

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
SEDE MANABÍ
CARRERA DE BIOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN



Pontificia Universidad
Católica del Ecuador

MANABÍ

Estudio metagenómico del contenido intestinal de una ballena jorobada
(*Megaptera novaeangliae*) post mortem en la playa de Bahía de Caráquez,
Manabí

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

MANEJO SOSTENIBLE DE RECURSOS

SUBLÍNEA DE INVESTIGACIÓN

MICROBIOLOGÍA

PREVIO AL TÍTULO DE

BIÓLOGO

AUTOR

CRISTHIAN LAVAYEN PICO

TUTOR

FRANCISCO POZO MIRANDA, M SC

BAHÍA DE CARÁQUEZ – ABRIL 2024

Certificación

En mi calidad de tutor del trabajo de integración curricular, certifico haber revisado el presente manuscrito de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí, cumpliendo los requisitos establecidos por la Dirección de Investigación; en consecuencia, es apto para su presentación y sustentación.

Francisco Pozo Miranda, *M. Sc.*

Tutor del trabajo de titulación

CI: 0918330952

Aprobación del tribunal

El jurado examinador aprueba el presente manuscrito de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Sede Manabí.

Evelyn Arias Cedeño, *M. Sc.*

Primera Lector

Iván Loor Santana, *M. Sc.*

Segundo Lector

Francisco Pozo Miranda, *M. Sc.*

Tercer lector

Bahía de Caráquez, junio 2024

Declaración de originalidad

Este manuscrito no contiene ningún tipo de material que haya sido aceptado para la obtención de un título universitario en otra institución, excepto en forma de información de soporte que ha sido debidamente citada en mi trabajo. Este trabajo es de total responsabilidad del autor, quien declara bajo juramento que ninguna sección de este trabajo de integración curricular infringe los derechos de autor de nadie.

Cristhian Fabricio Lavayen Pico

CI: 1350730295

Teléfono: 0986461347

difh3101@gmail.com

Declaración sobre derechos de autor

Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a distribuir este manuscrito de investigación en medios físicos y electrónicos con el fin de promover la divulgación de mis resultados a la comunidad científica y a la sociedad en general. Adicionalmente autorizo el uso de los contenidos de esta investigación como bibliografía para fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, citando como fuente de información al autor de este trabajo.

Cristhian Fabricio Lavayen Pico

CI: 1350730295

Dedicatoria

A mis padres, cuyo apoyo y confianza constante fue y será siempre mi fuente de inspiración para la culminación todo lo que logre conseguir a lo largo de mi vida, comenzando desde aquí. A mis hermanos, por ser el motivo de mi intento de ser mejor persona y tratar de servirles de ejemplo. A mis abuelos, por todo el amor que me han dado y que ayudó a convertirme en quien soy. A mi pareja, por su incondicionalidad, los buenos y los malos ratos, por aguantarme y por ser en sí misma otra razón por la cual mantenerme despierto y crecer.

Los amo.

Agradecimiento

Agradezco a la comunidad universitaria por la oportunidad brindada, a mis profesores en carrera, los Biólogos Kruger Loor, Evelyn Arias y Gabriel Durán, siempre enfocados y manteniendo la confianza en quien escribe.

A mi tutor, el Biólogo Francisco Pozo, por guiarme durante todo el desarrollo de este trabajo, y por su increíble capacidad de esclarecer mis ideas cuando me sentía perdido, admiro lo inteligente que es.

A mis compañeros, a los amigos que hice y que ahora aprecio, aprendí mucho con todos y gracias a ustedes pude redescubrirme un poco a mí mismo. Valoro mucho las experiencias, el interés, la guía, la expectativa, las alegrías y las tristezas que experimenté en este entorno.

Resumen

El objetivo del presente estudio es conocer la composición microbiana del intestino de un ballenato de *Megaptera novaeangliae* encallado a través de un análisis metagenómico para así evaluar la funcionabilidad de esas bacterias y su relación con el organismo, esto ante la falta de información referente con respecto a la especie. La metodología implicó la recolección y almacenamiento de muestras de líquido intestinal tras el encallamiento del animal. Después, la extracción y secuenciación del ADN en laboratorios en Quito y Corea del Sur, respectivamente. La evaluación de la composición microbiana se realizó calculando diversos índices de diversidad para evaluar la muestra obtenida y analizar abundancia relativa y absoluta para establecer bacterias dominantes, así se construyeron árboles filogenéticos usando secuenciaciones de otras fuentes para establecer similitudes entre las comunidades bacterianas. El análisis de la diversidad bacteriana reveló una comunidad microbiana equilibrada y rica en especies, aunque ligeramente por debajo de la diversidad promedio esperada para los mamíferos marinos según lo indicado en las fuentes. Los principales filos bacterianos identificados fueron *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Fusobacteria*, con una composición que difiere de estudios previos en otras ballenas, específicamente en la menor abundancia de *Firmicutes*. Se destaca la presencia de *Pasteurella skyensis*, bacteria posiblemente riesgosa para la salud de las ballenas, por lo que se debería prestar atención en el futuro a más casos de composición similares. Además, los análisis filogenéticos revelan una considerable diversidad genética entre las cepas consultadas, indicando adaptaciones específicas para cada especie y región.

Palabras clave: *Megaptera novaengliaea*, comunidad microbiana, *Pasteurella skyensis*, diversidad, funcionalidad.

Abstract

The aim of this study is to determine the microbial composition of the intestine of a stranded *Megaptera novaeangliae* whale through metagenomic analysis to evaluate the functionality of these bacteria and their relationship with the organism, given the lack of information regarding this species. The methodology involved the collection and storage of intestinal fluid samples following the stranding of the animal. Subsequently, DNA extraction and sequencing were performed in laboratories in Quito and South Korea, respectively. The evaluation of the microbial composition was carried out by calculating various diversity indices to assess the obtained sample and analyze relative and absolute abundance to establish dominant bacteria, thus phylogenetic trees were constructed using sequences from other sources to establish similarities between bacterial communities. The analysis of bacterial diversity revealed a balanced and species-rich microbial community, although slightly below the average diversity expected for marine mammals as indicated in the sources. The main bacterial phyla identified were Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, and Fusobacteria, with a composition that differs from previous studies in other whales, specifically in the lower abundance of Firmicutes. The presence of *Pasteurella skyensis*, a potentially harmful bacterium for whale health, is highlighted, so attention should be paid in the future to more cases with similar compositions. Additionally, phylogenetic analyses reveal a considerable genetic diversity among the strains consulted, indicating specific adaptations for each species and region.

Keywords: *Megaptera*, Microbial, diversity, functionality.

Índice

1. Introducción	12
2. Metodología	16
2.1 Recolección de la muestra	16
2.2 Almacenamiento y preparación de la muestra	16
2.3 Secuenciación	16
2.4 Evaluación de la Composición Microbiana	17
2.5 Análisis de Filogenia y Clados	17
2.6 Evaluación de la Diversidad	18
3. Resultados	22
3.1 Análisis de especies totales	22
3.2 Índices de diversidad	24
3.3 Análisis funcional de bacterias	25
3.4 Análisis de Estructura microbiana	29
4. Discusión	36
5. Conclusiones	40
6. Bibliografía	41

Índice de ilustraciones

Imágenes

Imagen 1. Parámetros para el análisis MEGA	18
Imagen 2. Panorama general del resultado de metagenómica del contenido intestinal de la <i>Megaptera novaeangliae</i>	22
Imagen. 3. Krona específico para el filo Proteobacteria.....	23
Imagen 4. Krona del género <i>Vibrio</i> en la muestra.	23
Imagen 5. Krona de una de las clases probióticas encontradas en los análisis	24

Tabla

Tabla 1.	25
Resultados de Diversity 4 para los índices de diversidad.....	25

Figuras

Figura 1. Análisis de agrupamiento clúster relacionado a la composición microbiana presente.....	30
Figura 2. Análisis de componentes principales	30
Figura 3. Árboles filogenéticos de cuatro bacterias patógenas	32
Figura 4. Árboles filogenéticos de cuatro bacterias catalogadas como probióticas	35

1. Introducción

Al ser animales marinos que migran junto a la costa, la ruta de las ballenas jorobadas se extiende desde zonas de latitudes altas, cerca de la Antártida, hasta las de latitudes bajas donde llegan para reproducirse, las aguas costeras del Ecuador están incluidas en ese registro desde el año 2004, ya que generalmente se pueden avistar ballenas acompañadas de sus crías (Acevedo, 2014).

Cuando la cría deja de alimentarse de leche, comenzará a consumir de krill y otros crustáceos como un adulto (Betancourt et al., 2006). Los registros no muestran que exista una variación entre la alimentación de una cría con un adulto más allá de la cantidad que pueden llegar a consumir, esto debido a que cuando existe una cría en el grupo, esta se alimenta junto al resto de la manada.

Por otra parte, la microbiota intestinal, también conocida como flora intestinal o microbioma, desempeña un papel fundamental en la salud y el funcionamiento de numerosos organismos, incluidas las ballenas jorobadas. La comprensión de la composición y la función de la microbiota intestinal en estas criaturas marinas es esencial para entender sobre su salud, su adaptación a un ambiente marino dinámico y su conservación a largo plazo. Se sabe relativamente poco sobre las consecuencias funcionales de las alteraciones de la microbiota intestinal y cómo los cambios en la riqueza y diversidad de la microbiota se traducen en cambios en la salud y la susceptibilidad a las enfermedades (Turner, P. V.2018).

La metagenómica nos permite analizar comunidades microbianas naturales, incluyendo organismos que escapan a nuestras posibilidades de cultivo en el laboratorio. Además, informa sobre la diversidad y estructura trófica de las comunidades y permite

ligarlas con las funciones ecológicas del ciclo de nutrientes del ecosistema que las contiene (Bonilla-Rosso et al., 2008).

Muchos de los análisis metagenómicos que se realizan en mamíferos marinos proceden de muestras recolectadas de la cavidad oral como lo hicieron Dudek et al., (2017) en su investigación cuyas muestras fueron extraídas de delfines nariz de botella (*Tursiops truncatus*) en los cuales encontraron poblaciones bacterianas de 24 filos bacterianos entre los que se encuentran: *Deinobacterium*, *Fermentibacterium*, *Modulibacterium*, *Moranbacterium*, *Saccharibacterium*, *Campbellbacterium*, *Absconditibacterium*.

En Francia se han realizado análisis de la microbiota en el delfín listado, los estudios se centraron en cavidad oral, nasal, espiráculo e intestino, indicando que la población de bacterias en este último sistema contenía una población dominante de *Photobacterium*, como se indica en el trabajo de Godoy-Vitorino et al., (2017).

Además, cabe mencionar que cuando se realizan trabajos de análisis de este tipo en el exterior del organismo, en este caso marino, la diversidad microbiótica está compuesta por especies planctónicas, como lo reportado en delfines nariz de botella y orcas por Chiarello et al., (2017), cuya composición varía entre especies e individuos, lo cual puede atribuirse a la exposición directa con el medio y la variación de las condiciones a las que se someten, convirtiéndose en un medio variado. Mientras que aquellos estudios que se centran en la recolección intestinal presentan como resultados poblaciones dominantes de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Es así que Erwin et al., (2017) reportaron que los números de estos filos representan más del 68 % del total de las comunidades microbianas; a este último filo de bacterias se le atribuye la función de regulación de poblaciones bacterianas invasoras en el organismo.

Sin embargo, la microbiota cuenta con distintas funciones dependiendo de su composición y la localización en el organismo, por ejemplo, *la leche de manatí contiene una combinación de componentes químicos y microbianos para su óptimo desarrollo y crecimiento* (Aceros, D. F. 2022). Además, se ha visto que las bacterias más abundantes en el tracto digestivo de los mamíferos son las *Firmicutes*, *Proteobacterias*, y *Bacteroidetes*, tal y como se demuestra en el trabajo realizado por Bik et al., (2016) a partir del análisis de la microbiota bucal, líquido gástrico, tracto respiratorio y recto, aunque mostrando algunos déficits de población microbiana en el recto de algunos de los delfines analizados.

Las ballenas jorobadas son animales migratorios que llegan al Ecuador desde aguas subantárticas y permanecen frente a las costas de Ecuador desde principios de junio hasta finales de septiembre. (Díaz, S. H., & Lasso, S. 2014), los animales débiles o jóvenes sufren varamiento en las costas de Manabí, lo que permite estudiar la metagenómica del microbiota intestinal para determinar su diversidad específica y ayudar a comprender mejor la simbiosis de este mamífero y sus huéspedes bacterianos.

Sin embargo, a pesar de que existen documentos de investigación sobre la composición microbiana de mamíferos marinos, estos estudios están en su mayor parte centrados en animales más pequeños como lobos marinos, manatíes o delfines, debido quizá al fácil manejo y acceso si se los compara con la *Megaptera novaeangliae* con respecto al tamaño.

Los estudios sobre metagenómica o microbiota, además de ayudar a comprender el funcionamiento de la simbiosis bacteriana con el organismo, brindan información sobre su alimentación y estado de salud. Los escasos recursos sobre metagenómica relacionada con estos animales hacen que los cuerpos varados de ballenas sean una oportunidad para

enriquecer el conocimiento faltante en un área cuyo acceso a muestras para el estudio depende de la suerte.

En este contexto, el análisis del ballenato varado en la comunidad de Bahía de Caráquez proporcionó una valiosa oportunidad para mejorar la comprensión de la dinámica microbiana en ballenas jorobadas. Por lo que, los objetivos específicos de este estudio fueron determinar la composición microbiana presente en crías de *Megaptera novaeangliae* mediante análisis de metagenómica, analizar la estructura de las bacterias descritas para conocer su funcionalidad en el organismo, y categorizar las relaciones existentes entre los clados determinados. Estos objetivos contribuyen al entendimiento de las interacciones simbióticas de esta especie con sus huéspedes bacterianos.

2. Metodología

A partir del encallamiento de un ballenato post mortem de ballena jorobada en 2023 en Bahía de Caráquez se recolectaron diferentes tipos de muestras para la realización de pruebas, entre ellas, se recolectó fluido intestinal para la realización de un análisis metagenómico por parte de un laboratorio externo para comprender la composición microbiana y la relación con el ballenato.

2.1 Recolección de la muestra

Se procedió a abrir la parte ventral del animal con una herramienta de corte de uso agrícola, un machete Hansa, hasta despejar el área del estómago e intestino. El contenido se colocó en un recipiente plástico estéril marca Koch. Luego con un vaso de precipitación pyrex se tomó un volumen de 500 ml de contenido líquido.

2.2 Almacenamiento y preparación de la muestra

La muestra se mantuvo congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un refrigerador Electrolux del laboratorio en las instalaciones de la universidad hasta su procesamiento. Antes de la secuenciación, se descongeló la muestra a temperatura controlada hasta llegar a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) para evitar la degradación del ADN.

2.3 Secuenciación

La extracción de la muestra fue realizada por IDGEN en Quito, los parámetros obtenidos fueron una concentración de 91.8 ng/uL y calidad de 260/280, por lo que se cumplió con los requerimientos para el envío a la secuenciación.

La muestra se envió al laboratorio MacroGen en Corea del Sur para la secuenciación.

2.4 Evaluación de la Composición Microbiana

A partir de la muestra se construyó una biblioteca genómica, que es una colección de fragmentos de ADN que incluye secuencias representativas de un genoma o cromosoma. Dicha biblioteca se creó siguiendo la metodología utilizada por Ubiquitina, 2004, clonando fragmentos de tamaño adecuado para contener genes y sus secuencias reguladoras, permitiendo así la selección y análisis de millones de secuencias clonadas. Esto se efectuó con el objetivo de facilitar la identificación de los genes de especies microbianas que se encuentren en dicha muestra para proceder con la evaluación mediante la diferenciación. El proceso consistió en comparar los genomas con una biblioteca (NCBI) y realizar el proceso de Blast. Genomas de especies con similitud del 99.99 % son asignados como especies identificadas.

Análisis funcional

Una vez identificadas las especies de relevancia se utilizó la misma base de datos de NCBI para la búsqueda de sus funcionalidades en los medios que habitan según las investigaciones de las cuales se extraían las secuencias. En total se recolectó información de 11 especies en documentos de investigación y 7 de información directa de la biblioteca online, se explicó su funcionalidad y se las estableció como patógenas o probióticas.

2.5 Análisis de Filogenia y Clados

Se construyó un árbol filogenético utilizando las secuencias obtenidas. La filogenia de bacterias investiga el desarrollo evolutivo de las distintas líneas y la aparición de especies a partir de otras preexistentes, según Cuadra, J. M. M. H. (2017).

En el caso de este trabajo, la filogenia de bacterias después de la secuenciación del ADN, se realizó mediante el programa MEGA según los siguientes parámetros; Prueba de filogenia: Método de Bootstrap, número de replicaciones: 500, tipo de sustituciones: nucleótido, número de hilos: 8 y distribución Gamma a 0,16 (Imagen 1).



Imagen 1. Parámetros para el análisis MEGA

2.6 Evaluación de la Diversidad

Se calcularon los siguientes índices con ayuda del software Diversity 4 que permite calcular dichos índices con los datos que se le proporcionen.

- Índice de Shannon-Wiener

El Índice de Shannon-Wiener es una medida cuantitativa de la diversidad biológica en una comunidad. Este índice tiene en cuenta tanto la riqueza de especies como la uniformidad en la distribución de individuos entre esas especies (Valdez M et al., 2018).

La fórmula es:

$$H' = -\sum (p_i \ln p_i)$$

En donde:

H' Es el índice Shannon-Wiener

Pi es la proporción de individuos de la i-ésima especie en relación con el total de individuos.

El valor del Índice de Shannon-Wiener varía generalmente entre 0 y 4, donde un valor de 0 indica que hay una sola especie presente, y valores más cercanos a 4 reflejan una mayor diversidad con una distribución uniforme de las especies.

- Equidad de Pielou

El Índice de Pielou es una medida de la equidad o uniformidad en la distribución de abundancia de las especies. Este índice varía de 0 a 1, donde 0 indica una distribución completamente desigual y 1 indica una distribución perfectamente equitativa (Valdez M et al., 2018).

La dominancia de Pielou presenta la siguiente fórmula:

$$J' = H' / \ln (S)$$

Donde:

J' es la dominancia de Pielou

H' es el índice de Shannon-Wiener.

$\ln(S)$ El número de especies presentes.

Cuando $J' = 1$, significa que todas las especies tienen la misma abundancia y la distribución es perfectamente equitativa. Cuando J' se acerca a 0, indica una distribución más desigual.

- Diversidad de Margalef

El Índice de Margalef es una medida de diversidad biológica utilizada para evaluar la riqueza relativa de especies. Este índice tiene en cuenta tanto el número total de especies presentes como el número total de individuos (Valdez M et al., 2018).

La fórmula del Índice de Margalef es la siguiente:

$$D Mg = (S - 1) / \ln N$$

Donde:

$D Mg$ es el Índice de Margalef.

S es el número total de especies en la muestra.

N es el número total de individuos en la muestra.

\ln es el logaritmo natural.

El índice se interpreta como la riqueza relativa de especies en función del tamaño de la muestra. Cuanto mayor sea el valor del índice, mayor será la diversidad relativa de especies.

- Dominancia de Simpson

El Índice de Simpson busca determinar la dominancia o equitatividad de especies. Se calculó a partir de la proporción de individuos de una especie específica en relación con el total de individuos en la muestra. En resumen, cuantifica la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar pertenezcan a especies diferentes (Valdez M et al., 2018).

La fórmula para el Índice de Simpson es:

$$\lambda = \sum (p_i)^2$$

Donde:

λ es el Índice de Simpson.

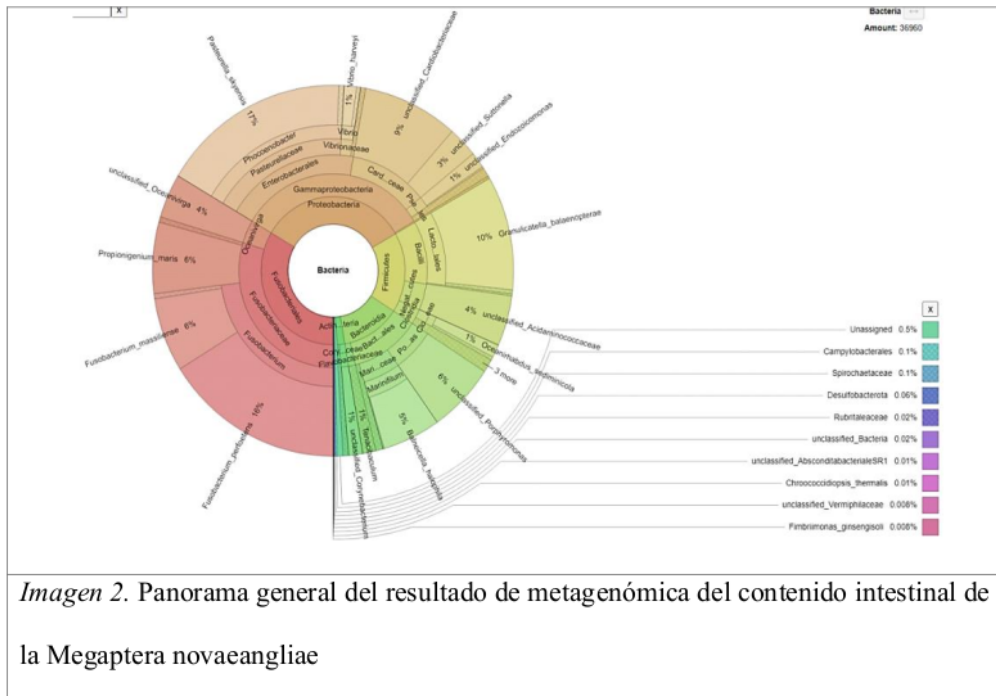
P_i es la proporción de individuos de la i -ésima especie con respecto al total de individuos en la muestra.

El índice varía de 0 a 1, donde 0 indica máxima diversidad (todas las especies son igualmente abundantes) y 1 indica mínima diversidad (una especie domina completamente la muestra).

3. Resultados

3.1 Análisis de especies totales

Se identificaron un total de 149 especies bacterianas en la muestra analizada. Se observó que los filos dominantes fueron los Fusobacteriales con un 34%, seguido de las Proteobacteria con un 33% y Firmicutes con 17% (Imagen 2).



Las proteobacterias resultantes del análisis están representadas en un 99% por Gammaproteobacterias (Imagen 3), una clase altamente rica en géneros de microorganismo patógenos tales como *Vibrio*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Pasteurella*, cuyas propiedades y naturaleza puede ocasionar complicaciones en la salud de distintas especies de animales (Williams, K. P., et al., 2010). En particular, la especie bacteriana más abundante fue *Pasteurella skyensis* con un 51% del total dentro del filo proteobacteria.

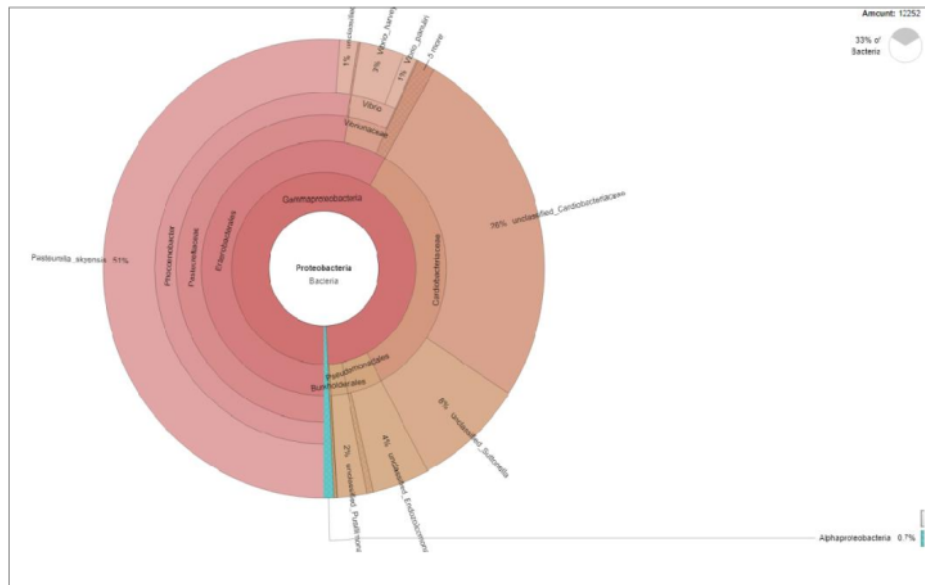


Imagen 3. Krona específico para el filo Proteobacteria.

Entre los organismos bacterianos patógenos identificados se encuentra el género *Vibrio*, que representa el 1% del total de la muestra. Dentro de este género, *Vibrio harveyi* constituye la mayor población, con un 76% del total, mientras que *Vibrio parvulus* representa el 24% restante (ver Imagen 4).

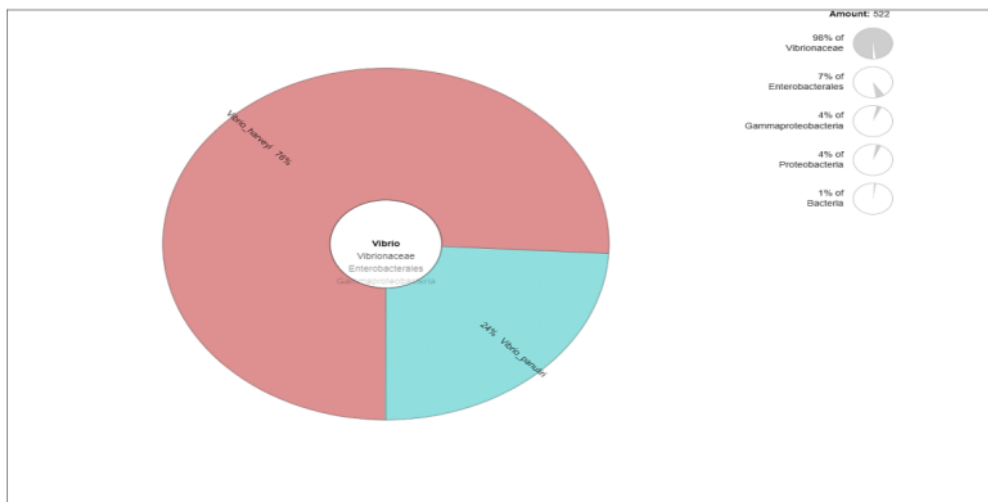


Imagen 4. Krona del género *Vibrio* en la muestra.

Los Bacilli, del filo de los *Firmicutes*, son generalmente conocidos por sus propiedades probióticas, estos representan el 10% del total de la muestra, destacando como especie dominante la *Grannulicatella balaenopterae* siendo estos el 95% de todos los integrantes de esta clase (Imagen 5).

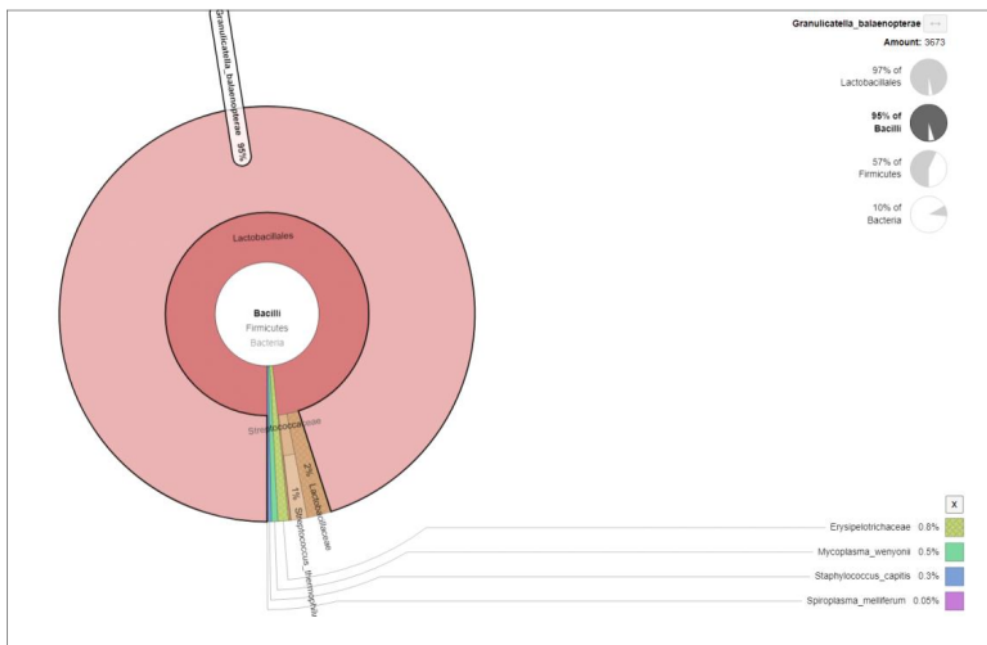


Imagen 5. Krona de una de las clases probióticas encontradas en los análisis

3.2 Índices de diversidad

Se evaluaron los índices de diversidad, dominancia y equidad en relación con la composición microbiana presente en la ballena *Megaptera novaeangliae*. El índice de diversidad de Shannon-Wiener obtuvo un valor de 2.882 bits, lo que sugiere una diversidad media, de acuerdo con el rango general del índice, esto indica una comunidad bacteriana en proporciones relativamente equilibradas. Por otra parte, el índice de Margalef fue de 14.07 bits, lo cual sugiere una alta riqueza específica, indicando una notable diversidad en términos de la variedad de especies presentes.

En la dominancia de Simpson el resultado fue de 0,0898 bits, demostrando que la comunidad bacteria no posee prevalencia por una especie en particular, sino que varias especies tienen una presencia uniforme.

Finalmente, el análisis mediante el índice de Pielow, que evalúa la distribución equitativa de las especies en una comunidad, arrojó un valor de 0,576 bits, el valor refleja una distribución relativamente igual en la muestra (ver tabla 1).

Tabla 1.

Resultados de Diversity 4 para los índices de diversidad.

Parámetros de diversidad	N°
Taxa_S	149.0 bits
Dominancia D	0,0898 bits
Shannon_H	2,8820 bits
Equitatividad J	0,5760 bits
índice de Margalef	14,0700 bits

3.3 Análisis funcional de bacterias

Pediococcus pentosaceus

Es una bacteria productora láctica que ha ganado atención debido a su potencial probiótico puesto que las bacteriocinas que produce pueden ejecutar funciones antibacterianas en su ambiente, además se han registrado casos en los que actúan como antioxidantes y desintoxicantes. (Jiang, S. et al., 2021)

Lactococcus lactis

Es una bacteria grampositiva del tracto intestinal de muchos animales que cumple una función probiótica por su capacidad de degradar la sacarosa y algunas cepas se identificaron como desintoxicantes.

Clostridium perfringens

Anaeróbica grampositiva que produce enterotoxinas que ocasionan intoxicaciones graves en los organismos en caso de una proliferación, se encuentra con regularidad en el tracto intestinal de los organismos, la intoxicación puede ser más o menos grave dependiendo de la especie hospedadora.

Facklamia tabacinasalis

Actúa como contaminante del tabaco en polvo, es una bacteria grampositiva con forma de coco que se sospecha puede ocasionar infecciones respiratorias, sin embargo, no se ha confirmado ningún tipo de afección por parte de esta bacteria. Las bacterias de este género presentan susceptibilidad variada a antimicrobianos y poseen patrones de resistencia complejos.

Anaerococcus prevotii

Bacteria anaeróbica grampositiva cuya presencia en organismos se centra en accesos ubicados en la piel, cavidad oral y el tracto gastrointestinal

Pseudomonas plecoglossicida

Bacteria gramnegativa que se asocia a la enfermedad de ascitis hemorrágica en peces ayu (*Plecoglossus altivelis*), los cuales habitan en la zona pale ártica, los estudios sobre la interacción de esta bacteria patógena y el pez se centran en estudios de métodos de control utilizando bacteriófagos.

Photobacterium damsela

Se trata de una bacteria gramnegativa altamente patógena que provoca úlceras en la piel y en algunos casos hemorragias, principalmente afectando a los peces de menor o mediano tamaño a los cuales puede provocar la enfermedad conocida como pseudo tuberculosis (Morick, D. et al., 2023).

Pantoea ananatis

Es una bacteria fitopatógena gramnegativa que causa pérdidas económicas en cultivos agronómicos y árboles. Se encuentra asociada con plantas, insectos y humanos, además de ser aislada en diversos ambientes terrestres, además, su genoma flexible le permite adaptarse a una variedad de hábitats y estilos de vida (Weller-Stuart, T., et al., 2017).

Mycoplasma wenyonii

Es un patógeno que puede causar anemia, fiebre y edemas en los bovinos, sin embargo, se ha confirmado su presencia en una buena gama de otros animales como canes y equinos. Se trata de una bacteria a la que aún no se le ha asignado un grupo Gram, por lo que se denomina Gram indeterminada. (Nouvel, L. X., et al., 2019)

Erwinia persicina

Bacteria gramnegativa que se conoce por su capacidad de afectar principalmente a plantas, afectando la calidad de las semillas y la producción agrícola en algunos casos, patógena.

Clostridium chauvoei

Es una bacteria anaerobia grampositiva, formadora de esporas y con una fuerte actividad hemolítica, además es altamente virulenta capaz de causar, en bovinos principalmente, fiebre, depresión y cojeras, conduciendo a una mortalidad alta al ganado afectado (Kuhnert, P., et al., 1996).

Vibrio panuliri

Gramnegativa que suele encontrarse en el tracto digestivo y huevos de las langostas. (Kumari, P., et al., 2014).

Vibrio harveyi

Bacteria marina Gram-negativa y luminiscente, común en aguas cálidas costeras y en la microbiota intestinal de animales marinos causando vibriosis luminosa y afecta invertebrados y peces provocando úlceras, lesiones oculares y gastroenteritis (López, J. R., et al., 2009).

Endozoicomonas sp

Bacteria clasificada de este género, Gram-negativa con naturaleza simbiote en varias especies de animales que van desde las esponjas hasta los peces, además poseen buena flexibilidad genética, pudiendo llegar a participar en el ciclado de nutrientes de su hospedador (Neave, M. J., et al., 2016).

Porphyromonas sp

Bacteria sin clasificación cuyo género es conocido ampliamente por habitar la cavidad oral de algunos organismos y ocasionar enfermedades periodontales, recientes estudios han sugerido que pueden tener alguno tipo de implicaciones en enfermedades sistémicas (Mei, F., et al., 2020).

Fusobacterium massiliense

Es una especie de bacteria anaeróbica y Gram-negativa descubierta recientemente cuya naturaleza ni afecciones han sido descritas oficialmente aún.

Fusobacterium perfoetens

Bacteria gramnegativa muy común del tracto gastrointestinal de una amplia gama de mamíferos, sin embargo, sus funciones específicas en este medio no están establecidas.

Además, pueden causar infecciones cuando existe alguna alteración que impulse su crecimiento poblacional (Pacheco-Sandoval, A., et al., 2022).

Pasteurella skyensis

Gram-negativa que ha sido descrita como bacteria con virulencia baja siendo registrada en la piel de mamíferos y en salmones, provocando enfermedades en estos últimos si las condiciones son favorables para la proliferación, sin embargo, estas infecciones son raras (Reid, H. I., et al., 2015).

3.4 Análisis de Estructura microbiana

Composición de la comunidad microbiana

Al analizar la estructura microbiana según agrupamientos por Gray-Curtis (figura 1) y análisis de componentes principales (figura 2), se puede observar una estructura microbiana comprendida con un conjunto de 40 grupos microbianos (figura 1), aunque la predominancia de la comunidad microbiana fue por parte de Lachnospiraceae, Acidaminococcaceae, Marinifilaceae, Porphyromonadaceae, Pasteurellaceae, Cardiobacteriaceae, Fusobacteriaceae. Esta comunidad microbiana muestra interacción al generar una macro agrupación en el eje de la accisa 1 del análisis de componentes principales, pero también nos permite conocer el estado de salud del individuo mostrando a grupos patógenos en niveles bajos de Campylobacteraceae, Pseudomonadaceae, Streptococcaceae Clostridiaceae y Vibrionaceae.

Filogenia especies patógenas

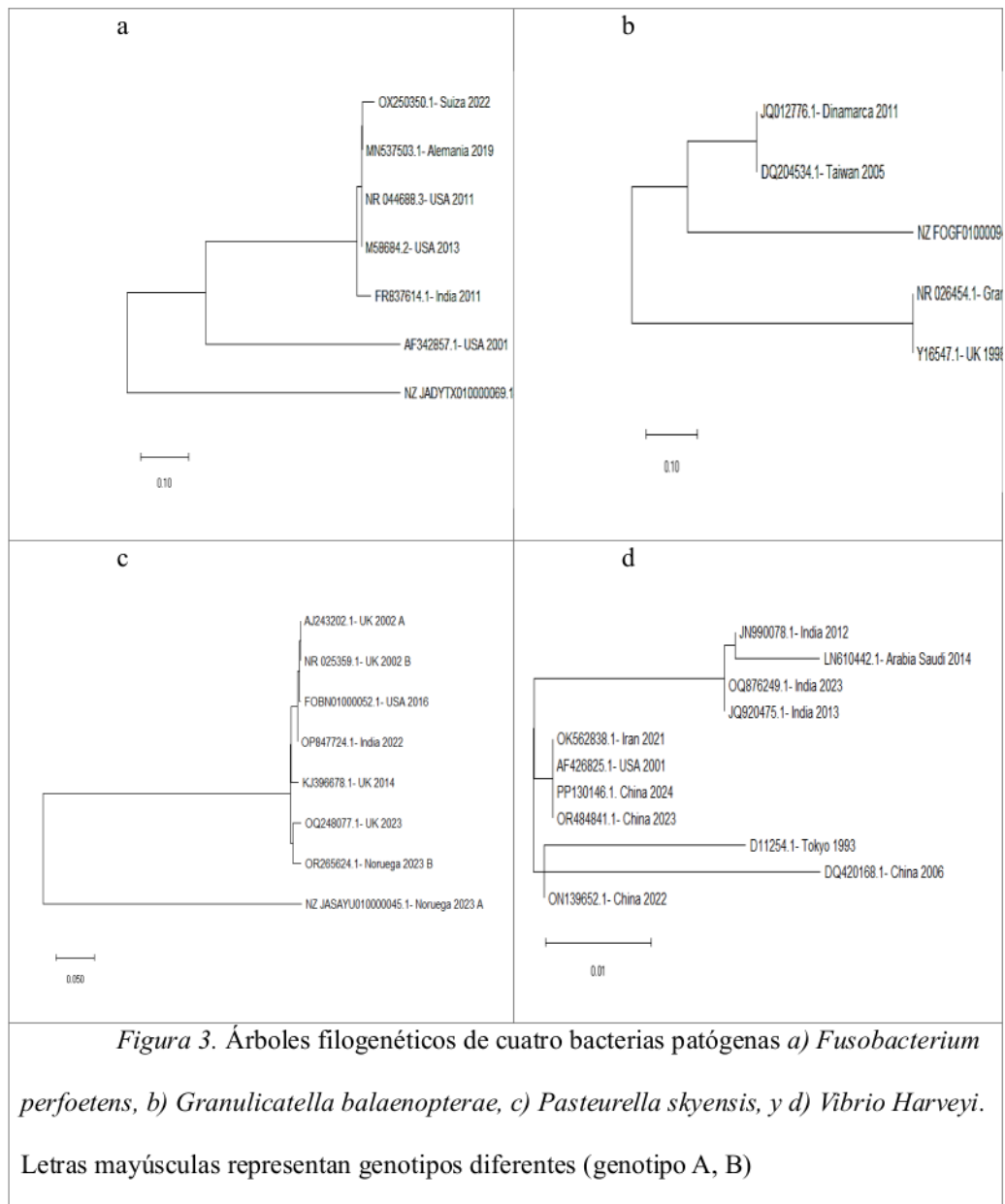
El árbol filogenético de la figura 3a muestra la relación evolutiva entre diferentes secuencias genéticas de *Fusobacterium perfoetens*. Las ramas del árbol representan la distancia evolutiva entre las secuencias, donde el clado con más genotipos comprende las secuencias de Suiza (2022) y Alemania (2019), Estados Unidos (2013-2023) e India (2011). Aunque el genotipo Estados Unidos (USA 2011) genera un clado diferente, finalmente el genotipo de Republica Checa (Chequa 2020) posee mayor divergencia evolutiva entre *Fusobacterium perfoetens* (figura 3a).

Para *Granulicatella balaenopterae*, Se forma tres clados, el primer clado comprende secuencias de Dinamarca (2011) y Taiwán (2005), que están más cercanas entre sí, seguidas un segundo clado formado por la secuencia de Estados Unidos (2016). Por otra parte, las secuencias de *G. balaenopterae* en Gran Bretaña (1999) y Reunido Unido (UK 1998) forman un tercer clado según la alta similitud entre ellas, como se observa en la figura 3b.

Para las secuencias de *Pasteurella skyensis*, se puede observar dos clados. Donde el primer clado posee siete genotipos que corresponden a Estados Unidos (2016), India (2022), Noruega (2023 B) y Reino Unido (UK 2014 - UK 2023 - UK 2022A - UK 2022 B). El segundo clado observado es Noruega (2023 A), el cual posee una distancia genética alta para esta especie (figura 3c).

Para *Vibrio harvyi*, se puede observar que, se forman cinco clados entre las secuencias analizadas, formándose el primero por las cepas de la India (2012-2013-2023) y Arabia Saudita (2014), teniendo esta último más parentesco con la cepa encontrada en India 2012.

El segundo clado lo integran las cepas de Irán (2021) China (2023-2024) y USA (2001), mostrando similitudes entre todas. La secuencia de Japón (Tokio 1993) forma el tercer clado, mientras que China 2006 y China 202 forman el cuarto y quinto clado respectivamente (figura 3d).

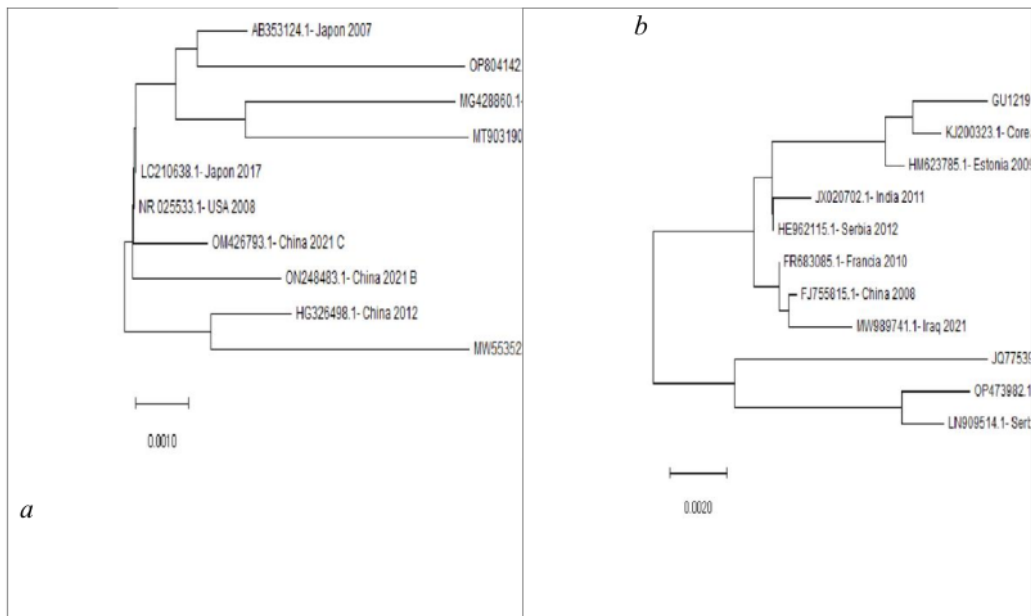


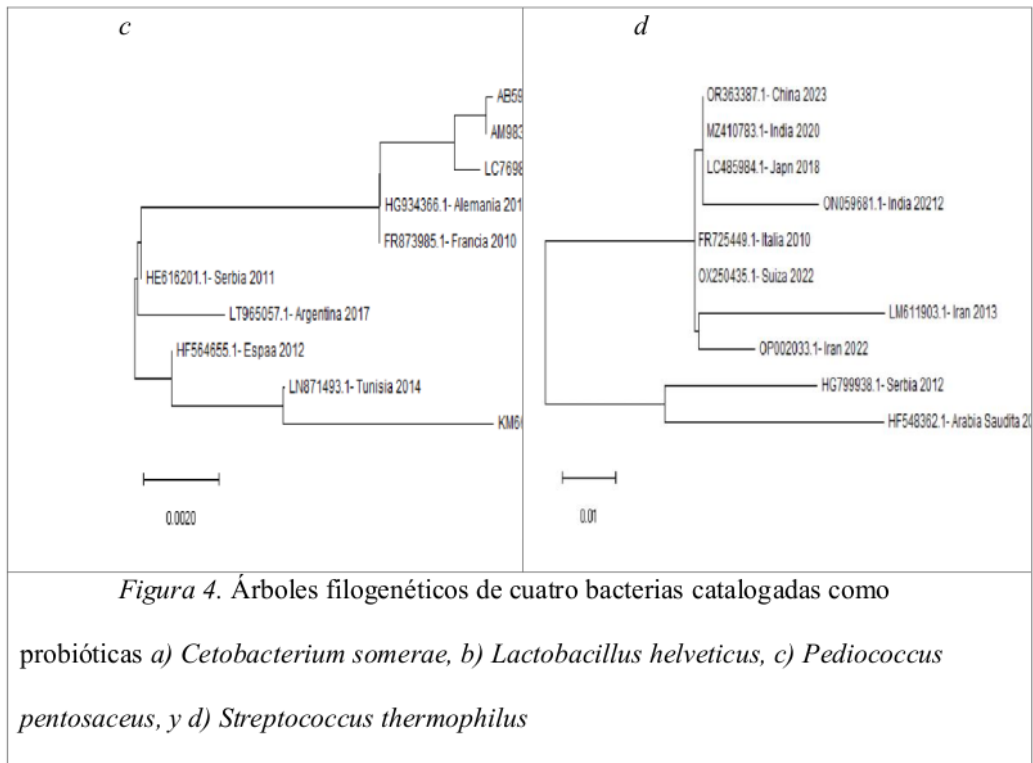
El árbol filogenético de *Cetobacterium somerae* (figura 4a) muestra la relación evolutiva entre diferentes secuencias genéticas de esta bacteria encontrada en distintos lugares. Posee un clado representativo en Japón 2007, China 2021 genotipo A y China 2017, 2020, siendo las dos últimas más similares entre ellas que las dos primeras, las cuales son más distantes. El segundo clado de cepas con secuencias con similitudes distantes entre sí, se forma en un grupo por las de Japón 2017, USA 2008, China 2021 genotipo B y genotipo C, siendo las 2 últimas y las dos primeras más similares entre ellas mismas y, a su vez, distanciándose de un segundo grupo no muy similar de secuencias dentro del mismo clado conformado por China (2012) y México (2021).

El árbol filogenético de *Lactobacillus helveticus* (figura 4b) revela la formación de dos clados distintos. Uno de ellos agrupa las secuencias de China (2012), Irán (2022) y Serbia (2015), encontrando que las dos últimas forman un grupo separados por una similitud más cercana. Las demás secuencias forman un clado y se agrupan de manera diversa. Corea (2009, 2013) con Estonia (2009), habiendo mayor similitud entre las secuencias coreanas, India (2011) con Serbia (2012) se agrupan más distanciadas del grupo anterior y Francia (2010), China (2008) e Iraq (2021), se separan en otro grupo en la cual, la última secuencia de Iraq se encuentra más distanciada.

Para el árbol filogenético de *Pediococcus pentosaceus* (figura 4c), se distingue un clado conformado por las secuencias de Japón (2010), Reino Unido (2008) y Tailandia (2023) siendo las dos primeras más cercanas entre ellas que con la última. Un segundo clado con dos secuencias altamente similares, Alemania (2013) y Francia (2010). Y un último tercer clado conformado por Serbia (2011) que es cercana a la de Argentina (2017), y por las de España (2012), Túnez (2014) y China (2014), sin embargo, todas estas secuencias se encuentran distancias entre ellas.

De la misma manera, para *Streptococcus thermophilus* (figura 4d), las secuencias de China (2023), India (2020), Japón (2018) e India (2012) forman un clado en el que las 3 primeras secuencias son ampliamente similares entre ellas y la última es un poco más distinta. Un segundo clado con Italia (2010) y Suiza (2022) cuya similitud es alta y las secuencias de Irán (2013) – (2022) con pequeñas variaciones. Un tercer clado conformado por Serbia (2012), Arabia Saudita (2012) con una ligera diferenciación.





4. Discusión

La diversidad bacteriana intestinal es fundamental para discernir el estado de salud del huésped y la estabilidad de su ecosistema microbiano, como se observa en *Megaptera novaengliaea*. Aquí, los índices de diversidad como el de Shannon-Wiener (2,8 bits) y el de Margalef (14,07 bits) sugieren una comunidad microbiana bien equilibrada y rica en especies, lo que indica un entorno intestinal saludable y resistente.

Sin embargo, aunque la comunidad muestra una notable riqueza, su diversidad general está ligeramente por debajo de los promedios previstos para los microbiomas intestinales de los mamíferos marinos, como lo demuestran estudios comparativos, como el de Pacheco-Sandoval, A. M. (2017), el autor reporta índices de diversidad más altos (promedio 3,5 bits) en comunidades de focas comunes del Golfo de México, todos siendo adultos.

De la misma forma, como indica Toro-Valdivieso, C (2021), la investigación realizada en Chile en lobos marinos *Arctocephalus philippii* plasman sus índices de diversidad entre 2.9 a 3.4 bits en las comunidades del trabajo. Por otro lado, un estudio realizado por Bai, S (2021) en un acuario en China sobre la comparativa de microbiota en mamíferos marinos determinó que una ballena beluga estudiada poseía un índice de diversidad de Shannon establecido en 2.9 bits, sin embargo, este resultado se obtiene en un contexto diferente al de este trabajo por el hecho de ser realizado en un acuario.

Por último, Tian, J (2020) en una investigación realizada en el misticeto *Balaenoptera acutorostrata* o ballena enana, que comparte también distribución con la *Megaptera novaeangliae* indica que estos mamíferos marinos poseen una diversidad

promedio de 3,5 a 4,4 bits, por lo que nuevamente puede considerarse una diversidad baja la obtenida en este trabajo.

Los filos dominantes identificados en nuestro estudio incluyen Bacteroidetes (13%), Firmicutes (17%), Proteobacteria (33%) y Fusobacteria (34%). Esta composición difiere un poco de los hallazgos en ballenas barbadas examinados por Erwin et al. (2017), donde Firmicutes y Bacteroidetes dominaron colectivamente entre el 84% y el 91% del total de microbiomas. En particular, Proteobacteria supera las expectativas en nuestro estudio, en contraste con investigaciones anteriores que sugieren que Firmicutes es el filo predominante, como se ve en los estudios de Miller et al. (2020) centrándose en las ballenas de Groenlandia.

Otro punto por considerar es la presencia de bacterias patógenas como *Clostridium perfringens* y *Vibrio harveyi* que plantea preocupaciones sobre posibles riesgos para la salud de las ballenas. En especial, *C. perfringens* es conocido por su producción de toxinas que causan enfermedades graves en animales, incluyendo las crías de ballena franca, lo cual representa una amenaza significativa para la salud de estos individuos (Morris, W. E., & Fernández-Miyakawa, M. E. 2009; Marón, C. F., et al., 2019).

De manera similar, *V. harveyi*, un patógeno marino que causa enfermedades en organismos acuáticos, presenta riesgos de necrosis y lesiones cutáneas (Gauger, E. J., & Gómez-Chiarri, M. 2002). Su presencia relativamente moderada en nuestro estudio podría atribuirse a la ingestión de crustáceos portadores durante la alimentación de las ballenas.

Otra bacteria patógena que podría provocar efectos negativos en organismos marinos es *Pasteurella skyensis*, la cual representa el 17% de la muestra total y merece

especial atención. Su presencia en la flora intestinal plantea preocupaciones sobre posibles infecciones, dada su importante población. Si bien sus efectos en organismos más grandes siguen sin estar documentados, sus impactos conocidos en el salmón incluyen oscurecimiento de la piel, hemorragias y septicemia (Strøm, S. B. y Nilsen, H. 2021).

Sin embargo, *P. skyensis* ha sido identificada previamente en la superficie de la piel de las ballenas jorobadas, como lo demuestra la investigación realizada por Apprill, A., et al., (2011). Este estudio se centró en el análisis de secuenciación genética de bacterias en la piel de 19 ballenas jorobadas del Pacífico Norte, tres de las cuales presentaban salud comprometida y una mostraba dominio de este patógeno.

Los estudios previos han indicado que factores de estrés anormales durante la migración como cambios en la dieta, condiciones de salud comprometidas o exposiciones a ambientes contaminados pueden alterar la composición del microbioma intestinal y favorecer la proliferación de patógenos. A pesar de esto, no existen registros de *P. skyensis* en el tracto intestinal de ballenas jorobadas. Sin embargo, dados los hallazgos, es muy probable que un juvenil de *M. novaengliae* enfermo albergue poblaciones significativas de este patógeno tanto en la superficie de la piel como en el tracto intestinal, ya que podría estar asociado con condiciones de salud comprometidas o factores ambientales estresantes que alteran su composición microbiana

Los análisis filogenéticos revelan una considerable diversidad genética entre cepas seleccionadas de diversos estudios, formando clados y grupos muy dispersos a pesar de pertenecer a la misma especie. Sin embargo, centrándonos en *P. skyensis*, como lo analizan Strøm, S. B. y Nilsen, H. (2021) y Gulla, S., et al., (2023), esta bacteria exhibe divisiones

genomovares (variantes genéticas dentro de una misma especie), influenciadas por especies y condiciones geográficas.

En particular, todas las cepas seleccionadas para el árbol específico en este estudio pertenecen a *Salmon salar*, muestran una diferenciación mínima y forman dos clados. Esto sugiere que varias cepas de *P. skyensis* pueden infectar a la misma especie de salmón, así como a otras especies de peces de la región como el lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). En consecuencia, es muy probable que la cepa de esta bacteria encontrada en la cría de ballena *Megaptera novaengliae* sea patógena para el *Salmón salar* o muy similar genéticamente, posiblemente infectando al sujeto debido a complicaciones de salud con causas externas.

5. Conclusiones

La comunidad microbiana en el ballenato de *Megaptera novaengliae* es equilibrada y rica en especies, sin embargo, está ligeramente por debajo de la diversidad esperada para los mamíferos marinos según los estudios consultados realizados en otros mamíferos marinos cuya diversidad del microbioma intestinal también fue calculada.

El análisis metagenómico identificó que los filos principales en el microbioma intestinal de la cría de *Megaptera novaengliae* son Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria y Fusobacteria, con una menor proporción de Firmicutes en comparación con estudios previos en otras especies de ballenas como el mencionado sobre las ballenas francas. Esto podría indicar una estructura microbiana diferente en las crías, sin embargo, no hay certeza de ese hecho.

Se identificaron bacterias patógenas como *Clostridium perfringens*, *Vibrio harveyi* y *Pasteurella skyensis* en el microbioma intestinal de las crías de ballena. Esta presencia genera preocupaciones sobre el riesgo potencial que dichos microorganismos pueden ocasionar para la salud de las ballenas, dado que estas bacterias están asociadas con enfermedades graves y complicaciones en otros animales.

El análisis filogenético de las cepas bacterianas mostró una alta diversidad genética para cada especie, esto sugiere adaptaciones específicas para diferentes especies y regiones. De esta manera, se reflejan las capacidades adaptativas de las bacterias a sus ambientes y huéspedes específicos.

6. Bibliografía

- Dudek, N. K., Sun, C. L., Burstein, D., Kantor, R. S., Goltsman, D. S. A., Bik, E. M., ... & Relman, D. A. (2017). Novel microbial diversity and functional potential in the marine mammal oral microbiome. *Current Biology*, 27(24), 3752-3762.
- Turner, P. V. (2018). The role of the gut microbiota on animal model reproducibility. *Animal Models and Experimental Medicine*, 1(2), 109–115. doi:10.1002/ame2.12022
- Correa Aceros, D. F. (2022). Aislamiento, caracterización y análisis de microbiota presente en la leche del manatí antillano (*Trichechus manatus*).
- Bik, E. M., Costello, E. K., Switzer, A. D., Callahan, B. J., Holmes, S. P., Wells, R. S., ... & Relman, D. A. (2016). Marine mammals harbor unique microbiotas shaped by
- Díaz, S. H., & Lasso, S. (2014). Estudio de la Incidencia de la temporada de observación de ballenas jorobadas en los aspectos socio-cultural y ambientales en el cantón Puerto López. *RICIT: Revista Turismo, Desarrollo y Buen Vivir*, (8), 8-30. and yet distinct from the sea. *Nature communications*, 7(1), 10516.
- Erwin, P. M., Rhodes, R. G., Kiser, K. B., Keenan-Bateman, T. F., McLellan, W. A., & Pabst, D. A. (2017). High diversity and unique composition of gut microbiomes in pygmy (*Kogia breviceps*) and dwarf (*K. sima*) sperm whales. *Scientific reports*, 7(1), 7205.
- Chiarello, M., Villéger, S., Bouvier, C., Auguet, J. C., & Bouvier, T. (2017). Captive bottlenose dolphins and killer whales harbor a species-specific skin microbiota that varies among individuals. *Scientific Reports*, 7(1), 15269.
- Acevedo, J. (2014). El viaje de invierno de las ballenas jorobadas. *Boletín Antártico Chileno*, 33, 1.

- Poblete Vio, R. (2014). La ballena jorobada.
- Betancourt Fernández, L., & Herrera-Moreno, A. (2006). Conociendo a las ballenas jorobadas: nuestros más distinguidos visitantes.
- Godoy-Vitorino, F., Rodríguez-Hilario, A., Alves, A. L., Gonçalves, F., Cabrera-Colon, B., Mesquita, C. S., ... & Santos, P. M. (2017). The microbiome of a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) stranded in Portugal. *Research in microbiology*, 168(1), 85-93.
- Juidias Rodríguez, V. (2016). QiimeApp-Una plataforma web para análisis metagenómicos, 37-38.
- Camps, J. (2019). Taxonomía y filogenia ¿Qué es la especie? Universitat Autònoma de Barcelona, 20-21.
- Cuadra, J. M. M. H. (2017). Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S.
- Bai, S., Zhang, P., Zhang, C., Du, J., Du, X., Zhu, C., ... & Li, S. (2021). Comparative study of the gut microbiota among four different marine mammals in an aquarium. *Frontiers in Microbiology*, 12, 769012.
- Valdez M., Carlos Gerardo, Guzmán L., Marco Antonio, Valdés G., Arcadio, Forougbakhch P., Rahim, Alvarado V., Marco Antonio, & Rocha E., Alejandra. (2018). Estructura y diversidad de la vegetación en un matorral espinoso prístino de Tamaulipas, México. *Revista de Biología Tropical*, 66(4), 1674-1682. <https://dx.doi.org/10.15517/rbt.v66i4.32135>
- Bilenca, D. N., & Kravetz, F. O. (1995). Patrones de abundancia relativa en ensambles de pequeños roedores, de la región pampeana. *Ecología Austral*, 5(1), 021–030. Recuperado a partir de https://ojs.ecologiaaustral.com.ar/index.php/Ecologia_Austral/article/view/1679
- Ruíz Herrera, M. L. (2012). Estudio florístico del estado actual del bosque ripario en la microcuenca el Coyote, Condega, Estelí (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria, UNA).

- UBIQUITINA, U. S. H. A. (2004). CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA GENÓMICA DE. UNIVERSITAS SCIENTIARUM, 9, 81-90.
- Gauger, E. J., & Gómez-Chiarri, M. (2002). 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 52(1), 39-46.
- Birkbeck, T. H., Laidler, L. A., Grant, A. N., & Cox, D. I. (2002). *Pasteurella skyensis* sp. nov., isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(3), 699-704.
- Toro-Valdivieso, C., Toro, F., Stubbs, S., Castro-Nallar, E., & Blacklaws, B. (2021). Patterns of the fecal microbiota in the Juan Fernández fur seal (*Arctocephalus philippii*). *MicrobiologyOpen*, 10(4), e1215.
- Strøm, S. B., & Nilsen, H. (2021). *Pasteurella skyensis* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Western Norway. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 41(4), 160-168.
- Morris, W. E., & Fernández-Miyakawa, M. E. (2009). Toxinas de *Clostridium perfringens*. *Revista argentina de microbiología*, 41(4), 251-260.
- Pacheco-Sandoval, A. M. (2017). El microbioma intestinal de la foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*) y su relación con la dieta: caracterización mediante secuenciación masiva (Doctoral dissertation, Tesis de Maestría, CICESE, Ensenada).
- Miller, C. A., Holm, H. C., Horstmann, L., George, J. C., Fredricks, H. F., Van Mooy, B. A., & Apprill, A. (2020). Coordinated transformation of the gut microbiome and lipidome of bowhead whales provides novel insights into digestion. *The ISME Journal*, 14(3), 688-701.
- Marón, C. F., Kohl, K. D., Chirife, A., Di Martino, M., Fons, M. P., Navarro, M. A., ... & Uhart, M. (2019). Symbiotic microbes and potential pathogens in the intestine of dead southern right whale (*Eubalaena australis*) calves. *Anaerobe*, 57, 107-114.

- Tian, J., Du, J., Lu, Z., Han, J., Wang, Z., Li, D., ... & Wang, Z. (2020). Distribution of microbiota across different intestinal tract segments of a stranded dwarf minke whale, *Balaenoptera acutorostrata*. *MicrobiologyOpen*, 9(10), e1108.
- Apprill, A., Mooney, T. A., Lyman, E., Stimpert, A. K., & Rappé, M. S. (2011). Humpback whales harbour a combination of specific and variable skin bacteria. *Environmental microbiology reports*, 3(2), 223-232.
- Zhang, X. H., He, X., & Austin, B. (2020). *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *Marine life science & technology*, 2, 231-245.
- Gulla, S., Colquhoun, D. J., Olsen, A. B., Spilsberg, B., Lagesen, K., Birkbeck, T. H., & Nilsen, H. K. (2023). Phylogeography and host specificity of Pasteurellaceae pathogenic to sea-farmed fish in the north-east Atlantic. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1236290.