

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS DE LA
MICROBIOTA INTESTINAL EN AVES SILVESTRES DE LA REGIÓN DELTA
DEL RÍO COLORADO, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRO
EN CIENCIAS VETERINARIAS**

PRESENTA

SANTIAGO HARDY RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. GERARDO ENRIQUE MEDINA BASULTO

MEXICALI, B. C. MÉXICO

AGOSTO 2021

Aislamiento e identificación molecular de bacterias de la microbiota intestinal en aves silvestres de la región delta del río Colorado, Baja California, México. Tesis presentada por Santiago Hardy Ramírez como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el siguiente comité:

Dr. GERARDO ENRIQUE MEDINA BASULTO

Director de tesis

Dra. SAWAKO HORI-OSHIMA

Asesor

Dr. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA

Asesor

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por concederme una beca para realizar mis estudios de posgrado y el apoyo económico durante mi proceso formativo.

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) e Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) por la oportunidad de formar parte del cuerpo estudiantil y hacer uso de las instalaciones para trabajar mi proyecto de investigación.

A la Coordinación de Maestría en Ciencias Veterinarias por su ayuda en la facilitación de tramites durante el posgrado y en mi movilidad académica.

Agradezco enormemente al Dr. Gerardo E. Medina Basulto por su apoyo y darme su confianza para llevar a cabo este proyecto tan especial para mí.

A la Dra. Sawako Oshima Hori por su gran carisma y hospitalidad, sus enseñanzas y su apoyo, pero sobre todo por sus consejos que me ayudaron a expandir mi pensamiento crítico en la investigación.

A mis asesores de tesis por su apoyo y consejos para culminar mi proyecto de investigación.

A la Dra. Ursula Höfle por compartir su gran conocimiento en la investigación de las aves y por su hospitalidad durante mi estancia académica en su laboratorio.

Al equipo anillador de Pronatura Noroeste por su gran apoyo y camaradería para colecta de las muestras, sin ustedes esto hubiera sido posible, muchas gracias.

A mis compañeros y compañeras del laboratorio de Biología molecular y de maestría, por su gran ayuda y compañía durante este proyecto. Y mis estudiantes de verano científico, de verdad muchas gracias.

DEDICATORIA

A mis padres, por su apoyo incondicional y su enorme cariño, por estar siempre presentes en mi vida.

A mi abuela, por tus bendiciones y tu gran amor, siempre te voy extrañar.

A mis mejores amigos, por su gran amistad y las risas, su energía es muy valiosa en mi vida.

A mis hermosas perras Dolores y Dorothea, por acompañarme semanas debajo de mi escritorio durante la escritura de mi tesis y por ser tan adorables, las amo.

RESUMEN

Aislamiento e identificación molecular de bacterias de la microbiota intestinal en aves silvestres de la región delta del río Colorado, Baja California, México

La microbiota intestinal en vertebrados juega funciones vitales en la digestión y nutrición, inmunidad contra patógenos y enfermedades, desarrollo, comportamiento y reproducción; y esta puede estar determinada por el medio ambiente y factores asociados al hospedero. La caracterización de la microbiota en la vida silvestre puede aportar información importante para la gestión de la vida silvestre, prevención de patógenos y enfermedades, y las prácticas veterinarias. El estudio de la microbiota intestinal en aves ha sido pobremente investigado, en especial a las aves silvestres. El delta del río Colorado presenta una avifauna de las más ricas y abundantes de Norteamérica, sin embargo, no existen estudios de la microbiota intestinal en aves silvestres de esta región. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la microbiota intestinal en aves silvestres de la región del delta del río Colorado mediante técnicas microbiológicas y moleculares utilizando el gen 16S rDNA. Se tomaron muestras cloacales de aves silvestres en tres sitios de restauración del delta del río Colorado, se lograron aislar 85 cultivos de bacterias provenientes de 33 aves de 15 especies diferentes de las temporadas invierno y verano. Se detectaron 60 especies de bacterias distintas, mediante la secuenciación del gen 16S rDNA, presentando una composición de la microbiota intestinal de Firmicutes 65%, Actinobacteria 21% y Proteobacteria 14%. Se mostraron similitudes en las especies de bacterias en un sitio de muestreo en ambas temporadas. Dicha similitud posiblemente estén relacionadas al medio y a la dieta y comportamiento de las aves.

Palabras claves: Microbiota intestinal – Aves silvestres – Cloacal – 16S rDNA – Delta del río Colorado – Baja California

ABSTRACT

Isolation and molecular identification of bacteria from the gut microbiota in wild birds of the delta region of the Colorado River, Baja California, Mexico

The gut microbiota of vertebrates performs vital functions in digestion and nutrition, immunity against pathogens and diseases, development, behavior and reproduction; and this can be determined by the environment and factors associated with the host. Characterizing the microbiota in wildlife can provide important information for wildlife management, pathogen and disease prevention, and veterinary practices. The study of the gut microbiota in birds has been little investigated, especially in wild birds. The Colorado River Delta has one of the richest and most abundant avifaunas in North America, however, there are no studies of the gut microbiota in wild birds in this region. Therefore, the objective of the present work was to determine the gut microbiota in wild birds of the Colorado River delta region by microbiological and molecular techniques using the 16S rDNA gene. Cloacal samples were taken from wild birds in three restoration sites of the Colorado River delta, it was possible to isolate 85 bacteria cultures from 33 birds of 15 different species from the winter and summer seasons. 60 different species of bacteria were detected by sequencing the 16S rDNA gene, presenting a composition of the gut microbiota of Firmicutes 65%, Actinobacteria 21% and Proteobacteria 14%. Similarities were shown in bacteria species at a sampling site in both seasons. This similarity is possibly related to the environment, diet and behavior of the birds.

Keywords: Gut microbiota - Wild birds - Cloacal - 16S rDNA - Colorado River Delta - Baja California

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA.....	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT	VI
CONTENIDO	VII
LISTA DE CUADROS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Antecedentes históricos.....	3
Microbiota intestinal.....	4
Importancia del estudio de la microbiota intestinal.....	5
Microbiota intestinal en aves silvestres.....	6
Diversidad de microorganismos intestinales en aves silvestres.....	6
Funciones de la microbiota intestinal en las aves silvestres.....	9
<i>Nutrición.....</i>	9
<i>Función inmunitaria.....</i>	10
<i>Desintoxicación.....</i>	10
Factores que afectan la microbiota intestinal.....	11
<i>Factores extrínsecos.....</i>	12
<i>Factores intrínsecos.....</i>	13
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Sitios y áreas de estudio.....	16
<i>Miguel Alemán.....</i>	17
<i>La Herradura.....</i>	18
<i>Laguna Grande-CILA.....</i>	18
Muestreo.....	18
<i>Tipo de muestreo.....</i>	19
<i>Criterios de inclusión.....</i>	19

<i>Captura de aves</i>	19
<i>Registro de datos</i>	19
<i>Colecta de muestra</i>	19
Análisis de Laboratorio	20
<i>Cultivo microbiológico y aislamiento de cepas</i>	20
<i>Extracción de ADN</i>	21
<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	21
<i>Secuenciación de productos de PCR</i>	23
<i>Análisis de secuencias</i>	23
<i>Análisis estadístico</i>	24
RESULTADOS	25
Colecta de muestras y aislamiento de cepas	25
Detección del gen 16S rDNA y secuenciación	25
Composición de especies de bacterias de la microbiota intestinal en aves silvestres del delta del río Colorado	27
Diversidad de especies de bacterias por especies de aves de cada temporada	28
Similitud de la composición de las comunidades de bacterias por sitio de estudio y temporada	31
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	38
LITERATURA CITADA	39

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág.
Cuadro I	Filos microbianos en intestino de las aves silvestres...	8
Cuadro II	Oligonucleótidos universales utilizados para la amplificación del gen 16S rDNA.....	22
Cuadro III	Condiciones de termociclador para la amplificación del gen 16 rDNA.....	23
Cuadro IV	Diversidad de especies de bacterias en la microbiota intestinal de las aves silvestres del delta de río Colorado.....	26
Cuadro V	Número de aislados por especies de ave de cada temporada con la estacionalidad del ave.....	28
Cuadro VI	Especies de bacterias por especie de ave.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
Figura I	Factores extrínsecos e intrínsecos que afectan la microbiota intestinal en aves.....	11
Figura II	Mapa de sitios de estudio.....	17
Figura III	Porcentajes de Filos por gremio alimenticio y forrajero de las aves silvestres.....	27
Figura IV	Dendrograma del Índice de Similitud de Jaccard entre los sitios de estudio por temporada.....	31

INTRODUCCIÓN

Las aves representan una clase importante dentro de los seres vivos que habitan en la Tierra. Desde que tuvieron su primera aparición en la era Mesozoica (Evans et al., 2017), las aves presentan un linaje diverso y evolutivamente exitoso, compuesto por 10,000 especies y 22,000 subespecies descritas a la fecha (Garcia et al., 2017; Hou et al., 2021). Al igual que los humanos se encuentran distribuidas a nivel mundial. Su capacidad de migrar grandes distancias, colonizar nuevas áreas y resistir a una gran variedad de entornos, les permite tener una distribución cosmopolita en distintas áreas de la Tierra (Chung et al., 2018). México es considerado un país megadiverso. Estudios anteriores reportan que el 11% de la diversidad de especies de aves habitan en su territorio, colocándolo en el onceavo lugar por su riqueza de avifauna y cuarto lugar en proporción de endemismo (Navarro et al., 2014). En el norte de la península de Baja California se localiza el área de delta del río Colorado, que ha sido reconocida como una de las regiones más ricas para la vida silvestre en el suroeste de Estado Unidos y noroeste de México. La avifauna del delta del Río Colorado es una de las más abundantes y diversas de Norteamérica, con registros de 371 especies, y con la presencia de 300,000 aves acuáticas migratorias cada invierno (Hinojosa-Huerta et al., 2007). El delta del Río Colorado es un sitio importante para la reproducción, descanso y alimento de las aves migratorias debido a que se localiza dentro la ruta migratoria del Pacífico, una de las principales rutas migratorias de aves en el mundo.

En años recientes, los biólogos han reconocido la importancia de la coevolución de las comunidades de bacterias asociadas o microbiota en el estudio de los animales. Todos los animales están involucrados en el mundo de las bacterias como hospederos, y las interacciones con estos microorganismos afectan en muchos aspectos la vida animal; esta relación de hospeder-

microbiota es el resultado de una evolución sincronizada en ambas formas de vida durante millones de años. Una de las mayores interacciones ocurre en el intestino, el cual típicamente es colonizado por un gran número de microorganismos. Varias funciones importantes han sido atribuidas a la microbiota intestinal, las cuales juegan un papel crucial en la salud de los animales, como absorción de nutrientes, el desarrollo y función inmune, comportamiento y otros procesos fisiológicos (Ellegaard y Engel, 2016; Evans et al., 2017; Garcia et al., 2017; Vargas et al., 2019;).

La mayor parte de los estudios publicados sobre el estudio de la microbiota intestinal han sido en mamíferos, particularmente en humanos. Mientras los estudios sobre microbiota intestinal en vida silvestre están aumentando. En una reciente revisión de literatura se encontró que más del 90% de estos estudios se centran en mamíferos. Los estudios en aves silvestres se han concentrado en un pequeño número de especies (Oliveira et al., 2020), la mayor parte de los estudios de microbiota intestinal en aves están relacionados con la producción avícola (Evans et al., 2017). Las aves a lo largo de su evolución han desarrollado un sistema anatómico, fisiológico, conductual, además de una dieta y rasgos sociales únicos, y un fuerte componente genético como hospedero. Estas características hacen de las aves organismos interesantes para estudiar a los microorganismos asociados debido a su alta diversidad de especies hospedadoras, que probablemente presenten las condiciones favorables para una amplia gama de diversas adaptaciones microbianas (Garcia et al., 2017). Hasta el momento, no existen estudios previos relacionados a la microbiota en aves silvestres del delta del río Colorado. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo es determinar la microbiota intestinal en aves silvestres de la región del delta del río Colorado en el valle de Mexicali mediante el uso técnicas microbiológicas y moleculares utilizando el gen 16S rRNA.

REVISIÓN DE LITERATURA

Antecedentes históricos

En el siglo XVII Anton van Leeuwenhoek observó por primera vez en microscopio a los microorganismos asociados a un hospedero en la placa dental a los cuales llamo “animálculos”. El descubrimiento de la vida microscópica dio surgimiento al estudio de la microbiología donde las principales herramientas fueron el análisis microscópico y el cultivo de microorganismos. Desde que Robert Koch probó la “teoría germinal de las enfermedades infecciosas”, la visión de los microorganismos asociados a un hospedero había estado contenida por su papel causante de enfermedades infecciosas. Sin embargo, una nueva visión surgió a finales del siglo XIX hacia las interacciones entre el hospedero y los microorganismos asociados de una manera positiva, donde la mayoría de las interacciones no son patógenas sino mutuamente beneficiosas. En 1885 Theodor Escherich observó la aparición de bacterias en las heces normales y tracto intestinal que posiblemente modificaban las propiedades fisiológicas del hospedero, por lo tanto dio inicio a la investigación sobre microbiota intestinal la cual era llamada “flora normal”. Antes de que se desarrollaran métodos eficaces para el cultivo de bacterias anaerobias, las investigaciones se centraban principalmente en bacterias aerobias. A mediados del siglo XX se descubrieron nuevas especies anaeróbicas dominantes estrictas y la sucesión temprana de especies de microbiota intestinal en recién nacidos. Observar los microorganismos en microscopios vs. medios de cultivo generó un frecuente desacuerdo en la diversidad de los microorganismos; además, muchos de los microorganismos no eran cultivables y nuestro conocimiento de la microbiota intestinal era rudimentaria y sesgada. Los avances en la tecnología permitieron transformar la metodología microbiana en la década de los ochenta a una nueva era de la biología molecular. En 1980 Carl Woese y colaboradores estudiaron la filogenia bacteriana utilizando la secuenciación del gen 16s ribosómico (rRNA), el cual empezó a utilizarse como marcador molecular por varias razones, entre ellas su distribución universal entre bacterias, una longitud total de 1500 pb que

lo hace fácilmente manejable, el ser un gen altamente conservado, lo cual permite el uso efectivo de cebadores universales, y poseer nueve regiones hipervariables, lo cual ayuda en la diferenciación específica de especies. El gen 16S rRNA cambió y resolvió la divergencia entre las metodologías microbiológicas y microscópicas y ofreció la sensibilidad de detección necesaria para el estudio de los microorganismos (Fox et al., 1980; Anh-Thu, 2014; Ren, 2016).

Microbiota intestinal

Existen dos términos importantes para definir las comunidades de microorganismos, el término microbioma se refiere a todo hábitat, incluidos los microorganismos, sus genomas y las condiciones ambientales del entorno, mientras que el término microbiota es el conjunto de microorganismos presentes en un ambiente definido (Marchesi y Ravel, 2015), por ejemplo el intestino de un ave.

Los animales evolucionaron desde un mundo microbiano hace aproximadamente 3 mil millones de años, por lo tanto, puede que no sea sorprendente que cada animal sea anfitrión de una comunidad compleja de microorganismos que pueda contener miles de millones de microorganismos pertenecientes a un microbioma de cientos a miles de especies de todas las divisiones de la vida como Bacteria, Archea y Eukarya. Se estima que hay un número casi igual de células microbianas y humanas en el cuerpo humano, y los genes microbianos pueden superar en número a los genes del hospedero (Hird, 2017). Avances recientes en este campo de estudio han demostrado claramente la importancia de la microbiota asociada al hospedero ya que proporciona importantes beneficios para el anfitrión, en particular la que se desarrolla en el tracto digestivo (Kreisinger et al., 2015). La diversidad y función de la microbiota intestinal de los vertebrados es un área de interés para los investigadores debido a que contribuye en importantes funciones en la digestión y nutrición, inmunidad

contra patógenos y enfermedades, desarrollo, comportamiento y reproducción (Drovetski et al., 2019). La microbiota intestinal varía ampliamente entre las distintas especies de animales y altamente conservada dentro de una misma especie, aunque existe una variación interindividual significativa incluso dentro de la misma especie. Además, esta puede estar afectada por muchos factores como el medio ambiente, la alimentación, infección por patógenos y administración de antibióticos (Xenoulis et al., 2010).

Importancia del estudio de la microbiota intestinal

Comprender el papel de la microbiota en la biología animal requiere la caracterización de las comunidades microbianas asociadas a los animales y la identificación de los factores evolutivos y ecológicos que dan forma a su variación. La gran variedad de la microbiota en los animales está determinada por su ecología como especie, su forma de reproducción y otros rasgos de su ciclo de vida. También, pueden variar entre los niveles de organización biológica, por ejemplo entre especies hospedadoras, entre individuos y en distintas partes del cuerpo del organismo. Por último, algunos animales adquieren microorganismos simbiotes a través de los padres y del medio ambiente (van Veelen et al., 2017).

Se reconoce cada vez más el papel crucial que desempeña la microbiota intestinal en la salud de los seres humanos y los animales. La caracterización y monitoreo de la microbiota en la vida silvestre está emergiendo como una nueva herramienta en la conservación, en la cría de animales en cautiverio y manejo de especies en extinción (Oliveira et al., 2020). En gran medida, esa información ayuda en la gestión de la vida silvestre, prevención de patógenos y prácticas veterinarias (Pearce et al., 2017). La presencia del microbioma y/o microbiota en los animales, nos da la oportunidad única de comprender la evolución y la red de interacciones biológicas entre individuos y comunidades, de tal manera que son una gran herramienta para conocer más nuestra biodiversidad.

Microbiota intestinal en aves silvestres

Las aves representan un linaje diverso y evolutivamente exitoso, con más de 10 000 especies existentes (Gill y Donsker, 2015) y son sistemas interesantes de estudio para investigar el papel de los microorganismos intestinales, debido a que tienen dietas extremadamente complejas y únicas, rasgos fisiológicos y estrategias dentro de su desarrollo (Kohl, 2012). Al poseer una gran diversidad morfológica disponen de una amplia gama de estilos de vida, en su mayoría las especies presentan la capacidad para volar facilitando la colonización de nichos en todos los ecosistemas del mundo (Waite y Taylor, 2015), lo que da lugar a una gran variedad en su dieta que las agrupan en carnívoras, frugívoras, granívoras, herbívoras, insectívoras, nectarívoras, omnívoras, piscívoras y carroñeras; por lo tanto, estos hábitos alimenticios afectan la evolución de las especies de aves y la microbiota (Hou et al., 2021).

El tracto gastrointestinal de las aves como el de otros vertebrados hospederos albergan una comunidad de microorganismos con una densidad de 10^{11} UFC/g en el intestino grueso. Así mismo, existe una evidencia amplia de que la colonización microbiana en el tracto gastrointestinal aporta beneficios a las aves hospedadoras como en la nutrición, su función inmunológica y su desarrollo (Waite y Taylor, 2015). Se han realizado muchos estudios sobre la función de la comunidad microbiana en especies de aves domésticas y muy pocos en aves silvestres, por esta razón, debemos inferir el papel biológico de la microbiota intestinal en las aves silvestres (Kohl, 2012).

Diversidad de microorganismos intestinales en aves silvestres

Las aves poseen una comunidad diversa de microorganismos (Cockerham et al., 2019). Ha habido varios esfuerzos para caracterizar la diversidad microbiana del intestino aviar; sin embargo, la mayoría de estos estudios utilizan técnicas de cultivo selectivo para investigar especies microbianas de su interés y se centran principalmente en identificar microorganismos potencialmente

patógenos (Craven et al., 2000; Gaukler et al., 2009). En estudios anteriores sobre la microbiota intestinal en distintos grupos de vertebrados se menciona que las aves silvestres poseen una microbiota intestinal similar a los pollos domesticados, diferente a la de los mamíferos no humanos y muy diferente a la microbiota intestinal de los humanos (Grond et al., 2018). Al igual que otros vertebrados hospederos, la microbiota intestinal en aves está dominada principalmente por miembros de Firmicutes, así como Actinobacteria, Bacteroidetes y Proteobacteria (Waite y Taylor, 2015); esta dominancia no es de sorprenderse, ya que se cree que el antepasado común de los amniotes (aves, reptiles y mamíferos) mantienen una comunidad microbiana compuesta principalmente por Firmicutes y Bacteroidetes (Costello et al., 2010). Al comparar algunos estudios de microbiota en mamíferos, humanos y pollos domésticos, la abundancia relativa de Firmicutes es similar entre humanos, pollos y aves silvestres en alrededor del 50% de todas las detecciones. Además, se observó que en aves domésticas y silvestres se presenta una abundancia relativa alta de Proteobacterias de alrededor del 25%, en comparación con el 1% en humanos (Eckburg et al., 2005; Ley et al., 2008; Waite y Taylor, 2015; Grond et al., 2018).

Filo	Descripción
Bacteroidetes	Bacterias Gram-negativas, aerobias estrictas hasta anaerobias obligadas. Comunes en todo el tracto gastrointestinal de aves y mamíferos. <i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> y <i>Flavobacterium</i> son los géneros más comunes. Algunos son potencialmente patógenas en aves y mamíferos.
Firmicutes	Bacterias en su mayoría Gram-positivas, incluyen anaerobias obligadas o facultativas de las clases Bacilli, Clostridia y Mollicutes y son muy comunes en el tracto gastrointestinal. Se han aislado algunos patógenas de aves silvestres como <i>Mycoplasma gallisepticum</i> , <i>Clostridium botulinum</i> y <i>C. perfringens</i> .
Proteobacteria	Bacterias Gram-negativas, se encuentran en grandes proporciones en el tracto digestivo de aves silvestres en comparación con mamíferos. Se presentan dentro y fuera del tracto gastrointestinal. Se incluyen una diversidad de géneros de patógenos oportunistas como <i>Campylobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>Rickettsia</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Vibrio</i> , aislados de aves.
Actinobacterias	Bacterias Gram-positivas que habitan en varios ecosistemas, suelos, agua dulce y salada, así como en el tracto gastrointestinal. Algunos patógenos que se incluyen son <i>Corynebacterium</i> , <i>Mycobacterium</i> y <i>Nocardia</i> .

Cuadro I. Filos microbianos en intestino de las aves silvestres. (Grond et al., 2018)

Funciones de la microbiota intestinal en las aves silvestres

Diversos estudios se han realizado para investigar las funciones fisiológicas e interacciones de los microorganismos con las aves silvestres. Los resultados que han obtenido estas investigaciones mencionan que los microorganismos intestinales desempeñan un papel importante en la nutrición, la función inmunitaria y procesamiento de toxinas en los hospederos aviares (Kohl, 2012).

Nutrición

La microbiota intestinal está ampliamente involucrada en procesos de la digestión de los alimentos, ayudando en la descomposición de polímeros dietéticos que pueden ser utilizados por el hospedero (Grond et al., 2018). En muchos mamíferos, ayudan a utilizar los polisacáridos vegetales como la celulosa como una fuente de energía (Dehority, 1997). Sin embargo, en las aves la presencia de microorganismos fibrolíticos depende en gran medida de la ubicación intestinal y su filogenia, por ejemplo especies de bacterias del filo Bacteroidetes y Firmicutes en el hoatzin (Godoy-Vitorino et al., 2008) y el avestruz (Matsui et al., 2010), dado que mantienen grandes cámaras de fermentación fibrolíticas que permiten obtener productos finales para suministrar energía al animal (Kohl, 2012). En una investigación realizada en colibrís, identificaron que existe una posible participación de la microbiota intestinal en el reciclaje de nitrógeno a través de la descomposición de uratos, debido al bajo contenido de nitrógeno del néctar (Preest et al., 2003). Son muy pocos los estudios realizados en aves silvestres relacionados a las funciones de la microbiota intestinal con la nutrición, por lo tanto, es un motivo más para estudiar la microbiota en aves silvestres desarrollando distintas líneas de investigación sobre microorganismos asociados a hospederos.

Función inmunitaria

Las interacciones entre la microbiota intestinal y sistema inmune en aves son poco entendidos y permanecen sin estudiar en aves silvestres (Grond et al., 2018). En mamíferos, la microbiota intestinal influye en gran medida en el desarrollo y eficacia de la respuesta inmune y en las mucosas. Además, se ha demostrado que el reconocimiento de los antígenos por los linfocitos T se ajusta con el tiempo, lo que puede atribuirse a las interacciones con la microbiota comensal (Manzarian et al., 2005; Kohl, 2012). En las aves, la bolsa de Fabricius interviene en el desarrollo de linfocitos B en aves jóvenes hasta que estas alcancen su madurez sexual. La bolsa de Fabricius es un divertículo del tracto intestinal colonizado por microorganismos, y estos pueden actuar como antígenos o inducir la producción de citosinas, aumentando la proliferación y la maduración de los linfocitos B (Ratcliffe, 2006; Madej et al., 2013). La falta de información sobre las interacciones microbiota intestinal y función inmune del hospedero en aves es muy notable, aunque a menudo se asume que estas interacciones son muy similares a las de los mamíferos pero aún no han sido descritas (Kohl, 2012).

Desintoxicación

Las aves que se alimentan de plantas o invertebrados a menudo ingieren metabolitos que pueden actuar como toxinas cuando se absorben. Metabolizar estos compuestos requiere de mucha energía, por lo que se ha expuesto que los hospederos pueden albergar microorganismos que ayudan en la desintoxicación para evitar un gasto energético excesivo (Kohl, 2012). En un estudio en hoatzines se encontraron bacterias capaces de degradar saponinas en el buche (García-Amado et al., 2007), mientras que en los intestinos de pollo la comunidad microbiana puede metabolizar varias micotoxinas (Young et al., 2007). Sin embargo, no ha sido determinado el papel de los microorganismos comensales en las aves como responsables del proceso de desintoxicación en sus procesos de alimentación.

Factores que afectan la microbiota intestinal

La microbiota que alberga un animal hospedero está determinada por el medio ambiente y los factores asociados al hospedero. Sin embargo, aún falta mucha información para comprender como estos factores determinan las interacciones entre hospedero y la microbiota, especialmente en especies no mamíferas. La composición de las bacterias intestinales y su dinámica están constantemente determinadas por una gama de factores extrínsecos (por ejemplo, las fuentes de alimento disponibles, medio ambiente y las interacciones sociales) y factores intrínsecos (por ejemplo, dieta, fisiología, edad, composición genética, sexo). Aun así, la forma en que estos factores dan forma a la microbiota intestinal sigue en estudio, de modo que no está claro y a menudo se percibe confuso (Vargas, 2019).

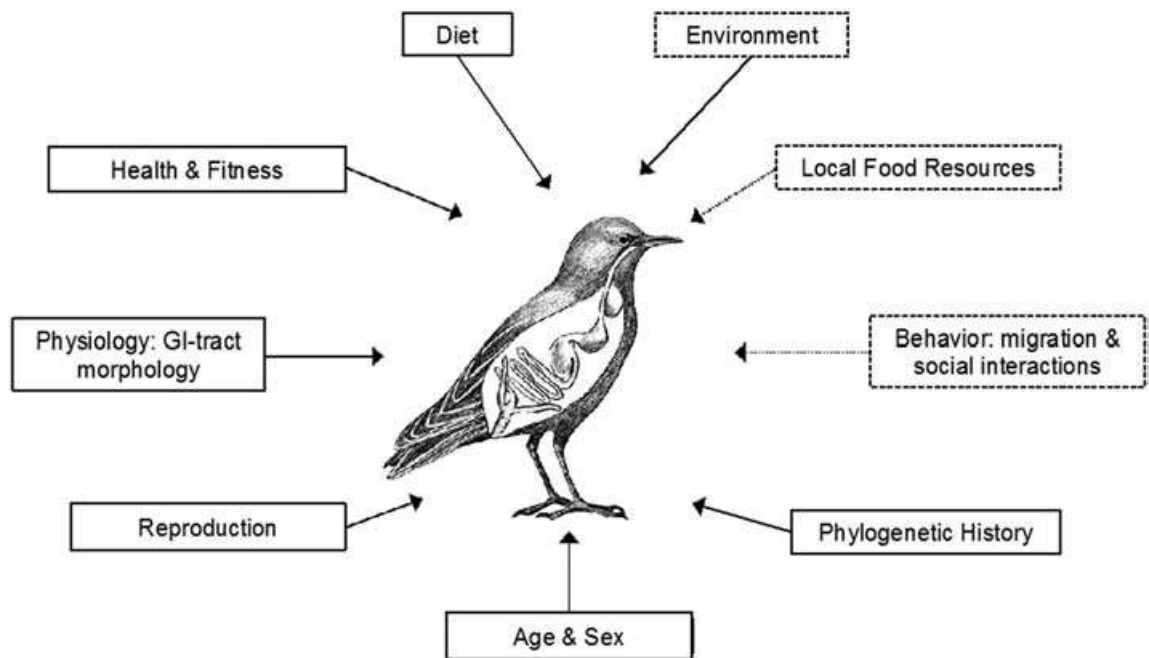


Figura I. Factores extrínsecos e intrínsecos que afectan la microbiota intestinal en aves (Grond et al., 2018)

Factores extrínsecos

En el medio ambiente habitan comunidades microbianas que varían debido a la heterogeneidad de los factores abióticos y bióticos. Las aves están expuestas a diferentes microorganismos con la posibilidad de ser inóculos intestinales, debido a las condiciones ambientales en donde habitan, la dieta, el agua, el suelo, sus entornos de anidación y las interacciones sociales (Grond et al., 2018). Estos hallazgos se han visto en algunos estudios de paserinos en áreas urbanas donde encontraron alteraciones en la microbiota intestinal comparadas con las poblaciones de aves que habitan en áreas rurales (Maraci et al., 2021) y también fue observado en especies como *Larus argentus* (Fuirst et al., 2018). Es importante resaltar que para conocer la relación que existe entre el medio ambiente y la microbiota intestinal es necesario realizar un muestreo exhaustivo de manera simultánea a las aves, suelos, cuerpos de agua y sitios de anidación. Esto nos ofrecerá una visión generalizada de la microbiota con la que se relacionan para poder realizar análisis comparativos entre distintos factores.

En la mayoría de los estudios disponibles se ha observado que la dieta es causante de las diferencias en los microorganismos intestinales, por lo tanto, la digestión es una pieza clave en la microbiota intestinal. El componente extrínseco de la dieta incluye la ingestión de microorganismos asociados con las fuentes de alimento disponibles (Grond et al., 2018). Los alimentos disponibles en diferentes sitios geográficos puede que proporcionen una diversidad microbiana al ingerirlos. Un estudio realizado en aves playeras del Ártico, reportan diferencias significativas en la diversidad de la microbiota intestinal entre embriones antes de eclosionar, polluelos de 0-2 días de edad y 3-10 días a causa de la ingesta de alimentos y el medio ambiente (Grond et al., 2017). Aún se desconoce hasta qué punto los microorganismos ingeridos contribuyen o afectan la microbiota intestinal madura en aves silvestres (Grond et al., 2018).

La migración ofrece un escenario atractivo para investigar los patrones temporales y la influencia local del medio ambiente, así como los recursos alimentarios disponibles para algunas especies de aves silvestres (Lewis et al., 2016). Las aves residentes pueden pasar toda una vida en un área, por lo que pueden estar menos expuestas a diversos inóculos que pueden adquirir en su microbiota intestinal (Grond et al., 2018). Un aspecto clave en las aves migratorias es la demanda energética requerida durante el vuelo migratorio, ocasionándole estrés al animal y, por consiguiente un impacto en la microbiota intestinal, como en algunas especies de passeriformes, que experimentan cambios en su entorno intestinal o función inmunológica (Lewis et al., 2016). Actualmente se desconoce el tiempo de retención de la microbiota local en el intestino de las aves; y la variación de la microbiota intestinal durante las etapas del ciclo migratorio no se ha relacionado con el tiempo y la ubicación (Grond et al., 2018).

Factores intrínsecos

La preferencias alimentarias como la herbívora, insectívora y frugívora son factores intrínsecos entre las especies, en especial en las aves que presentan una diversidad de alimentación en todo su linaje (Grond et al., 2018; Vargas, 2019; Hou et al., 2021). La dominancia de los filos de bacterias entre especies de aves está determinada por la dieta, tal es el caso con las comunidades microorganismos que se alojan en el intestino de las aves herbívoras, el cual a menudo está dominado por miembros del filo Bacteroidetes, que probablemente ayuden en la descomposición de polisacáridos como celulosa y otros polímeros complejos (Thomas et al., 2011). En las especies de aves carnívoras se ha visto una dominancia de los filos Proteobacteria y Firmicutes (Grond et al., 2014; Ryu et al., 2014). Sin embargo, no hay estudios en aves silvestres que hayan investigado la variación de la microbiota intestinal dependiente de las diferencias en la dieta.

Las comunidades microbianas suelen ser muy similares entre individuos estrechamente relacionados, esto suele implicar un cierto nivel de heredabilidad en los microorganismos asociados al hospedero. Algunos investigadores mencionan que la coevolución en animales con potencial de transmisión vertical de comunidades microbianas completas, es una razón importante en la filogenia de la estructura de la microbiota (Ley et al., 2008; Vargas, 2019). En un estudio de meta análisis en un conjunto de especies de aves, se observó que la filogenia del hospedero es el principal determinante de la microbiota intestinal (Waite y Taylor, 2014). En un estudio realizado en el carbonero *Parus major*, se observó que la microbiota intestinal entre hermanos era similar dentro del mismo nido y no tanto con crías de la misma especie en otros nidos (Lucas y Heeb, 2005), lo cual podría deberse a patrones de parentesco o a un entorno de nido en común.

Los cambios más drásticos en la microbiota intestinal ocurren en las primeras etapas de vida y van incrementando en diversidad y estabilidad a través del tiempo (Vargas, 2019). Se han reportado fuertes diferencias en las comunidades bacterianas en el tracto gastrointestinal de polluelos de gaviota tridáctila *Rissa tridactyla* en comparación a los adultos de la misma especie, ya que a edad temprana ocurre colonización por muchas especies de microorganismos transitorios que se van estabilizando en gradualmente hasta la edad adulta (van Dongen et al., 2013).

Los machos y las hembras difieren en su fisiología reproductiva y comportamiento, por esta razón, pueden manifestarse diferencias en su microbiota intestinal. Por ejemplo, en la codorniz del norte *Colinus virginianus* se observó que el género *Enterococcus* es más común en hembras, en tanto los géneros *Rothia* y *Streptococcus* son más comunes en machos. (Su et al., 2014).

Aún no está claro cómo es que funciona la microbiota intestinal en aves silvestres y todos aquellos factores extrínsecos e intrínsecos que pueden afectar, modificar o beneficiar la microbiota intestinal. Las aves son organismos muy interesantes que pueden darnos respuestas clave sobre la evolución y composición de la microbiota en distintos ecosistemas y lugares con impacto antropogénico y ecológico. Al poseer una morfología exquisita para poder volar y migrar grandes distancias, una fisiología para habitar lugares con condiciones extremas y una diversidad de especies colosal, nos pueden ayudar a conocer el aporte de las diferentes especies de la microbiota en diferentes condiciones para posteriormente poder utilizar estos conocimientos en la formulación de dietas con diferentes especies de microorganismos con fines de mejorar la nutrición y la salud animal, además muchas especies de la microbiota intestinal tienen potencial biotecnológico al producir metabolitos de interés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios y áreas de estudio

El estudio se llevó a cabo en tres áreas localizadas dentro de la región perteneciente al delta del Río Colorado en el Valle de Mexicali, Baja California, México. Denominados Miguel Alemán, La Herradura y Laguna Grande-CILA (Figura II.), los cuales son importantes sitios de restauración del corredor ribereño del delta del Colorado y forman parte de las 485 hectáreas destinadas a la restauración desde 2008 (Sonoran Institute, 2019), donde participan asociaciones civiles y organismos gubernamentales del estado de Baja California y Sonora, y otras instituciones de conservación en Estados Unidos de Norte América.

El Valle de Mexicali está localizado en el extremo noreste del estado de Baja California, México. El clima es desértico y es considerado como BWh según la clasificación Köppen-Geiger con temperatura media anual de 22.4 °C, con mínimas de 4 °C y máximas de 48 °C. En meses de verano se han registrado temperaturas máximas de 50 °C, con una precipitación media anual de 79 mm. El Valle de Mexicali tiene una superficie de aproximadamente 3 709 km² (Lira, 2005), siendo unos de los valles agrícolas más grandes de país. El río Colorado fluye a través del Valle de Mexicali hacia su desembocadura en el Golfo de California, con una longitud de 150 km en el lado mexicano. La avifauna del delta del Río Colorado es una de las más ricas y diversas de Norteamérica, con registros de 371 especies, y con la presencia de 300,000 aves acuáticas migratorias cada invierno (Hinojosa-Huerta et al, 2007).

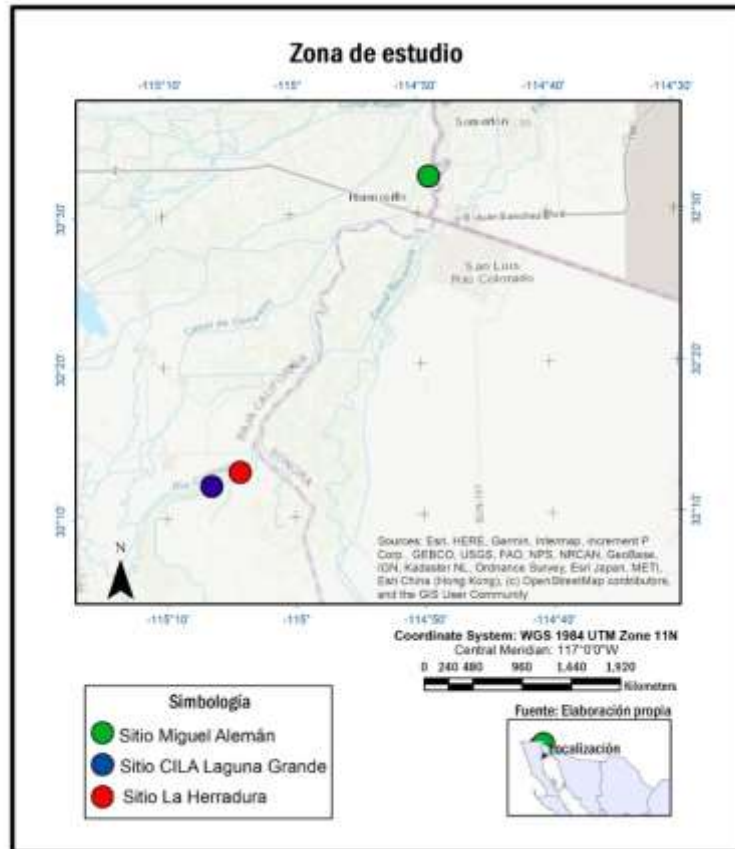


Figura II. Mapa de sitios de estudio. De norte a sur: Miguel Alemán (MA); La Herradura (RCLH) y Laguna Grande-CILA (CILA)

Fuente: Elaboración propia

Miguel Alemán

Miguel Alemán (MA) (32°32'26.36"N 114°49'5.71"O) es un sitio de restauración ubicado al norte del corredor ribereño del delta del Rio Colorado, muy cercano a la frontera internacional con el estado de Arizona, EUA. Tiene un área total de 200 hectáreas, las cuales fueron otorgadas a Pronatura Noroeste en el 2010 por el Gobierno Federal Mexicano. Presenta un área de 100 hectáreas restauradas con vegetación nativa compuesta de álamo (*Populus fremontii*), sauce (*Salix gooddingii*) y mezquite (*Prosopis pubescens*). Este sitio es un importante hábitat de aves riparias residentes y migratorias debido a que existen

actividades de anidación por la estrecha relación con la vegetación riparia nativa (Comisión Internacional de Límites y Aguas México y Estados Unidos, 2018).

La Herradura

La Herradura (RCLH) (32°13'2.63"N 115° 4'12.75"O) es uno de los sitios de interés para restauración dentro del área de los sitios de restauración de Laguna Grande, ubicado en la parte central del corredor ribereño del delta del Río Colorado. Es un área que presenta un impacto antropogénico y un gran cobertura vegetal de plantas no nativas arbustivas (*Tamarix spp*), algunas especies nativas como cachanilla (*Pluchea sericea*) y *Baccharis*, y pocos representantes arbóreos de álamos, sauces y mezquite. Es un importante sitio para el estudio de aves, ya que se ha reportado un aumento en la abundancia y diversidad de aves, después del evento llamado flujo pulso del 2014 para la inundación y restauración del delta del Río Colorado (Comisión Internacional de Límites y Aguas México y Estados Unidos, 2018).

Laguna Grande-CILA

Laguna Grande-CILA (CILA) es un sitio de restauración ubicado en la parte sur de Laguna Grande. Es un área con una extensión de 207 hectáreas, a cargo de la organización Sonoran Institute, y es una de las áreas con mayores avances en la restauración de plantas nativas del corredor ribereño. Considerado como un sitio con abundancia y diversidad de aves.

Muestreo

El muestreo se llevó a cabo durante el primer semestre de 2019 dividido en dos etapas. La primera etapa denominada como muestro invernal se realizó en los meses de febrero y marzo, mientras que la segunda etapa correspondiente al muestreo verano se realizó en los meses de mayo y junio. Se contó con el apoyo del grupo de monitoreo y anillador de aves de Pronatura Noroeste en

donde se acataron los lineamientos reguladores de captura descritos por la institución.

Tipo de muestreo

Se realizó un muestreo de tipo descriptivo por conveniencia.

Criterios de inclusión

Todas las aves capturadas durante el horario de muestreo de cada etapa.

Captura de aves

Para la captura de aves en los tres sitios de estudio, se utilizaron redes de niebla de 12 metros de largo por 2 metros de altura, distribuidas en 16 puntos específicos de cada sitio de estudio designados por el grupo de monitoreo y anillador de aves de Pronatura Noroeste. Las redes fueron colocadas durante periodos diurnos por 7 horas y se monitorearon cada media hora para evitar el estrés y daño al bienestar de las aves. Todas las aves capturadas se colocaron dentro de una bolsa de tela para minimizar su estrés y se transportaron al punto de reunión del sitio de estudio, donde se realizó el registro de datos y la colecta de la muestra para después ser liberadas.

Registro de datos

Primeramente, se realizó la identificación de la especie con el apoyo del personal experto de Pronatura Noroeste. Además, se tomaron datos del sitio de estudio, número de red, acumulo de grasa, tipo de muestra, gremio alimenticio, estacionalidad y observaciones.

Colecta de muestra

La colecta de las muestras fue cloacal y se realizó a cada individuo capturado, omitiendo a las aves con niveles altos de estrés por captura, o que

presentaran algunos signos que pusieran en riesgo su vida, o un tamaño muy pequeño que dificultara la colecta de muestra y pudiese herir al animal. Primeramente, se limpió el área externa de la cloaca con una solución de alcohol al 70% para evitar contaminación en la muestra. Las muestras cloacales se colectaron con el uso de hisopos de algodón estériles, y en aves pequeñas se emplearon palillos de madera estériles para facilitar su colecta y evitar daño al animal. Estos fueron conservados en tubos estériles tipo Falcon de 15 ml con 500 μ l de buffer fosfato salino (PBS) con pH 7.4 para su conservación (Origlia et al., 2018). Finalmente, todas las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su traslado al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

Análisis de Laboratorio

En principio, las muestras colectadas fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Posteriormente, se realizaron algunos análisis en las instalaciones del laboratorio clínico El Dorado. Ambos laboratorios ubicados en la ciudad de Mexicali, Baja California, México.

Cultivo microbiológico y aislamiento de cepas

Para determinar la presencia de bacterias de las muestras colectadas se utilizaron placas de Petri con medio nutritivo agar Luria-Bertani (LB) y un medio selectivo agar MacConkey. Las muestras fueron previamente homogenizadas en vortex y se tomaron 100 μ l de la muestra para su sembrado en placa utilizando la técnica de siembra de superficie con espátula de vidrio. Posteriormente, se incubaron a 37°C por un periodo de 48 horas, y una vez transcurrido el tiempo de incubación las colonias obtenidas se identificaron por medio de observación macroscópica por tamaño, consistencia, color y forma; si se observaron colonias distintas de cada muestra, estas fueron aisladas utilizando la técnica depósito y

posterior quemado para una mejor visualización de morfología colonial y obtener cepas completamente aisladas. Finalmente, se realizó observación microscópica de las bacterias aisladas utilizando la técnica de tinción de Gram para conocer su diferenciación estructural de la pared celular (Coico, 2005).

Extracción de ADN

Para iniciar el proceso de extracción de ADN de las cepas aisladas, se realizó una resiembra en tubos de 15 ml con 3 ml de medio de cultivo líquido LB y se incubaron a 37°C con agitación por un periodo de 24 hrs. Una vez teniendo turbidez y crecimiento en los tubos, se inició con la extracción de ADN donde se utilizó el Kit PureLink™ Genomic DNA (Life Technologies, Carlsbad CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el ADN extraído fue resuspendido en 100 µl de agua de grado molecular y se evaluó la calidad y cantidad del ADN extraído mediante la realización de electroforesis en un gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se amplificó el gen 16S rDNA mediante la técnica de PCR convencional para determinar la presencia de ADN bacteriano y posterior secuenciación. Los oligonucleótidos universales utilizados se muestran en el Cuadro II (Negoro et al., 2013).

Cuadro II. Oligonucleótidos universales utilizados para la amplificación del gen 16S rDNA

Oligonucleótidos	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)
<i>UNI 8F</i>	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	8-27
<i>UNI 53SR</i>	5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3'	517-535

El PCR se efectuó en un termociclador de la marca Thermo Hybaid™ (EU). La reacción consistió en 25 µl de master mix DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific, EU), 1 µl de cada oligonucleótido a una concentración de 5 pmol/µl, 5 µl de ADN bacteriano y 18 µl de agua grado molecular, con un volumen final de 50 µl. Las condiciones del PCR se muestran en el Cuadro III. Por último, se utilizaron 5 µl de cada producto de PCR para realizar electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio a 0.5 µg/ml. Para la visualización de los geles se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta UVP™ (EU).

Cuadro III. Condiciones de termociclador para la amplificación del gen 16 rDNA

Etapas	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	45 seg	35
Alineamiento	60°C	45 seg	
Extensión	72°C	45 seg	
Extensión final	72°C	3 min	1

Secuenciación de productos de PCR

Se dializaron los productos de PCR para quitar residuales que pudieran afectar la secuenciación. Se utilizaron filtros de membrana MF-Millipore™ con un tamaño de poro de 0.025µm sobre una cama de agua destilada. Los productos de PCR dializados, fueron secuenciados en ambas direcciones por el método de Sanger por la empresa Eurofin Genomics (E.U.) Los oligonucleótidos utilizados se describen en el Cuadro II.

Análisis de secuencias

Los archivos de secuencia se compararon con los cromatogramas y se empalmaron las dos cadenas secuenciadas de cada muestra minimizando posibles errores. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos genómicos Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) considerando los porcentajes de identidad superiores al 97% (Su et al., 2014).

Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva para determinar las frecuencias de los Filos de la composición de la comunidad de bacterias de la microbiota intestinal de las aves silvestres muestreadas de todos los sitios y similitud de la composición de la comunidad de bacterias por sitio de estudio y temporada, utilizando el cociente de número de especies de bacterias entre el número de animales muestreados. Se empleó el software EstimateS (Versión 9.1.0), Copyright R. K. Colwell: <http://purl.oclc.org/estimates> y PAST (Versión 4.03).

RESULTADOS

Colecta de muestras y aislamiento de cepas

Se realizó una captura total de 70 aves de 19 especies diferentes correspondientes a las dos etapas de muestreo de todos los sitios de estudio, teniendo un total de 70 muestras cloacales. Solamente se tuvo éxito de cultivo de microorganismos en 33 muestras de 15 especies de aves diferentes: 18 muestras de invierno y 15 de verano, obteniendo una eficiencia de muestreo baja con 35,3% en el muestreo de invierno y 15,4% en el de verano. Finalmente, se obtuvieron 85 aislados, de estos, 47 fueron de invierno, (25 de MA, 12 de RCLH y de 10 CILA), y 38 fueron de verano, (26 de MA, 3 de RCLH y 9 de CILA).

Detección del gen 16S rDNA y secuenciación

Los productos de PCR de los aislados presentaron fragmentos cercanos a 500 pb del gen 16S rDNA. En total, de los 85 aislados sometidos a secuenciación del gen 16S rDNA, se reveló 60 especies de bacterias distintas (Cuadro IV). 81 (95.29%) secuencias analizadas presentaron un porcentaje de identidad de 98% a 100% con las secuencias del gen 16S rDNA depositadas en GenBank. Solamente 4 (4.70%) secuencias analizadas presentaron un porcentaje de inferior a 97%.

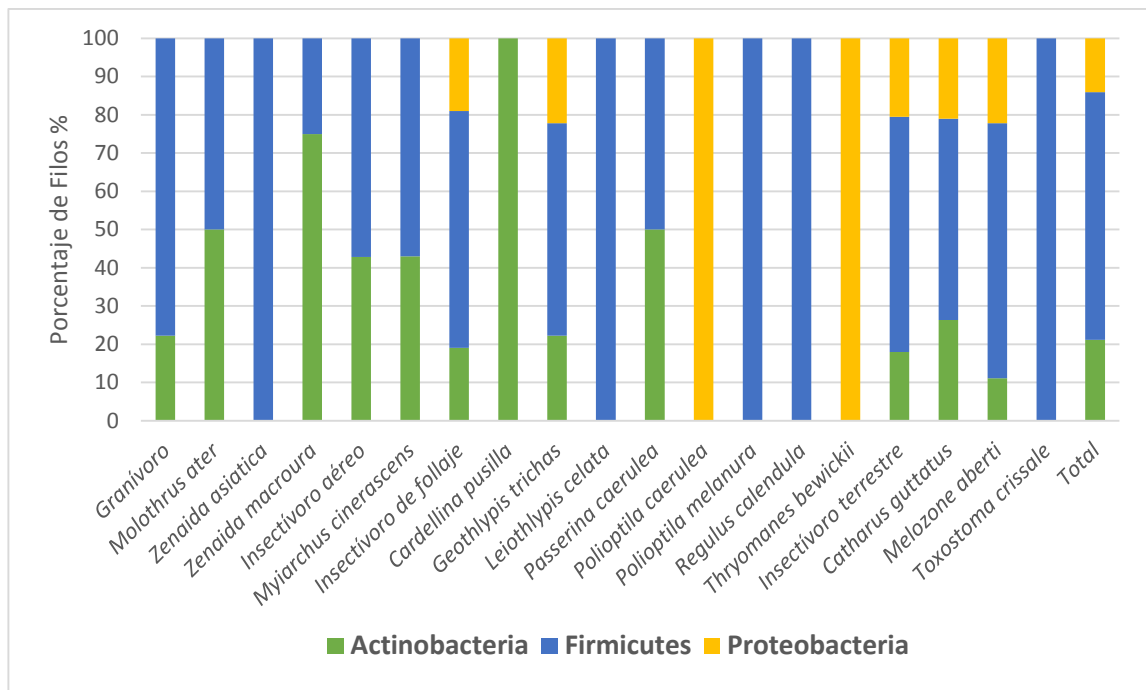
Cuadro IV. Diversidad de especies de bacterias en la microbiota intestinal de aves silvestres del delta de río Colorado

Especie bacteria	Filo	Especie bacteria	Filo
<i>Arthrobacter gandavensis</i>	Actinobacteria	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Firmicutes
<i>Arthrobacter luteolus</i>	Actinobacteria	<i>Cellulomonas hominis</i>	Actinobacteria
<i>Bacillus aryabhatai</i>	Firmicutes	<i>Cellulomonas pakistaneasis</i>	Actinobacteria
<i>Bacillus cereus</i>	Firmicutes	<i>Corynebacterium afermentans</i>	Actinobacteria
<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes	<i>Corynebacterium pelargi</i>	Actinobacteria
<i>Bacillus endophyticus</i>	Firmicutes	<i>Corynebacterium pseudopelargi</i>	Actinobacteria
<i>Bacillus filamentosus</i>	Firmicutes	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Actinobacteria
<i>Bacillus flexus</i>	Firmicutes	<i>Enterobacillus tribolii</i>	Proteobacteria
<i>Bacillus foraminis</i>	Firmicutes	<i>Enterobacter ludwigii</i>	Proteobacteria
<i>Bacillus galactosidilyticus</i>	Firmicutes	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Firmicutes
<i>Bacillus halotolerans</i>	Firmicutes	<i>Enterococcus faecalis</i>	Firmicutes
<i>Bacillus infantis</i>	Firmicutes	<i>Erwinia aphidicola</i>	Proteobacteria
<i>Bacillus licheniformis</i>	Firmicutes	<i>Gordonia terrae</i>	Actinobacteria
<i>Bacillus megaterium</i>	Firmicutes	<i>Isoptericola dokdonensis</i>	Actinobacteria
<i>Bacillus mojavensis</i>	Firmicutes	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Proteobacteria
<i>Bacillus muralis</i>	Firmicutes	<i>Kocuria sediminis</i>	Actinobacteria
<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes	<i>Kocuria turfanaensis</i>	Actinobacteria
<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes	<i>Lactococcus garavieae</i>	Firmicutes
<i>Bacillus niacini</i>	Firmicutes	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	Firmicutes
<i>Bacillus oceanisediminis</i>	Firmicutes	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	Firmicutes
<i>Bacillus paralicheniformis</i>	Firmicutes	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	Actinobacteria
<i>Bacillus pumilus</i>	Firmicutes	<i>Microbacterium paludicola</i>	Actinobacteria
<i>Bacillus safensis</i>	Firmicutes	<i>Microbacterium thalassium</i>	Actinobacteria
<i>Bacillus simplex</i>	Firmicutes	<i>Mixta intestinalis</i>	Proteobacteria
<i>Bacillus songklensis</i>	Firmicutes	<i>Pantoea stewartii</i>	Proteobacteria
<i>Bacillus subtilis</i>	Firmicutes	<i>Pseudomonas hunanensis</i>	Proteobacteria
<i>Bacillus thaonhiensis</i>	Firmicutes	<i>Pseudomonas putida</i>	Proteobacteria
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Firmicutes	<i>Rothia amarae</i>	Actinobacteria
<i>Bacillus zanthoxyli</i>	Firmicutes	<i>Serratia marcescens</i>	Proteobacteria
<i>Bacillus zhangzhovensis</i>	Firmicutes	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i>	Actinobacteria

Composición de especies de bacterias de la microbiota intestinal en aves silvestres del delta del rio Colorado

El total de los resultados obtenidos se clasificaron en 3 filos. Firmicutes (65%) el filo más extenso, seguido de Actinobacteria (21%) y Proteobacteria (14%). Los resultados clasificados por gremio alimenticio y forrajero, las especies de aves granívoras presentaron Firmicutes (78%) y Actinobacterias (22%), las especies de aves insectívoras aéreas Firmicutes (57%) y Actinobacterias (43%). En las aves insectívoras de follaje y terrestre fueron las únicas en presentar especies de bacterias del filo Proteobacteria. Las aves insectívoras presentaron Firmicutes (62%), Actinobacterias (19%) y Proteobacterias (19%), mientras que las aves insectívoras terrestres presentaron Firmicutes (62%), Actinobacterias (18%) y Proteobacterias (21%) (Fig.III).

Figura III. Porcentajes de Filos por gremio alimenticio y forrajero de las aves silvestres



Diversidad de especies de bacterias por especies de aves de cada temporada

En el cuadro V se muestra las especies con mayor número de aislados por cada temporada. La ave con más frecuencia en el muestreo de invierno fue *Catharus guttatus* con la obtención de 19 aislados, mientras que en el muestreo de verano fue *Melozone aberti* con la obtención de 18 aislados.

Cuadro V. Número de aislados por especies de ave de cada temporada con la estacionalidad del ave

Espece de ave	Estacionalidad del Ave	Muestras* Invierno	Muestras* Verano	Número Aislados
<i>Cardellina pusilla</i>	RI	1	-	1
<i>Catharus guttatus</i>	RI	5	-	19
<i>Geothlypis trichas</i>	RI	4	-	9
<i>Leiothlypis celata</i>	RI	1	-	3
<i>Polioptila caerulea</i>	RI	1	-	1
<i>Regulus calendula</i>	RI	1	-	2
<i>Melozone aberti</i>	RT	2	4	18
<i>Molothrus ater</i>	RT	-	2	2
<i>Myiarchus cinerascens</i>	RT	1	2	7
<i>Polioptila melanura</i>	RT	1	-	2
<i>Thryomanes bewickii</i>	RT	1	-	1
<i>Toxostoma crissale</i>	RT	-	2	2
<i>Zenaida macroura</i>	RT	-	1	4
<i>Passerina caerulea</i>	RV	-	2	2
<i>Zenaida asiatica</i>	RV	-	2	12
Totales		18	15	85

RI=residente de invierno; RV= residente de verano; RT= residente todo el año

*Cada muestra es de un individuo distinto

Cuadro VI. Especies de bacterias por especie de ave

Especie de ave	Invierno	Verano
<i>Cardellina pusilla</i>	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	-
<i>Catharus guttatus</i>	<i>Bacillus circulans</i>	-
	<i>Bacillus foraminis</i>	-
	<i>Bacillus licheniformis</i>	-
	<i>Bacillus mojavenis</i>	-
	<i>Bacillus nealsonii</i>	-
	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	-
	<i>Bacillus pumilus</i>	-
	<i>Bacillus safensis</i>	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	-
	<i>Bacillus zhangzhovens</i>	-
	<i>Gordonia terrae</i>	-
	<i>Isoptericola dokdonensis</i>	-
	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	-
	<i>Microbacterium thalassium</i>	-
	<i>Pseudomonas hunanensis</i>	-
	<i>Pseudomonas putida</i>	-
	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i>	-
<i>Geothlypis trichas</i>	<i>Bacillus muralis</i>	-
	<i>Bacillus niacini</i>	-
	<i>Bacillus simplex</i>	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-
	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	-
	<i>Kocuria sediminis</i>	-
	<i>Kocuria turfanensis</i>	-
	<i>Mixta intestinalis</i>	-
	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Leiothlypis celata</i>	<i>Bacillus aryabhatai</i>	-
	<i>Bacillus endophyticus</i>	-
	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	-
<i>Melospiza aberti</i>	<i>Bacillus endophyticus</i>	<i>Bacillus endophyticus</i>
	<i>Bacillus filamentosus</i>	<i>Bacillus filamentosus</i>
	<i>Bacillus mojavenis</i>	<i>Bacillus foraminis</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Cellulomonas hominis</i>
	<i>Enterobacter ludwigii</i>	<i>Cellulomonas pakistaneasis</i>
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Enterobacillus tribolii</i>
		<i>Enterococcus faecalis</i>
		<i>Klebsiella oxytoca</i>
		<i>Lactococcus garavieae</i>
<i>Molothrus ater</i>		<i>Bacillus endophyticus</i>

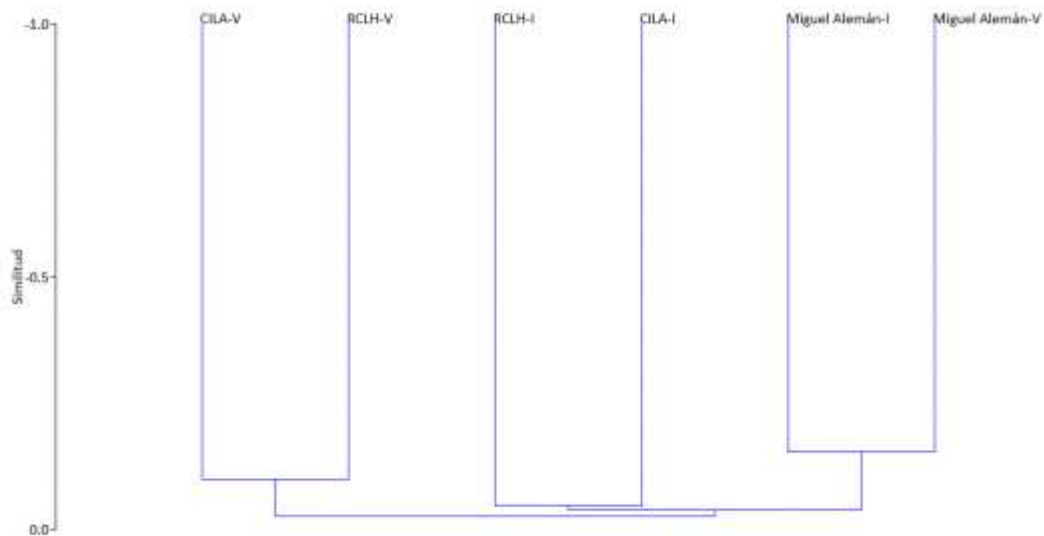
		<i>Microbacterium paludicola</i>
<i>Myiarchus cinerascens</i>	<i>Bacillus niacini</i>	<i>Arthrobacter gandavensis</i>
	<i>Bacillus songklensis</i>	<i>Arthrobacter luteolus</i>
	<i>Bacillus thaonhiensis</i>	<i>Bacillus galactosidilyticus</i>
		<i>Rothia amarae</i>
<i>Passerina caerulea</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>
		<i>Kocuria turfanensis</i>
<i>Polioptila caerulea</i>	<i>Erwinia aphidicola</i>	-
<i>Polioptila melanura</i>	<i>Bacillus flexus</i>	-
	<i>Bacillus megaterium</i>	
<i>Regulus calendula</i>	<i>Bacillus circulans</i>	-
	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	-
<i>Thryomanes bewickii</i>	<i>Pantoea stewartii</i>	
<i>Toxostoma crissale</i>		<i>Bacillus megaterium</i>
		<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Zenaida asiatica</i>		<i>Bacillus cereus</i>
		<i>Bacillus endophyticus</i>
		<i>Bacillus halotolerans</i>
		<i>Bacillus licheniformis</i>
		<i>Bacillus mojavensis</i>
		<i>Bacillus niabensis</i>
		<i>Bacillus simplex</i>
		<i>Bacillus subtilis</i>
		<i>Bacillus thuringiensis</i>
		<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>
		<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	
<i>Zenaida macroura</i>		<i>Bacillus infantis</i>
		<i>Corynebacterium afermentans</i>
		<i>Corynebacterium pelargi</i>
		<i>Corynebacterium pseudopelargi</i>

En el cuadro VI se muestra las especies de bacterias por especie de ave, donde se obtuvieron 60 especies de bacterias distintas. *C. guttatus* presentó una mayor diversidad de especies de bacterias en el muestreo de invierno con 17 (28%) especies, mientras que en el muestreo de verano, *Zenaida asiatica* presentó 12 (20%) de especies bacterianas.

Similitud de la composición de las comunidades de bacterias por sitio de estudio y temporada

Se calculó la diversidad beta (β) para comparar la comunidad de bacterias entre temporadas la cual presentó un índice de similitud de Jaccard de 0.167. Resultando una diversidad beta (β) muy baja, contando con 10 especies de bacterias compartidas. La similitud entre sitios de estudio por temporada, se observa en el dendrograma (Fig. IV) la mayor similitud en el conjunto del sitio de estudio de MA de ambas temporadas compartiendo 6 (10%) especies de bacterias, mientras que los sitios de estudio RCLH y CILA en temporada de invierno compartieron una similitud de 1 especie (1,6%) y 5 especies (8,3%) entre ambos conjuntos con MA. La similitud más baja entre todos los conjuntos se registró en los sitios de estudio de CILA y RCLH de la temporada de verano, compartiendo 3 especies (5%), y solo 1 especie (1,6%) entre ambos sitios estudio.

Figura IV. Dendrograma del Índice de Similitud de Jaccard entre los sitios de estudio por temporada



DISCUSIÓN

Comprender a su totalidad la función e importancia de los microorganismos en los animales silvestres es relevante para los investigadores, ya sea patogénicamente, simbióticamente o comensalmente. En aves silvestres la información es relativamente pobre, la mayoría de los estudios realizados en aves silvestres se han centrado en patógenos, en particular de importancia zoonótica o económica (Stephens et al., 2016). Para comprender mejor a las aves y sus características únicas, necesitamos incorporar el estudio de la microbiota. Conocer la microbiota silvestre puede ayudar a prevenir la extinción de especies, información para su crianza y conservación, y sus microorganismos endémicos (Evans et al., 2017). Estos datos deben ser una prioridad para los futuros estudios de campo.

El presente estudio proporciona los primeros hallazgos de la microbiota intestinal de las aves silvestres del delta del río Colorado, utilizando métodos de cultivo microbiológicos, extracción, purificación de ácidos nucleicos y la secuenciación del gen 16S rDNA, de manera que se lograron identificar 60 especies bacterianas, correspondientes a 85 aislados de 33 muestras cloacales de las temporadas de invierno y verano. Los estudios en aves han utilizado varios métodos diferentes para colectar muestras de la microbiota intestinal de los hospederos, sin tener claro cuál es la mejor metodología (Knutie y Gotanda, 2018). Un aspecto importante en el diseño experimental de un proyecto de investigación de microbiota intestinal, es saber si el animal debe ser sacrificado o no para poder conseguir una muestra confiable. En este estudio se colectaron muestras cloacales para respetar la integridad del animal y por acuerdos gestionados con el equipo anillador de Pronatura Noroeste para la realización de la colecta. Las muestras de heces e hisopados cloacales son dos métodos de muestreo comunes no letales más elegidos para el estudio de las comunidades microbianas de las aves (Berlow et al., 2020). Sin embargo, estas muestras

pueden no capturar con precisión el perfil de la microbiota intestinal, aunque existe un gran número de estudios de investigación de bacterias en reptiles y aves que han muestreado la cloaca (Vela et al., 2015; van Veelen et al., 2017; Videvall et al., 2017). En el muestreo de esta investigación hubo algunas limitaciones en la toma de muestra por la captura de pequeñas aves lo que dificultaba tomar una muestra viable de la cloaca, por lo tanto, consideramos como la principal causa de no tener éxito de crecimiento bacteriano en algunas muestras colectadas. La colecta de heces podría haber sido una alternativa para las pequeñas aves, aunque podría haber sido complicado obtener datos moleculares fiables debido a la composición química de sus heces, ya que los productos urinarios como el ácido úrico pueden degradar el ADN o interferir en su extracción (Regnaut et al., 2006; Ericksson et al. 2017). Además, se han reportado rendimientos bajos en el ADN de las heces, con dificultad en la amplificación y problemas de contaminación (Hájková et al., 2006). Un aspecto clave es que el muestreo cloacal se usa ampliamente por su practicidad y nos permite realizar el muestreo de manera repetitiva, ofreciéndonos la posibilidad de obtener muestras fiables, así mismo es una opción para la protección y conservación de las aves silvestres. Sin embargo, no sabemos si la microbiota de la cloaca proporciona un reflejo preciso de la microbiota intestinal, aunque existen razones para creer que la comunidad bacteriana de cloaca no es simplemente el arrastre de las bacterias en las heces, sino también por las bacterias compartidas en la reproducción y ser el final del tracto digestivo, probablemente constituye un ambiente aerobio en comparación al lumen del tracto digestivo (Videvall et al., 2017). Por último, cabe señalar que el hecho de depender del cultivo microbiológico hace menos posible el análisis en la profundidad de la diversidad de las especies de bacterias, y probablemente no se logró determinar muchas especies de bacterias que no se pueden cultivar en el laboratorio. No obstante, se obtuvieron una colección diversa de cultivos vivos lo cual hizo posible una caracterización fenotípica de los microorganismos. A pesar de que el análisis de las comunidades microbianas basado en técnicas de cultivo detecta sola una pequeña fracción de la comunidad microbiana, presenta

la ventaja de tener aislados puros que se pueden utilizar para estudios posteriores en epidemiología o fisiología (Vela et al., 2015).

En los 85 aislados obtenidos en el presente estudio, se presentaron 60 especies de bacterias pertenecientes en mayor abundancia al filo Firmicutes con un 65 %, seguido de Actinobacteria 21 % y Proteobacteria 14%. Varios estudios de microbiota intestinal en aves silvestres reportan Firmicutes como el filo más abundante (Xenoulis et al., 2010; Sue et al., 2014; Bodawatta et al., 2020). La mayoría de las especies de aves muestreadas en este estudio pertenecen al orden Passeriformes, solamente dos especies de aves *Zenaida macroura* y *Zenaida asiatica* son representantes del orden Columbiformes. Las aves paserinas son uno de los grupos taxonómicos más estudiados. Oliveros et al. (2019), en un estudio de la composición y función de la microbiota en heces de aves passeriformes y psitaciformes encontraron que la mayoría de la microbiota estaba compuesta por cinco filos, siendo Firmicutes el de mayor porcentaje mientras Proteobacteria, Actinobacteria, Tenericutes y Bacteroidetes se encontraron en proporción (Garcia et al., 2021). En aves columbiformes se reportó una alta proporción en Actinobacteria en un estudio comparativo de la microbiota de la molleja y los intestinos en aves silvestres neotropicales (Garcia et al., 2018). En este estudio fue visible que *Z. macroura* presenta en su mayoría especies de bacterias perteneciente al filo de Actinobacteria, lo que concuerda con el mencionado estudio. Al comparar la abundancia relativa de Firmicutes entre humanos y aves de producción, se ha observado que es muy similar, siendo de alrededor de un 50% aproximadamente, mientras que en aves domésticas y silvestres se presenta una abundancia relativa alta del filo Proteobacteria de un 25% en contraste con el 1% en un humanos (Grond et al., 2018).

La dieta es un factor intrínseco de ingestión de microorganismos asociados con las fuentes de alimentos disponibles en el medio ambiente (Grond

et al., 2018). Las aves presentan diferentes grupos de alimentación, tales como las especies que se alimentan de néctar, hojas, carroña, insectos, entre otras. Existen pocos estudios en aves silvestres donde investiguen la relación de la dieta con la microbiota intestinal. En un reciente estudio sobre la variación del microbioma fecal y la dieta en 41 especies de aves no paserinas de un zoológico en Guangzhou, China, reportaron que las aves con dieta a base de granos y semillas presentan una abundancia relativa alta en especies de bacterias del filo Firmicutes, mientras que especies de aves carroñeras, fructívoras y piscívoras, presentan un aumento en especies de bacterias pertenecientes del filo Proteobacteria y Actinobacteria (Xiao et al., 2021). En cuanto aves que se alimentan de insectos, un estudio realizado con aves carboneras *Pajus major* capturadas de poblaciones silvestres, fueron sometidas a un experimento de dos tratamientos de dieta para calcular la abundancia relativa de su microbiota intestinal, donde los resultados mostraron que las aves tratadas con una dieta a base de insectos presentaron una abundancia relativa alta en especies microbianas del filo Proteobacteria en comparación con el grupo de aves que fueron tratadas con una dieta de semillas donde presentaron un ligero aumento en el filo Proteobacteria (Davidson et al., 2020). En las aves muestreadas de este presente estudio las especies de aves granívoras presentaron un 78% de especies microbianas del filo Firmicutes y 22% de Actinobacterias, a diferencia de las especies de aves insectívoras que fueron las que presentaron solamente especies microbianas del filo Proteobacteria. Por lo tanto, podemos asumir que la diversidad de bacterias aisladas de las aves muestreadas está relacionada con la dieta del ave y a los recursos alimenticios disponibles del medio ambiente.

En este estudio detectamos diversas especies del genero *Bacillus*, que posiblemente esté asociado a que el ave tenga contacto con el suelo, tal como se reporta con la codorniz de Virginia (*Colinus virginianus*) en un estudio de la microbiota intestinal de bacterias cultivables donde obtuvieron especies como *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. nealsonii*, *B. pumilus*, *B. simplex* y *B. subtilis* (Su et al.,

2014) las cuales fueron también identificadas en el presente estudio. Algo similar se observó en un estudio de la diversidad de microorganismos cultivables en las plumas de aves silvestres (Shawkey et al., 2005). Un aspecto importante de la microbiota intestinal de las aves silvestres es que puede ser una fuente de una serie de enfermedades en humanos y animales a través de la transmisión directa o actuar como vectores de patógenos zoonóticos (Tsiodras et al., 2008). El filo Proteobacteria incluye una diversidad de géneros de patógenos oportunistas tales como, *Campylobacter*, *Escherichia*, *Heliobacter*, *Rickettsia*, *Salmonella* y *Vibrio*, todos ellos aislados de aves (Grond et al., 2018), en tanto, varios patógenos han sido aislados de aves silvestre del filo Firmicutes como *Mycoplasma galliseptium*, *Clostridium botulinum* y *C. perfringens* (Benskin et al., 2009). En este estudio hubo una baja proporción de bacterias patógenas, posiblemente asociada a la limitación de la técnica de cultivo de microorganismos. Sin embargo, se pudieron aislar algunas especies patógenas oportunistas, tales como *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Lactococcus garvieae*, *Gordonia terrae*, *Enterococcus faecalis* y *E. casseliflavus*, de manera similar a lo observado en algunos estudios realizados en la microbiota cloacal, faringe, heces y tracto digestivo de aves silvestres (Stenkat et al., 2014; Su et al., 2014; Kropáčková et al., 2017; Musitelli et al., 2017; Bodawatta et al., 2018).

El medio ambiente ocasiona variaciones temporales de las comunidades microbianas ambientales debido a los factores abióticos y bióticos que se presenten (Grond, et al., 2018). La microbiota de los animales silvestres puede estar influenciada por la exposición de microorganismos a través de la variación del hábitat y la dieta (Furst et al., 2018). Sin embargo, la información es casi nula en cuanto a la comparación de bacterias de la microbiota intestinal de aves silvestres en diferentes sitios, aunque existen algunos estudios donde investigan los efectos de la urbanización y el impacto ambiental del hábitat en la microbiota intestinal de aves paserinas y anseriformes (Furst et al., 2018; Teyssier et al., 2018; Wu et al., 2018). Se compararon las especies bacterianas aisladas en las

dos temporadas de muestreo, observándose que en el sitio MA se presentó una mayor similitud de especies entre invierno y verano todas ellas pertenecientes al filo Firmicutes. En los sitios de estudio CILA y RCLH se presentó una menor similitud de especies entre invierno y verano (Figura IV) lo cual puede deberse porque se obtuvo un menor número de muestras. Es posible que las comunidades de bacterias compartidas estén correlacionadas al medio ambiente o a las fuentes de alimento disponibles del sitio, por ejemplo, el rascador del desierto (*Melozone aberti*) que es una especie residente insectívora, que fue capturada en ambas temporadas del mismo sitio presentó en su microbiota intestinal *Bacillus endophyticus* y *B. filamentosus*, mientras que la paloma alas blancas (*Zenaida asiatica*) un ave migratoria granívora veraniega tuvo presencia de *B. endophyticus* en el muestreo de verano. Por otra parte, el zorzal ermitaño (*Catharus guttatus*) un ave migratoria insectívora invernal presentó *Bacillus licheniformis* al igual que la paloma alas blancas (*Z. asiatica*), siendo ambas aves migratorias, por lo tanto, la similitud podría asociarse su comportamiento migratorio.

CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación reportó la primera evidencia de la microbiota intestinal de bacterias aisladas en aves silvestres de la región delta del Río Colorado en el Valle de Mexicali, Baja California, México. La composición de la diversidad de bacterias de los 85 aislados analizados presentó un mayor porcentaje de bacterias del filo Firmicutes, y en menor porcentaje Actinobacteria y Proteobacteria.

La composición de la diversidad de la microbiota intestinal está influenciada por los factores extrínsecos e intrínsecos a que están sometidos los individuos, sin embargo, es necesario llevar a cabo futuros estudios sobre análisis de la microbiota de las heces, sitios de anidación, plumaje, cuerpos de agua y recursos alimenticios disponibles para observar la correlación con la microbiota intestinal en las aves.

Este tipo de estudios puede ser de interés para salud pública y veterinaria ya que algunas de especies de bacterias aisladas son patógenas oportunistas, siendo las aves silvestres sus portadoras y dispersoras.

Finalmente, se sugiere continuar con más estudios de la microbiota intestinal en aves silvestres de esta importante región, por ejemplo, con la utilización de análisis metagenómico y otros medios cultivos para identificar un mayor número de especies bacterianas que nos ayuden a comprender las relaciones existentes con el hospedero, su estado sanitario, y la obtención de bacterias con potencial biotecnológico en la industria alimentaria, farmacéutica, agrícola y veterinaria.

LITERATURA CITADA

- Benskin, C. M., Wilson, K., Jones, K., y Hartley, I. R. 2009. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 84(3), 349–373. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00076.x>
- Berlow, Mae., Kohl, Kevin y Derryberry, Elizabeth. 2019. Evaluation of non-lethal gut microbiome sampling methods in a passerine bird. *Ibis*. 162. 10.1111/ibi.12807.
- Bodawatta, K. H., Puzejova, K., Sam, K., Poulsen, M., y Jønsson, K. A. 2020. Cloacal swabs and alcohol bird specimens are good proxies for compositional analyses of gut microbial communities of Great tits (*Parus major*). *Animal microbiome*, 2(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s42523-020-00026-8>
- Bodawatta, K. H., Sam, K., Jønsson, K. A., y Poulsen, M. 2018. Comparative Analyses of the Digestive Tract Microbiota of New Guinean Passerine Birds. *Frontiers in microbiology*, 9, 1830. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01830>
- Chung, D. M., Ferree, E., Simon, D. M., y Yeh, P. J. 2018. Patterns of Bird-Bacteria Associations. *EcoHealth*, 15(3), 627–641. <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1342-5>
- Cockerham, S., Lee, B., Orben, R. A., Suryan, R. M., Torres, L. G., Warzybok, P., Bradley, R., Jahncke, J., Young, H. S., Ouverney, C., y Shaffer, S. A. 2019. Microbial Ecology of the Western Gull (*Larus occidentalis*). *Microbial ecology*, 78(3), 665–676. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01352-4>
- Coico, Richard. 2005. Gram Staining. *Current protocols in microbiology*. Appendix 3. Appendix 3C. 10.1002/9780471729259.mca03cs00.

- Comisión internacional de límites y aguas México y Estados Unidos. 2018. Informe Final del Acta 319 sobre el Monitoreo de Flujos Ambientales en el Tramo Limítrofe y Delta del Río Colorado. <http://www.cila.gob.mx/rc/M319MRF.pdf>
- Costello, E. K., Gordon, J. I., Secor, S. M., y Knight, R. 2010. Postprandial remodeling of the gut microbiota in Burmese pythons. *The ISME journal*, 4(11), 1375–1385. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.71>
- Craven, S. E., Stern, N. J., Line, E., Bailey, J. S., Cox, N. A., y Fedorka-Cray, P. 2000. Determination of the incidence of *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens* in wild birds near broiler chicken houses by sampling intestinal droppings. *Avian diseases*, 44(3), 715–720.
- Davidson, G. L., Wiley, N., Cooke, A. C., Johnson, C. N., Fouhy, F., Reichert, M. S., de la Hera, I., Crane, J., Kulahci, I. G., Ross, R. P., Stanton, C., y Quinn, J. L. 2020. Diet induces parallel changes to the gut microbiota and problem solving performance in a wild bird. *Scientific reports*, 10(1), 20783. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77256-y>
- Dehority BA. 1997. Foregut fermentation. In: Mackie RI, White BA (eds) *Gastrointestinal microbiology*. Chapman and Hall, New York.
- Drovetski, S. V., O'Mahoney, M., Matterson, K. O., Schmidt, B. K., y Graves, G. R. 2019. Distinct microbiotas of anatomical gut regions display idiosyncratic seasonal variation in an avian folivore. *Animal microbiome*, 1(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s42523-019-0002-6>
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., y Relman, D. A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1635–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>
- Eriksson, P., Mourkas, E., González-Acuna, D., Olsen, B., y Ellström, P. 2017. Evaluation and optimization of microbial DNA extraction from fecal

- samples of wild Antarctic bird species. *Infection ecology & epidemiology*, 7(1), 1386536. <https://doi.org/10.1080/20008686.2017.1386536>
- Evans, J. K., Buchanan, K. L., Griffith, S. C., Klasing, K. C., y Addison, B. 2017. Ecoimmunology and microbial ecology: Contributions to avian behavior, physiology, and life history. *Hormones and behavior*, 88, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.12.003>
- Fox, G. E., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T. A., Wolfe, R. S., Balch, W. E., Tanner, R. S., Magrum, L. J., Zablen, L. B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B. J., Stahl, D. A., Luehrsen, K. R., Chen, K. N., y Woese, C. R. 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 209(4455), 457–463. <https://doi.org/10.1126/science.6771870>
- Fuirst, M., Veit, R. R., Hahn, M., Dheilly, N., y Thorne, L. H. 2018. Effects of urbanization on the foraging ecology and microbiota of the generalist seabird *Larus argentatus*. *PLoS One*, 13(12), e0209200.
- García-Amado, M. A., Michelangeli, F., Gueneau, P., Pérez, M. E., Domínguez-Bello, M. G. 2007. Bacterial detoxification of saponins in the crop of the avian foregut fermenter *Opisthocomus hoazin*. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 16(Suppl. 2), 82-85. <https://doi.org/10.22358/jafs/74460/2007>
- García-Amado, M. A., Shin, H., Sanz, V., Lentino, M., Martínez, L. M., Contreras, M., Michelangeli, F., y Domínguez-Bello, M. G. 2018. Comparison of gizzard and intestinal microbiota of wild neotropical birds. *PloS one*, 13(3), e0194857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194857>
- Garcia-Mazcorro, J. F., Castillo-Carranza, S. A., Guard, B., Gomez-Vazquez, J. P., Dowd, S. E., y Brighthsmith, D. J. 2017. Comprehensive Molecular Characterization of Bacterial Communities in Feces of Pet Birds Using 16S Marker Sequencing. *Microbial ecology*, 73(1), 224–235. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0840-7>

- Garcia-Mazcorro, J., Alanis-Lopez, C., Marroquin, A., y Kawas, J. 2021. Composition and Potential Function of Fecal Bacterial Microbiota from Six Bird Species. *Birds*. 2. 42-59. 10.3390/birds2010003.
- Gaukler, S. M., Linz, G. M., Sherwood, J. S., Dyer, N. W., Bleier, W. J., Wannemuehler, Y. M., Nolan, L. K., y Logue, C. M. 2009. *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in wild European starlings at a Kansas cattle feedlot. *Avian diseases*, 53(4), 544–551. <https://doi.org/10.1637/8920-050809-Reg.1>
- Gill F, D. Donsker y P. Rasmussen (Eds). 2015. IOC World Bird List (v11.1). doi : 10.14344/IOC.ML.11.1.
- Godoy-Vitorino, F., Ley, R. E., Gao, Z., Pei, Z., Ortiz-Zuazaga, H., Pericchi, L. R., Garcia-Amado, M. A., Michelangeli, F., Blaser, M. J., Gordon, J. I., y Domínguez-Bello, M. G. 2008. Bacterial community in the crop of the hoatzin, a neotropical folivorous flying bird. *Applied and environmental microbiology*, 74(19), 5905–5912. <https://doi.org/10.1128/AEM.00574-08>
- Grond, K., Lanctot, R. B., Jumpponen, A., y Sandercock, B. K. 2017. Recruitment and establishment of the gut microbiome in arctic shorebirds. *FEMS microbiology ecology*, 93(12), fix142.
- Grond, Kirsten & Sandercock, Brett & Jumpponen, Ari y Zeglin, Lydia. 2018. The Avian Gut Microbiota: Community, Physiology and Function in Wild Birds. *Journal of Avian Biology*. 49. 10.1111/jav.01788.
- Hajkova, P., Zemanová, B., Bryja, J., Hajek, B., Roche, K., Tkadlec, E. y Zima, J. 2006. Factors affecting success of PCR amplification of microsatellite loci from otter faeces. *Molecular Ecology Notes - Mol ecol notes*. 6. 559-562. 10.1111/j.1471-8286.2006.01269.x.
- Hinojosa-Huerta, O., García-Hernández, J., Carrillo-Guerrero, Y. y Zamora, E. 2007. Hovering over the Alto Golfo: status and conservation of birds from the Rio Colorado to the Gran Desierto. *Dry Borders: Great Natural*

Reserves of the Sonoran Desert. University of Utah Press. Capítulo 27(pp.383-407) Chapter: 27

- Hird, S.M., 2017. Evolutionary biology needs wild microbiomes. *Front. Microbiol.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00725>.
- Hou, X., Pan, S., Lin, Z., Xu, J., y Zhan, X. 2021. Performance comparison of different microbial DNA extraction methods on bird feces. *Avian Research*, 12(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s40657-021-00254-9>
- Knutie, S. A., y Gotanda, K. M. 2018. A Non-invasive Method to Collect Fecal Samples from Wild Birds for Microbiome Studies. *Microbial ecology*, 76(4), 851–855. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1182-4>
- Kohl K. D. 2012. Diversity and function of the avian gut microbiota. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 182(5), 591–602. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0645-z>
- Kreisinger, J., Čížková, D., Kropáčková, L., y Albrecht, T. 2015. Cloacal Microbiome Structure in a Long-Distance Migratory Bird Assessed Using Deep 16sRNA Pyrosequencing. *PloS one*, 10(9), e0137401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137401>
- Kropáčková, L., Pechmanová, H., Vinkler, M., Svobodová, J., Velová, H., Těšický, M., Martin, J. F., y Kreisinger, J. 2017. Variation between the oral and faecal microbiota in a free-living passerine bird, the great tit (*Parus major*). *PloS one*, 12(6), e0179945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179945>
- Lewis, W., Moore, F. y Wang, S. 2016. Characterization of the gut microbiota of migratory passerines during stopover along the northern coast of the Gulf of Mexico. *Journal of Avian Biology*. 47. n/a-n/a. 10.1111/jav.00954.
- Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R., y Gordon, J. I. 2008. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature reviews. Microbiology*, 6(10), 776–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1978>

- Lira, H. 2005. Actualización del modelo geológico conceptual del yacimiento geotérmico de Cerro Prieto, BC. *Geotermia. Revista Mexicana de Geoenergía*, vol. 18, núm. 1, CFE/Asociación Geotérmica Mexicana, México. pp. 37-46.
- Lucas, F. y Heeb, P. 2005. Environmental factors shape cloacal bacterial assemblages in great tit *Parus major* and blue tit *P-caeruleus* nestlings. *Journal of Avian Biology*. 36. 510-516. 10.1111/j.2005.0908-8857.03479.x.
- Madej, J. P., Chrząstek, K., Piasecki, T., y Wieliczko, A. 2013. New insight into the structure, development, functions and popular disorders of bursa Fabricii. *Anatomia, histologia, embryologia*, 42(5), 321–331. <https://doi.org/10.1111/ahe.12026>
- Maraci, Ö., Corsini, M., Antonatou-Papaioannou, A., Jünemann, S., Sudyka, J., Di Lecce, I. y Szulkin, M. 2021. Alterations to the Gut Microbiota of a Wild Juvenile Passerine in an Urban Mosaic. *bioRxiv*.
- Marchesi, J. y Ravel, J. 2015. The vocabulary of microbiome research: A proposal. *Microbiome*. 3. 10.1186/s40168-015-0094-5.
- Matsui, H., Kato, Y., Chikaraishi, T., Moritani, M., Ban-Tokuda, T., & Wakita, M. (2010). Microbial diversity in ostrich ceca as revealed by 16S ribosomal RNA gene clone library and detection of novel *Fibrobacter* species. *Anaerobe*, 16(2), 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.07.005>
- Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O., y Kasper, D. L. 2005. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122(1), 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.007>
- Musitelli, F., Ambrosini, R., Rubolini, D., Saino, N., Franzetti, A. y Gandolfi, I. 2017. Cloacal microbiota of barn swallows from Northern Italy. *Ethology Ecology & Evolution*. 30. 1-11. 10.1080/03949370.2017.1388294.

- Navarro-Sigüenza, A. G., Rebón-Gallardo, Ma. F., Gordillo-Martínez, A., Townsend Peterson, A., Berlanga-García, H. y Sánchez-González, L. A. 2014. Biodiversidad de aves en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85(Supl. ene), S476-S495. <https://doi.org/10.7550/rmb.41882>
- Negoro, E., Iwasaki, H., Tai, K., Ikegaya, S., Takagi, K., Kishi, S. y Ueda, T. 2013. Utility of PCR amplification and DNA microarray hybridization of 16S rDNA for rapid diagnosis of bacteremia associated with hematological diseases. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(4), e271-e276.
- Oliveira, B. C., Murray, M., Tseng, F., y Widmer, G. 2020. The fecal microbiota of wild and captive raptors. *Animal Microbiome*, 2, 1-9.
- Oliveros, C. H., Field, D. J., Ksepka, D. T., Barker, F. K., Aleixo, A., Andersen, M., Alström, P., Benz, B. W., Braun, E. L., Braun, M. J., Bravo, G. A., Brumfield, R. T., Chesser, R. T., Claramunt, S., Cracraft, J., Cuervo, A. M., Derryberry, E. P., Glenn, T. C., Harvey, M. G., Hosner, P. A. y Faircloth, B. C. 2019. Earth history and the passerine superradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(16), 7916–7925. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813206116>
- Origlia, J. A., Cadario, M. E., Frutos, M. C., Lopez, N. F., Corva, S., Unzaga, M. F., Piscopo, M. V., Cuffini, C., y Petruccelli, M. A. 2019. Detection and molecular characterization of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia abortus* in psittacine pet birds in Buenos Aires province, Argentina. *Revista Argentina de microbiología*, 51(2), 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.04.003>
- Pearce, D., Hoover, B., Jennings, S., Nevitt, G. y Docherty, K. 2017. Morphological and genetic factors shape the microbiome of a seabird species (*Oceanodroma leucorhoa*) more than environmental and social factors. *Microbiome*. 5. 10.1186/s40168-017-0365-4.

- Preest, M., Donna G. Folk, y Beuchat, C. 2003. Decomposition of Nitrogenous Compounds by Intestinal Bacteria in Hummingbirds. *The Auk*, 120(4), 1091-1101. doi:10.2307/4090280
- Ratcliffe M. J. 2006. Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Developmental and comparative immunology*, 30(1-2), 101–118. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.06.018>
- Regnaut, S., Lucas, F. y Fumagalli, L. 2006. DNA degradation in avian faecal samples and feasibility of non-invasive studies of threatened Capercaillie populations. *Conservation Genetics*. 7. 449-453. 10.1007/s10592-005-9023-7.
- Ren, Tiantian. 2016. Ecological forces shaping gut microbiota in wild animal populations. Ph.D. Thesis. University of Virginia.10.18130/V3X30Q.
- Ryu, H., Grond, K., Verheijen, B., Elk, M., Buehler, D. M., y Santo Domingo, J. W. 2014. Intestinal microbiota and species diversity of *Campylobacter* and *Helicobacter* spp. in migrating shorebirds in Delaware Bay. *Applied and environmental microbiology*, 80(6), 1838–1847. <https://doi.org/10.1128/AEM.03793-13>
- Shawkey, M. D., Mills, K. L., Dale, C., y Hill, G. E. 2005. Microbial diversity of wild bird feathers revealed through culture-based and culture-independent techniques. *Microbial ecology*, 50(1), 40–47. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0089-4>
- Sonoran Institute. 2019. El Flujo de fuerza, informe anual 2019. <https://www.sonoraninstitutemexico.org/resource/informe-anual-2019/>
- Stenkat, J., Krautwald-Junghanns, M. E., Schmitz Ornés, A., Eilers, A., y Schmidt, V. 2014. Aerobic cloacal and pharyngeal bacterial flora in six species of free-living birds. *Journal of applied microbiology*, 117(6), 1564–1571. <https://doi.org/10.1111/jam.12636>

- Stephens, P. R., Altizer, S., Smith, K. F., Alonso Aguirre, A., Brown, J. H., Budischak, S. A., Byers, J. E., Dallas, T. A., Jonathan Davies, T., Drake, J. M., Ezenwa, V. O., Farrell, M. J., Gittleman, J. L., Han, B. A., Huang, S., Hutchinson, R. A., Johnson, P., Nunn, C. L., Onstad, D., Park, A. y Poulin, R. 2016. The macroecology of infectious diseases: a new perspective on global-scale drivers of pathogen distributions and impacts. *Ecology letters*, 19(9), 1159–1171. <https://doi.org/10.1111/ele.12644>
- Su, H., McKelvey, J., Rollins, D., Zhang, M., Brightsmith, D. J., Derr, J., y Zhang, S. 2014. Cultivable bacterial microbiota of northern bobwhite (*Colinus virginianus*): a new reservoir of antimicrobial resistance?. *PloS one*, 9(6), e99826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099826>
- Teyssier, A., Rouffaer, L. O., Saleh Hudin, N., Strubbe, D., Matthysen, E., Lens, L., y White, J. 2018. Inside the guts of the city: Urban-induced alterations of the gut microbiota in a wild passerine. *The Science of the total environment*, 612, 1276–1286. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.035>
- Thomas, F., Hehemann, J. H., Rebuffet, E., Czjzek, M., y Michel, G. 2011. Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. *Frontiers in microbiology*, 2, 93. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00093>
- Tsiodras, S., Kelesidis, T., Kelesidis, I., Bauchinger, U., y Falagas, M. E. 2008. Human infections associated with wild birds. *The Journal of infection*, 56(2), 83–98. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2007.11.001>
- van Dongen, W. F., White, J., Brandl, H. B., Moodley, Y., Merklings, T., Leclaire, S., Blanchard, P., Danchin, E., Hatch, S. A., y Wagner, R. H. 2013. Age-related differences in the cloacal microbiota of a wild bird species. *BMC ecology*, 13, 11. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-13-11>
- van Veelen, H., Falcao Salles, J., y Tieleman, B. I. 2017. Multi-level comparisons of cloacal, skin, feather and nest-associated microbiota suggest considerable influence of horizontal acquisition on the microbiota

- assembly of sympatric woodlarks and skylarks. *Microbiome*, 5(1), 156.
<https://doi.org/10.1186/s40168-017-0371-6>
- Vargas Pellicer, P. 2019. Composition and development of gut microbiota in birds. Ph.D thesis. Imperial College London, London.
- Vargas-Pellicer, P., Watrobska, C., Knowles, S., Schroeder, J., y Banks-Leite, C. 2019. How should we store avian faecal samples for microbiota analyses? Comparing efficacy and cost-effectiveness. *Journal of microbiological methods*, 165, 105689.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105689>
- Vela, A. I., Casas-Díaz, E., Fernández-Garayzábal, J. F., Serrano, E., Agustí, S., Porrero, M. C., Sánchez del Rey, V., Marco, I., Lavín, S., y Domínguez, L. 2015. Estimation of cultivable bacterial diversity in the cloacae and pharynx in Eurasian griffon vultures (*Gyps fulvus*). *Microbial ecology*, 69(3), 597–607. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0513-3>
- Videvall, E., Strandh, M., Engelbrecht, A., Cloete, S., y Cornwallis, C. K. 2018. Measuring the gut microbiome in birds: Comparison of faecal and cloacal sampling. *Molecular ecology resources*, 18(3), 424–434.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12744>
- Vo, A. 2014. Determinants and Implications of Variation in the Avian Gut Microbiota. UC Berkeley. ProQuest ID: Vo_berkeley_0028E_14473. Merritt ID: ark:/13030/m5bk616q. Retrieved from <https://escholarship.org/uc/item/9xn036k9>
- Waite, D. W., y Taylor, M. W. 2015. Exploring the avian gut microbiota: current trends and future directions. *Frontiers in microbiology*, 6, 673.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00673>
- Wu, Y., Yang, Y., Cao, L., Yin, H., Xu, M., Wang, Z., Liu, Y., Wang, X., y Deng, Y. 2018. Habitat environments impacted the gut microbiome of long-distance migratory swan geese but central species conserved. *Scientific reports*, 8(1), 13314. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31731-9>

- Xenoulis, P. G., Gray, P. L., Brightsmith, D., Palculict, B., Hoppes, S., Steiner, J. M., Tizard, I., y Suchodolski, J. S. 2010. Molecular characterization of the cloacal microbiota of wild and captive parrots. *Veterinary microbiology*, 146(3-4), 320–325. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.024>
- Xiao, K., Fan, Y., Zhang, Z., Shen, X., Li, X., Liang, X., Bi, R., Wu, Y., Zhai, J., Dai, J., Irwin, D. M., Chen, W., y Shen, Y. 2021. Covariation of the Fecal Microbiome with Diet in Nonpasserine Birds. *mSphere*, 6(3), e00308-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00308-21>
- Young, J. C., Zhou, T., Yu, H., Zhu, H., y Gong, J. 2007. Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 45(1), 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.028>