminiclostridium* (3%), *Intestinibacter* (2%), dos miembros del género *Lachnoclostridium* (2%), *Phascolarctobacterium* (1%) y *Oscillibacter* (1%). Este filo presentó la mayor cantidad de representantes.

El filo Bacteroidetes está compuesto principalmente por los géneros: *Bacteroides* (20%), *Alloprevotella* (8%), *Alistipes* (5%) y un miembro no clasificado (3%). El filo Proteobacteria por: *Sutterella* (1%), *Anaerobiospirillum* (1%) y *Salinivibrio* (1%). A pesar de que el filo Actinobacteria representa el 2 % de la abundancia total, no en todas las muestras estuvo presente. Los géneros *Slackia* (1%) y *Collinsella* (1%) fueron los más abundantes. Veinticinco miembros bacterianos, presentes en las muestras fecales de 5 colonias de foca de puerto, contribuyen con una abundancia relativa del 95% a la comunidad microbiana fecal total (Fig. 16).

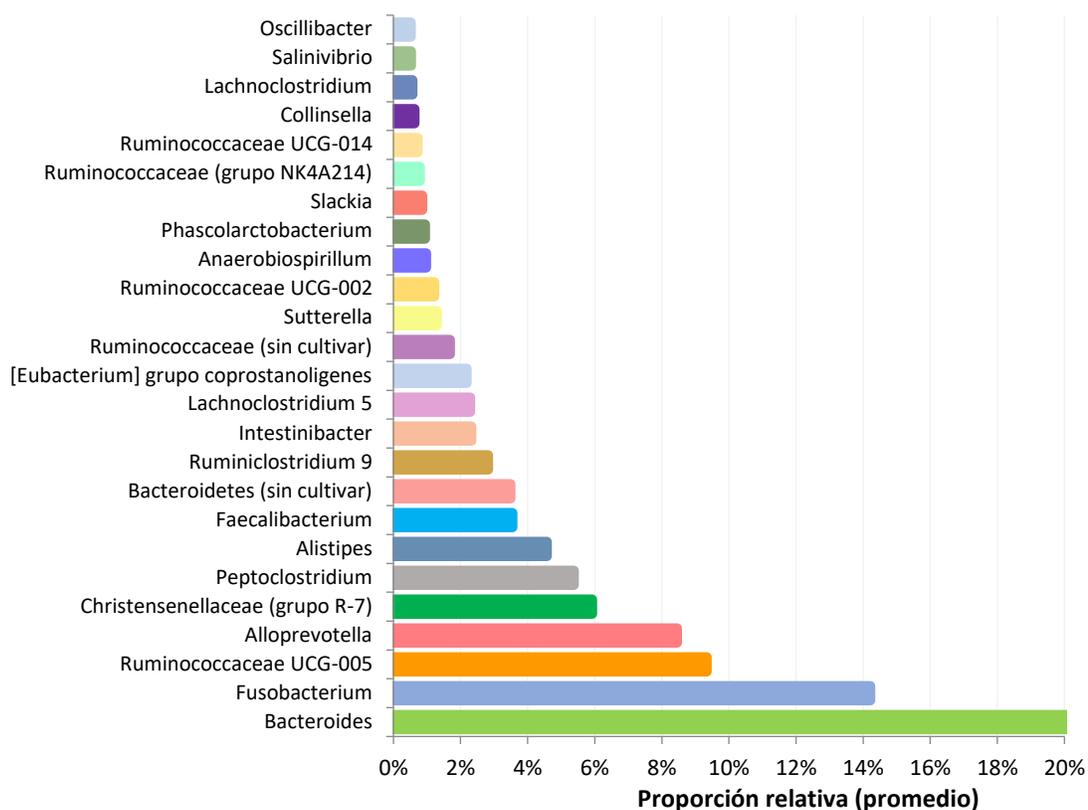


Figura 16. Composición porcentual de la comunidad microbiana fecal de las 5 colonias de focas de puerto a nivel de género basado en los resultados de secuenciación masiva. Sólo se muestran los géneros con una abundancia relativa $\geq 1\%$.

De estos 25 grupos bacterianos, cuya abundancia relativa es mayor al 1%, los géneros: *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Alloprevotella*, *Peptoclostridium*, *Alistipes*, *Faecalibacterium*, *Ruminiclostridium 9*, *Lachnoclostridium 5*, *Phascolarctobacterium*, así como dos miembros de la familia *Ruminococcaceae* y un miembro no clasificado del filo Bacteroidetes, estuvieron presentes en todas las muestras. Estos grupos bacterianos compartidos pueden considerarse el grupo núcleo de la microbiota intestinal de la foca de puerto en México y contribuyen, en promedio, con el 74% de la abundancia relativa microbiana intestinal (Fig. 17).

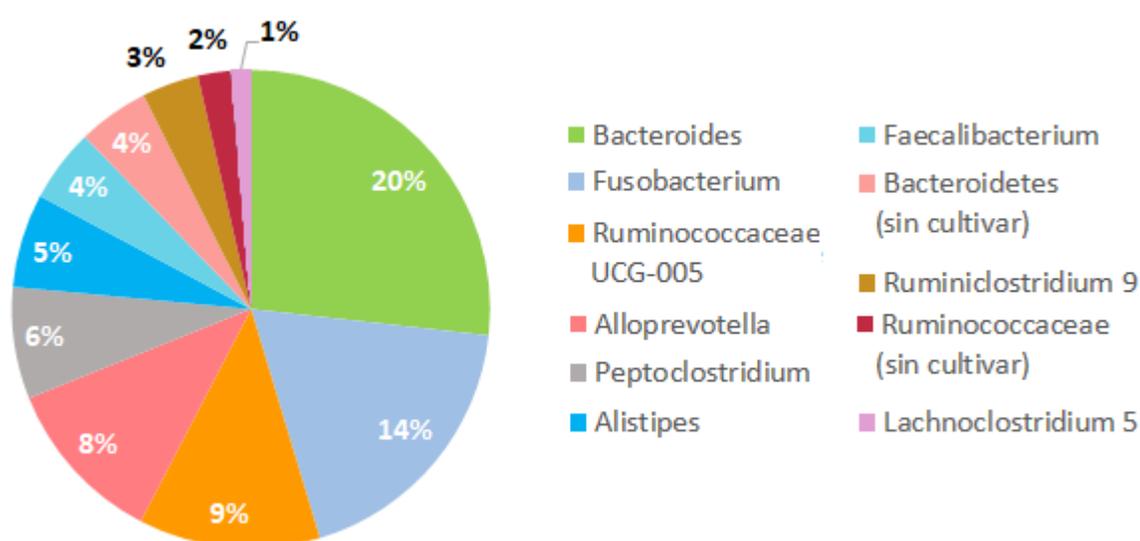


Figura 17. Composición porcentual del grupo núcleo bacteriano de las 5 colonias de focas de puerto a nivel de género. Se muestran los géneros que estuvieron presentes en, al menos, el 50% de las muestras de todas las colonias de estudio.

Once fue el número de OTUs, a nivel de género, compartidos por todas las colonias. Las colonias que comparten un mayor número de OTUs microbianos son las de EPB- TS y, a su vez, poseen 2 géneros que no están presentes en una abundancia $\geq 0.5\%$ en las demás colonias.

Las colonias de TS-SJ-N-SR poseen el menor número de OTUs en común, sólo comparten el grupo de bacterias considerado como “núcleo” (Fig. 18). Las colonias más distantes, EPB-SR, comparten un alto número de OTUs, resultado que contrasta con N-SR, colonias cercanas, que poseen la menor cantidad de

OTUs en común. No existe una relación clara entre la cercanía de las colonias con la cantidad de OTUs compartidos.

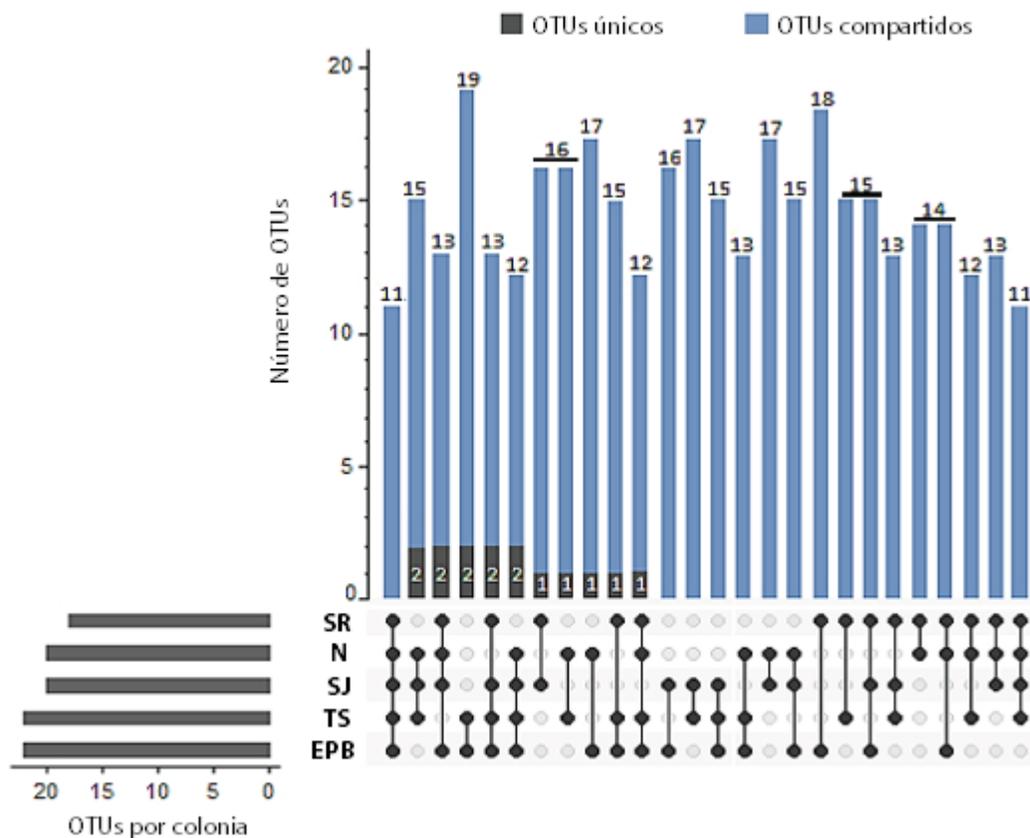


Figura 18. Número de OTUs, nivel género, únicos y compartidos entre las 5 colonias de focas de puerto del estudio. Se consideraron los géneros con una abundancia $\geq 0.5\%$, los números indican la cantidad de OTUs por categoría (únicos o compartidos). Estero de Punta Banda (EPB), Todos Santos (TS), San Jerónimo (SJ), Natividad (N) y San Roque (SR).

3.7 Comparación de las comunidades bacterianas fecales de las distintas colonias de foca de puerto

La curva de rarefacción demostró que aproximadamente, 10 000 lecturas por muestra es suficiente para realizar los análisis comparativos, al ser este valor donde se alcanza la asíntota. El conjunto de datos de todas las muestras y colonias se normalizó a 11 030 lecturas, que fue el número de lecturas obtenidas por muestra con el menor número de secuencias (SR43b). Para los análisis de diversidad y riqueza de especies se utilizó la matriz de datos normalizada (Fig. 19).

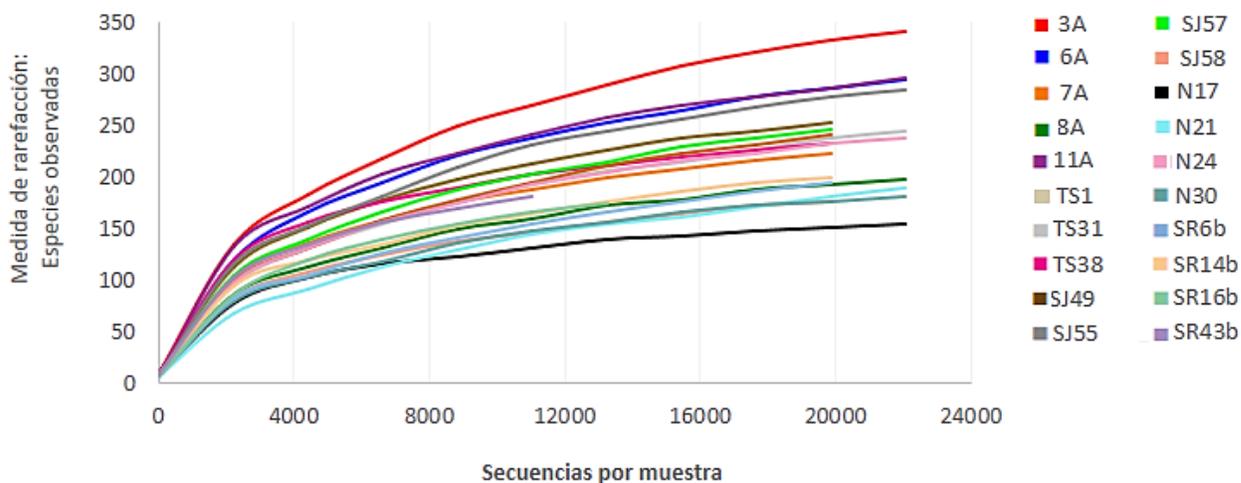


Figura 19. Curvas de rarefacción por muestra, basadas en la cantidad de especies observadas (OTUs). Estero de Punta Banda (EPB), Todos Santos (TS), San Jerónimo (SJ), Natividad (N) y San Roque (SR).

A pesar de que la curva de rarefacción indica que 10 000 secuencias son suficientes para una óptima cobertura de la microbiota de la foca de puerto, los análisis de diversidad alfa (Chao1) revelan que es posible encontrar más microorganismos si el esfuerzo del muestreo se intensifica. La colonia del EPB presentó el mayor número de OTUs observados (219) y la colonia de Natividad los más bajos (154). Es además en esta primera colonia donde se espera un mayor número de especies, con base en el resultado del promedio del índice de Chao1 calculado para 11 030 lecturas por muestra (Fig. 20).

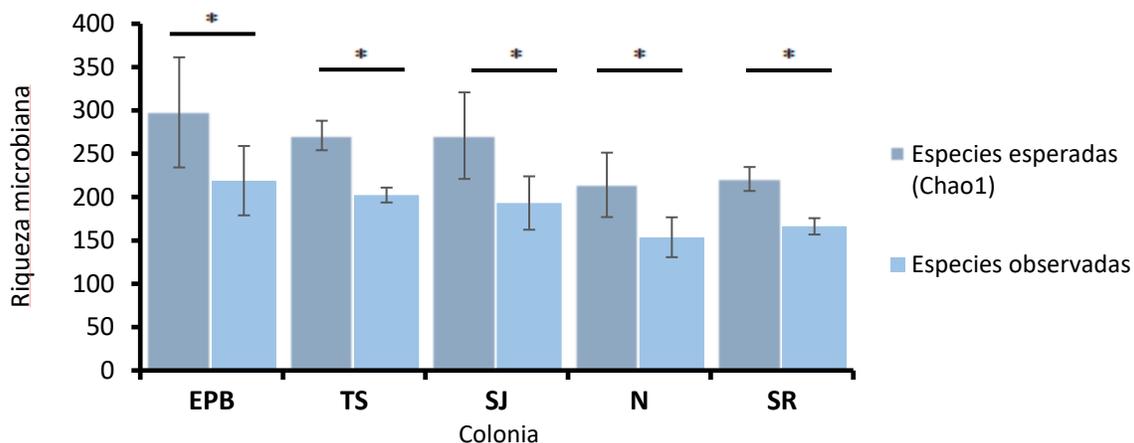


Figura 20. Riqueza microbiana en las diferentes colonias de focas de puerto. Estimación de los OTUs esperados (Chao1) y observados. El promedio del índice de Chao1 se calculó para cada colonia usando datos normalizados (11030 lecturas por muestra). Las barras de error indican la desviación estándar. * $p < 0.005$. Estero de Punta Banda (EPB), Todos Santos (TS), San Jerónimo (SJ), Natividad (N) y San Roque (SR).

Para calcular la diversidad de la microbiota entre colonias, se utilizó el índice de Shannon. No se observaron diferencias significativas en la biodiversidad del microbioma intestinal entre colonias (Fig. 21). Además, al comparar la estructura de la comunidad microbiana con el software STAMP, para observar diferencias significativas entre colonias, no se obtuvieron resultados significativos en ningún nivel taxonómico ($p > 0.05$).

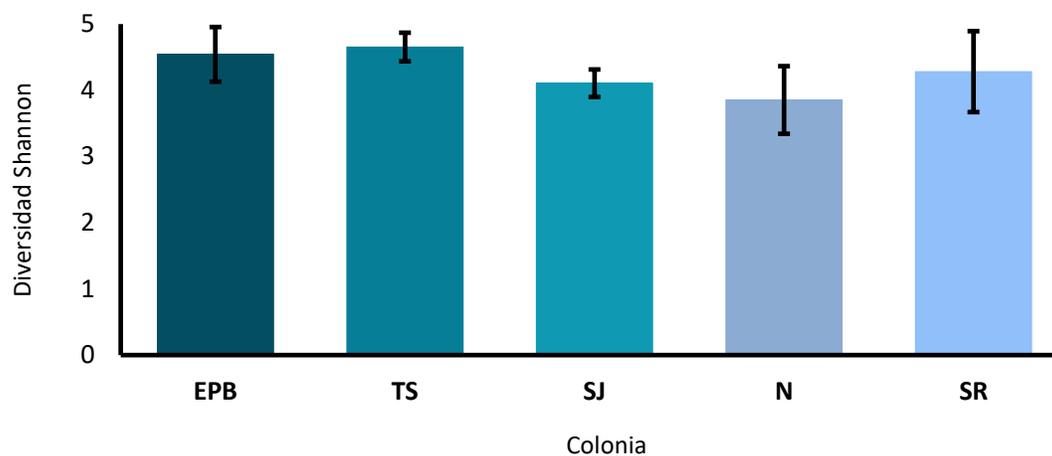


Figura 21. Diversidad microbiana en la microbiota intestinal de cada colonia. La diversidad (Shannon) se calculó para cada colonia usando datos normalizados (11 030 lecturas por muestra). Las barras de error indican la desviación estándar. Estero de Punta Banda (EPB), Todos Santos (TS), San Jerónimo (SJ), Natividad (N) y San Roque (SR).

Para explorar la similitud en la composición de la comunidad microbiana de las colonias, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA). Si se considera que las diferencias en la comunidad son el resultado de cambios en la abundancia de taxones (matriz ponderada), la mayoría de las muestras del EPB mostraron una abundancia similar en la composición de su microbiota y entre las muestras de TS (Fig. 22a). En las demás colonias no se observaron agrupaciones, lo que indica que existe un alto nivel de disimilitud en la abundancia de OTUs, incluso entre muestras de la misma colonia. No obstante, algunas muestras de distintas colonias (EPB7A, N17 y SR14b) mostraron una alta similitud en la abundancia de su taxa microbiana (Fig. 22a). Una muestra de la colonia de SR (SR16b) presenta la mayor diferencia en términos de composición microbiana con respecto a las demás muestras.

Sin embargo, cuando la abundancia de los taxones no se toma en cuenta y las diferencias que se observan son el resultado de la presencia y ausencia de OTUs (matriz no ponderada), no se aprecia una clara asociación entre colonias. Las muestras que se agruparon de acuerdo a la abundancia de OTUs, no

se concentran una cerca de la otra al usar este tipo de matriz. Este resultado indica que existen diferencias intraespecíficas en la composición de la microbiota intestinal de la foca de puerto (Fig. 22b).

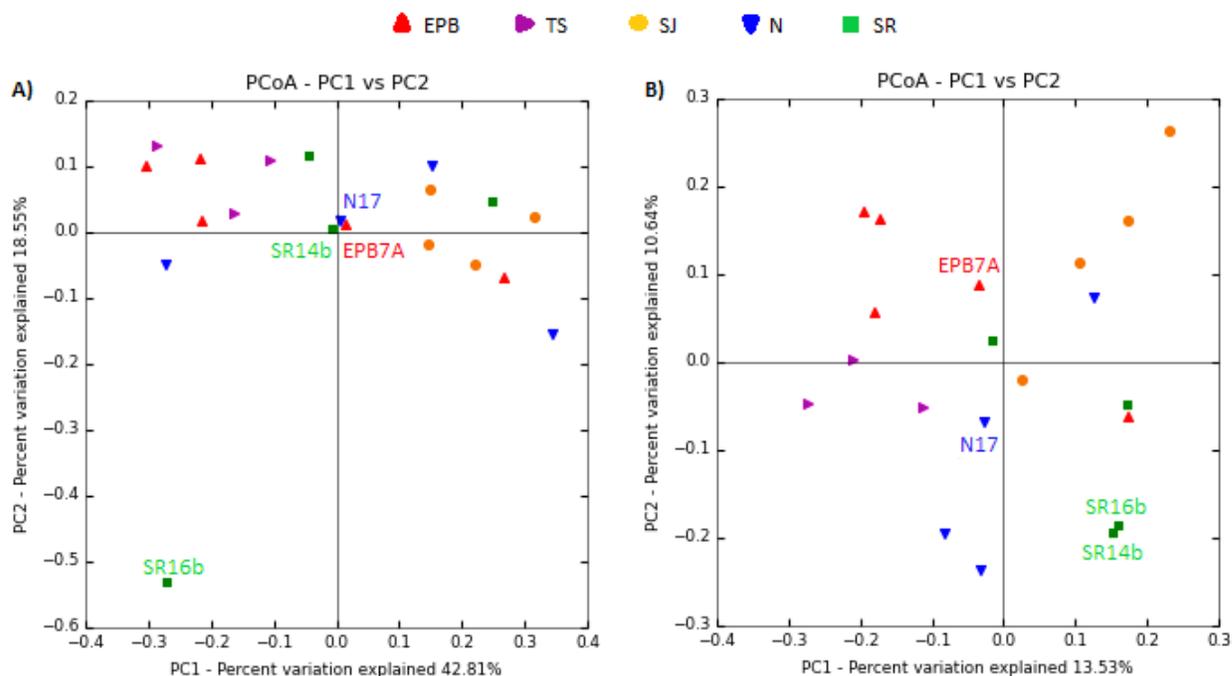


Figura 22. Análisis de coordenadas principales de la comunidad microbiana fecal de las colonias de foca de puerto basadas en la matriz de distancias filogenéticas Unifrac. A) Análisis ponderado, cuantitativo, y b) no ponderado, cualitativo. La distancia entre los símbolos refleja diferencias en la estructura de los miembros de la comunidad microbiana. Los datos fueron normalizados a 11030 lecturas por muestra. Simbología: Estero de Punta Banda (EPB), Todos Santos (TS), San Jerónimo (SJ), Natividad (N) y San Roque (SR).

3.8 Análisis de la dieta de la colonia del EPB

Se detectaron 34 presas en las muestras fecales de la colonia del EPB (Anexo C). Entre muestras existieron diferencias significativas con respecto al número de especies encontradas ($p= 0.0008$). Al realizar la comparación múltiple entre cada muestra, se observó que las muestras EPB7A y EPB8A, poseen un número de presas significativamente distinto al compararse con la muestra EPB11A, $p= 0.0022$ y $p= 0.0057$, respectivamente (Fig. 23).

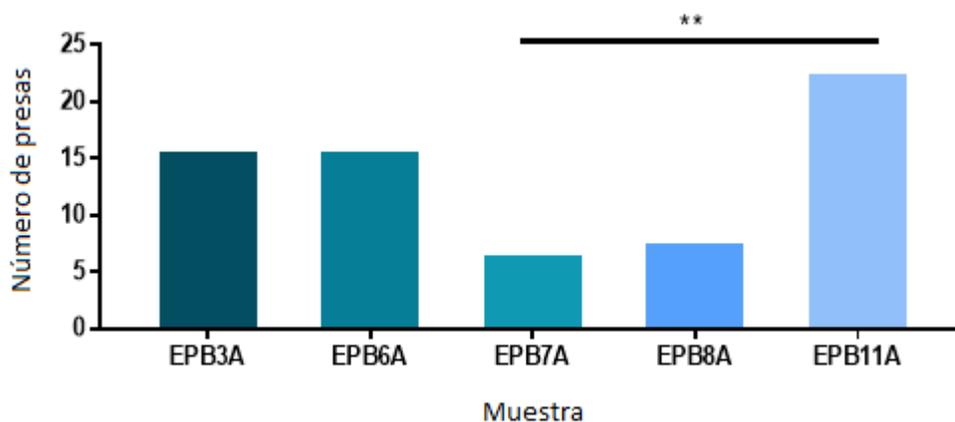


Figura 23. Número total de especies presa encontradas por muestra. **p < 0.01

La riqueza de especies observada es menor que la estimada por el índice de Chao2, lo que indica que es necesario aumentar el número de muestras para obtener una mejor cobertura de las especies presa de las focas de la colonia del Estero de Punta Banda (Fig. 24).

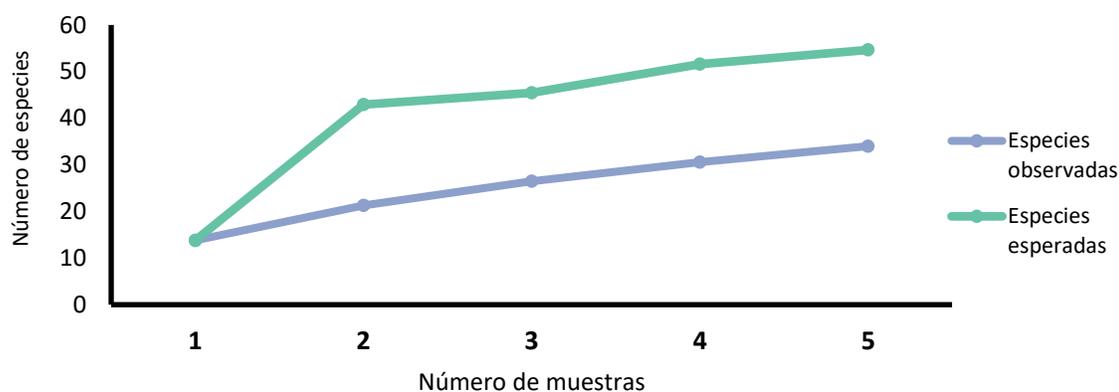


Figura 24. Curva de acumulación de especies obtenidas y esperadas (Chao2).

Los peces teleósteos fueron el principal grupo consumido por las focas de esta colonia, seguido de los elasmobranquios. Los grupos Porifera, Cephalopoda y Cnidaria, tuvieron el mismo porcentaje de abundancia al ser representado cada grupo por una especie. Crustacea fue el grupo de invertebrados con el mayor número de especies presa detectadas (Fig. 25).

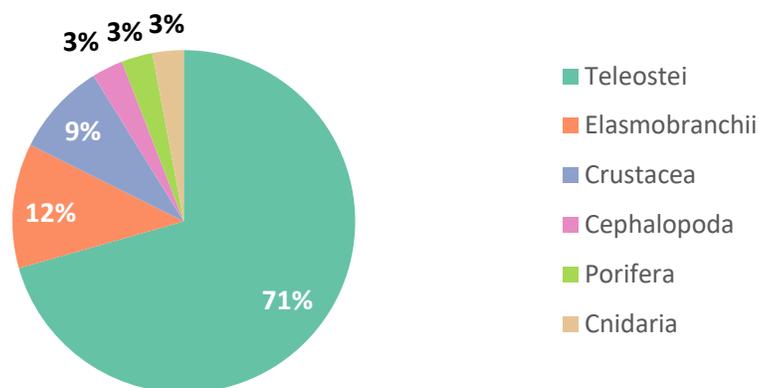


Figura 25. Gráfico porcentual de los principales grupos de presas consumidas en la colonia de focas de puerto del Estero de Punta Banda.

En algunos casos, no fue posible discriminar entre especies pertenecientes al mismo género (*Citharichthys sp.*, *Syngnathus sp.* y *Sebastes sp.*), al poseer una secuencia la misma probabilidad de pertenecer a una u otra especie. Con respecto a la frecuencia con que las presas son consumidas, 6 especies se consideraron de consumo preferencial, 11 de consumo secundario y 17 de consumo incidental. Entre las presas de consumo preferencial se encuentran 5 especies de peces teleósteos (*Auxis rochei*, *Synodus lucioceps*, *Citharichthys xanthostigma/sordidus*, *Menticirrhus undulatus*, *Mugil cephalus*) y una especie de elasmobranquio (*Raja binoculata*).

Los invertebrados tuvieron un consumo principalmente incidental, de las 6 presas de invertebrados detectadas, ninguna de ellas tuvo un consumo preferencial (Fig. 26). El cangrejo de arena, *Blepharipoda occidentalis* fue la especie de mayor incidencia. El único representante identificado del grupo Cephalopoda fue *Octopus rubescens*.

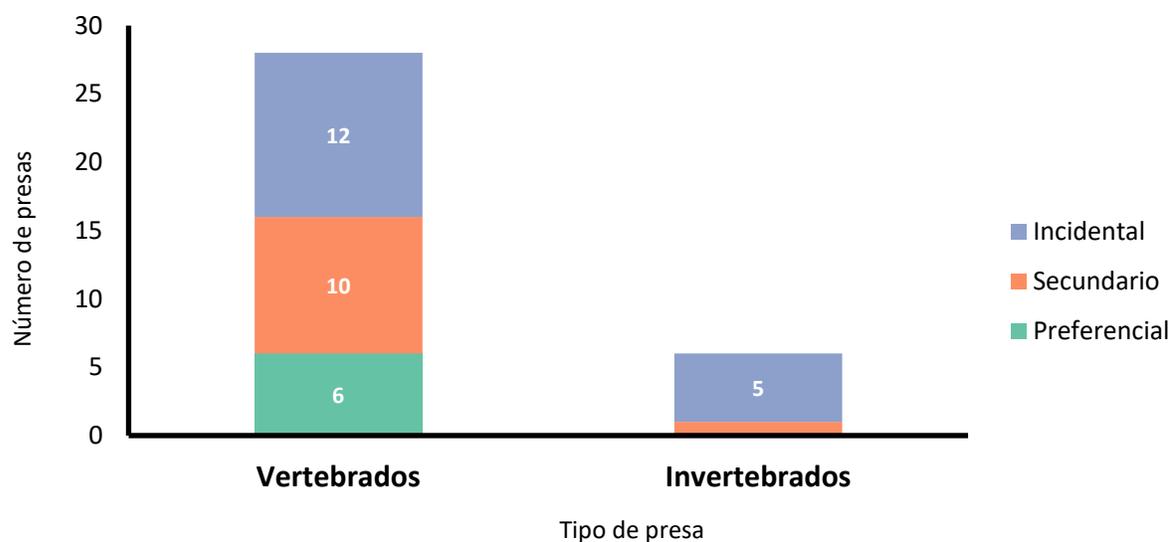


Figura 26. Consumo de presas por grupo basado en el porcentaje de frecuencia de ocurrencia (%FO).

Se identificó la presencia de la especie *Icelinus quadriseriatus/cavifrons* en una muestra, sin embargo, debido a su talla pequeña (7 cm), la especie se catalogó como alimento de las presas de la foca de puerto. El 26% de las presas identificadas no dejan restos duros en las heces, como los elasmobranquios y algunos invertebrados y, por lo tanto, no pueden ser detectadas con los métodos tradicionales. En general, la mayoría de las presas encontradas tienen hábitos demersales (76%) y una minoría, hábitos pelágicos.

Con el índice de Jaccard y su representación en un dendrograma, se determinó que la dieta de la colonia del EPB es la que más difiere con respecto a las demás. Las colonias de N y SR son las que poseen la mayor similitud en el contenido de su dieta, seguido de las colonias de TS y SJ (Fig. 27) (Brassea 2016). Es además en esta colonia, donde se pudo identificar la mayor riqueza de especies. De las 34 especies identificadas, 11 de ellas se consumen también en otras colonias (Anexo D).

Las presas presentes en todas las colonias fueron: *Synodus lucioceps*, *Citharichthys xanthostigma*, *Chilara taylori*, *Microstomus pacificus* y *Zaniolepis frenata*, siendo las primeras dos especies mencionadas, presas de consumo preferencial en todas las colonias de estudio.

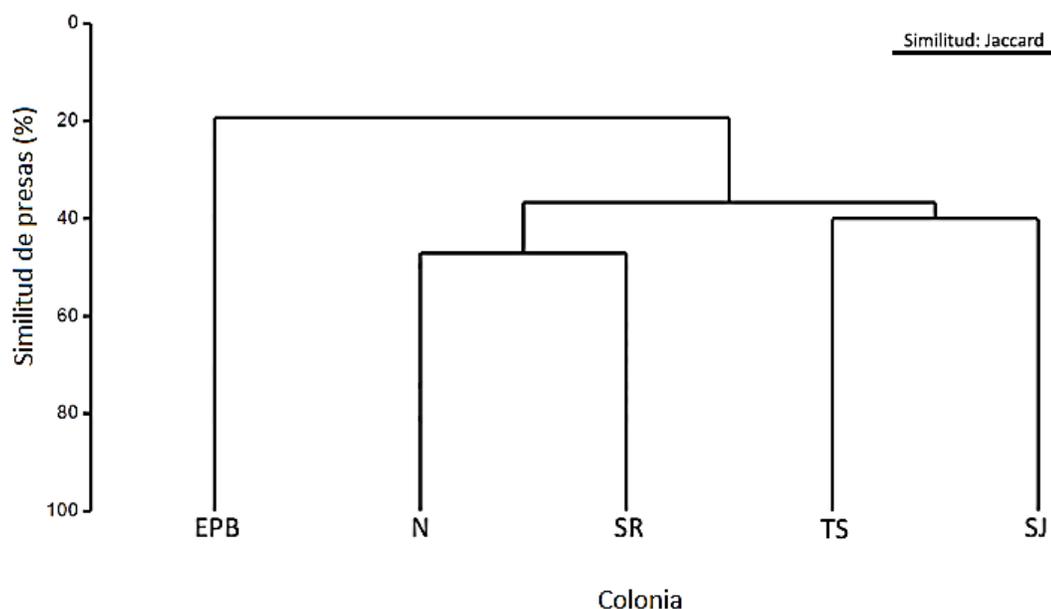


Figura 27. Dendrograma derivado del índice de Jaccard basado en la matriz de datos de presencia/ausencia de presas. Tipo de agrupamiento: *average linkage*. Estero de Punta Banda (EPB), Todos Santos (TS), San Jerónimo (SJ), Natividad (N) y San Roque (SR).

3.8.1 Comparación de los métodos de identificación de presas

Todas las especies presa encontradas en las muestras del EPB por el análisis de estructuras duras, fueron identificadas con el análisis metagenómico (Anexo E). Sin embargo, no todas las especies encontradas por restos duros en una muestra, se encontraron en esa muestra en el análisis metagenómico.

Con el primer método se detectaron una menor cantidad de taxones de presa con respecto al segundo, 12 y 34, respectivamente. En algunos casos, debido a la alta degradación de los otolitos, no fue posible determinar la especie y la clasificación se mantuvo a nivel de familia (Familia *Paralichthyidae*). El número de presas encontradas con ambos métodos mostró diferencias significativas (Fig. 28b).

Al igual que los resultados obtenidos del análisis metagenómico, la especie *Synodus lucioceps* se catalogó como presa de consumo preferencial, *Citharichthys stigmaeus* y *Paralichthys californicus* como presas secundarias, y *Engraulis mordax* y *Porichthys sp.* como presas incidentales. La frecuencia de ocurrencia de las demás presas encontradas, difirió entre los métodos de identificación. Con el método de

restos duros también se identificó la presencia del género *Icelinus sp*, con un %FO del 20% (consumo incidental o presa de las especies detectadas).

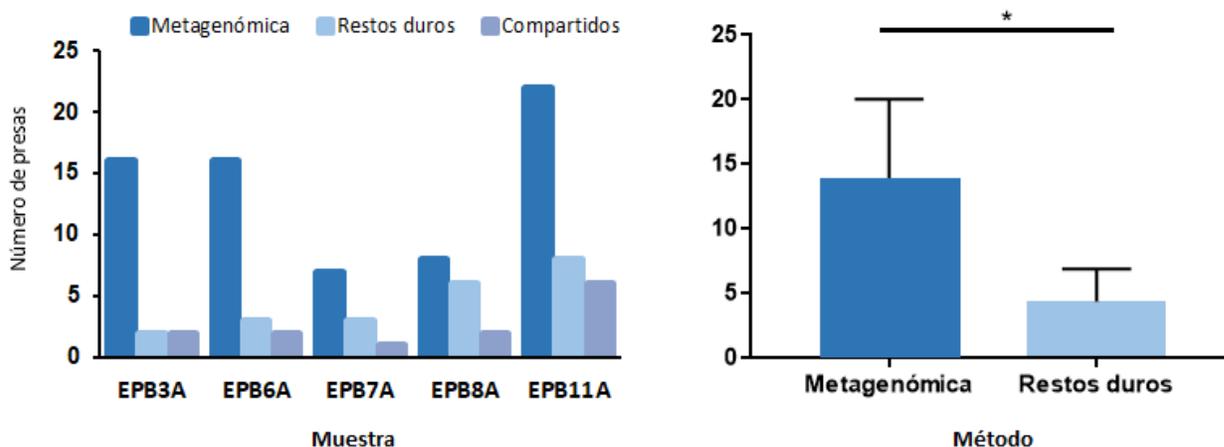


Figura 28. Comparación de la riqueza de especies presa obtenida en ambos métodos de detección. A) Comparación por muestra y número de especies presa en común, b) comparación total entre ambos métodos ($p = 0.02$).

3.9 Relación dieta-microbioma

3.9.1 Análisis funcional del microbioma de la foca de puerto

Para evaluar la exactitud de las predicciones funcionales realizadas por el software PICRUSt, se calculó la distancia filogenética promedio (NSTI) de los OTUs encontrados en el estudio, con respecto a genomas microbianos secuenciados. El promedio de NSTI obtenido fue 0.110, lo que indica que las predicciones realizadas por PICRUSt son confiables de acuerdo a lo reportado por Langille *et al.* (2013).

Las rutas metabólicas englobadas en 7 categorías demostraron que, en general, existen un mayor número de genes que participan en procesos metabólicos en el microbioma intestinal de la foca de puerto. Un alto porcentaje de genes no pudieron categorizarse completamente (14%) y existe un bajo número sin función conocida (0.2%). Grupos de genes ligados a enfermedades representaron el 1% del porcentaje total (Fig. 29).

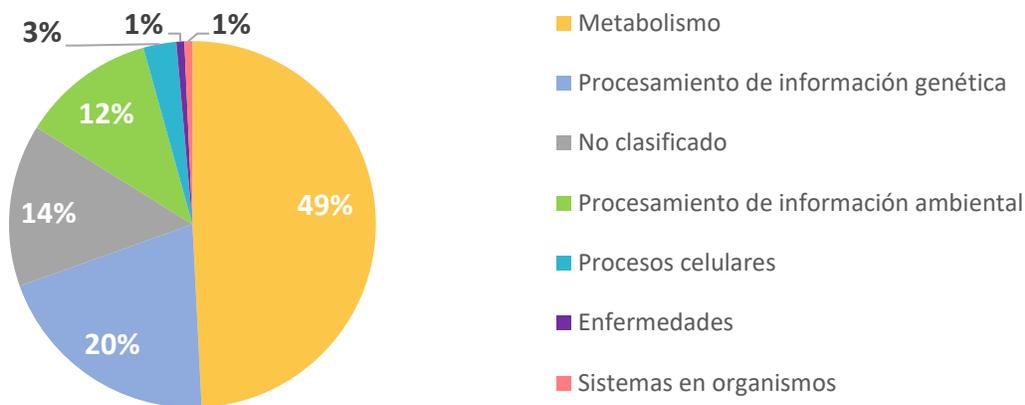


Figura 29. Categorías funcionales encontradas en los microbiomas de la foca de puerto. Composición porcentual de las principales categorías funcionales.

De las 276 categorías funcionales encontradas en el estudio, únicamente 24 de ellas tuvieron una representación mayor al 1%. Dentro de las rutas metabólicas más representadas, destacaron aquellas relacionadas con el metabolismo de moléculas orgánicas, como lípidos, carbohidratos y aminoácidos. Al igual que los resultados obtenidos en el análisis de diversidad de la comunidad microbiana (Fig. 22), las muestras del EPB se agrupan y mantienen una corta distancia con la mayoría de las muestras de TS, lo que indica una homogeneidad en el perfil funcional de EPB y a su vez, una alta similitud con TS y algunas muestras de SR (Fig 30). El alto porcentaje obtenido en el primer componente principal (79.2%) indica que existe una alta variación entre muestras.

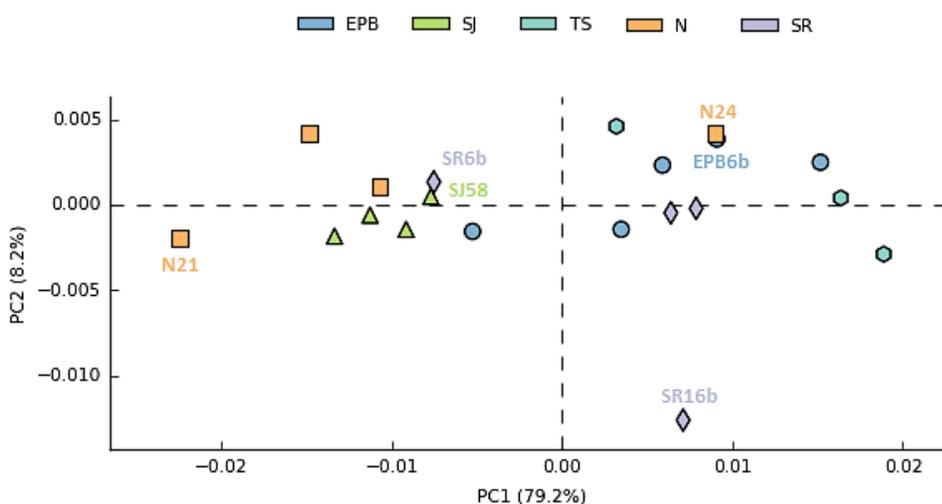


Figura 30. Análisis de componentes principales de la comunidad microbiana de las colonias de foca de puerto basado en los datos del perfil funcional obtenidos en PICRUST. La distancia entre los símbolos refleja diferencias en el perfil funcional de la comunidad microbiana (obtenido en el software STAMP).

Así mismo, las muestras de SJ son similares en la estructura de su perfil funcional, resultado que contrasta con el obtenido en el análisis de diversidad de la comunidad microbiana (Fig. 22). Algunas muestras correspondientes a colonias distintas poseen un perfil funcional similar (Fig. 30)

Los resultados obtenidos en PICRUSt se analizaron con el software STAMP para detectar diferencias significativas en genes que participan en procesos metabólicos y enfermedades en las colonias de estudio. Las colonias con el menor número de diferencias significativas entre sí, son aquellas que se agruparon en el análisis de componentes principales, SJ-N y EPB-SR (Fig. 22).

En las muestras del EPB, la mayoría de las rutas metabólicas que mostraron un incremento están relacionadas con la degradación de compuestos derivados de pesticidas y de petróleo presentes en zonas contaminadas (Fig. 31).

Las muestras de la colonia de TS no mostraron enriquecimiento alguno en genes relacionados con rutas metabólicas. En esta colonia se observó el mayor número de diferencias en la abundancia de genes involucrados en rutas metabólicas.

Con respecto a SJ, se observó el mayor número de diferencias en la riqueza de genes relacionados con rutas de interés, especialmente cuando se compara con TS. La mayoría de los genes enriquecidos participan en el metabolismo de cofactores, vitaminas y aminoácidos. Al igual que en el EPB, existe un aumento en genes relacionados con la degradación de elementos encontrados en pesticidas y derivados de actividades pesqueras (Fig. 31).

La colonia de Natividad presentó un enriquecimiento en genes relacionados con el metabolismo de treonina, glicina y serina al compararse con EPB, SJ y SR y en el metabolismo de compuestos antibacterianos, en contraste con EPB y SR (Fig. 31).

Además, en la colonia de San Roque se observó una mayor riqueza de genes relacionados al metabolismo de compuestos antimicrobianos. Al compararse con TS, existe un aumento en genes ligados al metabolismo de aminoácidos (Fig. 31).

Las rutas metabólicas involucradas en la absorción y digestión de proteínas y con el metabolismo de: aminoácidos, fenilalanina, treonina, serina, biotina, ubiquinona (coenzima Q10), folato, glutamato y vitamina B6, están involucradas en dietas basadas en alimentos ricos en proteínas (peces).

No se detectó la presencia de rutas metabólicas que pudieran relacionarse, en mayor medida, al consumo de invertebrados, como rutas involucradas en el metabolismo del colesterol, ni la presencia de enzimas como quitinasas o trehalasas que ayuden a metabolizar compuestos presentes en este tipo de organismos (p. ej. camarón, pulpo).

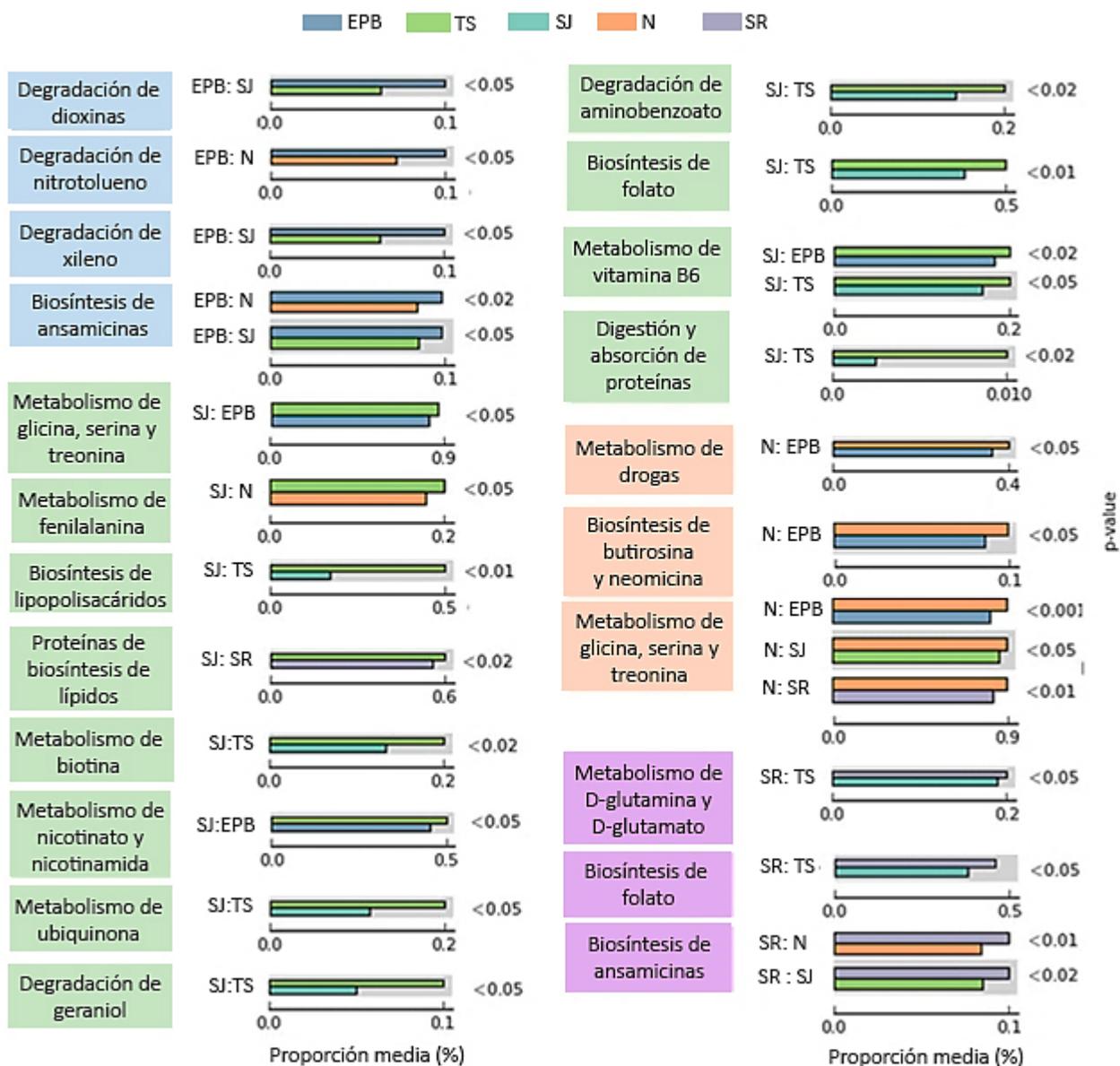


Figura 31. Rutas metabólicas enriquecidas entre las colonias de focas de puerto. Diagrama *post hoc* donde se muestra la proporción promedio de secuencias en cada colonia y el valor de p. Sólo se muestran las rutas metabólicas de interés que tuvieron diferencias significativas entre colonias ($p < 0.05$).

A pesar de que en el estudio se encontraron 29 rutas relacionadas con enfermedades, únicamente aquellas involucradas con enfermedades neurodegenerativas e inmunodeficiencias primarias, mostraron diferencias significativas entre colonias cuando se analizaron en el software STAMP. Genes ligados a inmunodeficiencias primarias y enfermedades neurodegenerativas mostraron un mayor enriquecimiento al comparar las muestras de SJ - SR con TS y N - SJ con la colonia del EPB, respectivamente (Fig. 32).

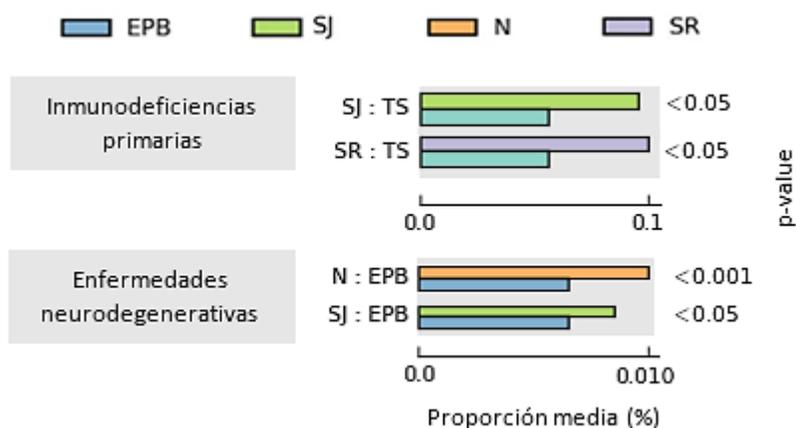


Figura 32. Rutas enriquecidas en algunas colonias de foca de puerto relacionadas con enfermedades. Diagrama *post hoc* donde se muestran la proporción promedio de secuencias en cada colonia y el valor de p. Sólo se muestran las rutas relacionadas con enfermedades que tuvieron diferencias significativas entre colonias ($p < 0.05$).

Capítulo 4. Discusión

4.1 Cambios en la composición microbiana: producto de variaciones en los factores naturales que moldean a la comunidad intestinal

El tiempo de preservación de las muestras varió entre colonias, siendo las muestras de TS y SR las que más tardaron en preservarse (2-5 días) y pudieron estar sujetas a una mayor degradación del ADN. Estudios anteriores han demostrado que, incluso en situaciones donde las muestras tardan en preservarse y se mantienen a temperatura ambiente, los cambios observados en la composición del microbioma usualmente no superan las diferencias encontradas entre los tipos de muestras o individuos (Song *et al.*, 2016). En los estudios metagenómicos donde se amplifica el gen 16S ARNr, las lecturas de 250 pb suelen ser tan útiles como las secuencias completas y sirven para la asignación taxonómica; siempre y cuando se seleccione una región del gen adecuada, como V2 o V4. Estas regiones han demostrado tener la menor tasa de asignaciones taxonómicas erróneas (Ley *et al.*, 2008). Para detectar los principales componentes de variación entre las comunidades de estudio, se requieren pocas secuencias por muestra (cientos) (Hamady y Knight, 2009). Todos estos requerimientos se cumplieron en el presente estudio.

Lo anterior sugiere que los cambios en la estructura de la microbiota intestinal observados en este estudio, son producto de factores naturales distintos que moldean a la comunidad microbiana, como la filogenia, el ambiente, la salud y la dieta del organismo (Fig. 33) y no de la metodología utilizada.

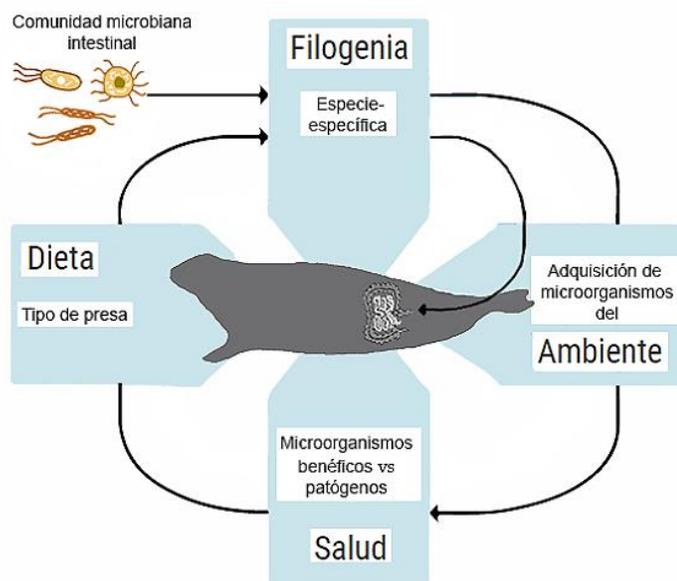


Figura 33. Principales factores que moldean la composición microbiana intestinal en la foca de puerto.

4.2 La estructura de la comunidad microbiana intestinal difiere entre las colonias de foca de puerto

Los resultados de la composición microbiana intestinal obtenidos en el presente estudio muestran la dominancia del filo Firmicutes y Bacteroidetes en la microbiota intestinal de las focas de puerto. Estos fila concuerdan con investigaciones previas (Glad *et al.*, 2010; Numberger *et al.*, 2016).

Este tipo de estudios ha demostrado que los mamíferos marinos poseen una mayor riqueza de especies que sus contrapartes terrestres, lo que podría deberse a la adquisición de taxa bacteriana del agua marina (Bik *et al.*, 2016). Al igual que en los mamíferos terrestres, existe una mayor abundancia de géneros pertenecientes a los fila Bacteroidetes y Firmicutes (Sanders *et al.*, 2015)

En humanos y en ratones se ha observado que cambios en la abundancia relativa de estos dos fila difiere entre organismos obesos y delgados (Ley *et al.*, 2005, 2006; Xu *et al.*, 2012). Ratones obesos poseen 50% menos Bacteroidetes y más miembros del filo Firmicutes (Ley *et al.*, 2005). Así mismo, personas obesas tienen una relación Firmicutes/Bacteroidetes más alta en comparación con personas delgadas. Esto sugiere que el intestino de personas obesas posee características especiales que fomentan la dominancia del filo Firmicutes (Ley *et al.* 2005). Además, el aumento en la cantidad de tejido adiposo indicaría que el microbioma de personas obesas es más efectivo en liberar calorías de la comida (Ley *et al.*, 2006).

La mayor presencia del filo Firmicutes en las focas de puerto podría relacionarse con la necesidad que tienen estos animales de almacenar grasa para la termorregulación (Delpont *et al.* 2016). La colonia de TS mostró una abundancia significativamente mayor del filo Firmicutes en comparación con la colonia de SJ; esto podría indicar que las focas de la colonia de TS poseen una mayor cantidad de grasa corporal, sin embargo, se necesitan más estudios para validarlo.

En humanos, el estudio del filo Fusobacteria se ha enfocado principalmente en la relación que posee con el aumento de padecer cáncer colorrectal (Guinane y Cotter, 2013). En especial se ha identificado una alta abundancia de distintos miembros del género *Fusobacterium* en tejidos tumorales (Guinane y Cotter, 2013; D'argenio y Salvatore, 2015). No obstante, este filo debe ejercer un papel importante en la fisiología de los mamíferos marinos, al ser más abundante en estos organismos; sin embargo, hasta el momento se desconoce su función (Nelson *et al.*, 2013). El género *Fusobacterium* es

abundante en sedimentos de agua marina (Ley *et al.*, 2008); probablemente los mamíferos marinos adquirieron más miembros de este filo al depender en mayor medida del ambiente marino.

Diversos estudios han reportado que miembros de los fila Bacteroidetes y Actinobacteria son más estables en el tiempo que aquellos pertenecientes a Firmicutes y Proteobacteria (Faith *et al.*, 2013; Dougal *et al.*, 2017). Así mismo, microorganismos pertenecientes al grupo núcleo de la comunidad microbiana intestinal son más estables y resistentes a cambios, en comparación con aquellos que no pertenecen a este grupo (Faith *et al.*, 2013).

Es concebible que los microorganismos pertenecientes al grupo núcleo deben de ejercer en el organismo hospedero funciones importantes en los microbiomas intestinales de vertebrados. Por ejemplo, los géneros *Bacteroides* y *Faecalibacterium* son de los más abundantes e importantes en el intestino del humano; producen ácidos grasos de cadena corta que son una fuente importante de energía y regulan la proliferación y apoptosis celular (Leser y Mølbak, 2009). Esto podría explicar la dominancia de ambos géneros, así como su pertenencia al grupo núcleo, en la microbiota intestinal de la foca de puerto.

Para los demás miembros existe poca información sobre el papel que desempeñan en el organismo y aquella disponible está relacionada con el enriquecimiento de algunos géneros en enfermedades inflamatorias, cáncer, diabetes, entre otras (Leser y Mølbak, 2009; Arumugam *et al.*, 2011; Krych *et al.*, 2013; D'argenio y Salvatore, 2015; Shreiner *et al.*, 2015).

Actualmente el concepto de la existencia de un grupo núcleo en la microbiota intestinal está en debate (Hamady y Knight, 2009). Existen diferentes modelos que podrían explicar las diferencias observadas a nivel de individuos, poblaciones y enfermedades (Fig. 34). El modelo del núcleo mínimo (Fig. 34b) explicaría la composición de la comunidad microbiana intestinal observada en las colonias de focas de puerto, al compartir todas un número pequeño de microorganismos y entre ellas otros cuantos (Hamady y Knight, 2009).

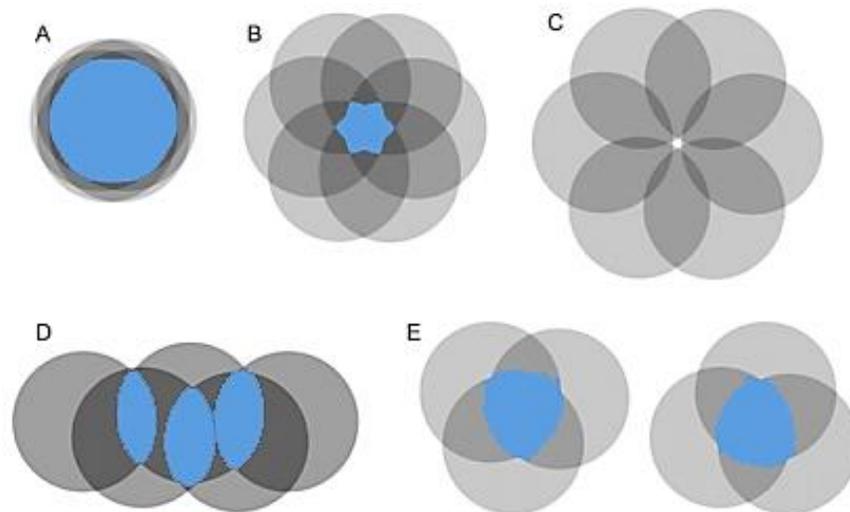


Figura 34. Diferentes modelos de microbiomas núcleos propuestos. Los círculos representan las comunidades microbianas en distintos individuos a nivel de cualquier taxa o gen. A) Modelo del núcleo sustancial, la mayoría de los individuos comparten la mayor parte de los componentes del microbioma. B) Modelo del núcleo mínimo, todos los individuos comparten pocos componentes. C) Modelo del núcleo inexistente, ningún componente se comparte entre todos los individuos y la mayoría de la diversidad es única entre individuos. D) Modelo del gradiente, los individuos que se encuentren próximos en un gradiente (edad, enfermedad) comparten algunos componentes del microbioma, mientras que los extremos no tienen elementos en común. E) Modelo de subpoblación, diferentes subpoblaciones (definidas a nivel geográfico o por alguna enfermedad), poseen diferentes grupos núcleo, pero entre subpoblaciones no se comparten componentes. Modificado de Hamady y Knight (2009).

El único género del filo Deferribacteres que se detectó en el microbioma intestinal de las focas de puerto fue *Mucispirillum*. La presencia de este género se ha detectado en el microbioma intestinal de ratones pero no en el de humanos y se ha relacionado con una mayor predisposición a sufrir colitis (Krych *et al.*, 2013).

Algunos de los géneros encontrados con una abundancia $\geq 1\%$ en la microbiota intestinal de las focas de puerto, son comunes entre mamíferos marinos, por ejemplo: *Coprobacillus*, *Blautia*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Phascolarctobacterium*, *Desulfovibrio* así como miembros de las familias Lachnospiraceae, Peptostreptococcaceae y Ruminococcaceae (Glad *et al.*, 2010; Bik *et al.*, 2016; Delpport *et al.*, 2016)

En la colonia de TS llama la atención la alta abundancia de un miembro de la clase Mollicutes RF9. Esta clase se caracteriza porque sus miembros carecen de pared celular y han desarrollado un estilo de vida parasitario en una gran variedad de animales, algunos siendo especie-específicos (Renaudin *et al.*, 2014). En esta clase se encuentra el género *Mycoplasma*, el cual ha sido reportado en *P. vitulina* y ha sido causante de epidemias (Konigsson *et al.*, 2017). Esto podría indicar que las focas de esta colonia son más susceptibles a enfermedades causadas por este tipo de bacterias.

No se encontraron diferencias significativas en la composición microbiana a nivel de género. No obstante, en algunas zonas del cuerpo en donde la diversidad de microorganismos es alta (intestino), se puede descartar la posibilidad de que cualquier especie se encuentre en la misma abundancia en todos los individuos, por lo que el enfoque debe realizarse en taxones superiores o a nivel de genes funcionales (Hamady y Knight, 2009).

También existe la posibilidad que en todos los individuos existan las mismas especies microbianas pero que la abundancia de una especie particular puede variar por órdenes de magnitud entre individuos en maneras que impactan en la salud y la enfermedad (Hamady y Knight, 2009).

Es importante tener en cuenta que la misma especie de bacteria que es benéfica en un organismo podría ser dañina en otro (Knight y Buhler, 2015). Sin embargo, debido a la falta de estudios sobre los perfiles funcionales de la microbiota intestinal en mamíferos marinos y otras especies afines, los resultados obtenidos en humanos, ratones y otros organismos modelo se utilizan para explicar la permanencia de los microorganismos en la comunidad intestinal de mamíferos marinos (Sanders *et al.*, 2015).

4.3 La dieta como factor clave en la composición de la comunidad microbiana intestinal

Indudablemente, la microbiota intestinal juega un papel muy importante en el hospedero al tener el potencial de influir en la dieta, la cantidad de calorías que se extraen de ella y los nutrientes a los que el organismo puede estar expuesto (Nelson *et al.*, 2013) . Actualmente es considerada la comunidad microbiana más grande y diversa del cuerpo (Knight y Buhler, 2015).

En humanos se ha descrito la presencia de dos enterotipos, cuyos representantes y las funciones que desempeñan son particulares (Arumugam *et al.*, 2011). El enterotipo 1 se caracteriza por la dominancia del género *Bacteroides*, la energía que obtienen deriva principalmente de la fermentación de proteínas y algunos carbohidratos. El enterotipo 2 está compuesto por miembros del género *Prevotella*, los cuales son capaces de degradar mucinas presentes en la capa mucosa del intestino (Arumugam *et al.*, 2011).

Estudios posteriores asociaron estos enterotipos con el tipo de dieta del organismo (Wu *et al.*, 2011). Un alto contenido de *Bacteroides* (enterotipo 1) está relacionado con dietas carnívoras, caracterizadas por altos niveles de proteínas, aminoácidos y grasas animales; mientras que una alta abundancia del género *Prevotella* (enterotipo 2) está asociada con dietas altas en carbohidratos y azúcares simples (Wu *et al.*, 2011) (Fig. 35).

Por lo tanto, es coherente encontrar en las focas de puerto una alta abundancia del género *Bacteroides*, al ser animales carnívoros que necesitan de las proteasas presentes en este tipo de bacterias para extraer energía del alimento (Wu *et al.*, 2011).

Múltiples estudios han observado una correlación positiva en el incremento del filo Actinobacteria con una mayor ingesta de grasas (Wu *et al.*, 2011; Davenport *et al.*, 2014). A pesar de que las colonias de TS y EPB mostraron la abundancia más alta de este filo, no se observaron diferencias significativas con respecto a las demás colonias.

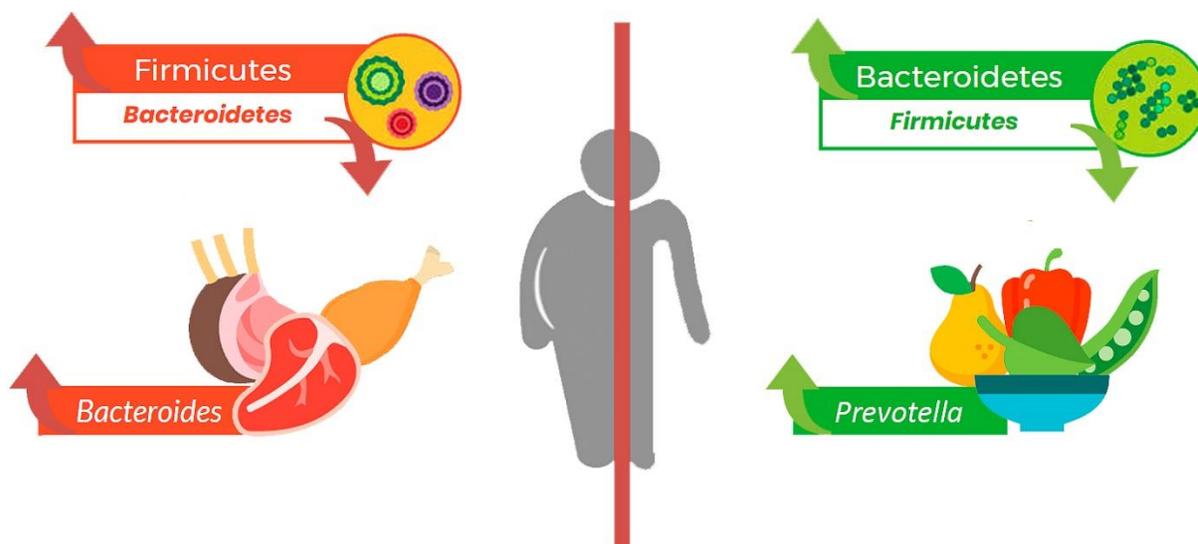


Figura 35. Características observadas en el microbioma de personas obesas y delgadas. Las diferencias en las proporciones de los filo Firmicutes y Bacteroidetes, así como la dieta y los géneros asociados, determinan el almacenamiento de lípidos en las personas (estos factores también se han observado en ratones).

No obstante, sí se observaron diferencias en la abundancia del filo Firmicutes en la colonia de TS. Una dieta alta en grasas poliinsaturadas está relacionada con una mayor abundancia de miembros del filo Firmicutes, en especial del género *Ruminococcus* (Lahti *et al.*, 2013). Este tipo de grasas se encuentran principalmente

en peces “azules”, que son aquellos organismos que almacenan una mayor cantidad de grasa entre el músculo (Hernández, 2017). A este grupo pertenecen las especies pelágicas, de mayor movimiento y mayor demanda energética, en comparación con peces demersales, denominados peces “blancos” (BBC, 2017).

En la colonia de TS se observó un mayor número de especies del filo Firmicutes, en especial de la clase Ruminococcaceae. Esto podría indicar que las focas de TS tienen un mayor aporte en su dieta de peces pelágicos, en comparación con las demás colonias. Lo anterior coincide con lo reportado por Brassea (2016), quien menciona que fue en esta colonia donde se encontró el mayor número de presas de hábitos pelágicos. Una similitud en los perfiles funcionales de las muestras de TS y EPB, observado en el análisis de componentes principales, podría indicar que ambas colonias están expuestas a factores semejantes (tipo de dieta, calidad del ambiente circundante).

Si bien las especies más abundantes en la comunidad microbiana intestinal ejercen un papel importante en el organismo, no significa que las funciones moleculares más representadas estén necesariamente proporcionadas por estas especies (Arumugam *et al.*, 2011). Este tipo de microorganismos, por si solos, no pueden revelar la complejidad entera funcional de la microbiota del intestino. Algunas especies poco abundantes son cruciales en la homeostasis del organismo al poseer funciones particulares (Hamady y Knight, 2009), por lo que es importante realizar análisis funcionales para una comprensión del papel de la comunidad intestinal.

Al realizar la predicción funcional de la comunidad microbiana del intestino, se observó un enriquecimiento de rutas relacionadas con compuestos encontrados en dietas altas en proteínas en las colonias de SJ y N (Fig. 30). Esto podría indicar que las focas de puerto de estos lugares tienen un mayor aporte en su dieta de peces que de cualquier otro tipo de presas (invertebrados), o bien tienen un mayor acceso a este tipo de recursos.

En general, el consumo de invertebrados es menor y no se observó un impacto en la predicción funcional del microbioma intestinal de la foca de puerto. Los invertebrados poseen grandes cantidades de quitina y trehalosas como compuestos estructurales (Olsen *et al.*, 2000; Argüelles, 2014). A diferencia de otros mamíferos marinos que se alimentan principalmente de invertebrados y que tienen un enriquecimiento en enzimas como quitinasas o trehalasas (Olsen *et al.*, 2000; June y Lindqvist, 2015), las focas no presentaron este tipo de compuestos.

A pesar de que los pinnípedos poseen bacterias quitinolíticas en el intestino, no utilizan la quitina como fuente de energía (Sugita *et al.*, 1996). Esto indicaría que en general, el consumo de invertebrados es secundario y que el aporte de energía está suplementado con otros compuestos encontrados en los peces.

La composición del microbioma intestinal es el resultado de una dieta a largo plazo, en donde los cambios en la alimentación en periodos cortos de tiempo tienen poco impacto en el microbioma del intestino (Wu *et al.*, 2011). Hasta después de un año de mantener una dieta constante, se observan los mayores efectos en la composición y en el perfil funcional de la microbiota intestinal (Wu *et al.*, 2011; Dougal *et al.*, 2017).

Esto significaría que la composición de la comunidad microbiana observada en las diferentes colonias de focas de puerto es, en parte, producto de un tipo de dieta preferente, constante y de largo plazo. Si bien el estudio de la composición microbiana intestinal de este organismo no da indicios de la presa exacta de la cual la foca se está alimentando, sí podría ayudar a determinar el tipo de presas de mayor consumo (“peces blancos- azules”, invertebrados) a pesar de carecer de datos constantes sobre la dieta.

Si bien no se observaron diferencias significativas en el índice de diversidad de Shannon, que podría deberse al tamaño pequeño de las muestras, la dieta puede afectar la composición, pero no la diversidad de la microbiota intestinal. Esto se debe a que diferentes, pero no menos especies microbianas, pueden prosperar en presencia de diversos substratos dietéticos (Hale *et al.*, 2017). Incluso si se hubiera contado con tamaños de muestra mayores, todavía se podría llegar a la misma observación de que, la diversidad microbiana, no difiere si la dieta se mantiene (Degnan *et al.*, 2012).

La aplicación de herramientas genómicas continúa en expansión y en las últimas décadas ha revelado un mundo microbiano altamente diverso y ubicuo. El estudio de las interacciones entre microorganismos y animales está alterando la manera en la que comprendemos la biología de un animal (Mcfall-Ngai *et al.*, 2013).

4.4 El estudio del microbioma intestinal revela posibles enfermedades en la foca de puerto

La predicción funcional del microbioma intestinal detectó la presencia de rutas inesperadas relacionadas con enfermedades. Las colonias de SJ y SR mostraron un enriquecimiento significativo en inmunodeficiencias primarias al compararse con la colonia de TS. Estas enfermedades son el resultado hereditario de defectos en la función y el desarrollo del sistema inmune que provocan una mayor susceptibilidad a infecciones (Mccusker y Warrington, 2011). La presencia de inmunodeficiencias primarias ha sido previamente registrada en la foca de puerto (Labrutd *et al.*, 2007).

La mayor presencia de estas rutas en las colonias de SJ y SR, podría indicar que estas focas están expuestas a factores que las hacen más propensas a padecer este tipo de enfermedades. Existen diversos estudios que determinan que las focas de puerto que se alimentan en zonas contaminadas, poseen un sistema inmune deprimido debido a la exposición crónica con contaminantes inmunotóxicos presentes en el ambiente, los cuales se acumulan a lo largo de la cadena alimenticia (De Swart *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 1996).

Rutas involucradas con enfermedades neurodegenerativas tuvieron un enriquecimiento significativo en las colonias de SJ y N con respecto a la del EPB. Este tipo de enfermedades se definen como el conjunto de padecimientos relacionados con cambios progresivos disfuncionales del sistema nervioso y se presentan con más frecuencia en la vejez (Immune Deficiency Foundation, 2017). En los mamíferos marinos, una dieta deficiente en tiamina (vitamina B) se ha relacionado con la aparición de enfermedades neurodegenerativas (Croft *et al.*, 2013), los organismos presentan síntomas como anorexia, regurgitación o ataxia y si la falta de tiamina continua puede provocar la muerte (MSD, 2016b).

Si bien las rutas previamente mencionadas fueron las únicas que mostraron diferencias significativas entre colonias, se detectó la presencia de otras enfermedades que se han descrito en pinnípedos, como tuberculosis (Bernardelli *et al.*, 1996), infección por *Staphylococcus aureus* (Faires *et al.*, 2009) y *Vibrio cholerae* (Hughes *et al.*, 2013), cáncer (Gulland *et al.*, 2015) y enfermedades respiratorias (Dierauf y Dougherty, 1983).

Las rutas relacionadas con tuberculosis fueron las más abundantes en la categoría de enfermedades. La bacteria causante de la tuberculosis en pinnípedos es *Mycobacterium pinnipedii*, diferente a la que afecta al humano (Bernardelli *et al.*, 1996). Sin embargo esta especie es capaz de afectar

al hombre si existe una exposición con un animal infectado (Kiers *et al.*, 2008) . Actualmente se cree que las focas infectaron por primera vez con tuberculosis a los primeros habitantes americanos (Bos *et al.*, 2014). Este microorganismo se disemina ampliamente en el organismo y provoca lesiones en pulmones, hígado, riñones, páncreas, meninge y en algunos nódulos linfáticos (Bernardelli *et al.*, 1996).

El estudio del microbioma intestinal podría dar indicios sobre el estado de salud de las focas de puerto de Baja California, sin embargo, se necesitan más estudios que validen los resultados obtenidos con las predicciones funcionales.

4.5 Alta riqueza de especies presa en la colonia del Estero de Punta Banda

El Estero de Punta Banda fue declarado sitio Ramsar (humedal de importancia internacional) en 2006; se caracteriza por ser una zona altamente productiva y el lugar de reclutamiento y protección de múltiples especies marinas (The Ramsar Convention, 2006). La predominancia de juveniles representa una fuente importante de alimento para aves y mamíferos marinos (CONANP, 2012). Estas características se reflejaron en la alta riqueza de presas encontradas en las muestras fecales de las focas de puerto pertenecientes a este sitio.

De acuerdo a lo reportado por Rosales-Casian (1997), las especies dominantes en el EPB son: el lenguado de California (*Paralichthys californicus*), la cabrilla arenera (*Paralabrax nebulifer*), el turbo moteado (*Pleuronichthys ritteri*) y la corvineta de aleta manchada (*Rocador stearnsii*). De estas especies, *P. californicus* fue la única identificada como presa de la foca de puerto y es considerada la especie con el mayor índice de importancia en la comunidad del EPB (Beltrán Félix, 1984; Navarro Mendoza, 1985; Rosales-Casian, 1997). Las especies previamente mencionadas son presas potenciales para la foca de puerto y pudieron no haberse detectado debido a que en junio (periodo de colecta) no se distribuyen en la zona, o bien su abundancia es muy baja en este mes (Navarro Mendoza, 1985).

Las especies más abundantes asociadas a fondos arenosos en la Bahía de Todos Santos son: la corvineta blanca (*Genyonemus lineatus*), el lenguado pecoso (*Citharichthys stigmaeus*), el lagarto lucio (*Synodus lucioceps*) y la corvineta reina (*Seriphus politus*) (Rosales-Casian, 1997). Las tres primeras especies mencionadas se identificaron como presas de las focas de puerto. Además, la mayoría de los organismos encontrados en el presente estudio están asociados a este tipo de fondo. Lo anterior podría indicar la

preferencia que tienen las focas del EPB por alimentarse en zonas con este tipo de sustrato (Alamán, 2014). Tanto en este estudio, como en trabajos previos (Alamán, 2014), no se identificaron especies presa asociadas al intermareal rocoso, lo que sugiere que las focas del EPB no se alimentan en esta zona.

Existe poco conocimiento sobre especies pelágicas en el EPB. La anchoveta norteña (*Engraulis mordax*) y la corvineta blanca (especie bentopelágica) son las especies con este tipo de hábitos más abundantes encontradas a 15 m de profundidad; así mismo, *E. mordax* es considerado un visitante del EPB que entra con la marea para alimentarse (Rosales-Casian, 1997). Estas especies de hábitos pelágicos se catalogaron como presas de consumo incidental y secundario, respectivamente.

En las muestras fecales se detectó la presencia de especies con una baja abundancia en el EPB y de distribución irregular a lo largo del año, como lo son: *Porichthys miriaster*, *Rhinobatos productus*, *Menticirrhus undulatus* y *Triakis semifasciata* (Navarro Mendoza, 1985). Esto podría indicar que las focas de puerto no se alimentan necesariamente de las especies de mayor abundancia, lo cual apoya la hipótesis de que la foca de puerto del EPB es un depredador oportunista (Alamán, 2014).

Con respecto a los crustáceos identificados como presas, el camarón *Neotrypaea californiensis* se ha reportado como la especie que mayor biomasa aporta al ecosistema del EPB y es el alimento básico para múltiples especies presa de la foca de puerto, entre las cuales destaca: *Menticirrhus undulatus*, *Hypsopsetta guttulata*, *P. californicus*, *Rhinobatos productus* y *Myliobatis californica* (Navarro Mendoza, 1985). Esto podría significar que la presencia de esta especie en las muestras fecales de las focas del EPB es producto del alimento de especies presa; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que las focas de puerto también se alimenten de esta especie (Steingass, 2017).

La única especie de cefalópodo encontrada fue *Octopus rubescens* con una frecuencia de ocurrencia del 20%, esta especie ha sido reportada como presa de la foca de puerto en otros estudios (Elorriaga-Verplancken *et al.*, 2013; Brassea, 2016; Steingass, 2017). Esta baja incidencia podría deberse a una menor presencia de cefalópodos en el mes de junio (Alamán, 2014).

No existen registros en el EPB del pez *Auxis rochei* (de hábitos oceánicos y costeros, se acerca a la costa a finales de primavera e inicios de verano), de la anémona (*Pachycerianthus fimbriatus*) ni del cangrejo *Blepharipoda occidentalis*; sin embargo, son especies que se distribuyen a lo largo de la península de Baja California (Ricketts *et al.*, 1985; Cairns *et al.*, 2003; FAO, 2017). La falta de registro puede deberse a que existen pocos trabajos sobre la fauna íctica y de los invertebrados bénticos en el EPB y la mayoría de

ellos se remontan a hace más de 20 años (Navarro Mendoza, 1985; Beltrán-Félix *et al.*, 1986; Rosales-Casian, 1997). No obstante, ante la incertidumbre es necesario tomar estos resultados con precaución.

De las 17 especies reportadas como presas de la foca de puerto en el EPB por Alamán (2014), las especies: *Hyperprosopon anale*, *Lepidopsetta bilineata*, *Porichthys notatus*, *Loligo opalescens* y *Octopus bimaculatus*, no se detectaron en el presente estudio con los métodos de detección de presas utilizados (análisis metagenómico o identificación de restos duros). Sin embargo, por medio del análisis metagenómico fue posible detectar un mayor número de presas, especialmente de aquellas que no dejan restos visibles en las heces.

El EPB es un lugar de transición para muchas especies marinas (CONANP, 2012), esto podría indicar que la dieta de esta colonia varía significativamente de acuerdo a la estación del año. En primavera y a principios de verano (periodo de colecta de las muestras fecales) existe un alto número de peces pequeños, elasmobranquios y peces grávidos (Rosales-Casian, 1997). Los elasmobranquios son más frecuentes durante su periodo reproductivo (primavera- inicios de verano); la frecuencia de aparición de estos organismos muestra una sucesión de especies en el EPB (Beltrán Félix, 1984).

Además, varias de las especies encontradas en las muestras fecales, por ejemplo: *Mugil cephalus*, *P. californicus*, *H. guttulata*, *Rhinobatos productus*, *Myliobatis californica* y *Menticirrhus undulatus* son más comunes en primavera que en otras estaciones del año (Navarro Mendoza, 1985). De éstas, los elasmobranquios se catalogaron como presas de consumo incidental debido al %FO obtenido. Sin embargo, este resultado podría deberse a que estas especies son más abundantes en abril y mayo y no en junio, que fue el mes de la colecta de muestras fecales (Beltrán Félix, 1984).

De acuerdo a lo reportado por Beltrán-Félix *et al.* (1986), junio es el mes con la menor abundancia de especies en el EPB. Esto significaría que la baja densidad de especies podría provocar que la foca de puerto maximice las oportunidades de alimentación, ingiriendo incluso organismos inusuales como esponjas (*Aplysina sp.*), cangrejos de arena (*Blepharipoda occidentalis*) o cnidarios (*Pachygerianthus fimbriatus*).

De todas las colonias de estudio, la perteneciente al EPB mostró la mayor riqueza de especies presa. Si bien el esfuerzo de muestreo fue mayor ($n = 5$) en comparación con el realizado en las demás colonias ($n = 4$; Brassea 2016), los sistemas estuarinos se caracterizan por presentar una alta biomasa y

riqueza de especies, lo que podría significar una mayor disponibilidad y variedad de presas para la colonia de focas del EPB en comparación con las demás colonias.

La colonia del EPB también compartió un número alto de presas con la colonia de TS, posiblemente porque existe un movimiento estacional de especies entre ambos hábitats (Rosales-Casian, 1997). Sin embargo, de las 34 especies encontradas, 18 se encontraron únicamente en las focas del EPB lo que indicaría que, a pesar de la cercanía de ambas colonias, éstas poseen sitios de alimentación distintos, como sugirió previamente Alamán (2014).

El incluir los datos de la dieta de la colonia del EPB con los datos reportados de las demás colonias (Brassea, 2016), no afectó la similitud en la dieta encontrada entre N –SR y T–SJ. Esto demuestra que la colonia del EPB posee en su dieta presas que dependen en gran medida de los recursos del estero.

4.6 La foca de puerto como centinela ambiental

En la colonia del EPB, múltiples rutas metabólicas relacionadas con la degradación de contaminantes persistentes mostraron un enriquecimiento. Destaca la presencia de rutas relacionadas con la degradación de dioxinas, que son un grupo de compuestos derivados de contaminantes ambientales (National Institute of Environmental Health Sciences, 2017). Así mismo, la presencia de rutas de degradación de xilenos, presentes en gases derivados de la combustión de petróleo (Reif, 2011), y nitrotoluenos (European Commission, 2006), químicos utilizados en la agricultura, tuvieron una presencia significativa en las focas de este sitio, comparada con las demás colonias.

La presencia de xilenos podría deberse a que las focas de esta colonia están continuamente expuestas a la presencia de lanchas y motos acuáticas (Ruiz Mar, 2016). Los pinnípedos son susceptibles a daños pulmonares severos por la inhalación de compuestos volátiles de hidrocarburos (MSD, 2016a). La presencia de estos compuestos contaminantes podría ser un indicio del estado del ecosistema alrededor del Estero de Punta Banda.

En las zonas adyacentes al EPB se localiza el Valle de Maneadero, un sitio con una alta productividad agrícola, en donde la falta de servicios, como la ausencia de alcantarillado y el desecho de aguas residuales sin previo tratamiento, afecta la calidad del agua en el EPB (CONANP, 2012). Así mismo,

al estero llegan agroquímicos transportados por arrastre a través de los arroyos que desembocan en el canal principal (CONANP, 2012). La exposición a este tipo de contaminantes se reflejó en la predicción funcional del microbioma intestinal de la colonia del EPB.

La colonia de focas del SJ mostró también un enriquecimiento en rutas relacionadas con la degradación de componentes encontrados en pesticidas, como el geraniol (EFSA, 2012). San Jerónimo es una isla que se encuentra cerca de importantes asentamientos agrícolas, como San Quintín y El Rosario (SAGARPA, 2017). Los resultados obtenidos en el análisis del perfil funcional indican que las focas de esta colonia podrían tener una continua exposición a este tipo de compuestos (EFSA, 2012).

Los mamíferos marinos poseen una capacidad metabólica baja para la degradación de contaminantes químicos que se acumulan en el tejido adiposo de los animales a lo largo de la cadena alimenticia (Reif, 2011). Las focas de puerto, al ser depredadores tope, podrían acumular una gran cantidad de estos compuestos (Moore, 2008; Reif, 2011).

La exposición continua a contaminantes ambientales persistentes representa un peligro creciente en pinnípedos al aumentar las tasas de morbilidad, mortalidad y fallas reproductivas (Lauckner, 1985). Este tipo de sustancias tienen un fuerte efecto inmunosupresor e incluso la disminución de algunas poblaciones de focas de puerto se ha atribuido a la contaminación ambiental (Lauckner, 1985). Esto indicaría que las focas de puerto, especialmente de las colonias del EPB y SJ, son más susceptibles a enfermedades que pudieran poner en riesgo su abundancia poblacional.

La observación de apariciones espontáneas de enfermedades en estos organismos, podría proporcionar un sistema de alerta temprano sobre la salud del ambiente oceánico (Moore, 2008). El estudio del microbioma del intestino puede posicionar a la foca de puerto como un centinela ambiental de la costa de Baja California por ser un indicador sensible de la calidad del medio que la rodea.

En la figura 36 se presenta un breve resumen de los hallazgos más importantes de este estudio con respecto al microbioma intestinal de la foca de puerto de Baja California; se resalta la importancia de tres factores en la comunidad microbiana: a) la dieta, en especial el tipo de presas que consume la foca de puerto, provocará el aumento de enterotipos particulares, b) el ambiente, ciertas rutas metabólicas se enriquecen dependiendo de la calidad del hábitat, esto a su vez repercute en c) la salud del organismo, donde la exposición a contaminantes ambientales puede provocar la aparición de enfermedades que a su vez provocan cambios en la composición microbiana de intestino.

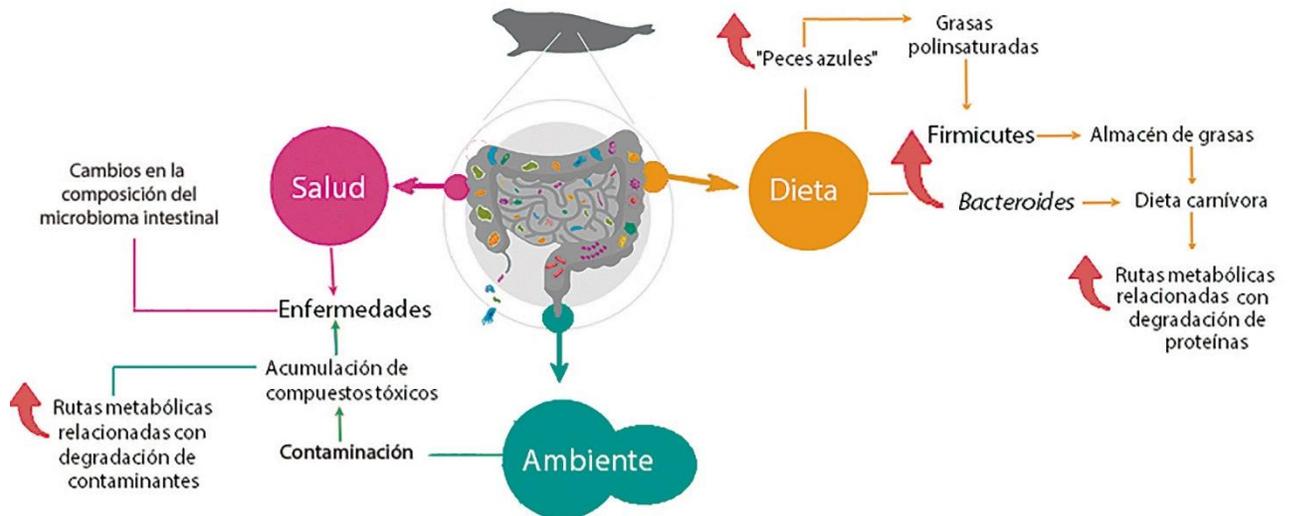


Figura 36. Principales efectos que ejercen la dieta, el ambiente y la salud, en la microbiota intestinal de la foca de puerto presente en Baja California.

Capítulo 5. Conclusiones

- ❖ La dieta podría ser un factor clave que moldea la composición de la comunidad microbiana intestinal en las focas de puerto.
- ❖ Al igual que en los mamíferos terrestres, los filo dominantes en la microbiota intestinal de las focas de puerto fueron: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria y Actinobacteria.
- ❖ La dominancia significativa del filo Firmicutes, en especial de miembros de la familia Ruminococcaceae en la colonia de Todos Santos, podría estar relacionada con un mayor consumo de grasas poliinsaturadas presentes en peces que almacenan una mayor cantidad de grasas en el músculo (pelágicos).
- ❖ La alta abundancia del género *Bacteroides* en la microbiota intestinal de las focas de puerto podría relacionarse con dietas altas en proteínas y grasas animales, las cuales constituyen la base de alimentación de este organismo.
- ❖ Las rutas metabólicas enriquecidas en la foca de puerto son aquellas relacionadas con el metabolismo de una dieta piscívora. No se observaron componentes relacionados con la degradación de compuestos presentes en invertebrados, lo que significa que el aporte de energía depende principalmente del consumo de peces.
- ❖ Las presas de consumo preferencial en la colonia de focas del EPB son peces teleósteos y elasmobranquios; la mayoría de los invertebrados se deben a un consumo incidental.
- ❖ Las colonias de focas de puerto del Estero de Punta Banda y Todos Santos, a pesar de su cercanía, poseen sitios de alimentación distintos, lo que se refleja en el bajo número de presas compartidas.
- ❖ El uso de herramientas de secuenciación masiva permite una mayor detección de presas en comparación con los métodos tradicionales (análisis de restos sólidos en muestras fecales), permitiendo detectar presas que no dejan restos sólidos en las heces.

- ❖ Es necesario realizar estudios sobre la ictiofauna y los invertebrados bentónicos en el Estero de Punta Banda para poder determinar con certeza la presencia de especies sin registro actual en el sitio.
- ❖ El enriquecimiento de rutas relacionadas con la degradación de contaminantes ambientales y de pesticidas en las colonias del Estero de Punta Banda y de San Jerónimo podría deberse a su cercanía a zonas de producción agrícola intensiva.
- ❖ El estudio del microbioma intestinal podría dar indicios de dietas a largo plazo, así como del estado de salud de la foca de puerto y del ambiente circundante. Esto podría posicionar a la foca de puerto como centinela ambiental de la costa de Baja California.

Literatura citada

- Abdi, Her E, Williams, Lynne J. 2010. Principal Component Analysis. *WIREs Comp Stat* 2: 433–59. doi:10.1002/wics.101.
- Alamán, Ricardo. 2014. Hábitos Alimentarios de la foca de puerto, *Phoca vitulina richardii*, en la Bahía Todos Santos, Baja California, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Baja California. 79 pp.
- Allen, Sarah G., Mortenson, Joseph, y Webb, Sophie. 2011. Harbor Seal. In *Field Guide to Marine Mammals of the Pacific Coast: Baja, California, Oregon, Washington, British Columbia*, 431–42. Berkeley: University of California Press.
- Amaral-Zettler, Linda A., McCliment, Elizabeth A., Ducklow, Hugh W., y Huse, Susan M. 2009. A Method for Studying Protistan Diversity Using Massively Parallel Sequencing of V9 Hypervariable Regions of Small-Subunit Ribosomal RNA Genes. *PLoS ONE* 4 (7): 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0006372.
- Argüelles, Juan-Carlos. 2014. Why Can't Vertebrates Synthesize Trehalose? *Journal of Molecular Evolution* 79 (3–4). Springer US: 111–16. doi:10.1007/s00239-014-9645-9.
- Arumugam, Manimozhiyan, Jeroen Raes, Eric Pelletier, Denis Le Paslier, Takuji Yamada, Daniel R Mende, Gabriel R Fernandes, Tap, Julien, Bruls, Thomas, Batto, Jean-Michel, Bertalan, Marcelo, Borruel, Natalia, Casellas, Francesc, Fernandez, Leyden, Gautier, Laurent, Hansen, Torben, Hattori, Masahira, Hayashi, Tetsuya, Kleerebezem, Michiel, Kurokawa, Ken, Leclerc, Marion, Levenez, Florence, Manichanh, Chaysavanh, Nielsen, H Bjørn, Nielsen, Trine, Pons, Nicolas, y Poulain, Julie. 2011. Enterotypes of the Human Gut Microbiome. *Nature* 473 (7346): 174–80. doi:10.1038/nature09944.
- BBC, 2017. Oily fish. Consultado el 28 de septiembre de 2017, de http://www.bbc.co.uk/food/oily_fish
- Beltrán-Félix, J.L., M.G Hammann, A., Chagoya-Guzman, A., y Alvarez-Borrego, S. 1986. Ictiofauna del Estero de Punta Banda, Ensenada Baja California, México, antes de una operación de dragado. *Ciencias Marinas* 12 (1): 79–92.
- Beltrán Félix, José Luis. 1984. Distribución, abundancia y diversidad de peces adultos en El Estero de Punta Banda, Ensenada, Baja California. Tesis de Maestría en Ecología Marina. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 89 pp.
- Bernardelli, A., Bastida, R., Loureiro, J., Michelis, H., Romano, M. I., Cataldi, A., y Costa, E. 1996. Tuberculosis in Sea Lions and Fur Seals from the South-Western Atlantic Coast. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz* 15 (3): 985–1005.
- Bik, Elisabeth M., Costello, Elizabeth K., Switzer, Alexandra D., Callahan, Benjamin J., Holmes, Susan P., Wells, Randall S., Carlin, Kevin P., Jensen, Eric D., Venn-Watson, Stephanie, y Relman, David A. 2016. Marine Mammals Harbor Unique Microbiotas Shaped by and yet Distinct from the Sea. *Nature Communications* 7. Nature Publishing Group: 10516. doi:10.1038/ncomms10516.
- Blankenberg, D., Gordon, A., Von Kuster, G., Coraor, N., Taylor, J., y Nekrutenko, A. 2010. Manipulation of FASTQ Data with Galaxy. *Bioinformatics* 26 (14): 1783–85. doi:10.1093/bioinformatics/btq281.

- Bos, Kirsten I., Harkins, Kelly M., Herbig, Alexander, Coscolla, Mireia, Weber, Nico, Comas, Iñaki, Forrest, Stephen A., Bryant, Josephine M., Harris, Simon R., Schuenemann, Verena J., Campbell, Tessa J., Majander, Kerttu, Wilbur, Alicia K., Guichon, Ricardo A., Wolfe Steadman, Dawnie L., Cook, Della Collins, Niemann, Stefan, Behr, Marcel A., Zumarraga, Martin, Bastida, Ricardo, Huson, Daniel, Nieselt, Kay, Young, Douglas, Parkhill, Julian, Buikstra, Jane E., Gagneux, Sebastien, Stone, Anne C., y Krause, Johannes. 2014. Pre-Columbian Mycobacterial Genomes Reveal Seals as a Source of New World Human Tuberculosis. *Nature* 514 (7523): 494–97. doi:10.1038/nature13591.
- Brassea, Elizabeth. 2016. Análisis metagenómico de la dieta de la foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*, Gray 1864) en México. Tesis de Maestría en Ecología Marina. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 142 pp.
- Bromaghin, Jeffrey F., Lance, Monique M., Elliott, Elizabeth W., Jeffries, Steven J., Acevedo-Gutiérrez, Alejandro, Kennish, John M. 2013. New Insights into the Diets of Harbor Seals (*Phoca vitulina*) in the Salish Sea Revealed by Analysis of Fatty Acid Signatures. *Fishery Bulletin* 111: 13–26. doi:10.7755/FB.111.1.2.
- Burns, John J. 2007. Harbor Seal and Spotted Seal. In *Encyclopedia of Marine Mammals*, edited by Perrin, William F., Würsig, Bernd y Thewissen, J. G. M. 2nd ed., 7:1. Amsterdam: Academic Press. doi:10.1186/1472-6785-7-1.
- Cairns, S.D., Calder, D.R., Brinckmann-Voss, A., Castro, C.B., Fautin, D.G., Pugh, P.R., Mills, C.E., Jaap, W.C., Arai, M.N., Haddock, S.H.D., y Opresko, D.M. 2003. *Common and Scientific Names of Aquatic Invertebrates from the United States and Canada: Cnidaria and Ctenophore*. 2nd ed. American Fisheries Society Special Publications.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Gonzalez Pena A., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J. y Knight R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7(5): 335-336.
- Clarke, K. R., y Gorley, R.N. 2015. *PRIMER v7: User Manual/Tutorial*. PRIMER-E, Plymouth.
- Committee on Taxonomy. 2016. *List of Marine Mammal Species and Subspecies*. Society for Marine Mammalogy. Society for Marine Mammalogy. www.marinemammalscience.org.
- CONANP. 2012. Plan de Manejo Sitio Ramsar Estero de Punta Banda. Consultado el 22 de septiembre de 2017, de http://ramsar.conanp.gob.mx/docs/sitios/lineamientos_instrumentos/ESTERO_PUNTA_BANDA.pdf
- Conway, Jake R, Lex, Alexander y Gehlenborg, Nils. 2017. UpSetR: An R Package for the Visualization of Intersecting Sets and Their Properties. *Bioinformatics* 33 (18): 2938–2940. doi:10.1093/bioinformatics/btx364.
- Cowles, Dave. 2005. *Octopus Rubescens* Berry, 1953. Consultado el 2 de octubre de 2017, https://inverts.wallawalla.edu/Mollusca/Cephalopoda/Octopus_rubescens.html.
- Croft, Lara, Napoli, Eleonora, Hung, Connie K., St. Leger, Judy, Gearhart, Scott, Heym, Kathy, Wong, Sarah Sakaguchi, Danielle, Lin, Alex, Puschner, Birgit, Giulivi, Cecilia 2013. *Clinical Evaluation and*

- Biochemical Analyses of Thiamine Deficiency in Pacific Harbor Seals (*Phoca vitulina*) Maintained at a Zoological Facility. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 243 (8): 1179–89. doi:10.2460/javma.243.8.1179.
- D'argenio, Valeria, y Salvatore, Francesco. 2015. The Role of the Gut Microbiome in the Healthy Adult Status. doi:10.1016/j.cca.2015.01.003.
- Davenport, Emily R, Mizrahi-Man, Orna, Michelini, Katelyn, Barreiro, Luis B, Ober, Carole, Gilad, Yoav. 2014. Seasonal Variation in Human Gut Microbiome Composition. *PLoS ONE* 9 (3). doi:10.1371/journal.pone.0090731.
- Deagle, Bruce E., Kirkwood, Roger y Jarman, Simon N. 2009. Analysis of Australian Fur Seal Diet by Pyrosequencing Prey DNA in Faeces. *Molecular Ecology* 18 (9): 2022–38. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04158.x.
- Deagle, Bruce E., Thomas, Austen C., Shaffer, Amanda K., Trites, Andrew W., y Jarman, Simon N. 2013. Quantifying Sequence Proportions in a DNA-Based Diet Study Using Ion Torrent Amplicon Sequencing: Which Counts Count? *Molecular Ecology Resources* 13 (4): 620–33. doi:10.1111/1755-0998.12103.
- De Swart, R. L., Ross, P. S., Timmermant, H. H., Vos, H. W., Reijnderst, P. J. H., y Vost, J. G. Osterhaus, A. D. M. E. 1995. Impaired Cellular Immune Response in Harbour Seals (*Phoca vitulina*) Feeding on Environmentally Contaminated Herring. *Clin Exp Immunol* 101: 480–86.
- Degnan, Patrick H, Pusey, Anne E, Lonsdorf, Elizabeth V., Goodall, Jane, Wroblewski, Emily E., Wilson, Michael L., Rudicell, Rebecca S., Hahn, Beatrice H., Ochman, Howard. 2012. Factors Associated with the Diversification of the Gut Microbial Communities within Chimpanzees from Gombe National Park. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (32): 13034–39. doi:10.1073/pnas.1110994109.
- Delpont, Tiffany C., Power, Michelle L., Harcourt, Robert G., Webster, Koa N., y Tetu, Sasha G. 2016. Colony Location and Captivity Influence the Gut Microbial Community Composition of the Australian Sea Lion (*Neophoca cinerea*). *Applied and Environmental Microbiology* 82 (12): 3440–3349. doi:10.1128/AEM.00192-16.
- Dierauf, Leslie A., y Dougherty, Susan A. 1983. Thyroid Hormone Levels in Orphaned Harbor Seal (*Phoca vitulina richardsi*) Pups in Respiratory Distress. IAAAM. Consultado el 12 de octubre de 2017, de <http://www.vin.com/doc/?id=6696240>.
- Dougal, Kirsty, Harris, Patricia A., Girdwood, Susan E., Creevey, Christopher J., Curtis, Gemma C., Barfoot, Clare F., Argo, Caroline M., y Newbold, Charles J. 2017. Changes in the Total Fecal Bacterial Population in Individual Horses Maintained on a Restricted Diet Over 6 Weeks. *Frontiers in Microbiology* 8. *Frontiers*: 1502. doi:10.3389/fmicb.2017.01502.
- Durazo, Rosa 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.
- Edgar, Robert C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26 (19): 2460–2461. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>

- Edgar, Robert C., Haas, Brian J, Clemente, Jose C., Quince, Christopher, y Knight, Rob. 2011. UCHIME Improves Sensitivity and Speed of Chimera Detection 27 (16): 2194–220010. doi:10.1093/bioinformatics/btr381.
- EFSA. 2012. Conclusion on the Peer Review of the Pesticide Risk Assessment of the Active Substance Geraniol 10 (11): 1–44. doi:10.2903/j.efsa.2012.2915.
- Elorriaga-Verplancken, Fernando, Morales-Luna, Laura, Moreno-Sánchez, Xchel, y Mendoza-Salas, Itzel. 2013. Inferences on the Diet of the Eastern Pacific Harbor Seal (*Phoca vitulina richardii*) at the Southern End of Its Distribution: Stable Isotopes and Scats Analyses. Aquatic Mammals 39 (4): 415–21. doi:10.1578/AM.39.4.2013.415.
- European Commission. 2006. Scientific Committee on Health and Environmental Risks SCHER: Opinion on Risk Assessment Report on 2-Nitrotolueno Environmental Part I. Recuperado de: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scher/docs/scher_o_077.pdf
- Faires, Meredith C., Gehring Erica, Mergl, June, y Weese Scott J. 2009. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in Marine Mammals. Emerging Infectious Diseases 15 (12): 2071–72. doi:10.1086/502234.
- Faith, Jeremiah J., Guruge, Janaki L., Charbonneau, Mark, Subramanian, Sathish, Seedorf, Henning, Goodman, Andrew L., Clemente, Jose C., Knight, Rob, Heath, Andrew C., Leibel, Rudolph L., Rosenbaum, Michael, y Gordon, Jeffrey I. 2013. The Long-Term Stability of the Human Gut Microbiota. Science 341 (6141): 1237439. doi:10.1126/science.1237439.
- FAO. 2017. Biological Characteristics of Tuna. Consultado el 25 de septiembre de 2017, de <http://www.fao.org/fishery/topic/16082/en#Olson and Boggs/1986>.
- Fitch, John E. 1964. The Fish Fauna of the Playa Del Rey Locality, a Southern California Marine Pleistocene Deposit. Contributions in Science. Los Angeles Country Museum.
- Gehlenborg, Nils. 2016. UpSetR: A More Scalable Alternative to Venn and Euler Diagrams for Visualizing Intersecting Sets.
- Gilbert, Jack A., Jansson, Janet K., y Knigh, Rob. 2014. The Earth Microbiome Project: Successes and Aspirations. BMC Biology 12 (69).
- Glad, Trine, Fam Kristiansen, Vibeke, Nielsen, Kaare M., Brusetti, Lorenzo, Wright, André-Denis G., y Sundset, Monica A. 2010. Ecological Characterisation of the Colonic Microbiota in Arctic and Sub-Arctic Seals. Microbiology Ecology 60 (2): 320–30. doi:10.1007/s00248-010-9690-x.
- Guinane, Caitriona M., y Cotter, Paul D. 2013. Role of the Gut Microbiota in Health and Chronic Gastrointestinal Disease: Understanding a Hidden Metabolic Organ. Ther Adv Gastroenterol 6 (4): 295–308.
- Gulland, Frances M. D., Browning, Helen M., Hammond, John A., Colegrove, Kathleen M., y Hall, Ailsa J. 2015. Common Cancer in a Wild Animal: The California Sea Lion (*Zalophus californianus*) as an Emerging Model for Carcinogenesis. Phil. Trans. R. Soc. B 370: 20140228. doi:10.1098/rstb.2014.0228.

- Hale, Vanessa L., Tan, Chia L., Niu, Kefeng, Yang, Yeqin, Knight, Rob, Zhang, Qikun, Cui, Duoying, Amato, Katherine R. 2017. Diet Versus Phylogeny: A Comparison of Gut Microbiota in Captive Colobine Monkey Species. *Microb Ecol*. Doi:10.1007/s00248-017-1041-8.
- Hamady, Micah, y Knight, Rob. 2009. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Research* 17 (7): 1141–52. doi:10.1101/gr.085464.108.
- Hammill, Mike O. 2009. Earless Seals. In *Encyclopedia of Marine Mammals*, edited by Perrin, William F., Würsig, Bernd, y Thewissen, J. G. M. 2nd ed., 342–48. Amsterdam: Academic Press.
- Hernández, Adriana. 2017. ¿Pescado Azul O Blanco? Consultado el 24 de septiembre de 2017, de <http://www.webconsultas.com/dieta-y-nutricion/higiene-alimentaria/saber-comprar/comprar-pescado/azul-o-blanco-2173>.
- Higdon, Jeff W, Bininda-Emonds, Olaf R. P., Beck, Robin, M. D. y Ferguson, Steven H. 2007. Phylogeny and Divergence of the Pinnipeds (Carnivora: Mammalia) Assessed Using a Multigene Dataset. *BMC Evolutionary Biology* 7: 216. doi:10.1186/1471-2148-7-216.
- Hughes, Stephanie N., Greig, Denise J., Miller, Woutrina A., Byrne, Barbara A., Gulland, Frances M. D., y Harvey, James 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): 982–94. doi:10.1007/s00248-013-0188-1.
- Illumina. 2013. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Illumina. 28 pp.
- Immune Deficiency Foundation. 2017. About Primary Immunodeficiencies. Consultado el 1 de octubre de 2017, de <https://primaryimmune.org/about-primary-immunodeficiencies>.
- Jansen, John K., Brady, Gavin M., Ver Hoef, Jay M., y Boveng, Peter L.. 2015. Spatially Estimating Disturbance of Harbor Seals (*Phoca vitulina*). *PLoS ONE* 10 (7): e0129798. doi:10.1371/journal.pone.0129798.
- June, Armond, y Lindqvist, Charlotte. 2015. Oceanic Microcosms: The Cetacean Microbiome. University at Buffalo. Consultado el 2 de octubre de 2017, de http://curca.buffalo.edu/students/pdfs/2015_posters/oceanic-microcosms-the-cetacean-microbiome.pdf.
- Kanehisa, Minoru, y Goto, Susumu. 2000. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research* 28 (1).
- Kiers, A., Klarenbeek, A., Mendelts, B., Van Soolingen, D., y Koëter, G. 2008. Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to Humans in a Zoo with Marine Mammals. *INT J TUBERC LUNG DIS* 12 (12): 1469–73.
- Klindworth, Anna, Pruesse, Elmar, Schweer, Timmy, Peplies, Jörg, Quast, Christian, Horn, Matthias, y Glöckner, Frank Oliver. 2013. Evaluation of General 16S Ribosomal RNA Gene PCR Primers for Classical and Next-Generation Sequencing-Based Diversity Studies. *Nucleic Acids Research* 41 (1): 1–11. doi:10.1093/nar/gks808.

- Knight, Rob, y Buhler, Brendan. 2015. Follow Your Gut: The Enormous Impact of Tiny Microbes. In *Frontiers in Microbiology*, 9–24. Simon and Schuster/ TED.
- Konigsson, Malin Heldtander, Pettersson, Bertil, y Karl-Erik Johansson. 2017. Phylogeny of the Seal Mycoplasmas *Mycoplasma phocae* Corrig., *Mycoplasma phocicerebrale* Corrig. and *Mycoplasma Phocirhinis* Corrig. Based on Sequence Analysis of 16S rDNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1389–93.
- Krych, Lukasz, Hansen, Camilla, H. F., Hansen, Axel K., Van Den Berg, Frans W. J., y Nielsen, Dennis S. 2013. Quantitatively Different, yet Qualitatively Alike: A Meta- Analysis of the Mouse Core Gut Microbiome with a View towards the Human Gut Microbiome. Doi:10.1371/journal.pone.0062578.
- Labrutd, Sophie, Wyersd, Monique, Miclardd, Julien, Colle, Marie-Anne Sophie. 2007. Primary Meningeal T-Cell Lymphoma in a Harbor Seal (*Phoca vitulina*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 38 (2): 323–328.
- Lahti, Leo, Salonen, Anne, Kekkonen, Riina A., Salojärvi, Jarkko, Jalanka-Tuovinen, Jonna, Palva, Airi, Orešič, Matej y De Vos, Willem M. 2013. Associations between the Human Intestinal Microbiota, *Lactobacillus rhamnosus* GG and Serum Lipids Indicated by Integrated Analysis of High-Throughput Profiling Data. *PeerJ* 1: e32. doi:10.7717/peerj.32.
- Langille, Morgan G. I. Zaneveld, Jesse, Gregory Caporaso, J., McDonald, Daniel, Knights, Dan, Reyes, Joshua A., Clemente, Jose C., Burkepille, Deron E., Vega Thurber, Rebecca L., Knight, Rob, Beiko, Robert G., y Huttenhower, Curtis. 2013. Predictive Functional Profiling of Microbial Communities Using 16S rRNA Marker Gene Sequences. *Nature Biotechnology* 31 (9): 814–23. doi:10.1038/nbt.2676.
- Lauckner, G. 1985. Diseases of Mammalia: Pinnipedia. In *Diseases of Marine Animals*, edited by Kinne, Otto, 684–793. Germany: Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. doi:3-9800818-4-2.
- Leser, Thomas D., y Mølbak, Lars. 2009. Better Living through Microbial Action: The Benefits of the Mammalian Gastrointestinal Microbiota on the Host. *Environmental Microbiology* 11 (9): 2194–2206. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01941.x.
- Lesser, Michael P., Fiore, Cara, Slattery, Marc, y Zaneveld, Jesse. 2016. Climate Change Stressors Destabilize the Microbiome of the Caribbean Barrel Sponge, *Xestospongia muta*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 475: 11–18.
- Ley, Ruth E., Turnbaugh, Peter J., Klein, Samuel, y Gordon, Jeffrey I. 2006. Human Gut Microbes Associated with Obesity. *Nature* 444: 1022–23. doi:10.1038/nature4441021a.
- Ley, Ruth E., Bäckhed, Fredrik, Turnbaugh, Peter, Lozupone, Catherine A., Knight, Robin D., y Gordon, Jeffrey I. 2005. Obesity Alters Gut Microbial Ecology. *Proceedings of the National Academy of Science* 102 (31): 11070–75.
- Ley, Ruth E., Lozupone, Catherine A., Hamady, Micah, Knight, Rob y Gordon, Jeffrey I. 2008. Worlds within Worlds: Evolution of the Vertebrate Gut Microbiota. *Nat Rev Microbio* 6 (10): 776–78. doi:10.1038/nrmicro1978.
- Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J. and Knight, Rob. 2010. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME Journal* 5 (10): 169–172. doi:

10.1038/ismej.2010.133.

- Lowry, Mark S. 2011. Photographic Catalog of California Marine Fish Otoliths: Prey of California Sea Lions (*Zalophus californianus*).
- Lubinsky, Denise. 2010. Estado actual de la foca común del Pacífico Oriental (*Phoca vitulina richardsi*) en México. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. 147 pp.
- Matamoros, Sebastien, Gras-Leguen, Christele, Le Vacon, Françoise, Potel, Gilles, y de La Cochetiere, Marie-France. 2012. Development of Intestinal Microbiota in Infants and Its Impact on Health. *Trends in Microbiology* 21 (4): 167–73. doi:10.1016/j.tim.2012.12.001.
- Mccusker, Christine, y Warrington, Richard. 2011. Primary Immunodeficiency. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 7: S11. doi:10.1186/1710-1492-7-S1-S11.
- Mcfall-Ngai, Margaret, Hadfield, Michael G., Bosch, Thomas C. G., Carey, Hannah V., Domazet-Lo So, Tomislav, Douglas, Angela E., Dubilier, Nicole, Eberl, Gerard, Fukami, Tadashi, Gilbert, Scott F., Hentschel, Ute, King, Nicole, Kjelleberg, Staffan, Knoll, Andrew H., Kremer, Natacha, Mazmanian, Sarkis K., Metcalf, Jessica L., Neelson, Kenneth , Pierce, Naomi E., Rawls, John F., Reid, Ann, Ruby, Edward G., Rumpho, Mary, Sanders, Jon G., Tautz, Diethard, y Wernegreen, Jennifer J.. 2013. Animals in a Bacterial World, a New Imperative for the Life Sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (9): 3229–36.
- Microsynth AG. 2015. Amplicon Deep Sequencing on the Illumina MiSeq / NextSeq Platform (Application Note), 1–4.
- Moore, Sue E. 2008. Marine Mammals as Ecosystem Sentinels. *Journal of Mammalogy* 89 (3): 534–40. doi:10.1644/07-MAMM-S-312R1.1.
- MSD. 2016a. Environmental Diseases of Marine Mammals. Consultado el 25 de septiembre de 2017, de <http://www.msdvetermanual.com/exotic-and-laboratory-animals/marine-mammals/environmental-diseases-of-marine-mammals>.
- MSD . 2016b. Nutrition and Nutritional Diseases of Marine Mammals. Consultado el 25 de septiembre de 2017, de <http://www.msdvetermanual.com/exotic-and-laboratory-animals/marine-mammals/nutrition-and-nutritional-diseases-of-marine-mammals>.
- Murillo Díaz, Bertha Paulina. 2007. Catálogo de otolitos de peces marinos de las costas adyacentes a Baja California Sur. Universidad Autónoma de Baja California Sur.
- National Institute of Environmental Health Sciences. 2017. Dioxins. Consultado el 28 de septiembre de 2017, de <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/dioxins/index.cfm>.
- Navarro Mendoza, Miguel. 1985. Ecología Trófica de la comunidad íctica en El Estero de Punta Banda, Ensenada, México. Tesis de Maestría en Ecología Marina. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 179 pp.
- Nelson, Tiffanie M., Rogers, Tracey L., Carlini, Alejandro R., y Brown Mark V. 2013. Diet and Phylogeny Shape the Gut Microbiota of Antarctic Seals: A Comparison of Wild and Captive Animals.

Environmental Microbiology 15 (4): 1132–45. doi:10.1111/1462-2920.12022.

- Nelson, Tiffanie M., Apprill, Amy, Mann, Janet, Rogers, Tracey L., y Brown, Mark V. 2015. The Marine Mammal Microbiome: Current Knowledge and Future Directions. *Microbiology Australia* 36 (1): 8–13. doi:10.1071/MA15004.
- Nelson, Tiffanie M, Tracey L Rogers, y Mark V., Brown. 2013. The Gut Bacterial Community of Mammals from Marine and Terrestrial Habitats. *PLoS ONE* 8 (12). doi:10.1371/journal.pone.0083655.
- Numberger, Daniela, Herlemann, Daniel P. R., Jürgens, Klaus, Dehnhardt, Guido, y Schulz-Vogt, Heide. 2016. Comparative Analysis of the Fecal Bacterial Community of Five Harbor Seals (*Phoca vitulina*). *MicrobiologyOpen* 5 (5): 782–792. doi:10.1002/mbo3.369.
- Olsen, M. A., Blix, A. S., Utsi, T. H., Sørmo, W., y Mathiesen, S. D. 2000. Chitinolytic Bacteria in the Minke Whale Fore stomach. *Canadian Journal of Microbiology* 46 (1): 85–94. doi:10.1139/w99-112.
- Parks, Donovan H., Tyson, Gene W., Hugenholtz, Philip, y Beiko, Robert G. 2014. STAMP: Statistical Analysis of Taxonomic and Functional Profiles 30 (21): 3123–24. doi:10.1093/bioinformatics/btu494.
- Pompa, Sandra, Ehrlich, Paul R., y Ceballos, Gerardo. 2011. Global Distribution and Conservation of Marine Mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (33): 13600–13605.
- Pompanon, Francois, Deagle, Bruce E. , Symondson William O. C., Brown, David S., Jarman, Simon N., y Taberlet, Pierre. 2012. Who Is Eating What: Diet Assessment Using Next Generation Sequencing. *Molecular Ecology* 21 (8): 1931–50. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05403.x.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Jörg P., J. y Glöckner, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(D1):D590–596. [PubMed: 23193283]
- R Core Team. 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reif, John S. 2011. Animal Sentinels for Environmental and Public Health. *Public Health Reports* 126: 50–57.
- Renaudin, Joël, Breton, Marc, Browning, Glenn, y Citti, Christine. 2014. Molecular Genetic Tools for Mollicutes. In *Mollicutes : Molecular Biology and Pathogenesis*, edited by Browning, Christine, Citti Glenn F., 346. Australia: Caister Academic Press.
- Rice, Dale W. 2007. Classification (Overall). In *Encyclopedia of Marine Mammals*, edited by Perrin, William F., Würsig, Bernd, y Thewissen, J. G. M. 2nd ed., 234–36. Amsterdam: Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-374144-8.00079-5.
- Ricketts, Edward, Calvin, Jack, Hedgpeth, Joel Walker, y Phillips, David W. 1985. Open-Coast Sandy Beaches. In *Between Pacific Tides*, 5th ed, 249–66. California: Stanford University Press.
- Rodicio, M. R., y Mendoza, M. C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22

(4): 238–45.

- Rosales-Casian, J.A. 1997. Estructura de la comunidad de peces y el uso de los ambientes de bahías, lagunas y costa abierta en el Pacífico Norte de Baja California. Tesis de Doctorado en Ecología Marina. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 201 pp.
- Ross, P.S., De Swarta, R. L., Timmermanb, H. H., Reijnders, P. J. H., Vosb, J. G., Van Loverenb H., y Osterhaus, A.D.M.E. 1996. Suppression of Natural Killer Cell Activity in Harbour Seals (*Phoca vitulina*) Fed Baltic Sea Herring. *Aquatic Toxicology* 34: 71–84.
- Ruiz Mar, Maria Guadalupe. 2016. Determinación del periodo de lactancia y cuidado materno en la foca de puerto *Phoca vitulina richardii* y su relación con el disturbio humano en El Estero de Punta Banda, Baja California, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 70 pp.
- SAGARPA. 2017. Isla San Jerónimo. Consultado el 28 de septiembre de 2017, de <http://www.sportfishinginmexico.com/anp-isla-san-jeronimo/>.
- Sanders, Jon G., Beichman, Annabel C., Roman, Joe, Scott, Jarrod J., Emerson, David, McCarthy, James J., y Girguis, Peter R. 2015. Baleen Whales Host a Unique Gut Microbiome with Similarities to Both Carnivores and Herbivores. *Nature Communications* 6. Nature Publishing Group: 8285. doi:10.1038/ncomms9285.
- Shreiner, Andrew B, Kao, John Y., y Young, Vincent B. 2015. The Gut Microbiome in Health and in Disease. *Curr Opin Gastroenterol* 31 (1): 69–75. doi:10.1097/MOG.000000000000139.
- Song, Se Jin, Amir, Amnon, Metcalf, Jessica L., Amato, Katherine R., Xu, Zhenjiang, Zech, Humphrey, Greg, y Knight, Rob. 2016. Preservation Methods Differ in Fecal Microbiome Stability, Affecting Suitability for Field Studies. *mSystems* 1 (3): e00021-16. doi:10.1128/mSystems.00021-16.
- Steingass, Sheanna. 2017. Dietary Composition of Four Stocks of Pacific Harbor Seal (*Phoca vitulina richardii*) in the Northern California Current Large Marine Ecosystem As Synthesized From Historical Data, 1931–2013. *Northwestern Naturalist* 98 (1): 8–23. doi:10.1898/NWN16-05.1.
- Sugita, H, J Kumazawa, y Deguchi, Y. 1996. Production of Chitinase and Beta-N-Acetylglucosaminidase by Intestinal Bacteria of Pinnipedian Animals. *Letters in Applied Microbiology* 23 (5): 275–78.
- The Ramsar Convention. 2006. Mexico Names Four New Ramsar Sites for World Wetlands Day | Ramsar. Consultado el 28 de septiembre de 2017, de <http://www.ramsar.org/news/mexico-names-four-new-ramsar-sites-for-world-wetlands-day>.
- Thomas, Austen C. 2015. Diet Analysis of Pacific Harbour Seals (*Phoca vitulina richardsi*) Using High-Throughput DNA Sequencing. Tesis de Maestría en Filosofía. The University of British Columbia. 166 pp.
- Vestheim, Hege, y Jarman, Simon N. 2008. Blocking Primers to Enhance PCR Amplification of Rare Sequences in Mixed Samples - a Case Study on Prey DNA in Antarctic Krill Stomachs. *Frontiers in Zoology* 5: 12. doi:10.1186/1742-9994-5-12.

- Wilson, K.H., y Blitchington, R. B. 1996. Human Colonic Biota Studied by Ribosomal DNA Sequence Analysis. *Appl. Envir. Microbiol.* 62 (7): 2273–78.
- Wolff, Gary A. 1984. Identification and Estimation of Size from the Beaks of 18 Species of Cephalopods from the Pacific Ocean. U.S. Department of Commerce. Vol. 17.
- Wu, Gary D., Chen, Jun, Hoffmann, Christian, Bittinger, Kyle, Chen, Ying-Yu, Keilbaugh, Sue A., Bewtra, Meenakshi, Knights, Dan, Walters, William A., Knight, Rob, Sinha, Rohini, Gilroy, Erin, Gupta, Kernika, Baldassano, Robert, Nessel, Lisa, Li, Hongzhe, Bushman, Frederic D., Lewis, James D. 2011. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* 334: 105–8. doi:10.1126/science.1208344.
- Xu, Peiru, Li, Min, Zhang, Jihong y Zhang, Tao. 2012. Correlation of Intestinal Microbiota with Overweight and Obesity in Kazakh School Children. *BMC Microbiology* 12 (283): 2–6. doi:10.1186/1471-2180-12-283.
- Yildirim, Suleyman, Yeoman, Carl J., Sipos, Maksim, Torralba, Manolito, Wilson, Brenda A., Goldberg, Tony L., Stumpf, Rebecca M., Leigh, Steven R., White, Bryan A., y Nelson, Karen E. 2010. Characterization of the Fecal Microbiome from Non-Human Wild Primates Reveals Species Specific Microbial Communities. *PLoS ONE* 5 (11): e13963. doi:10.1371/journal.pone.0013963.

Anexo A

Tabla 4. Condiciones para la amplificación de las regiones de interés

| Gen | Desnaturalización inicial | Ciclos | | | Extensión final | Conservación |
|---------------------------------------|---------------------------|--|-------------|-----------|-----------------|--------------|
| | | <i>Des-naturalización</i> | Hibridación | Extensión | | |
| 16S ARNr (región V4) | 95°C x 3' | 25 ciclos (95°C x 30"; 55°C x 30"; 72°C x 30") | | | 72°C x 5' | 4°C |
| 18S ARNr: Eukaryota (región V9) | 94°C x 3' | 35 ciclos (94°C x 45"; 65°C x 15"; 57°C x 30"; 72°C x 90") | | | 72°C x 10' | 4°C |
| ADNmt 16S: Cordados | 95°C x 15'' | 34 ciclos (94°C x 30"; 65.5°C x 90"; 72°C x 45'') | | | 72°C x 2' | 4°C |
| ADNmt 16S: Cefalópodos | 95°C x 15'' | 34 ciclos (94°C x 30"; 57°C x 90"; 72°C x 60') | | | 72°C x 2' | 4°C |

Tabla 5. Condiciones para el segundo paso de PCR

| Gen | Desnaturalización inicial | Ciclos | | | Extensión final | Conservación |
|--|---------------------------|--|-------------|-----------|-----------------|--------------|
| | | <i>Des-naturalización</i> | Hibridación | Extensión | | |
| Microbioma16S ARNr | 95°C x 3' | 8 ciclos (95°C x 30"; 61°C x 30"; 72°C x 5') | | | 72°C x 5' | 4°C |
| Dieta (Eukaryota, cordados, cefalópodos) | 95°C x 3' | 8 ciclos (95°C x 30"; 61°C x 30"; 72°C x 5') | | | 72°C x 5' | 4°C |

Anexo B

Tabla 6. Fila bacteriana encontrada en el microbioma intestinal de la foca de puerto

| Reino | Filo | EPB | TS | SJ | N | SR |
|----------|------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Bacteria | Firmicutes | 53.836% | 63.186% | 24.856% | 31.793% | 40.940% |
| Bacteria | Bacteroidetes | 28.432% | 25.476% | 51.973% | 47.970% | 29.772% |
| Bacteria | Fusobacteria | 12.746% | 4.400% | 16.708% | 13.221% | 22.813% |
| Bacteria | Proteobacteria | 1.843% | 1.546% | 6.008% | 6.701% | 4.561% |
| Bacteria | Actinobacteria | 2.854% | 3.510% | 0.206% | 0.199% | 1.203% |
| Bacteria | Tenericutes | 0.020% | 1.877% | 0.033% | 0.040% | 0.333% |
| Bacteria | Deferribacteres | 0.192% | 0.000% | 0.150% | 0.073% | 0.373% |
| Archaea | Thaumarchaeota | 0.051% | 0.000% | 0.006% | 0.000% | 0.000% |
| Bacteria | Acidobacteria | 0.006% | 0.000% | 0.031% | 0.000% | 0.000% |
| Bacteria | Verrucomicrobia | 0.000% | 0.000% | 0.012% | 0.000% | 0.000% |
| Bacteria | Nitrospirae | 0.006% | 0.000% | 0.003% | 0.000% | 0.000% |
| Bacteria | Gemmatimonadetes | 0.007% | 0.000% | 0.000% | 0.000% | 0.000% |
| Bacteria | Latescibacteria | 0.000% | 0.000% | 0.006% | 0.000% | 0.000% |
| Bacteria | Chloroflexi | 0.002% | 0.000% | 0.002% | 0.000% | 0.000% |
| Bacteria | Planctomycetes | 0.001% | 0.000% | 0.002% | 0.000% | 0.000% |
| Bacteria | Cyanobacteria | 0.002% | 0.000% | 0.000% | 0.000% | 0.000% |
| Bacteria | Hydrogenedentes | 0.001% | 0.000% | 0.000% | 0.000% | 0.000% |

Anexo C

Tabla 7. Especies presa encontradas por medio del análisis metagenómico, en las muestras fecales de las focas de puerto del EPB.

| Especie | Hábito | %FO | Talla (cm) |
|--|------------------------|------|------------|
| <i>Auxis rochei</i> | Pelágico-nerítico | 100% | 35 |
| <i>Synodus lucioceps</i> | Demersal | 100% | 30 |
| <i>Citharichthys xanthostigma/sordidus</i> | Demersal | 80% | 20 / 41 |
| <i>Menticirrhus undulatus</i> | Demersal | 80% | 71 |
| <i>Mugil cephalus</i> | Bentopelágico | 80% | 50 |
| <i>Raja binoculata</i> | Demersal | 80% | 130 |
| <i>Chilara taylori</i> | Demersal | 60% | 30 |
| <i>Hypsopsetta guttulata</i> | Demersal | 60% | 46 |
| <i>Paralichthys californicus</i> | Demersal | 60% | 152 |
| <i>Pleuronichthys verticalis</i> | Demersal | 60% | 37 |
| <i>Anchoa compressa</i> | Pelagico neritico | 40% | 13.3 |
| <i>Blepharipoda occidentalis</i> | Bentónico | 40% | 8 |
| <i>Citharichthys stigmaeus</i> | Demersal | 40% | 17 |
| <i>Genyonemus lineatus</i> | Bentopelágico | 40% | 41 |
| <i>Peprilus simillimus</i> | Demersal/bentopelagico | 40% | 28 |
| <i>Symphurus atricaudus</i> | Demersal | 40% | 13 |
| <i>Syngnathus leptorhynchus/exilis</i> | Demersal | 40% | 32.5 |
| <i>Aplysina sp.</i> | Demersal | 20% | NA |
| <i>Engraulis mordax</i> | Pelagico neritico | 20% | 18 |
| <i>Microstomus pacificus</i> | Demersal | 20% | 40 |
| <i>Myliobatis californica</i> | Demersal | 20% | 100 |
| <i>Neotrypaea californiensis</i> | Demersal | 20% | 12 |
| <i>Octopus rubescens</i> | Demersal | 20% | 45 |
| <i>Ophidion scrippsae</i> | Demersal | 20% | 28 |
| <i>Pachycerianthus fimbriatus</i> | Demersal | 20% | 30 |
| <i>Pleuroncodes planipes</i> | Demersal | 20% | 7.5 |
| <i>Pleuronichthys decurrens</i> | Demersal | 20% | 37 |
| <i>Porichthys myriaster</i> | Demersal | 20% | 51 |
| <i>Sebastes miniatus/pinniger</i> | Demersal | 20% | 37-46 |
| <i>Sebastes simulator</i> | Demersal | 20% | 30 |
| <i>Triakis semifasciata</i> | Demersal | 20% | 160 |
| <i>Rhinobatos productus</i> | Demersal | 20% | 99 |
| <i>Zaniolepis frenata</i> | Demersal | 20% | 25 |
| <i>Zaniolepis latipinnis</i> | Demersal | 20% | 30 |

Anexo D

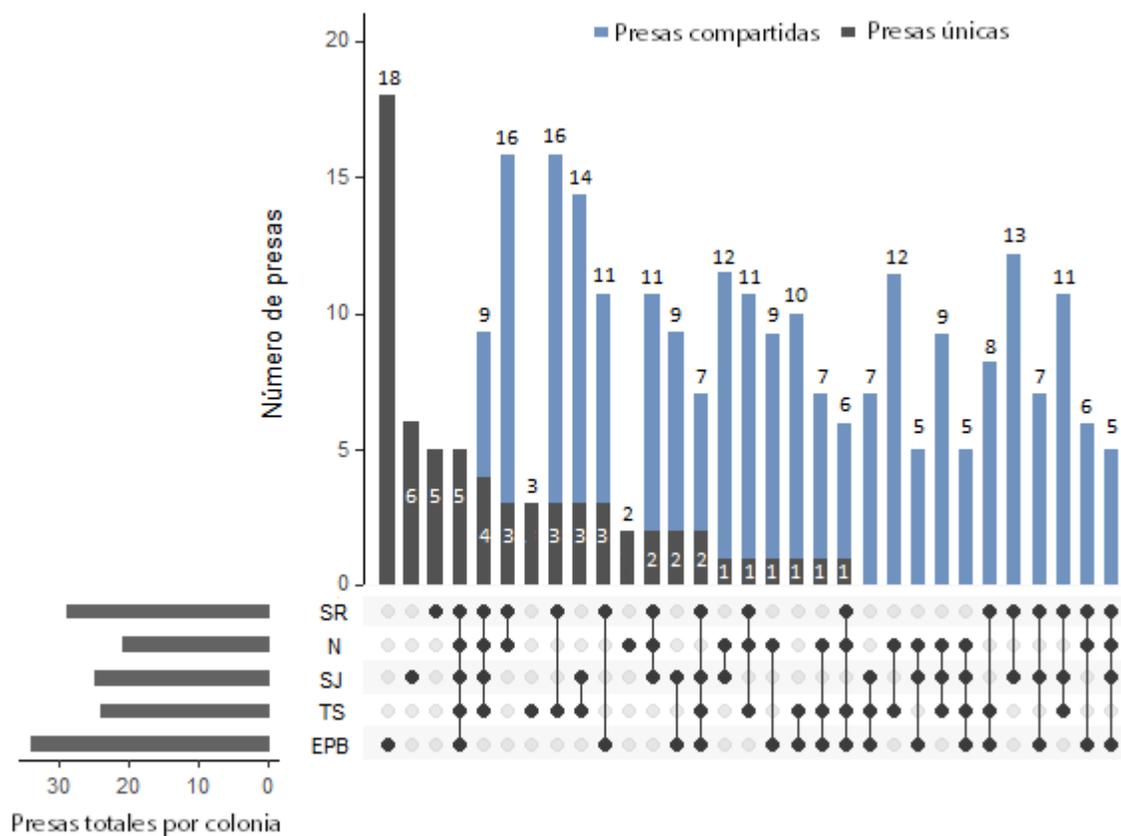


Figura 37. Número de presas únicas y compartidas detectadas por medio del análisis metagenómico, entre las 5 colonias de focas de puerto del estudio. Además, se incluye el número total de especies presa detectadas en cada colonia. A excepción del Estero de Punta Banda, los datos de las presas de las colonias restantes se obtuvieron de Brassea (2016). Estero de Punta Banda (EPB), Todos Santos (TS), San Jerónimo (SJ), Natividad (N) y San Roque (SR).

Anexo E

Tabla 8. Especies presa de la colonia de focas de puerto del EPB detectadas por medio del análisis de restos sólidos. Además, se incluye la comparación del %FO obtenido de cada presa con los distintos métodos de caracterización de la dieta.

| Espece presa | %FO (restos sólidos) | %FO (metagenómica) |
|-----------------------------------|----------------------|--------------------|
| <i>Synodus lucioceps</i> | 80% | 100% |
| <i>Microstomus pacificus</i> | 60% | 20% |
| <i>Sebastes sp.</i> | 60% | 20% |
| <i>Citharichthys stigmaeus</i> | 40% | 40% |
| <i>Octopus rubescens</i> | 40% | 20% |
| <i>Paralichthys californicus</i> | 40% | 60% |
| <i>Chilara taylori</i> | 20% | 60% |
| <i>Citharichthys xanthostigma</i> | 20% | 80% |
| <i>Engraulis mordax</i> | 20% | 20% |
| <i>Porichthys spp</i> | 20% | 20% |
| <i>Peprilus simillimus</i> | 20% | 40% |
| <i>Icelinus sp.*</i> | 20% | 20% |
| Fam. Paralichthyidae | 20% | - |

*Catalogado como presa de las especies encontradas