

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

**ANÁLISIS DE MICROBIOTA FECAL EN 3 ESPECIES DE AVES DE
COMPAÑÍA UTILIZANDO SECUENCIACIÓN MASIVA DE NUEVA
GENERACIÓN**

PRESENTADA POR

MVZ CECILIA ALANÍS LÓPEZ

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

OCTUBRE, 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**ANÁLISIS DE MICROBIOTA FECAL EN 3 ESPECIES DE AVES DE
COMPAÑÍA UTILIZANDO SECUENCIACIÓN MASIVA DE NUEVA
GENERACIÓN**

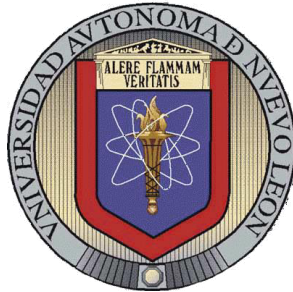
PRESENTADA POR

MVZ CECILIA ALANÍS LÓPEZ

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

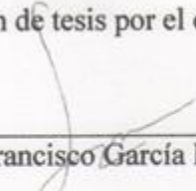
OCTUBRE, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA - VETERINARIA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

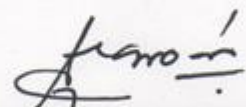



ANÁLISIS DE MICROBIOTA FECAL EN 3 ESPECIES DE AVES DE COMPAÑÍA
UTILIZANDO SECUENCIACIÓN MASIVA DE NUEVA GENERACIÓN


Aprobación de tesis por el comité

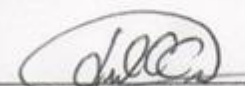

PhD. José Francisco García Mazcorro

Director de Tesis


PhD. Alicia Guadalupe Marroquín Cardona
Co-Director de Tesis


PhD. Donald Brigham Smith
Co-Asesor externo


Dra. Diana Elisa Zamora Avila


Dr. Julio César Cruz Valdéz

ESCOBEDO, N.L., MÉXICO

OCTUBRE DEL 2015

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de los logros se los debo a ustedes, en los que incluyo este. Me formaron con reglas y ciertas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron con constancia para alcanzar mis anhelos. Gracias por todo ese inmenso amor, cariño y respeto; por ese gran esfuerzo de toda una vida de arduo trabajo, sacrificios y preocupaciones para ayudarme a forjar mi camino, cumplir con mis metas, objetivos y ser una mejor persona. Agradezco los consejos sabios que en el momento exacto han sabido darme para no dejarme caer y enfrentar los momentos difíciles, por guiarme para tomar las decisiones que me ayuden a balancear mi vida y sobre todo gracias por el amor tan grande que me dan.

A mis maestros no solo de la carrera sino de toda la vida que me han aportado un conocimiento, me han hecho madurar y crecer como persona. A mi director de tesis, que en los momentos difíciles estuvo ahí para ayudarme, gracias por sus consejos y a su experiencia he aprendido lo adecuado del tema. A los investigadores de Instituciones Científicas, a quien les debo mi formación Académica, principalmente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y al Laboratorio de Virología de esta institución por apoyarme en el procesamiento de las muestras.

A mis sinodales, gracias por darme la oportunidad y por el tiempo que me han dedicado para leer este trabajo.

A todos mis amigos y compañeros de la carrera, en cada uno de ustedes hay una persona muy especial. He aprendido y disfrutado con ustedes mis horas de estudio, gracias por la ayuda cuando en ocasiones me he sentido perdida y por esa amistad sincera.

Y finalmente a todas aquellas personas que han y están marcando mi vida y que me han permitido ser parte de la suya, amigos, compañeros de trabajo, entrañables que han separado su camino, y los que ahora caminan conmigo, a quienes confiaron en mí de una u otra forma para dejar huella por esta vida, a no pasar desapercibida, y a seguir siendo quien soy ahora, a todos ustedes....

GRACIAS.

La serenidad viene cuando todo lo que crees en tu interior es tu verdad personal y propia de ser y de sentir, aprender a creer es ser tú mismo, aplicar lo que eres y sientes con la gente que te rodea.

DEDICATORIA

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A mis maestros que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida, a todos y cada uno de ellos les dedico cada una de estas páginas de mi tesis.

A mis familiares y amigos que se adelantaron en el camino pero me dejaron buenos recuerdos y experiencias.

Pero sobre todo a aquellas personas que con sus buenos y malos comentarios me inspiraron para seguir adelante, con este y otros proyectos.

Índice General

ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Antecedentes.....	13
1.2 Objetivo.....	16
2. LITERATURA REVISADA.....	18
2.1 Anatomía y fisiología de las aves.....	18
2.2 La microbiota aviar.....	29
2.2.1 Técnicas de cultivo.....	34
2.2.2 Métodos moleculares.....	38
2.3 Secuenciación.....	44
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
3.1 Colección de heces.....	49
3.2 Extracción de ADN.....	51
3.3 Secuenciación.....	51
3.3.1 Bioinformática.....	52
3.4 Análisis estadístico.....	52
4. RESULTADOS.....	53
4.1 Proporciones relativas.....	54
4.2 Uso de Unifrac.....	59

5. DISCUSIÓN.....	63
6. CONCLUSIONES.....	66
7. RECOMENDACIONES.....	68
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
9. ANEXOS.....	75
Anexo I.....	76
Anexo 2.....	77
Anexo 3.....	78
Anexo 4.....	79
Anexo 5.....	80
Anexo 6.....	81
Anexo 7.....	82

ABREVIATURAS

μL	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Grados Centígrados
μg	Microgramo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BLASTn	Basic Local Alignment Search Tool. (Herramienta Básica de búsqueda de alineación)
GB	Gigabyte
mg	Miligramo
ml	Mililitro
OTUs	Unidades Taxonómicas Operacionales
PICRUSt	Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (Investigación Filogenética de Comunidades por la Reconstrucción de los estados no observados)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology. (Perspectivas cuantitativas en Ecología Microbiana)
RDP	Proyectos de bases de datos ribosomal
RAM	Random Access Memory. (Memoria de Acceso Aleatorio)
Rnasa	Ribonucleasa
SNG	Secuenciación de Nueva Generación
TGI	Tracto Gastrointestinal

RESUMEN

Las aves son uno de los grupos de seres vivos más interesantes que habitan en el mundo, ya que presentan rasgos fisiológicos, estrategias de desarrollo y dietas extremadamente complejas, logrando adaptarse a diferentes hábitats del mundo, co-existir y evolucionar a lo largo del tiempo. Sin embargo, estas diferencias podrían derivarse de la selección de ecosistemas microbianos debido a la dieta de un hospedador o a su sistema inmunológico. Del mismo modo, las comunidades microbianas del intestino pueden estar compuestas de microorganismos ambientales pre-adaptados al entorno bioquímico del Tracto Gastrointestinal (TGI), en lugar de los microorganismos que han co-evolucionado con sus hospederos.

Teniendo en cuenta dicha variación de la microbiota gastrointestinal con la condición de su hospedero, el estudio del conjunto de bacterias dentro de los animales tiene un alto valor ecológico y un gran impacto en cuestiones evolutivas. Sin embargo, la importancia biológica de la microbiota intestinal en las aves sigue siendo desconocida.

Para determinar la composición del ecosistema bacteriano de las aves en este estudio se realizó un método de secuenciación masiva utilizando el gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal a partir de la microbiota fecal de 3 especies de aves de compañía. En el resultado del análisis comparativo de secuencias se encontró una notable diferencia en el porcentaje de especies bacterianas entre las aves de compañía destacando la microbiota fecal de los canarios (*Serinus canaria*) compuesta en su mayoría por *Lactobacillus aviarius* (mediana: 74% de todas las secuencias, la mediana de todas las otras

muestras: 0.2%). El patógeno *Clostridium colinum* estaba presente en concentraciones altas sólo en muestras de cacatúas (*Nymphicus hollandicus* mediana: 21.4%, la mediana de todas las otras muestras: 0.02%).

Con este estudio, se sugiere que existen importantes diferencias en los ecosistemas microbianos del TGI entre las aves estudiadas. Al mismo tiempo, esta investigación proporciona información relevante para futuros estudios sobre la secuenciación del gen 16S relacionando los efectos de la edad, la genética, el medio ambiente y la alimentación de las diferentes especies de aves.

1. INTRODUCCIÓN

Sumado a las demandas de innovación tecnológica para los servicios de diferentes ámbitos sociales, se deben atender las demandas nacionales e internacionales de implementar estrategias de gestión sustentable, para la conservación de los sistemas ecológicos, conformados por factores bióticos, incluyendo a todos los seres vivos, y factores abióticos, siendo estos los factores que no tienen vida pero que determinan el espacio físico en el cual habitan los seres vivos; entre los más importantes podemos encontrar: el agua, la temperatura, la luz, el pH, el suelo, la humedad, el aire y los nutrientes.

Ante dichas demandas, los centros de investigación de instituciones públicas y particulares, realizan investigaciones científicas enmarcadas en líneas de investigación y generación del conocimiento sobre: Auto ecología (ecología de las poblaciones relacionadas genéticamente); Ecología de ecosistemas específicos (lagos, biopelículas, microbiomas; fuentes volcánicas, océanos profundos, etc.); Asociaciones especiales (rizosfera y micorrizas); Ecología biogeoquímica (Biología de los ciclos a nivel local y/o global); y Ecología microbiana aplicada (biorremediación, biotecnología).

Debido a que los ecosistemas microbianos han sido ampliamente utilizados en la producción industrial, se han dejado a un lado las interrelaciones de los organismos dentro de ellos, los cuales no han sido completamente aclarados debido a la compleja composición y estructura de los ecosistemas microbianos naturales. Por lo tanto, es un reto obtener una visión profunda sobre cómo funcionan los ecosistemas microbianos y la interacción con los entornos circundantes (Wagg, 2014).

La Microbiología Ambiental se ha ocupado de los procesos a escala macroscópica, sin considerar en detalle los microambientes. Actualmente se avanza en estudios de la estructura, composición y fisiología de las comunidades microbianas en el ambiente (suelo, aire, agua, biósfera y otros organismos) y comunidades intestinales. Se ha documentado que los microorganismos impactan en los ecosistemas, dado que contribuyen a la formación, mantenimiento y degradación de los suelos; contribuyen en la síntesis y descomposición de la materia orgánica; son fuentes de nutrientes, modifican los sustratos; solubilizan nutrientes, producen sustancias inhibidoras; y aportan una base energética a los ecosistemas (Robinson, 2010).

1.1 Antecedentes

La presente investigación abraza el compromiso de dar respuesta a las demandas nacionales e internacionales antes mencionadas, enfocando estudios sobre la estructura, composición y fisiología de los ecosistemas microbianos del TGI de las aves. La mayoría de los estudios utilizados para identificar especies microbianas realizan técnicas específicas basadas en el cultivo, identificando bacterias en base a su fenotipo (Craven, 2000). Sin embargo, dichas técnicas no son ideales, ya que se estima que cerca del 99.9% de las especies microbianas no se pueden cultivar en condiciones de laboratorio (Rappe, 2003).

La imposibilidad de *cultivar* la mayoría de las especies microbianas, en especial bacterias y arqueas extremófilas, es un desafío mayor debido a que es casi imposible crear el ambiente necesario para su crecimiento (Robinson, 2010). Por lo tanto, el desarrollo de herramientas

moleculares como la secuenciación del 16S del ARN ribosomal (ARNr) y los enfoques de la metagenómica y la metaproteómica están revolucionando el entendimiento del mundo microbiano, la Ecología y la Biología (Baker, 2003).

El método de secuenciación convencional de Sanger fue una de las primeras tecnologías utilizadas para descifrar el orden de nucleótidos en una secuencia genética, el cual replica regiones específicas del ADN bajo condiciones controladas (Sanger, 1977). La secuenciación masiva surge del desarrollo de la Secuenciación de Siguiete Generación (NGS, por sus siglas en inglés: Next Generation Sequencing), la cual ha permitido el desarrollo de técnicas eficientes y de alto rendimiento menos costosas y más rápidas (Xu, 2006).

Los investigadores utilizan el gen que codifica para la subunidad 16S del ARNr debido a que este gen (aproximadamente 1542 nucleótidos de longitud) no ha presentado cambios importantes a lo largo de la evolución, lo cual ha originado la presencia de regiones conservadas (secuencias de nucleótidos idénticas en todos los tipos de bacterias) y regiones variables e hipervariables, las cuales sirven para identificar y catalogar microorganismos en diferentes linajes filogenéticos (Baker, 2003).

Los aislamientos específicos pueden ser secuenciados en un día mediante técnicas de secuenciación de nueva generación. Introducido en 2006, el Illumina Genome Analyzer se basa en la "secuenciación por síntesis" (SBS, por sus siglas en inglés) para producir secuencias de fragmentos de ADN (Mardis, 2008), abarcando lecturas con longitudes más cortas que el Sistema 454. El rendimiento es mucho mayor y, a partir de febrero de 2008,

1.5 GBP se generan en cada serie, durando aproximadamente 3 días. La precisión en bruto se dice que es en 98.5% y el consenso ($3 \times$ cobertura) en el 99.99%. El costo por la base es de aproximadamente 1% del costo para secuenciación de Sanger (Illumina, 2007).

En términos generales, los análisis basados en 16S ARNr han revelado información limitada sobre el papel fisiológico de ecosistemas microbianos dentro de un ambiente intestinal. La secuenciación metagenómica ha permitido a los científicos revelar diferencias significativas en el potencial metabólico de las bacterias en diferentes ambientes (Hugenholtz, 2008). Recientemente, las tecnologías de secuenciación de nueva generación han sido utilizadas para caracterizar la diversidad microbiana y la capacidad funcional de una gama de ecosistemas microbianos en el tracto gastrointestinal de seres humanos (Gill, 2006), así como en varias especies animales (Qu, 2008).

Entre los ejemplos de comunidades microbianas se encuentran las comunidades intestinales. La mucosa intestinal constituye una barrera inmunológica esencial para el hombre y los animales, ya que opera en tejidos involucrados en la defensa del hospedero contra enfermedades infecciosas, así como en la aceptación de los microorganismos del intestino y los antígenos de la dieta (Revolledo, 2006).

Los diferentes microorganismos colonizadores son sensibles a cambios que puedan ocurrir en el TGI del hospedero, por lo que en éste deben existir factores adecuados de pH, temperatura, nutrientes y fluidos esenciales (Jerningan, 1985). Los animales saludables mantienen una población microbiana balanceada del ecosistema gastrointestinal (Yeo,

1977). Si existiese una variación temporal en el ecosistema microbiano puede traer consecuencias importantes ocasionando principalmente susceptibilidad a enfermedades (Stecher, 2011).

En la presente investigación se afirma que las aves son uno de los grupos de los seres vivos, imprescindibles en los sistemas ecológicos, las cuales han co-existido y evolucionado en diferentes ambientes (Wouter, 2013). Pero a la vez, se considera que desafortunadamente las aves son uno de los grupos más desprotegidos por el hombre y siendo escaso el conocimiento sistematizado de procedimientos médicos y/o etológicos para su preservación.

El tracto gastrointestinal de cualquier ser vivo y en particular de las aves es el hogar de un ecosistema microbiano complejo (Pedroso, 2013) el cual tiene un papel importante en aspectos fisiológicos, incluyendo el desarrollo adecuado de la morfología intestinal, así como la función digestiva y el sistema inmune (Leser, 2009). La microbiota intestinal influye positivamente en el huésped, el desarrollo, la bioquímica, inmunología, fisiología, y la resistencia no específica a la infección.

1.2 Objetivo

Teniendo en cuenta la relación de la microbiota gastrointestinal con la condición de su hospedero, el estudio de conjuntos de bacterias dentro de los animales tiene un alto valor

ecológico y un gran impacto en cuestiones evolutivas. Sin embargo, la importancia biológica de la microbiota intestinal en las aves sigue siendo desconocida (Ezenwa, 2012).

Por lo anterior, se declara que actualmente el problema principal es debido a que aún no está descrita científicamente la microbiota intestinal de las aves. De tal manera que para incidir positivamente en la solución del problema declarado, nuestro **objetivo principal** es describir la composición de la microbiota fecal en 3 especies de aves de compañía utilizando una técnica de secuenciación masiva.

Debido a la anatomía del TGI de las aves, donde la cloaca se divide en 3 compartimentos (coprodeo, urodeo, proctodeo) en los cuales desembocan además del intestino, el sistema urinario y reproductivo, no se descarta la probabilidad de que la microbiota fecal de las aves pudiera abarcar además parte de la microbiota reproductiva y urinaria. Se espera que se mantengan los avances en la tecnología de secuenciación utilizando los clústeres de computación, para facilitar la caracterización de los patrones de la comunidad microbiana que van desde las variaciones normales a alteraciones patológicas en personas, animales y otros problemas ambientales y/o del ecosistema.

Con este estudio, se sugiere que existen importantes diferencias en los ecosistemas microbianos del TGI entre las aves estudiadas. Proporcionando a su vez, información relevante para futuros estudios sobre la secuenciación del gen 16s relacionando los efectos de la edad, la genética, el medio ambiente y la alimentación de las diferentes especies de aves.

2. LITERATURA REVISADA

2.1 Anatomía y fisiología de las aves

Las aves son uno de los grupos de seres vivos más interesantes que habitan en el mundo, ya que presentan rasgos fisiológicos, estrategias de desarrollo y dietas extremadamente complejas, logrando adaptarse a diferentes hábitats del mundo a lo largo del tiempo. Hay que recordar que la taxonomía básica de las aves está determinada en una etapa temprana en la historia evolutiva debido a las limitaciones rigurosas impuestas en vertebrados voladores. En consecuencia, las adaptaciones en las aves han sido a lo largo de líneas que no siempre son indicados por los detalles de la anatomía, un hecho que los hace altamente interesantes (Colbert, 1980).

Más de 9.000 especies de aves (más de dos veces que los mamíferos) llenan muchos de los posibles nichos dentro de la red trófica de la tierra. La morfología del tracto gastrointestinal de un ave, su estrategia digestiva, y la capacidad metabólica han estado íntimamente entrelazadas durante la evolución para que coincida con el contenido de nutrientes y los atributos físicos de alimentos disponibles en su hábitat natural (King, 1984). Al comparar el tracto gastrointestinal entre las diferentes especies de aves se descubre que es el sistema de órganos más diverso anatómicamente hablando. Sin embargo, especies separadas consumen alimentos similares y a menudo muestran la convergencia morfológica debido a la presión de selección nutricional y ecológica (Ziswiler, 1985).

Las especies de compañía más comúnmente conservadas son granívoras con una tendencia hacia omnívoras, su TGI parece ser morfológicamente más similar al de los pollos y pavos, que a los pájaros con muy diferentes patrones dietéticos, tales como especies de carnívoros o herbívoros.

La estrategia de alimentación en la dieta de un animal (es decir, el tipo de alimentos que se consumen en estado salvaje) es una herramienta de gran valor nutricional utilizado para clasificar los grupos de animales. Esto nos permite utilizar a las gallináceas como un punto de referencia a la hora de examinar los tractos gastrointestinales de las especies de aves de compañía. El TGI tiene suficiente capacidad morfológica para dar cabida a los cambios en las necesidades nutricionales durante la vida ciclo y para adaptarse a los cambios en las características físicas y nutricionales de la dieta (Diamond, 1991).

En general, la mayoría de las aves del orden *Psittaciformes* consumen dietas basadas en vegetales, y se clasifican como florívoros. Dentro de esta categoría general, se pueden hacer subclasificaciones adicionales basándose en los principales tipos de partes de plantas consumidas. Una subclasificación dentro de los psitácidos incluyen granívoros (grano o dieta a base de semillas, incluyendo periquitos y cacatúas), frugívoros (dieta a base de fruta, incluidos muchos guacamayos), y nectarívoros (dieta a base de néctar, incluyendo loritos y loris). Dentro de la categoría de las aves granívoras, las aves más pequeñas tienden a seleccionar semillas de la hierba y las aves más grandes tienden a seleccionar un aumento de la proporción de semillas de arbustos, que contienen niveles más altos de proteína.

Mientras que las clasificaciones en la dieta se pueden hacer a partir de observaciones de la conducta alimentaria en la naturaleza, ingredientes de la dieta seleccionados por las aves psitácidas han demostrado que varían con el tiempo dependiendo de la disponibilidad, nutrientes, el sexo del ave y la edad. Otra distinción importante en la selección de los productos alimenticios por parte de estas aves es su capacidad para adaptarse y explotar fuentes introducidas, nativas o caseras de comida (Klasing, 1998).

El TGI aviar puede ser considerado uno de los más eficientes de los vertebrados, teniendo una longitud más corta por unidad de peso corporal o área de superficie en comparación con los vertebrados no aviares. Cada sección del tracto gastrointestinal superior, es decir, el esófago, buche, proventrículo y molleja, realiza una función independiente en la mayoría de las aves, incluyendo los psitácidos. Una de las principales características de la digestión gástrica en las aves se debe a que el ácido gástrico es producido en el proventrículo, y la proteólisis gástrica generalmente se produce en gran parte, o totalmente, en un segundo órgano llamado ventrículo o molleja (Figura 1).

El proceso de digestión implica una serie de cambios mecánicos y químicos a los cuales debe someterse el alimento ingerido antes de que pueda ser absorbido en los intestinos. Dichos cambios mecánicos incluyen la deglución, la maceración y trituración de los alimentos en el estómago muscular. La digestión química consiste en la secreción de enzimas del pico, el proventrículo, los intestinos y el páncreas, de la bilis desde el hígado, de ácido clorhídrico en el proventrículo, y de la acción bacteriana. La eficiencia de la digestión y la absorción se ven muy afectados por la actividad secretora digestiva, la

naturaleza física de la comida, y la longitud de tiempo disponible para la absorción (Klasing, 1999).

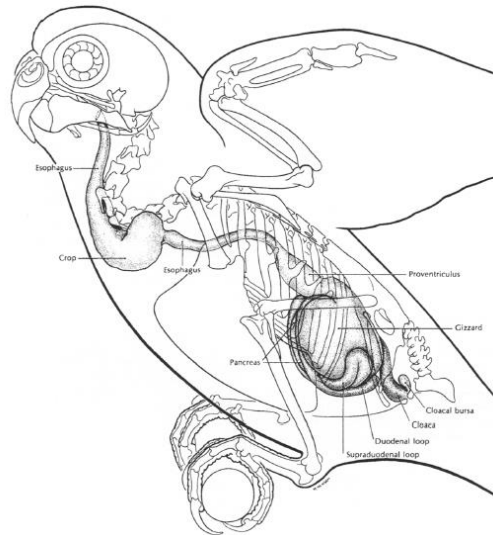


Figura 1. Tracto Gastrointestinal de un periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) (Kirck, 1999).

Cada porción del tracto digestivo proporciona la función para la adquisición, digestión y absorción de nutrientes. La adquisición de alimentos está habilitada por el pico, la lengua y la cavidad oral. Además, el pico de los psitácidos se utiliza para el acicalamiento, cortejo, el comportamiento de los padres, trepar y defenderse. El aparato hioides, que consta de múltiples huesos articulados y su musculatura asociada, moviliza la lengua. Las lenguas de psitácidos contienen una ranura medial de la glotis a la punta, tienen un clavo lingual bien desarrollado, que consta de una cubierta rígida de la cutícula de las superficies ventrales y laterales de la lengua (Homerger, 1985).

Debido a que no se produce la masticación en las aves, el principal requisito para ayudar al proceso de deglución se da mediante la lubricación, que se consigue por la naturaleza

mucinoso de la saliva. Contracciones peristálticas llevan alimentos a lo largo del esófago ya sea para el proventrículo o en el buche. Tres cepas amilolíticas de *Lactobacillus* aisladas del buche del pollo mostraron tener actividades de amilasa similares a los de otras bacterias que hidrolizan el almidón, aisladas del tracto gastrointestinal. Estas enzimas, junto con los de las glándulas salivales, pueden ocasionar la hidrólisis de hidratos de carbono complejos (Jerret, 1978).

Los loros tienen unos 350 receptores del gusto, en comparación con 9.000 en humanos. La mayoría de las papilas gustativas están situadas en el paladar y en la parte posterior de la lengua. Las papilas gustativas del paladar se encuentran normalmente en las regiones donde el epitelio es suave y glandular, típicamente cerca de las glándulas salivales (Berkhoudt, 1985). A pesar de la escasez de papilas gustativas, se ha demostrado que el gusto es un factor importante en la determinación de la aceptación y el rechazo de alimentos para aves. Las aves nectarívoras diferencian entre soluciones de azúcar basado en composición y concentración (Jackson, 1998).

Las glándulas salivales consisten en masas de células secretoras que están dispuestas alrededor de un sistema de conductos en el que parte del contenido de las células secretoras se libera para formar saliva (Homberger, 1986). La forma y tamaño de la lengua también presenta adaptaciones de acuerdo a la recolección, manipulación y deglución de los alimentos (Figura 2). Ligeras diferencias en la anatomía de la lengua se pueden encontrar entre especies de psitácidos. Por ejemplo, las especies de la subfamilia Loriinae (loritos) consumen polen y néctar de las flores y tienen lenguas que son más largas y estrechas que las de los loros (Homberger, 1985).

mecánica y química en el tracto gastrointestinal (Duke, 1986). La forma del buche varía dramáticamente dependiendo de la especie, la cantidad y la forma de la ingesta.

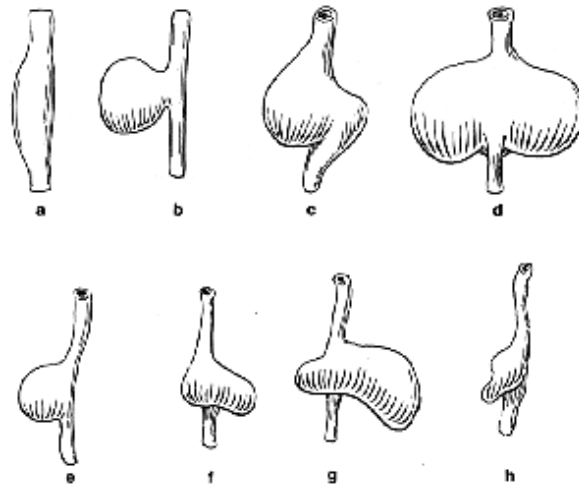


Figura 3. Variaciones en la anatomía del buche de las aves
Algunas formas del buche incluyen a) Gran Cormorán, b) Pavoreal, c) Periquito australiano y d) Paloma doméstica. e-h) Diversas formas en una cacatúa. (McLelland, 1984).

Las etapas iniciales de la digestión de carbohidratos (mediada por la amilasa salival) puede ocurrir en el buche de algunas especies. El buche altamente desarrollado del Hoatzin es inusual. En esta especie, el ventrículo es pequeño, y el buche muscular es el sitio principal para la disociación mecánica de los alimentos (Figura 4).

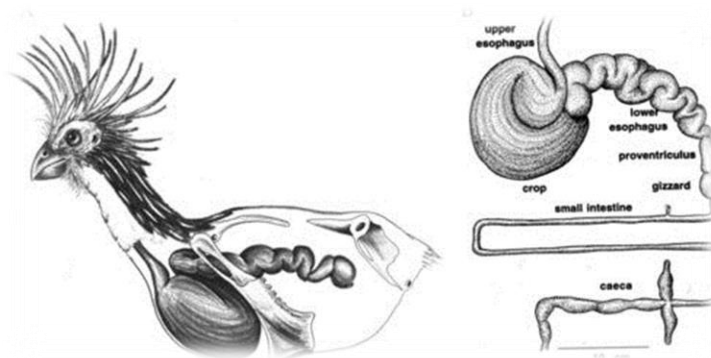


Figura 4. Anatomía del tracto Gastrointestinal del hoatzin.

El proventrículo es una estructura ovoide situado entre la parte inferior del esófago y la molleja y está forrada con una membrana mucosa glandular que contiene la secreción gástrica. El proventrículo y la molleja de las aves psitácidas son variables en su anatomía funcional. Tras la ingesta de alimentos, la mayor parte de este moco se descarga y se sustituye posteriormente con la secreción de la región basal de la célula mucosa (Duke, 1986). La función principal del proventrículo es la producción de jugo gástrico (moco, ácido clorhídrico, y pepsinógeno), la propulsión de zumo y alimentos en la molleja (Figura 5).

El flujo de jugo gástrico el cual contiene un pH de 0.2 a 0.5 es de aproximadamente 8 a 9 ml/kg/h para la familia de aves pertenecientes a las gallináceas, esto excede con mucho la tasa perteneciente al hombre, perro, rata y monos. Incluso el porcentaje basal (sin estímulos) produce una tasa de secreción más alta que otras especies, indicando una alta tasa de actividad digestiva en las aves (Hill, 1971)

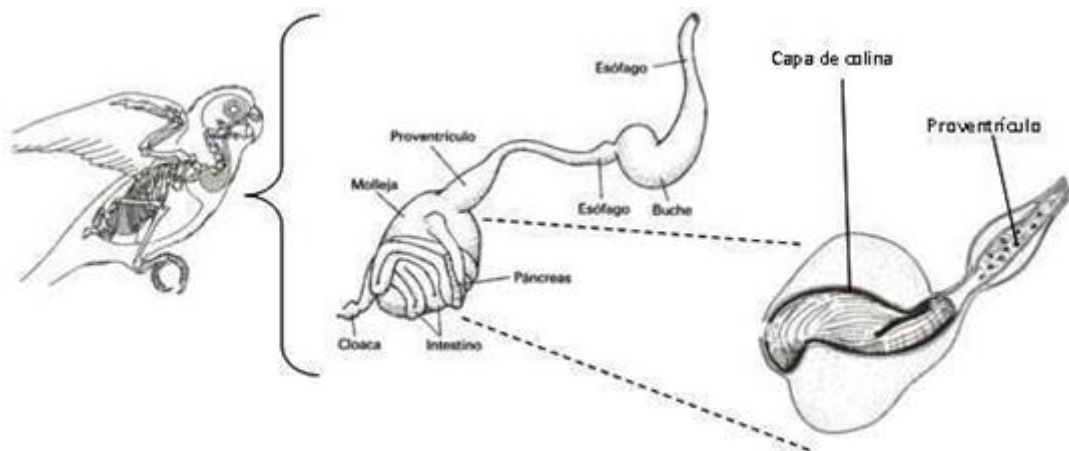


Figura 5. Descripción detallada del tracto gastrointestinal de un periquito australiano. (*Melopsittacus undulatus*) (Kardong, 2006).

En periquitos, las glándulas gástricas se enrollan y ramifican en un solo conducto (Bartels 1997). El ventrículo verdadero o comúnmente llamado “molleja”, posee dos características morfológicas altamente especializadas: la primera se relaciona con el desarrollo muscular, la segunda se relaciona a una capa dura sobre la membrana mucosa gruesa: estas características se refieren a las funciones de la molleja como una cámara de molienda de alimentos y como un sitio de proteólisis (Jones, 1987). La molleja muscular no solo favorece la demolición mecánica de partículas de alimentos, sino que también contribuye a la eficiencia del sistema mediante reflujo (acción muscular de espesor) de la ingesta semilíquida hacia adelante al nivel del (acción muscular delgada) proventrículo, desembocando en el duodeno, donde comienza la absorción. Las altas concentraciones de mioglobina dan a estos músculos su distintiva coloración roja (Klasing, 1998).

El Grit también podrá presentarse en la molleja añadiendo un efecto abrasivo más grueso. El tamaño de la molleja puede cambiar con la dieta, y en la mayoría de las especies silvestres, el tamaño de la molleja sigue un ritmo estacional. Por ejemplo, granívoros tienen una molleja grande y musculosa con una cutícula dura en el invierno cuando comen principalmente semillas; pero en el verano, cuando los pájaros se comen las frutas en su mayoría suaves, la molleja pesa la mitad y tiene una cutícula blanda con poco grano (Gionfriddo, 1996).

Las principales funciones del intestino delgado son la digestión enzimática y la absorción de nutrientes. Las enzimas pancreáticas hidrolizan la mayoría de los almidones, las proteínas y los ácidos nucleicos en los alimentos, pero la proporción de enzimas liberadas durante una comida varía con la especie. La presencia de lactasa no se ha demostrado,

haciendo que los alimentos que contienen lactosa no se digieran (Zoopy, 1969). La absorción de nutrientes se produce a través de las vellosidades intestinales en los enterocitos. Mediante la adaptación de su superficie, las vellosidades facilitan la absorción de nutrientes en esta región.

El ciego de las aves del orden de los Psittaciformes está ausente o vestigial, lo cual resulta en poco o nada de la fermentación del intestino posterior de los hidratos de carbono difíciles de digerir (Figura 6). Muchas especies aviares conocidos, tales como patos, pollos y aves corredoras, tienen un ciego muy grande, que ayudan en la digestión de la vegetación y en el balance de agua (Clench, 1999).

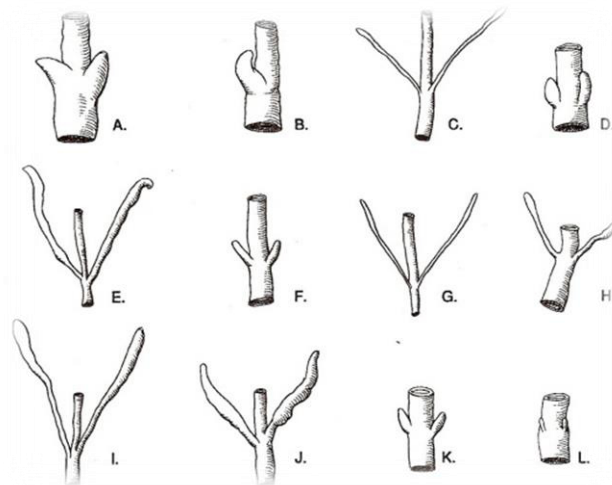


Figura 6. Diferentes Ciegos de aves

(A) Cormoran, *Phalacrocorax niger*, (B) Garcilla bueyera, *Bubulcus ibis*, (C) Ganso pigmeo de algodón, *Nettapus coromandelianus*, (D) Águila culebrera, *Spilornis cheela*, (E) Codorniz común, *Coturnix coturnix*, (F) Tórtola turca, *Streptopelia decaocto*, (G) Avefría roja bigotudo, *Vanellus indicus*, (H) Koel asiática, *Eudynamis scolopacea*, (I) Mochuelo moteado, *Athene brama*, (J) Carraca india, *Coracias benghalensis*, (K) Alondra oriental, *Alauda gulgula*, & (L) Lavandera gris, *Motacilla caspica* (Clench, 1999)

Por lo tanto, el intestino delgado termina en el recto, el cual desemboca en la cloaca. La cloaca actúa como sitio de almacenamiento para la orina y las heces. En muchas especies de aves, el movimiento retrógrado de la orina desde la cloaca hasta el recto permite la reabsorción de proteínas, sales, y agua. Un sinónimo de uso frecuente para el recto aviar es "colon". Es muy corto y pequeño en diámetro en comparación con el intestino grueso de los mamíferos (excepto en el avestruz), por lo que no se conoce adecuadamente como un "intestino grueso". Histológicamente, el recto es similar al intestino delgado, excepto que las vellosidades son más cortas y más ricas en folículos linfoides.

En las aves se observa como elemento diferencial que tienen dos ciegos de escasa magnitud, que realizan una escasa acción microbiana y de absorción de nutrimentos. El intestino grueso (colon) es muy corto y similar al delgado y prácticamente no desempeña ninguna función, mientras que en mamíferos, el intestino grueso continúa absorbiendo agua y nutrientes minerales de los alimentos, además sirve como área de almacenamiento de las heces.

La duración media de tiempo que el alimento se retiene en el tracto gastrointestinal (tiempo medio de retención) depende de las características de los alimentos, estrategia de alimentación, anatomía digestiva, y el tamaño del cuerpo. En general, las aves más grandes tienen TGI más largos y tiempos de retención. La velocidad de paso de la ingesta en aves psitácidas no ha sido bien estudiada. La formulación o la selección de dietas adecuadas para aves cautivas del orden Psitaciformes requiere conocimiento de la estrategia de alimentación de las aves silvestres, la anatomía digestiva y la fisiología, además de

conocimiento específico de las necesidades de nutrientes de las especies o de una especie relacionada.

En resumen, las aves son un grupo de animales con características únicas que las diferencian de otros vertebrados. El aparato gastrointestinal consta de diferentes órganos y sistemas que ayudan en la digestión de los alimentos y protección contra amenazas biológicas y no biológicas. Cada órgano y tejido en el cuerpo de las aves es resultado de fuerzas evolutivas constantes en un esfuerzo por crecer y reproducirse.

Los temas de anatomía y fisiología del aparato digestivo en aves discutidos en este capítulo son soportados en su mayoría por publicaciones de la década de 1990 o incluso anteriores. Es importante recalcar que poco se ha estudiado acerca de estos importantes temas en los últimos años, por lo que la asociación entre caracteres fenotípicos y la microbiota gastrointestinal (ver abajo Sección 2.2 en el presente documento) resulta un desafío para los investigadores relacionados con este tema.

2.2 La microbiota aviar

En los animales, se encuentran las comunidades bacterianas, tanto externa (piel, plumas, escamas) e internamente (Tractus gastrointestinal, reproductivo) de sus anfitriones (Archie, 2011). Aunque muchas bacterias gastrointestinales son comensales, otros son de adaptación por ser central en los procesos fisiológicos fundamentales, o tienen efectos patógenos (Benskin, 2009). Teniendo en cuenta el potencial impacto profundo de la microbiota

gastrointestinal, el estudio de conjuntos de bacterias dentro de los animales es de gran importancia ecológica y evolutiva (Ezenwa, 2012).

La microbiota del tracto gastrointestinal consta de cientos a miles de especies bacterianas que desempeñan un papel importante en el funcionamiento normal del intestino y son cruciales para mantener el organismo en buen estado de salud. Se compone de las poblaciones bacterianas complejas que se han encontrado recientemente para ser específicos del huésped, resultado de las variaciones en los factores ambientales y la genética del huésped.

La principal vía de transmisión tanto para bacterias intestinales malignas y benignas es a través de las heces. La mayor parte de nuestros conocimientos actuales sobre la microbiota intestinal se deriva de los estudios de las heces. Un reto importante en la comprensión de la ecología de la microbiota fecal, sin embargo, es que puede estar compuesto de bacterias de diferentes segmentos dentro del tracto gastrointestinal. Por tanto, es muy importante entender lo que determina la composición de la microbiota fecal.

Se ha demostrado que la microbiota del tracto gastrointestinal afecta en gran medida la salud del huésped a través de diversos papeles funcionales en términos de nutrición, inmunidad, y otros sistemas fisiológicos. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en huéspedes mamíferos, que difieren en sus rasgos fisiológicos de otros taxones (Kohl, 2012). Los animales vertebrados mantienen asociaciones complejas e íntimas con una comunidad diversa de microbios que residen en sus tractos gastrointestinales (Ley, 2008).

Anteriormente, se creía que el principal beneficio de recibir estos microorganismos sería el ser capaz de utilizar las fuentes de alimentos nuevos, tales como la celulosa. Sin embargo, investigaciones recientes han revelado que estos microorganismos juegan un papel importante en muchos aspectos de la fisiología de un animal, incluyendo el desarrollo adecuado de la morfología intestinal y la función digestiva, así como la función inmune (Leser, 2009). Aunque la diversidad de microbiota, así como sus funciones e importancia en la fisiología de mamíferos se ha dilucidado, la importancia biológica de los microbios intestinales en las aves sigue siendo en gran medida desconocida.

Las aves constituyen un modelo útil para el estudio de las causas y consecuencias de la variación en los conjuntos bacterianos. Por ejemplo, las historias de vida contrastantes de las aves y los mamíferos pueden dar lugar a diferencias en los mecanismos de la colonización microbiana. Los mamíferos, por ejemplo, adquieren microorganismos maternos importantes durante el proceso de nacimiento (Palmer, 2007) mientras que las aves son más propensas a adquirir microorganismos después de la eclosión o de otras fuentes, tales como el medio ambiente de anidación o alimentación (Kohl, 2012).

Una de las preguntas centrales en el estudio de las comunidades microbianas en animales es la forma en que se obtienen y cómo la estructura de las comunidades varía con la edad. Las aves nacen de huevos, los cuales en teoría son internamente estériles (Van der Wielen, 2002); sin embargo, para que puedan tener muchas fuentes potenciales de comunidades microbianas, éstas habitan en las cáscaras del huevo sirviendo como fuente de inoculación, pudiendo ser modificadas por el comportamiento de anidación de los padres (Ruiz, 2011).

Sin embargo, las condiciones artificiales en la que se crían los animales cautivos hacen difícil extrapolar los conocimientos de las comunidades de bacterias en animales cautivos a sus contrapartes salvajes (Xenoulis, 2010). Además, la transmisión vertical puede ocurrir en las aves que se alimentan a través de la regurgitación (Figura 7), donde la recepción de los microbios transferidos de los padres es necesaria para la supervivencia (Godoy, 2010).

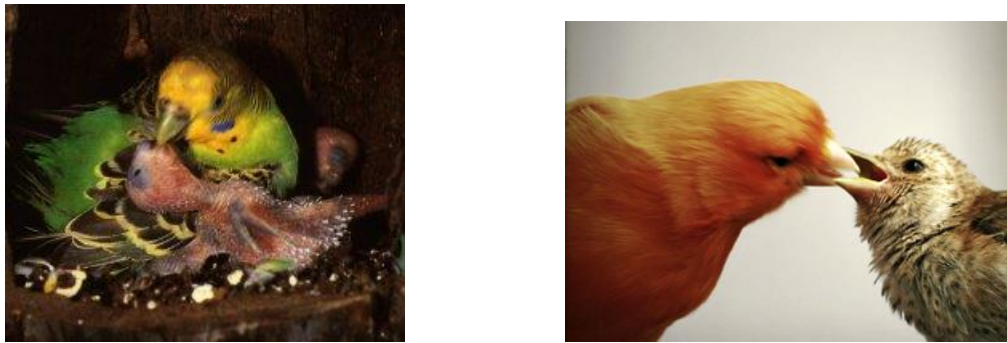


Figura 7. Regurgitación en diferentes especies de aves.

Se ha reportado en avestruces juveniles el consumo de heces de adultos, lo cual también puede ayudar a la colonización microbiana (Cooper 2004). Los pollos y los pavos son capaces de desarrollar una microbiota normal similar a los adultos al salir del huevo, estando completamente separados de éstos, por lo que deben obtener microorganismos de su entorno (Scupham, 2007).

La cloaca aviar tiene una doble función, la excreción (orina y heces) y la transferencia de gametos, creando un potencial importante para que patógenos intestinales se incorporen en los eyaculados, lo que puede facilitar la propagación de las enfermedades de transmisión sexual (Lombardo, 1998). Por otra parte, esta doble función puede proporcionar la oportunidad de obtener a través de la cópula (Figura 8), microbios beneficiosos dado que el

tracto gastrointestinal alberga una proporción sustancial de las bacterias simbióticas mutualistas (Ley, 2008). Sin embargo, las hembras pueden desarrollar estrategias conductuales para reducir el impacto perjudicial de las bacterias de transmisión sexual, tales como el comportamiento de expulsión de espermatozoides post-copulatorio (Wagner, 2004).

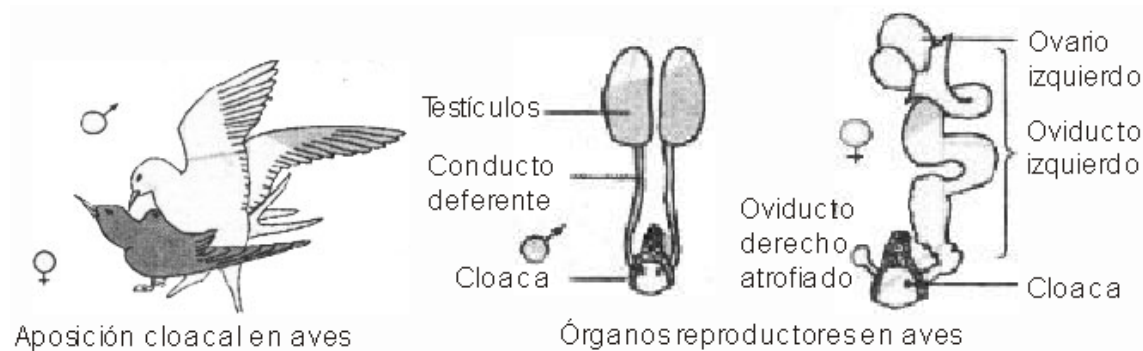


Figura 8. Cópula y aparato reproductor de las aves

Por lo tanto, los huéspedes aviares pueden experimentar una mayor variación en la diversidad y abundancia de microorganismos que colonizan el tracto gastrointestinal. La temperatura puede influir en las comunidades microbianas debido a la diferencia de las tasas de crecimiento y las tolerancias entre especies microbianas.

Las aves mantienen una temperatura corporal más alta en comparación con los mamíferos. La temperatura corporal también varía entre los grupos más altos de las aves; aves corredoras muestran las temperaturas corporales bajas y Passeriformes presentan algunas de las más altas. Es probable que la temperatura alta del cuerpo de las aves seleccione o inhiba el crecimiento de ciertas especies microbianas. Esto se cree que es una adaptación del microorganismo a su huésped aviar. Sin embargo, los estudios todavía no han investigado

el papel de la temperatura corporal en la determinación de las comunidades microbianas gastrointestinales (Clarke, 2008).

Esta variación puede tener efectos de por vida en el fenotipo del huésped, mediada a través de roles microbianos alterados en la fisiología del huésped. Tales correlaciones no excluyen las explicaciones alternativas para la similitud como la exposición conjunta a microorganismos fecales en el nido, el apareamiento selectivo y la transmisión horizontal no sexual, por ejemplo, la alimentación de cortejo o regurgitación (Faustino, 2004).

La microbiota en el tracto gastrointestinal aviar afecta la nutrición, inmunología, y la desintoxicación. Sin embargo, las bacterias parecen tener efectos tanto positivos como negativos en cada una de estas áreas, tales como la liberación de nutrientes, disminuyendo la absorción, la inducción de respuestas inmunes útiles todavía energéticamente costosos o bien, la reducción o el aumento de la toxicidad de las toxinas de la dieta. Por lo tanto, los estudios con una mayor diversidad taxonómica deben llevarse a cabo para dilucidar las compensaciones involucradas en la colonización microbiana de las aves, y específicamente qué roles funcionales son más importantes en términos de aptitud individual.

2.2.1 Técnicas de cultivo

Los ecosistemas microbianos de la biosfera son inmensos, se estima que el 99% de las especies microbianas no pueden ser cultivadas en condiciones de laboratorio (Rappe, 2003). La importancia de esto se debe a que después de casi dos siglos de la microbiología como ciencia, se sabe muy poco acerca de la inmensa parte de la diversidad microbiana en

nuestro planeta. El acceso a esta diversidad microbiana resulta muy importante por dos razones fundamentales: probablemente juega un papel relevante en la función de la biosfera, y muy posiblemente representa un mundo sin explotar de nuevos compuestos bioactivos (Lewis, 2010). El aprendizaje de la naturaleza de la diversidad microbiana es ampliamente reconocida como uno de los retos más importantes que enfrenta la microbiología (Hurst, 2005).

Han existido varios esfuerzos para caracterizar la diversidad microbiana del intestino aviar; Sin embargo, la mayoría de estos estudios utilizan técnicas selectivas, basadas en el cultivo, para investigar especies microbianas de interés, y en gran medida se centran en la identificación de la microbiota potencialmente patógena (Gaukler, 2009).

El cultivo convencional de microorganismos es laborioso, consume tiempo, y, lo más importante, el crecimiento de microorganismos específicos es selectivo y sesgado. La mayoría de las colonias bacterianas fueron obtenidas de la naturaleza y se visualizaron por microscopía siendo viables, pero por lo general no formaban colonias visibles en las placas (Figura 9). Este fenómeno puede reflejar las condiciones artificiales inherentes en la mayoría de los medios de cultivo (por ejemplo, concentraciones extremadamente altas en sustratos o la falta de nutrientes específicos necesarios para su crecimiento) (Eilers, 2000).

Existen técnicas moleculares independientes del cultivo las cuales han iluminado la enorme diversidad microbiana que existe en nuestro planeta y que han servido para definir cerca de 40 microorganismos a nivel de filo existentes dentro del dominio Bacteria. La mayor parte de estos microorganismos, sin embargo, están mal representados por los microorganismos

cultivados, y al menos 13 siguen siendo candidatos representados sólo por las secuencias de genes del medio ambiente (Hugenholtz, 1998).

Un número significativo de nuevos métodos de cultivo se han introducido durante los últimos diez años, todo lo cual lleva a un aumento significativo en la recuperación microbiana. Sin embargo, las razones por las que muchas especies no crecen en el laboratorio no se comprenden del todo. Tres maneras parecen prometedoras para profundizar esos esfuerzos. El método de fuerza bruta es simplemente aumentar el esfuerzo de cultivo convencional y la geografía de muestreo. El enfoque más específico es doble. Uno es incubar durante plazos más largos, a la espera de células latentes y formar colonias. Uno de los experimentos de incubación más largos realizados hasta la fecha empíricamente mostró que las colonias obtenidas de este modo no son un grupo de 'crecimiento lento' especializados. En cambio, representan especies 'normales', capaces de proliferación rápida, que aparecieron tarde durante la incubación inicial, aparentemente en forma estocástica (Buerger, 2012).



FIG. 2. Diversas técnicas para el aislamiento por estrías

Figura 9. Diversas Técnicas para aislamiento de bacterias.

Parece cierto que la investigación de la última década se trasladó del cultivo microbiano a un nivel cualitativamente diferente. En retrospectiva, no es de extrañar que la principal lección aprendida sea que imitar las condiciones naturales mejora el éxito del cultivo. La explicación más simple y lo más típico es que una estrecha relación entre la incubación y las condiciones ambientales ofrecen microorganismos con los factores de crecimiento adecuados en la concentración correcta.

Para descubrir y caracterizar la diversidad microbiana existen estudios basados en las nuevas tecnologías de secuenciación, técnicas de aislamiento, microfluídica y metagenómica entre otros. Estos enfoques han contribuido al descubrimiento de nuevos genes a partir de muestras ambientales, a la caracterización masiva de genes funcionales y filogenéticos. Las nuevas herramientas están cambiando la forma en que estudiamos el medio ambiente, el aumento de la resolución de las comunidades microbianas, sus complejidades y dinámica, se pueden estudiar para revelar su potencial genético y su diversidad funcional.

Se están tomando esfuerzos renovados en aislamiento para capturar más de la diversidad funcional microbiana. Estos nuevos métodos demuestran que el cultivo es a menudo posible si se imitan las condiciones del lugar. En contraste con el cultivo tradicional, las condiciones de aislamiento deben reflejar mejor los entornos naturales en términos de nutrientes (composición y concentración), los niveles de oxígeno, pH y asociaciones naturales con otros microorganismos (Figura 10).



Figura 10. Diversidad de medios de cultivo para el crecimiento y aislamiento bacteriano.

2.2.2 Métodos moleculares

El descubrimiento de nuevos microorganismos y su caracterización, así como sus funciones, son los principales objetivos en el estudio de la diversidad microbiana. Históricamente, esto se logró a través del cultivo y la posterior caracterización de cepas. Décadas más tarde, los métodos independientes del cultivo han proporcionado nuevas herramientas para estudiar el ecosistema microbiano.

Las estimaciones actuales indican que más del 99% de los microorganismos presentes en muchos ambientes naturales no son fácilmente cultivables y por lo tanto no es accesible para la biotecnología o la investigación básica. De hecho, la mayoría de las especies en muchos entornos nunca han sido descritas, y esta situación no va a cambiar hasta que se desarrollen nuevas tecnologías. Además, muchos enfoques actualmente utilizados para

explorar la diversidad y el potencial de las comunidades microbianas están sesgadas debido a las limitaciones de los métodos de cultivo (Amann, 1995).

La microbiota gastrointestinal tiene una de las densidades microbianas más altas para cualquier ecosistema y en las aves de corral se extiende desde 10^7 hasta 10^{11} bacterias por gramo de contenido intestinal (Apajalahti, 2004). Estudios anteriores han utilizado enfoques predominantemente dependientes del cultivo para la identificación de la composición de la microbiota intestinal de aves de corral. Sin embargo, un gran número de bacterias permanecen sin identificar debido a la falta de conocimiento de las condiciones de cultivo apropiadas. Además, el cultivo y las técnicas bioquímicas han dado lugar a la clasificación errónea de algunas bacterias (Tellez, 2006).

Estudios moleculares recientes dirigidas al ADN bacteriano en el intestino de aves de corral han dado una visión más detallada de la composición de la comunidad microbiana (Gong, 2002). A partir de estudios moleculares se estima que la microbiota cecal consta de al menos 640 especies, 140 géneros, siendo el 10% de las secuencias de las bacterias identificadas del gen 16S ARNr, representando especies bacterianas conocidas anteriormente, y las secuencias restantes pertenecen a nuevas especies o incluso géneros nuevos (Apajalahti, 2004). Sin embargo, la mayoría de las técnicas moleculares que se utilizan actualmente para estudiar la microbiota intestinal son incapaces de caracterizar la comunidad bacteriana en un único ensayo o no son propicias para análisis de alto rendimiento.

Para superar las dificultades y limitaciones asociadas con las técnicas de cultivo, se han desarrollado varios métodos moleculares basados en el ADN. En general, los métodos de análisis de genes basados en el 16S ARNr proporcionan una amplia información sobre los taxones y especies presentes en un entorno. Sin embargo, estos datos ofrecen poca o ninguna información sobre el papel funcional de los diferentes microorganismos dentro de la comunidad y la información genética que contienen. Por el contrario, la metagenómica al ser un estudio que utiliza el conjunto de genomas de un determinado entorno directamente a partir de muestras de ese ambiente, sin necesidad de aislar y cultivar esas especies, es un nuevo y rápido desarrollo de campo, que trata de analizar los complejos genómicos de nichos microbianos.

Recientemente, la metagenómica proporciona una exploración basada en los genes de dicha comunidad, mientras que el aislamiento y el cultivo continúan como la principal estancia para probar las capacidades metabólicas y estudios genómicos más detalladas de los distintos miembros de esta comunidad. Al tomar cada vez más muestras del entorno, se hizo evidente que la mayoría de los microorganismos aún no se han cultivado, impulsando el desarrollo de nuevos métodos para dar a conocer lo desconocido. Estos métodos se benefician de los avances en la secuenciación y el aislamiento, permitiendo a los investigadores estudiar las comunidades microbianas en sus entornos naturales y con una resolución más alta (Rappe, 2003).

Las técnicas actuales proporcionan una gran oportunidad para superar el requisito para el cultivo y se ha incrementado, por tanto, en gran medida nuestra comprensión de la diversidad y funcionalidad microbiana en el medio ambiente. Estos métodos se basan en la caracterización de los componentes celulares tales como ácidos nucleicos, proteínas, ácidos

grasos y otros compuestos específicos (Rosello, 2001). Tales moléculas pueden ser extraída directamente de muestras ambientales sin la necesidad de cultivo y el análisis de la composición molecular se puede utilizar para elucidar la composición de la comunidad microbiana (Amann, 1995).

Afortunadamente, los avances han permitido inventarios más completos de la comunidad microbiana intestinal. Con el advenimiento de la clonación y secuenciación de ARN ribosomal, se accede a los genes directamente desde el entorno para explorar la diversidad filogenética de las comunidades microbianas naturales.

La aplicación generalizada de métodos de clonación y secuenciación del gen 16S ARNr para identificar microorganismos en muestras naturales ha revelado una extensa y, en muchos casos, una diversidad insospechada dentro del dominio bacteriano. Además de descubrirse con estos métodos moleculares que secuencias de clon recuperados no pertenecían a cualquiera de los filos bacterianos conocidos (Rappe, 2003).

Se sabe que existe una amplia variedad de artefactos (clones de genes quiméricos, errores de PCR, la secuencia de errores) y errores metodológicos (alineación incorrecta, etc.) los cuales podrían causar la mala colocación de secuencias de clon de genes en los árboles filogenéticos, la observación de los clones no afiliados de diferentes estudios con frecuencia se agrupan en los análisis posteriores para formar grupos monofiléticos. Así mismo, se formaron grandes líneas de descenso dentro del dominio bacteriano que no contenía parientes cultivados, ya que estos linajes se han conocido como candidatos o filos,

lo que implica que todavía no existen cultivos para representar al grupo (Hugenholtz, 1998).

Existen diferentes filos bacterianos los cuales son altamente divergentes de las secuencias, siendo filogenéticamente equivalente a los filos de microorganismos cultivados. Debido a que las bases de datos de secuencias y métodos filogenéticos siguen evolucionando y/o se emplean enfoques genómicos comparativos la resolución de estas relaciones se aclarará pronto (Rappe, 2003). Se puede esperar que el número de nuevos genes identificados a través de tecnologías de metagenómica superará el número de genes identificados a través de la secuenciación de los microorganismos individuales.

Sin embargo, el problema no sólo radica en la acumulación de estas secuencias, sino en la comprensión de la función de estos nuevos genes y proteínas dentro de los ecosistemas microbianos y su papel en los ciclos globales. Además, no se requiere conocimiento previo de las especies bacterianas particulares para detectar los cambios generales en la composición de la comunidad microbiana. Para esto existen las unidades taxonómicas operacionales (OTUs), que representan a determinadas especies bacterianas o grupos taxonómicamente relacionados, los cuales pueden ser identificados y relacionados con las medidas de desempeño de las aves (Torok, 2008).

La secuenciación de alto rendimiento ha facilitado grandes avances en nuestra comprensión de la ecología microbiana y ahora está muy extendida en aplicaciones biotecnológicas de Medicina. Marcadores tales como el gen de ARNr 16S (16S) de las bacterias y arqueas se

utilizan con frecuencia para caracterizar la composición taxonómica y la diversidad filogenética de muestras ambientales.

Dado que los estudios de genes marcadores se centran en uno o unos pocos genes universales, no se pueden identificar directamente su función metabólica u otras capacidades funcionales de los microorganismos. Por el contrario, la secuenciación metagenómica pretende probar todos los genes de una comunidad y puede predecir una función metabólica detallada y perfiles funcionales.

Aunque se necesita la secuenciación para caracterizar la diversidad de una muestra (Kuczynski, 2010), se requiere un examen profundo, y por lo tanto costoso, la secuenciación permite acceder a organismos y genes diferentes (Knight, 2012). Por lo tanto, el gen marcador de perfiles de grandes colecciones de muestras es ahora rutinario, pero en el fondo la secuenciación metagenómica a través de muchas muestras resulta excesivamente costosa.

Las estrategias de secuenciación de genes marcadores difieren en el tipo de información producida, la filogenia y la función biomolecular permanecen correlacionadas. Los árboles filogenéticos basados en el 16S se parecen mucho a grupos obtenidos sobre la base de contenido de genes compartidos, y los investigadores suelen inferir propiedades de los organismos no cultivados de parientes cultivados (Snel, 1999).

La correlación entre la filogenia y atributos funcionales depende de factores que incluyen la complejidad de un rasgo, pero el grado global de correlación sugiere que puede ser

fructífero para predecir las funciones codificadas en el genoma de un organismo sobre la base de funciones codificadas en genomas estrechamente relacionados.

2.3 Secuenciación

Con su enfoque en los ensamblajes ecológicamente pertinentes de los microorganismos, la metagenómica (evaluación de fragmentos de ADN recogidas al azar de una comunidad microbiana) ha revelado un nuevo mundo de la diversidad y la complejidad microbiana. Los estudios de metagenómica pueden estar motivados por varios objetivos, entre ellos el descubrimiento de nuevos genes de interés, la validación de hipótesis metabólicas (García, 2006), el perfil de la relación entre la composición de la comunidad microbiana y la variación en el medio ambiente. Por esto, la evaluación detallada de las comunidades microbianas requiere el uso de secuenciación masiva.

En la mayoría de los casos, el ADN genómico define las especies y los individuos, lo que hace que la secuencia de ADN sea fundamental para la investigación sobre las estructuras y funciones de las células y la decodificación de los misterios de la vida. Existen tecnologías de secuenciación de ADN las cuales podrían ayudar a los biólogos y los proveedores de atención de la salud en una amplia gama de aplicaciones tales como la clonación molecular, la cría, la búsqueda de genes patógenos, los estudios comparativos y evolutivos. Las tecnologías de secuenciación de ADN idealmente deberían ser rápidas, precisas y fáciles de operar, además de ser económicas.

En los últimos treinta años, las tecnologías de secuenciación de ADN y sus aplicaciones han experimentado un enorme desarrollo y actúan como el motor de la era del genoma que se caracteriza por una gran cantidad de datos del genoma y posteriormente una amplia gama de áreas de investigación y múltiples aplicaciones (Church, 1994).

En 1977, Frederick Sanger desarrolló la tecnología de secuenciación de ADN que se basa en el método de terminación de cadena (también conocida como la secuenciación de Sanger), y Walter Gilbert desarrolló otra tecnología de secuenciación basado en la modificación química del ADN y la posterior escisión en bases específicas. Debido a su alta eficiencia y baja radiactividad, se adoptó la secuenciación de Sanger como la tecnología principal en la "primera generación" de laboratorio y aplicaciones de secuenciación comerciales (Sanger, 1977). En ese momento, la secuenciación del ADN fue laboriosa y radiactiva, sin embargo, después de años de mejora, Applied Biosystems presentó la primera máquina de secuenciación automática en 1987, utilizando la electroforesis capilar, la cual hizo la secuenciación más rápida y precisa. AB370 podría detectar 96 bases de una vez, 500 K bases de un día, y la longitud de lectura podría llegar a 600 bases.

Los instrumentos de secuenciación automática y el software asociado al uso de las máquinas de secuenciación capilar y tecnología de secuenciación de Sanger se convirtieron en las herramientas principales para la realización del proyecto del genoma del ser humano en 2001 (Collins, 2003). Este proyecto estimuló en gran medida el desarrollo de instrumentos poderosos de secuenciación para aumentar la velocidad y exactitud, al mismo

tiempo reducir costos y mano de obra, desarrollándose así la Secuenciación de Nueva Generación (SNG) (Mardis, 2008).

Las tecnologías SNG son diferentes del método de Sanger en los aspectos del análisis masivo en paralelo, alto rendimiento, y un costo reducido. Existen tres sistemas de secuenciación masivamente paralelas más típicos de la Secuenciación de Nueva Generación (SNG) que comparten un buen rendimiento, exactitud, y un bajo costo en comparación con la secuenciación de Sanger.

La comprensión de las diferencias en la composición de las comunidades microbianas es de gran importancia en la ecología microbiana. Los avances en la tecnología de secuenciación han permitido caracterizar a muchas comunidades microbianas utilizando secuencias de genes amplificadas directamente de muestras ambientales.

Existen al menos dos parámetros importantes de las comunidades, incluidas las comunidades microbianas: la diversidad individual (diversidad dentro de cada muestra, por ejemplo, el número de especies observadas en un medio ambiente), y la diversidad biológica (partición de la diversidad biológica entre los entornos a lo largo de un gradiente, por ejemplo, el número de especies compartidas entre dos ambientes). Estas medidas se pueden dividir en dos categorías: medidas cualitativas, que utilizan la presencia/ausencia de datos para comparar la composición de la comunidad, y las medidas cuantitativas, que también toman en cuenta la abundancia relativa de cada tipo de organismo (Lozupone, 2007).

Las técnicas de cultivo existentes no son rutinariamente capaces de capturar la diversidad microbiana total de las comunidades microbianas complejas que se encuentran en el tracto intestinal de los animales. Por lo tanto, las técnicas moleculares que analizan el ADN directamente son a menudo empleadas. En la mayoría de los casos, el gen 16S ARNr se amplificó a partir de ADN extraído total usando cebadores "universales" para atacar las regiones conservadas del gen, y los productos resultantes de la PCR se secuencian para identificar las especies de bacterias presentes. Con el advenimiento de la secuenciación de alto rendimiento, este enfoque de la definición de diversidad en poblaciones microbianas complejas ha entrado en su cuenta, ya que millones de secuencias ahora se pueden obtener de forma más económica y rápida.

Tradicionalmente, el estudio de los genes de los entornos naturales incluye la clonación de ADN en un vector, la inserción de dicho vector en un huésped y su posterior secuenciación de Sanger. Los métodos de secuencia por síntesis son más rápidos, baratos y simples para la secuencia del genoma. Las nuevas tecnologías de secuenciación difieren en tipo de salida, una longitud de lectura, velocidad y distribución de tasa de error.

Diferentes secuenciadores están siendo utilizados para diferentes aplicaciones: estudios de secuenciación del genoma y genes, análisis de ARN pequeño, y la comparación de cepas estrechamente relacionadas o variantes de cepas. Estos métodos compensan sus deficiencias de longitud de lectura y el error de polarización con la salida masiva, su cobertura, velocidad y simplicidad. Por lo tanto, con el uso de las nuevas metodologías de secuenciación, es posible crear una situación donde la limitación no es la capacidad de

producir datos de secuencia, sino la capacidad de almacenar y analizar dichos productos en nuevas formas reveladoras (Shendure, 2008).

Una de las principales ventajas de las nuevas tecnologías de secuenciación es la reducción sustancial de los costos, la democratización de la genómica y realizar listados de genes viables como una forma de descubrir nuevos microorganismos. Esto es especialmente útil para el estudio de las comunidades microbianas por análisis de genes 16S ARNr. Mediante la combinación de cebadores que hibridan en las regiones hipervariables del gen 16S ARNr con códigos de barras de nucleótidos, ahora es más factible para estudiar entornos con miles de secuencias en el momento.

En resumen, el análisis comparativo de la subunidad 16S ARNr se utiliza comúnmente para estudiar los componentes de las comunidades microbianas (Harris, 2004), para inferir la evolución bacteriana y el diseño de herramientas de seguimiento y análisis, tales como microarrays (Castiglioni, 2004). Debido a que la tasa de producción de la subunidad 16S ARNr para los organismos no cultivados ahora supera la tasa de producción para sus contrapartes cultivadas, los registros de secuencias de genes, así como la colocación taxonómica de las secuencias quedan obsoletas.

Las regiones hipervariables específicas, son lo suficientemente cortas (100-350 bases) que deben cubrir algunas de las nuevas tecnologías de secuenciación aún el tiempo suficiente para ser informativo para la clasificación de las bases de datos de ARNr actual (proyectos de bases de datos ribosomal (RDP), Greengenes, Silva), a pesar de que son pobres para la filogenia en comparación con la longitud completa del gen 16S ARNr (>1500 pb). El

primer estudio masivo de genes 16S ARNr fue de sedimentos de aguas profundas utilizando la región hipervariable V6 (Sogin, 2006). Desde entonces, otras regiones se han utilizado para estudiar los suelos de regiones tropicales y templadas (Roesch, 2007).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Dado que a la fecha, no hay datos disponibles acerca de la composición de la microbiota intestinal de las aves, en la presente investigación se aplicaron los siguientes materiales y métodos, para la caracterización de la composición de la microbiota fecal en 3 especies de aves de compañía.

3.1 Colección de heces

Se tomaron muestras de heces frescas de tres especies de aves de compañía Periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*), Ninfas (*Nymphicus hollandicus*) y Canario común (*Serinus Canaria*). Dichas heces fueron recolectadas de aves pertenecientes a propietarios privados, empresas locales en Monterrey y su área metropolitana ubicados en el noreste de México (ver Anexo 1).

Se decidió trabajar con estas aves de compañía debido a que son una de las mascotas más comunes en la región, principalmente, el periquito australiano, el cual posee diferentes gamas de colores en su plumaje, lo que lo hace vistoso y popular entre la población, además de ser económico, de agradable canto y fácil manejo. En comparación con los canarios, los cuales son más costosos, más pequeños, de plumaje menos vistoso, sin embargo poseen un

canto excepcional principalmente los machos, siendo más populares entre la población de adultos mayores. Por último, las ninfas son aves mucho más grandes, más costosas, poseen un plumaje opaco principalmente, llegando a reproducir sonidos del ambiente o bien aprendidos en el hogar, haciéndolas más ruidosas, por lo tanto, es un ave que es menos popular en el hogar.

Estas tres especies de aves son interesantes no sólo por su estrecho contacto con los seres humanos, sino también debido a que 2 especies entran en el orden de Psittaciformes (Periquito australiano, ninfa) originarias del continente australiano y mientras que la última especie entra en el orden Passeriforme (canario), siendo nativo de las Islas Canarias al noroeste de África. Por lo tanto, estas aves pueden utilizarse para obtener datos sobre el efecto del origen de hospedero en la composición de la microbiota fecal en las aves.

Las muestras se obtuvieron a partir de jaulas con diferente número de aves (2-33) y por lo tanto cada muestra representa un agregado de heces por jaula. Se procedió a retirar la bandeja metálica de la parte inferior de la jaula, limpiando la base y colocando papel nuevo y limpio sobre ella. Se esperó a que las aves defecaran en el papel sin realizar ningún manejo en ellas lo que propició a una toma de muestras con el menor estrés. Una vez teniendo la base con el papel defecado, se procedió a la recolección de heces.

Se colocó guantes estériles, y con un hisopo, las heces fueron recolectadas y almacenadas en un tubo Eppendorf de 2 ml. Dicha recolección se realizó en un lapso de 20 a 60 minutos, hasta que dicho tubo de plástico de 2 ml se llenó con heces. Una vez colectada toda la muestra, se colocó el tubo en una hielera, siendo transportadas a nuestro laboratorio

de Virología el cual se ubica en el tercer piso de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el municipio de Escobedo, congelándose a -20°C hasta su procesamiento.

3.2 Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN a partir de las muestras congeladas. ADN genómico total fue extraído de 100 mg de todas las muestras utilizando un estuche comercial (Wizard, Promega) siguiendo el protocolo establecido por el proveedor. Este estuche produjo más ADN ($> 40 \mu\text{g} / \mu\text{L}$) que los estuches basados en columnas utilizadas en estudios anteriores (García-Mazcorro, 2011).

3.3 Secuenciación

Las muestras de ADN genómico total fueron procesadas en el Laboratorio de Investigación Molecular ubicado en la ciudad de Shallowater, Texas, EE.UU. Los primers 515/806 fueron utilizados para amplificar la región V4 del gen que codifica para la subunidad 16S del ARNr. Se utilizaron una PCR de 30 ciclos utilizando el Kit HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen, EE.UU.) bajo las siguientes condiciones: 94 ° C durante 3 minutos, seguido por 28 ciclos de 94 ° C durante 30 segundos, 53 ° C durante 40 segundos y 72 ° C durante 1 minuto, después de lo cual se realizó una etapa de elongación final a 72 ° C durante 5 minutos. Después de la amplificación, los productos PCR fueron comprobados en un gel de agarosa al 2% para determinar el éxito de la amplificación y la intensidad relativa de las bandas. Múltiples muestras se agruparon en proporciones iguales en función de sus

concentraciones de ADN y peso molecular. Las muestras combinadas se purificaron utilizando perlas calibradas Ampure XP. Después, el producto de PCR purificado se agrupó y se utilizó para preparar la biblioteca de ADN siguiendo el protocolo de preparación de biblioteca de ADN TruSeq Illumina.

Illumina difiere de otras plataformas comunes de secuenciación, tal como 454, en que los investigadores generalmente obtienen dos archivos de lectura desde el proveedor de la secuenciación (lecturas forward y reverse). Las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) se definieron por la agrupación al 3% de divergencia (97% de similitud).

3.3.1 Bioinformática

El presente trabajo utilizó Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME) v.1.8 usando los archivos crudos formato .fastq, los cuales fueron compartidos por el Laboratorio de Secuenciación a través de BaseSpace. El análisis se realizó usando ambos archivos por separado, así como el archivo conteniendo los archivos de lecturas unidas. El script `join_paired_ends.py` de QIIME fue usado para unir las lecturas.

3.4 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se contempló el utilizar la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. En estadística, la prueba de H Kruskal-Wallis es un método no paramétrico para probar si un grupo de datos proviene de la misma población. Esta prueba asume que bajo la

hipótesis nula los datos vienen de la misma distribución. Sin embargo, solo análisis descriptivos fueron utilizados.

La diversidad alfa se estimó a través del número de OTUs, el índice de Shannon, y la métrica Chao1. El resultado se podrá colocar en medidas tanto ponderada, la que toma en cuenta los cambios en la abundancia relativa taxonómica y las no ponderadas, siendo éstas las que no tienen en cuenta la información sobre la abundancia taxonómica, con el UniFrac se utilizaron estas medidas para la diversidad beta (Lozupone, 2007).

4. RESULTADOS

Se recogieron muestras fecales de 171 aves pertenecientes a 11 localidades diferentes dentro de Monterrey y su área metropolitana en el noreste de México. Dichos ejemplares pertenecían a dueños particulares y establecimientos comerciales los cuales nos facilitaron el acceso a sus instalaciones para poder realizar la toma de muestra y así proceder con la investigación.

Utilizando un hisopo, se recolectaron heces frescas de un total de 100 periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) teniendo 12 muestras de estos, 55 canarios (*Serinus canaria*) obteniendo 6 muestras y 16 ninfas (*Nymphicus hollandicus*) con 4 muestras. Todos los ejemplares se mantuvieron con alimento a libre acceso, teniendo como “cama” una hoja de papel periódico la cual se colocaba nueva antes de la recogida de muestras para minimizar la contaminación.

Debido a que no se contaba con estudios previos sobre la caracterización de la microbiota en aves, las muestras fueron tomadas sin importar el parentesco de los ejemplares, la edad de éstos, las diferentes locaciones, la diferencia de sexo al existir una mezcla de hembras y machos, así como la dieta diferente entre cada uno, abarcando así todos los posibles factores que pudieran afectar el ecosistema microbiano de las especies, dándonos una idea para estudios posteriores.

4.1 Proporciones Relativas

Utilizando el análisis de proporciones relativas de secuencias se encontró una notable diferencia en el porcentaje de especies bacterianas entre las aves de compañía en las diferentes clasificaciones taxonómicas.

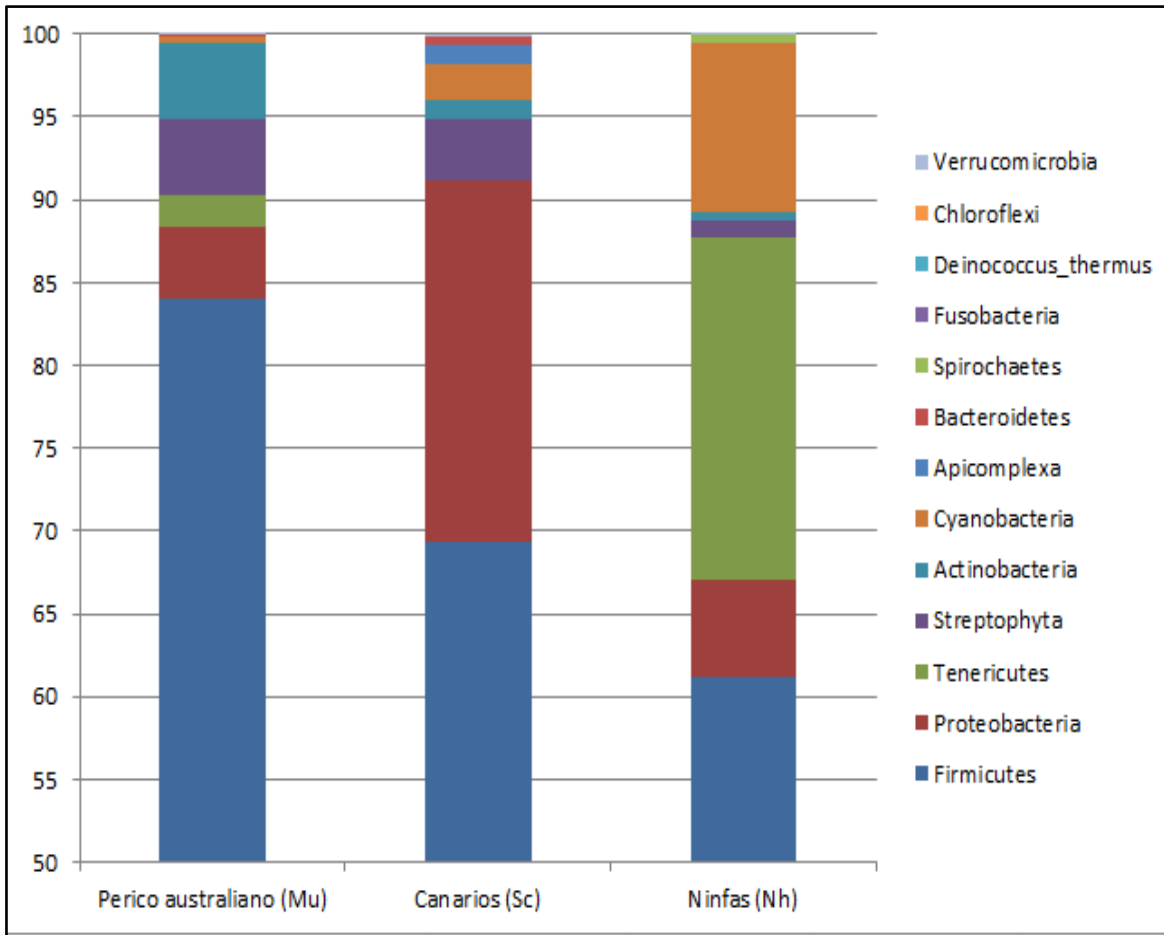


Figura 11. Composición de microbiota fecal en 3 especies de aves de compañía a nivel taxonómico de Filo. Mu: *Melopsittacus undulatus* (Perico australiano); Nh: *Nymphicus hollandicus* (Ninfas); Sc: *Serinus canaria* (Canarios). El axis y (porcentaje de secuencias) fue modificado para permitir la visualización de los filis poco abundantes. (Ver Anexo 2).

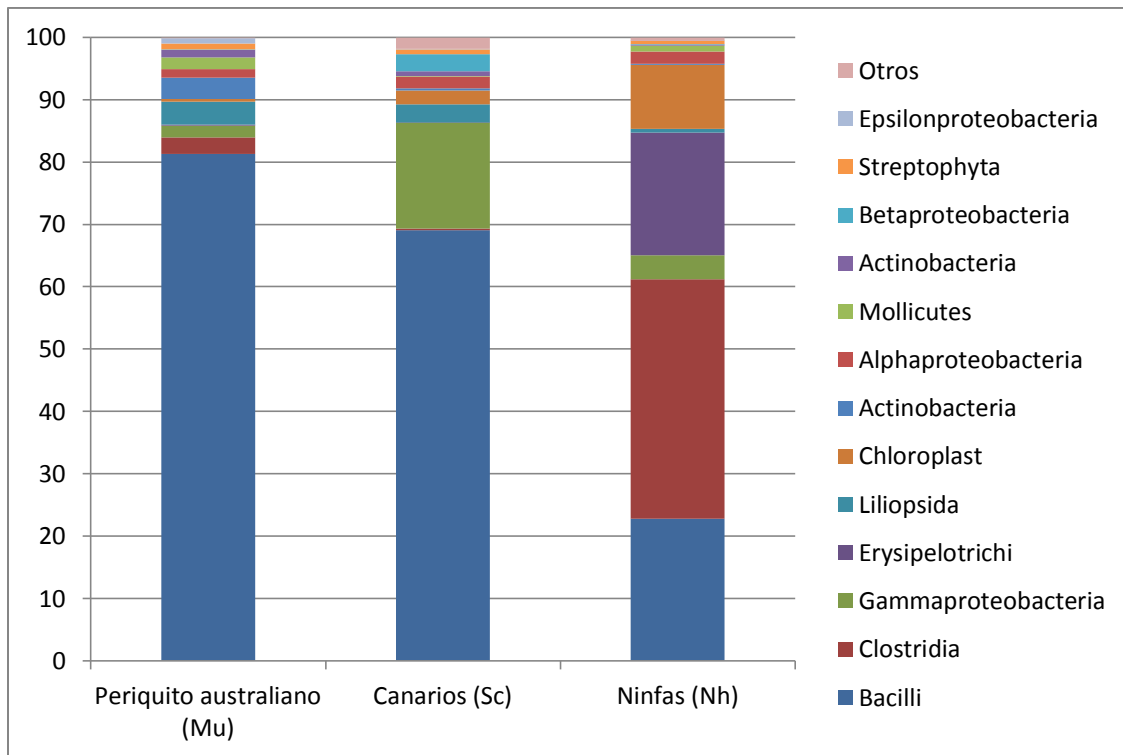


Figura 12. Composición de microbiota fecal en 3 especies de aves de compañía a nivel taxonómico de clase (Ver Anexo 3).

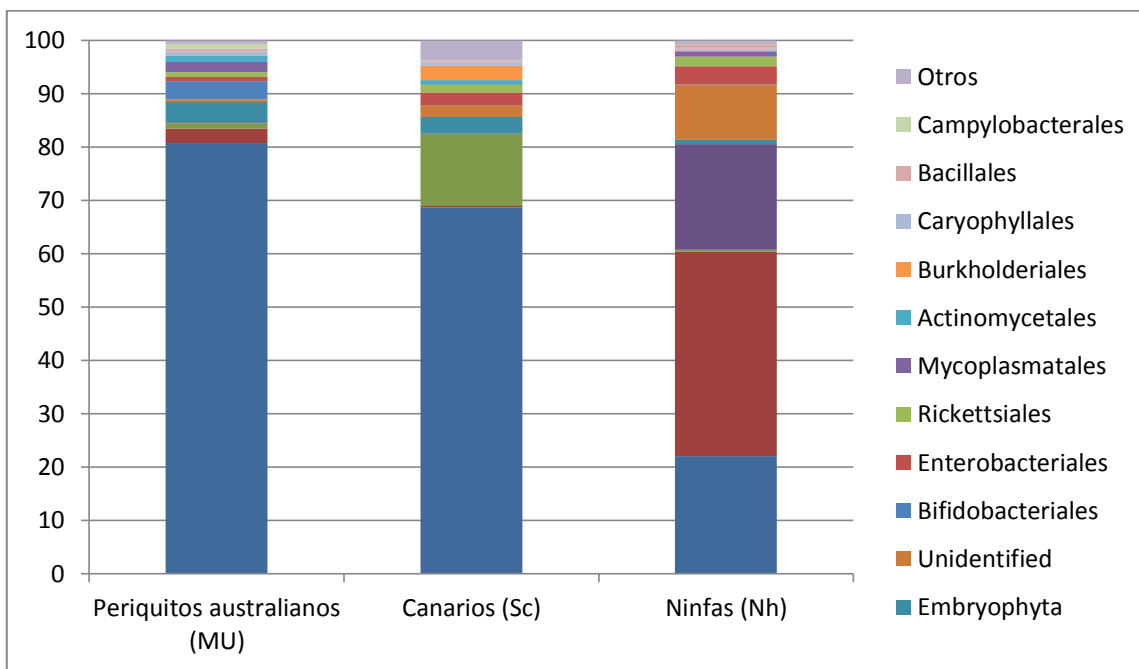


Figura 13. Composición de microbiota fecal en 3 especies de aves de compañía a nivel taxonómico de orden (Ver Anexo 4).

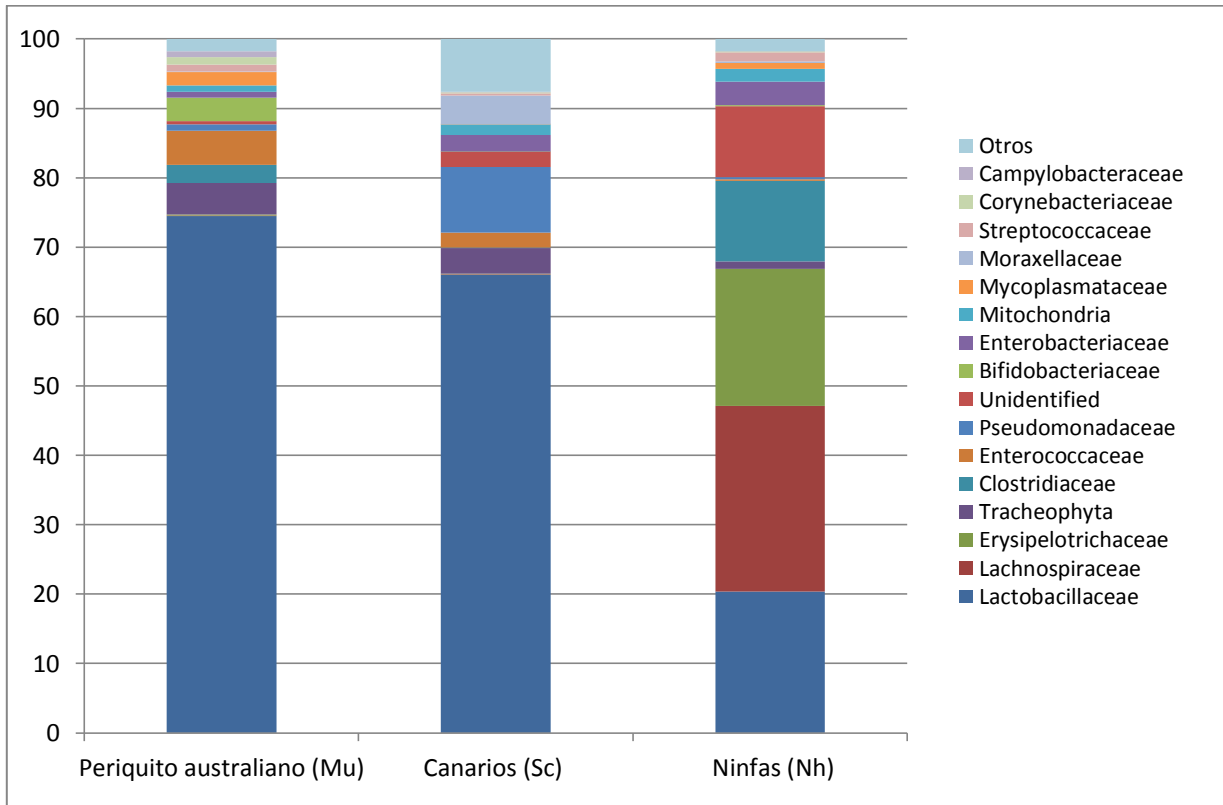


Figura 14. Composición de microbiota fecal en 3 especies de aves de compañía a nivel taxonómico de familia (Ver Anexo 5).

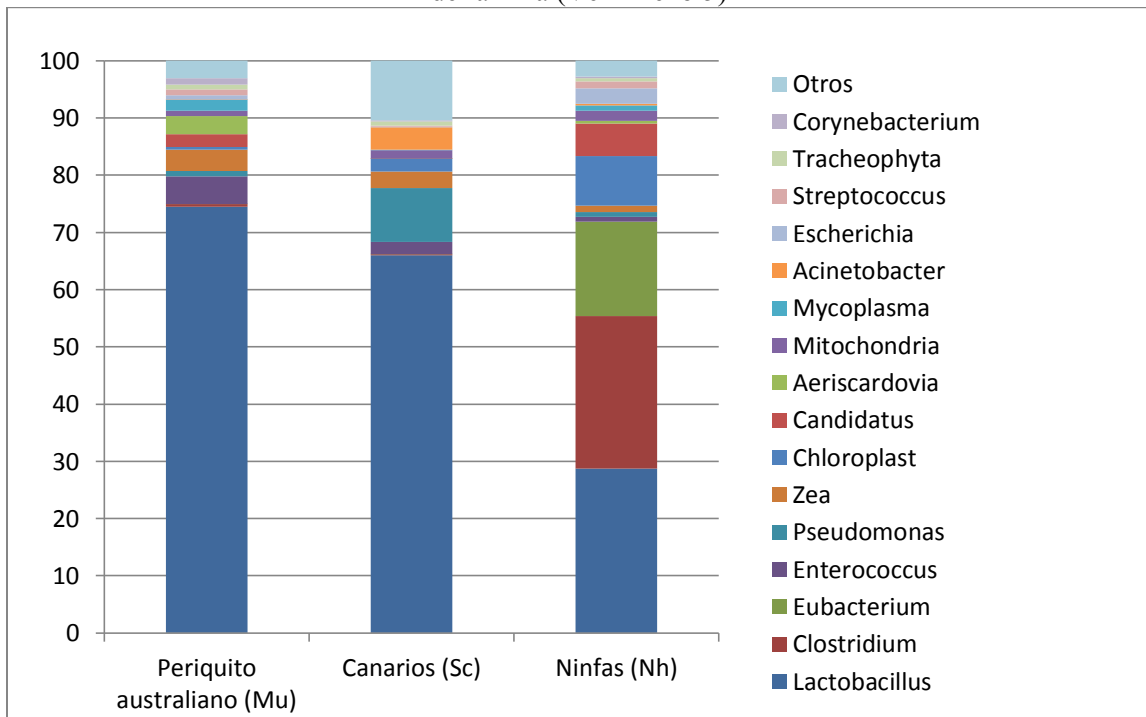


Figura 15. Composición de microbiota fecal en 3 especies de aves de compañía a nivel taxonómico de género (Ver Anexo 6).

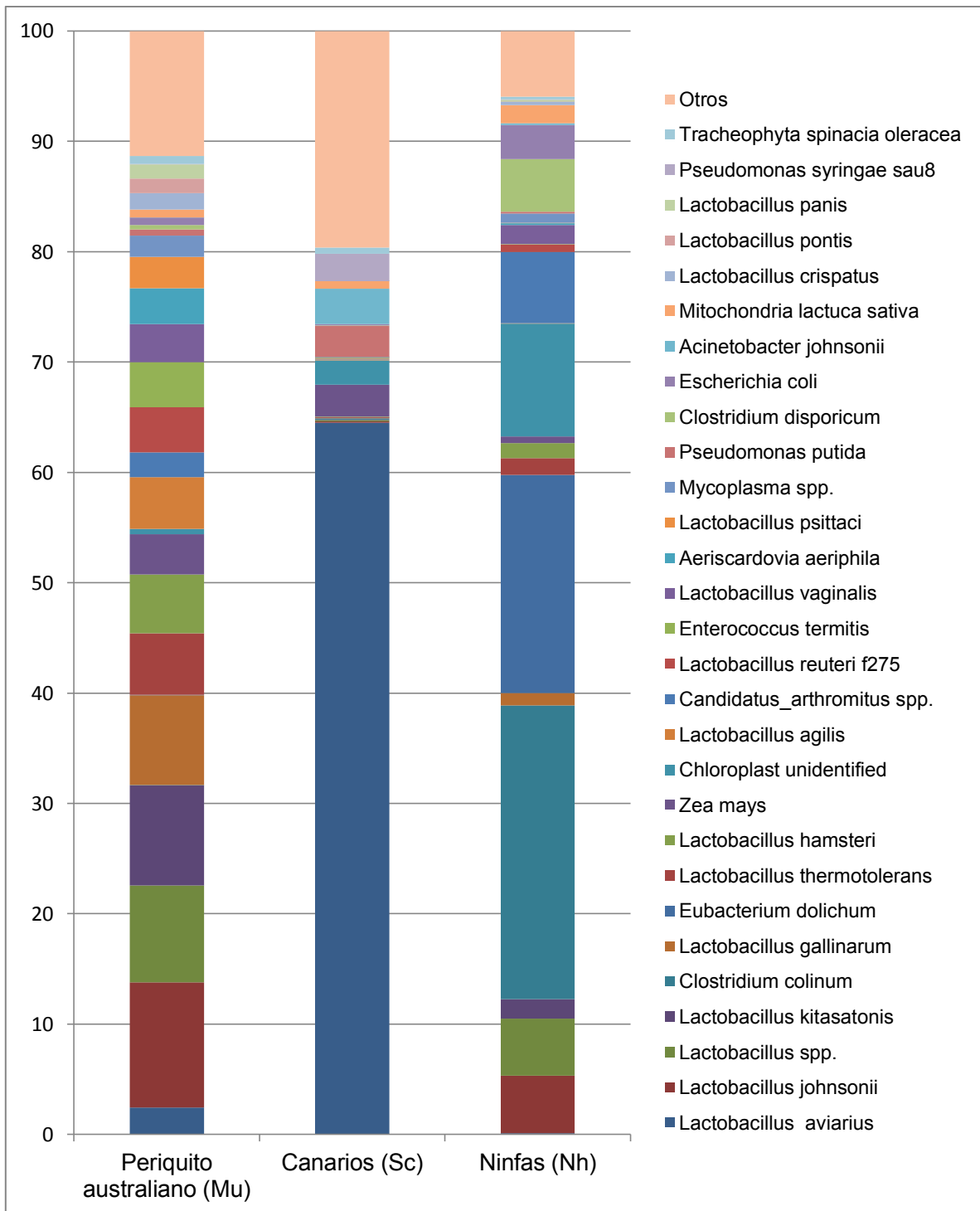


Figura 16. Composición de microbiota fecal en 3 especies de aves de compañía a nivel taxonómico de especie. Destacando la microbiota fecal de los canarios (*Serinus canaria*) compuesta en su mayoría por *Lactobacillus aviarius* (mediana: 74% de todas las secuencias, la mediana de todas las otras muestras: 0.2%). El patógeno *Clostridium colinum* se encontró presente en concentraciones altas sólo en muestras de ninfas (*Nymphicus hollandicus* mediana: 21.4%, la mediana de todas las otras muestras: 0.02%) (Ver Anexo 7).

4.2 Uso de UniFrac

Con el UniFrac se revelaron mediciones ponderadas y no ponderadas de diferentes asociaciones de microbiotas dentro y entre las especies animales. No obstante, en general cada especie de ave parece albergar una composición microbiana específica y única.

- Mediciones no ponderadas (unweighted)

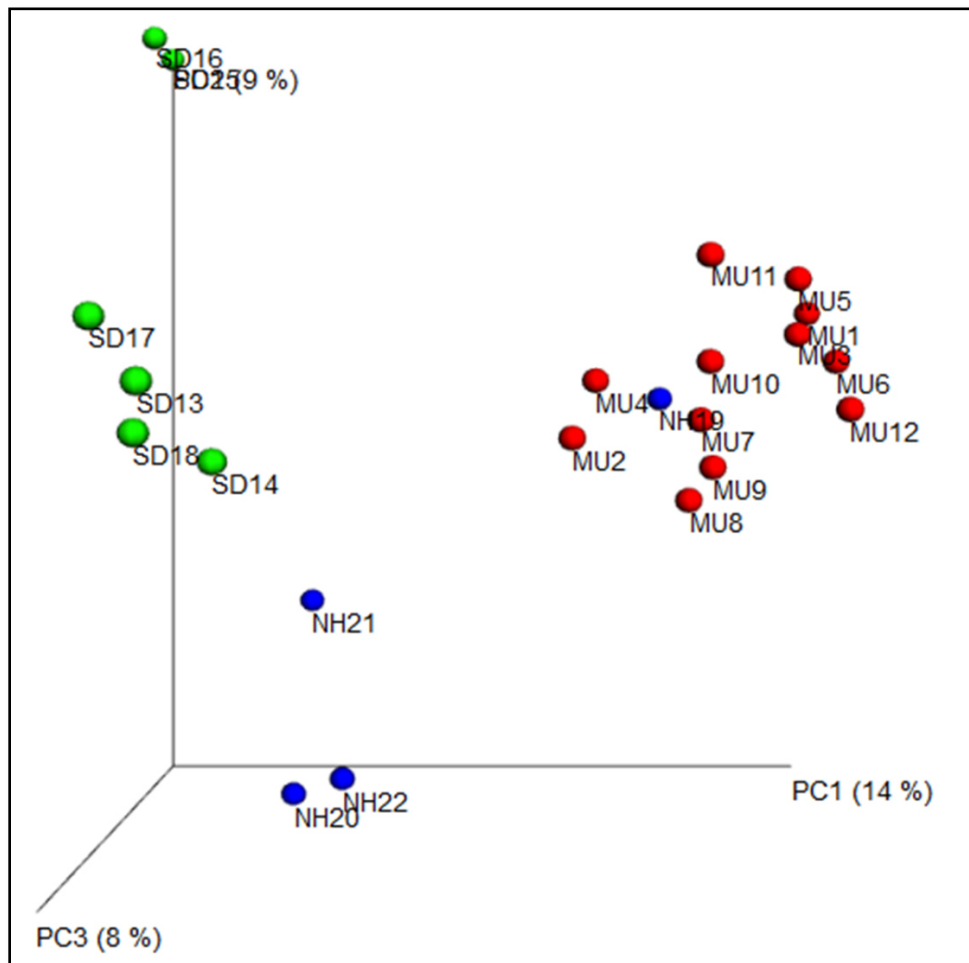


Figura 17. Grafico de análisis de coordenadas principales mostrando todas las muestras. Cada círculo representa 21,000 secuencias. Ver etiqueta de Figura 11 para las abreviaciones de las tres especies de aves.

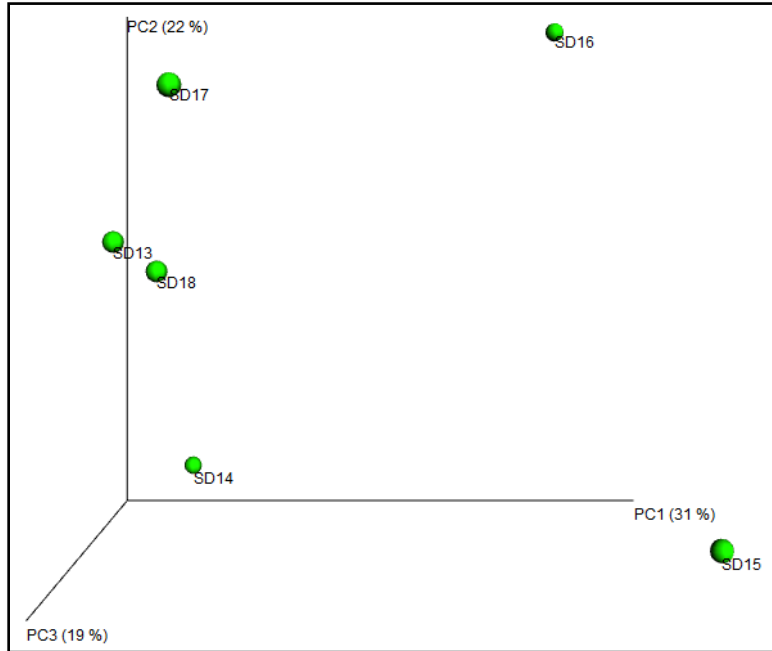


Figura 18. Gráfico de análisis de coordenadas principales mostrando las muestras de canarios. Este gráfico muestra una gran separación de la microbiota de canarios, probablemente debido a la constante manipulación del humano

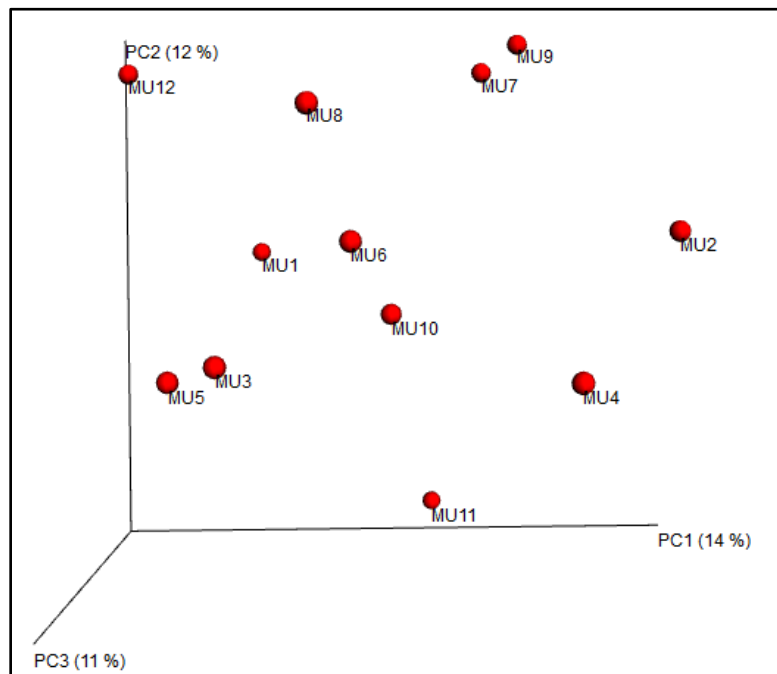


Figura 19. Gráfico de análisis de coordenadas principales mostrando las muestras de Periquito australiano (Mu). Este gráfico muestra una similitud de la microbiota de periquitos a pesar de los diversos factores que se tomaron en cuenta.

- Mediciones ponderadas (weighted)

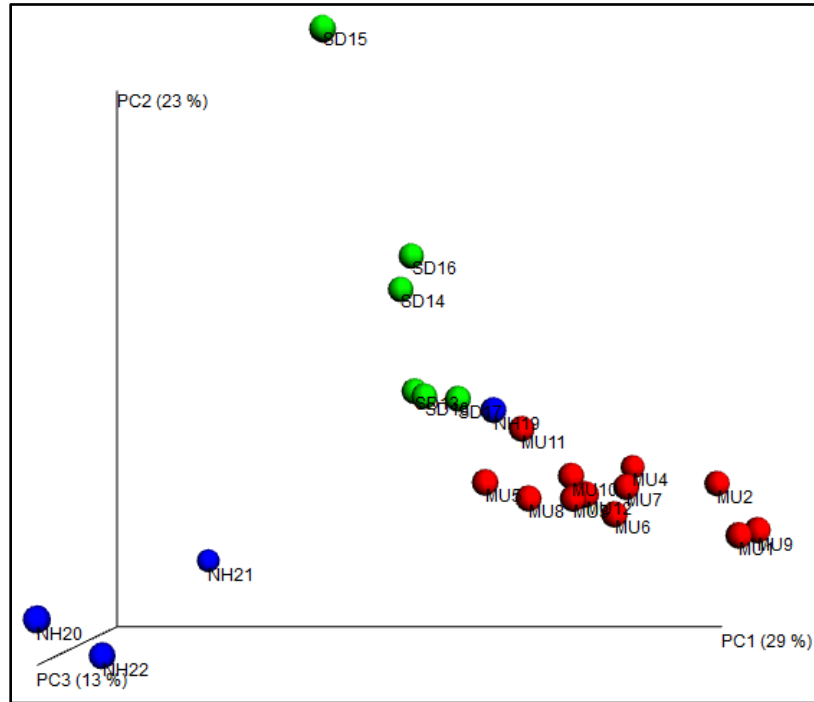


Figura 20. Gráfico de análisis de coordenadas principales mostrando todas las muestras.

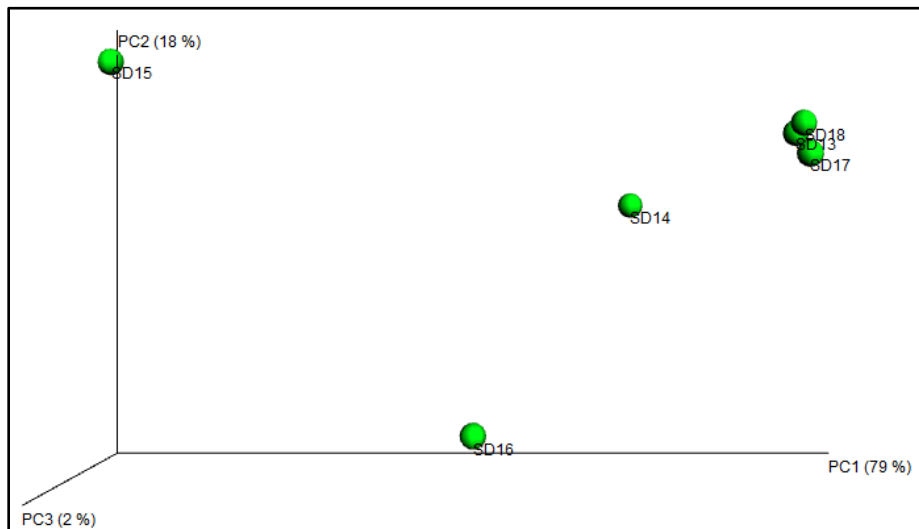


Figura 21. Gráfico de análisis de coordenadas principales mostrando las muestras de canarios

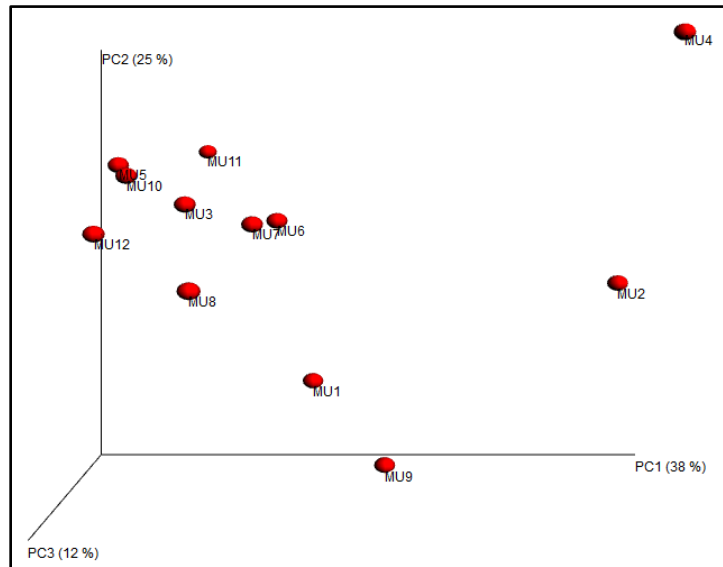


Figura 22. Gráfico de análisis de coordenadas principales mostrando las muestras de periquitos australianos

A pesar de las diferencias entre los indicadores ponderados y no ponderados UniFrac, cada especie de ave parece albergar comunidades microbianas propias de la especie. Sin embargo, existe una muestra de la especie *Nymphicus hollandicus* la cual se encuentra muy cerca de la especie *Melopsittacus undulatus*, esto podría ser debido a diferentes circunstancias, por lo anterior, se realizarán diferentes pruebas para llegar a una conclusión certera de la posible causa de similitud entre estos gráficos.

5. DISCUSIÓN

Una de las principales adaptaciones evolutivas de las aves es el sistema digestivo aviar el cual ha demostrado claramente que reduce la masa corporal para mejorar la eficiencia del vuelo (Duke, 1997). La morfología de tracto gastrointestinal, la estrategia digestiva, y la capacidad metabólica han estado íntimamente entrelazados durante la evolución para que coincida con el contenido de nutrientes y los atributos físicos de los alimentos disponibles en su hábitat natural (Klasings, 1999).

La microbiota intestinal juega un papel fundamental, no sólo para ayudar a digerir los componentes de los alimentos, sino también para la defensa contra patógenos potenciales. Primeramente, por su tamaño, representa una superficie de interacción muy extensa entre el medio ambiente externo y el ave (Kohl, 2012). Además, es el punto de entrada para muchos agentes etiológicos de gran impacto económico tales como: bacterias, virus y parásitos.

En el caso de la especie *Nymphicus Hollandicus* o Ninfa Carolina se encontró la presencia de 2 patógenos principales:

1. Uno de ellos es el *Clostridium colinum* el cual ocasiona enteritis ulcerativa e incluso la muerte en diferentes especies de aves de producción como son los pollos, las codornices y los faisanes (Berkhoff, 1985).
2. Además, se demostró la presencia del patógeno *Clostridium disporicum* el cual es parte normal de la microbiota de los ejemplares de Ninfa, se ha reportado una

infección intra-abdominal en humanos causando la muerte del paciente (Plassart, 2013).

Los seres humanos están en estrecho contacto con estas aves. Sería de impacto positivo para el sector salud y para la comunidad científica, investigar y encontrar resultados acerca de la posible existencia de algún tipo de zoonosis (patógenos animales transmitidos a humanos), relacionando la posesión de estos ejemplares como mascota y el desarrollo de esta enfermedad.

Se abordaron elementos de la Bioinformática en este estudio, debido a que desde la "revolución genómica" a la fecha, la evolución de la Bioinformática permite el desarrollo de interfaces complejas donde los investigadores pueden acceder, suministrar, revisar, analizar e interpretar varios tipos de datos, incluyendo secuencias de nucleótidos y aminoácidos, dominios de proteínas y estructuras protéicas.

Este es el primer estudio que se realiza para determinar la composición de los ecosistemas microbianos en especies aviares dentro de Monterrey y su área metropolitana en el noreste de México, tomando principalmente las que mantienen un contacto más estrecho con el ser humano debido a la facilidad de adquirir los ejemplares, así como a la comodidad de ser una mascota relativamente fácil de cuidar y mantener. Una de las aves más populares en todo el mundo son los periquitos australianos, así como con las otras 2 especies de las cuales se realizó la investigación. La microbiota intestinal desempeña un papel esencial para el bienestar de los animales, sin embargo, los microorganismos intestinales de periquitos permanecen sin caracterizar.

Se han realizado diferentes estudios los cuales nos han sugerido que los tractos gastrointestinales de polluelos son colonizados por muchas especies bacterianas transitorias y que los conjuntos bacterianos llevan una transición gradual al llegar al estado adulto. Las diferencias fenotípicas entre los polluelos y los adultos pueden llevar a estas fuertes diferencias en las comunidades bacterianas (Wouter, 2013). Estos datos proporcionan el marco para futuros estudios dirigidos a las causas y consecuencias de la variación en los ensamblajes bacterianos en aves silvestres.

Aunque hemos obtenido importantes conocimientos sobre la composición, la variabilidad y la importancia de los microorganismos intestinales de diferentes especies animales, es importante mirar en más especies con el fin de obtener una mejor comprensión de la co-evolución de los microorganismos y el medio intestinal.

Teniendo en cuenta la relación de la microbiota gastrointestinal con la condición de su hospedero, el estudio del conjunto de bacterias dentro de los animales tiene un alto valor en ecología microbiana y un gran impacto en cuestiones evolutivas. Sin embargo, la importancia biológica de la microbiota intestinal en las aves sigue siendo desconocida.

Es recomendable que para futuras investigaciones, se aborden conceptos avanzados de la bioinformática para análisis críticos de datos desde el ámbito de la Bioinformática, como disciplina científica emergente que utiliza tecnología para organizar, analizar y distribuir información biológica con la finalidad de responder preguntas complejas de investigación multidisciplinaria.

6. CONCLUSIONES

Debido a la anatomía del tracto GI de las aves, donde la cloaca se divide en 3 compartimentos (coprodeo, urodeo, proctodeo) en los cuales desembocan además del intestino, el sistema urinario y reproductivo, no se descarta la probabilidad de que la microbiota fecal de las aves pudiera abarcar además parte de la microbiota reproductiva y urinaria.

Décadas de investigación han proporcionado información interesante acerca de las comunidades microbianas heterogéneas que viven en el tracto intestinal de los seres humanos y otros animales. Factores tales como la dieta, la edad y estado de salud han sido implicados en la composición aparentemente única de la microbiota intestinal en sujetos individuales. Estos estudios tienen el potencial de conducir a mejores alternativas para el tratamiento de la enfermedad, así como para entender las complejas interacciones entre los microorganismos y las propias células de los animales.

Con este estudio, se sugiere que existen importantes diferencias en los ecosistemas microbianos del tracto GI entre las aves estudiadas. Proporcionando a su vez, información relevante para futuros estudios sobre la secuenciación del gen 16S relacionando los efectos de la edad, la genética, el medio ambiente y la alimentación de las diferentes especies de aves.

Como lo muestran otros investigadores, el análisis ponderado y no ponderado utilizando UniFrac puede conducir a conclusiones diferentes acerca de la estructura de la diversidad

microbiana. Estos análisis funcionales son una gran ayuda para determinar similitudes de las comunidades microbianas. Este estudio ayudará a generar una nueva investigación intrigante entre los que tienen un interés en la convivencia microbiana con huéspedes animales.

Es importante recalcar que poco se ha estudiado acerca de estos importantes temas en los últimos años, por lo que la asociación entre caracteres fenotípicos y la microbiota gastrointestinal resulta un desafío para los investigadores relacionados con este tema.

7. RECOMENDACIONES

Tal como se determinó en la delimitación del presente estudio, se investigó y se realiza una aportación científica sobre las diferencias en las estructuras, composición y fisiología de los ecosistemas microbianos en el tracto GI entre las aves estudiadas.

Se recomienda para otras investigaciones, atender las demandas nacionales e internacionales sobre:

- a) El impacto de la estructura, composición y fisiología de las comunidades microbianas en el ambiente (suelo, aire, agua, biósfera y otros organismos) y
- b) El impacto de los microorganismos en los ecosistemas (dado que contribuyen a la formación, mantenimiento y degradación de los suelos; contribuyen en la síntesis y descomposición de la materia orgánica; son fuentes de nutrientes, modifican los sustratos; producen sustancias inhibidoras; y aportan una base energética a los ecosistemas).

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Review*, (59), 143–69.
- Apajalahti, J., Kettunen, A., & Graham, H. (2004). Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World Poultry Science Journal*. (60), 223–232.
- Archie, E. A., & Theis, T. R. (2011). Animal behaviour meets microbial ecology. *Animal Behavior*. (82), 425–436.
- Bartels, T., Boos, A., Flachsbarth, M. F., & Wolf, P. (1997). Histological aspects of the digestive system of the budgerigar. *First International Symposium Pet Bird Nutrition*. (26).
- Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*. (55), 541-555.
- Benskin, C. M. H., Wilson, K., Jones, K., & 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), 349–373.
- Berkhoff, H. (1985). *Clostridium colinum* sp. Nov., nom. Rev., the Causative Agent of Ulcerative Enteritis (Quail disease) in Quail, Chickens, and Pheasants. *International Journal of Systematic Bacteriology*. (35), 155-159.
- Buerger, S., Spoering, A., Gavrish, E., Leslin, C., Ling, L., & Epstein, S. S. (2012). Microbial scout hypothesis, stochastic exit from dormancy, and the nature of slow growers. *Applied Environmental Microbiology*. (78), 3221-3228.
- Castiglioni, B., Rizzi, E., Frosini, A., Sivonen, K., Rajaniemi, P., Rantala, A., Mugnai, M. A., Ventura, S., Wilmotte, A., Boutte, C., Grubisic, S., Balthasart, P., Consolandi, C., Bordoni, R., Mezzelani, A., Battaglia, C., & De Bellis, G. (2004). Development of a universal microarray based on the ligation detection reaction and 16S rRNA gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria. *Applied Environmental Microbiology*. (70), 7161–7172.
- Church, G. M., & Gilbert, W. (1991). Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (81),7. 1991–1995.
- Clarke, A., & Rothery, P. (2008). Scaling of body temperature in mammals and birds. *Functional Ecology*. (22), 58–67.

- Clench, M. H., & Mathias, J. R., (1999). The avian cecum-A review. *Wilson Bull.* (107), 93-121.
- Colbert, E. H., Morales, M., & Minkoff, E. C. (2001). Evolution of the vertebrates: a history of the backboned animals through time. *New York: John Wiley and Sons*. 5th Edition.
- Collins, F. S., Morgan, M., & Patrinos, A. (2003). The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science.* (300),5617. 286–290.
- Cooper, R. G. (2004). Ostrich (*Struthio camelus*) chick and grower nutrition. *Animal Science Journal.* (75), 487–490.
- Craven, S. E., Stern, N. J., Line, E., Bailey, J. S., Cox, N. A., & Fedorka, C. 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 Disease.* (44), 715–720.
- Diamond, J. M. (1991). Evolutionary design of intestinal nutrient absorption: Enough but not too much. *News Physiology Science.* (6), 92-96.
- Duke, G. E., (1986). Alimentary canal: Anatomy, regulation of feeding, and motility, in Sturkie. *Avian Physiology, New York NY, Springer- Verlag.* 269-287.
- Duke, G. E., (1986). Alimentary canal: Secretion and digestion, special digestive functions, and absorption, in Sturkie. *Avian Physiology, New York NY, Springer- Verlag.* 289-302.
- Duke, G. E., (1997). Gastrointestinal physiology and nutrition in wild birds. *Proceedings of the Nutrition Society.* (56), 1049-1056.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Gločkner, F. O., & Amann, R. (2000). *Applied Environmental Microbiology.* (66), 3044–3051.
- Ezenwa, V. O., Gerardo, N. M., Inouye, D. W., Medina, M., & Xavier, J. B. (2012). Animal behavior and the microbiome. *Science.* (338), 198–199.
- Faustino, C.R., Jennelle, C.S., Connolly, V., Davis, A.K., Swarthout, E.C., & Dhondt, A.A. (2004). *Mycoplasma gallisepticum* infection dynamics in a house finch population: seasonal variation in survival, encounter and transmission rate. *Journal Animal Ecology.* (73), 651–669.
- García, M.H. (2006). Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. *National Biotechnology.* (24), 1263–1269.

- Gaukler, S. M., Linz, G.M., Sherwood, J. S., Dyer, N. W., Bleier, W. J., Wannemuehler, Y. M., Nolan, L. K., & Logue, C. M. (2009) *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in wild European Starlings at a Kansas cattle feedlot. *Avian Disease*. (53), 544–551.
- Gill, S. R., Pop, M., Deboy, R.T., Eckburg, P.B., & Turnbaugh, P.J. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. (312), 1355–1359.
- Gionfriddo, J. P., & Best, L. B. (1996). Grit-use patterns in North American birds: The influence of diet, body size, and gender. *Wilson Bull.* (108), 685-696,
- Godoy-Vitorino, F., Goldfarb, K. C., Brodie, E. L., Garcia-Amado, M. A., Michelangeli, F., & Dominguez-Bello, M. G. (2010). Developmental microbial ecology of the crop of the folivorous hoatzin. *ISME Journal*. (4), 611–620.
- Gong, J., Forster, R. J., Yu, H., Chambers, J. R., Sabour, P. M., Wheatcroft, R., & Chen, S. (2002). Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS Microbiology Letters*. (208), 1–7.
- Harris, J. K., Kelley, S. T., & Pace, N. R. (2004). New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. *Applied Environmental Microbiology*. (70), 845–849.
- Hill, K.J., (1971). *The physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*, new York, NY, *Academic Press*.
- Homberger, D., (1985). Functional anatomy of parrot tongues. *Journal of Ornithology*. (126), 345–346.
- Homberger, D. G., (1986). The lingual Apparatus of the african grey parrot. *Psittacus Erithacus dinne* (Aves: Psittacidae): Description and theoretical analysis. *Ornithological Monographs 39*, Washington, DC, *American Ornithologists' Union*,
- Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2008). Microbiology metagenomics. *Nature*. (455), 481–483.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., & Pace, N. R. (1998). Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal Bacteriology*. (180), 4765–4774.
- Hurst, C. J. (2005). Divining the future of microbiology. *ASM News*. (71), 262-263.
- Illumina, Analyst Day, September 15th, 2007. *Mandarin Oriental, New York, NY*.
- Jerningan, M. A., Miles, R.D. & Arafa, A.S. (1985). Probiotics in poultry nutrition- a review. *Journal of World Poultry Science*. 41, 99-107.

- Jerrett, S. A., & Goodge, W. R. (1978). Evidence for amylase in avian salivary glands. *Journal of Morphology*. (139), 27-46.
- King, A. S., & McLelland, J. (1984). Birds: Their Structure and Function. *Birds of Prey*. London, UK, Bailliere Tindall.
- Klasing, K. C. (1998). Comparative Avian Nutrition. *New York, NY: CAB International*.
- Klasing, K. C., (1999). Avian gastrointestinal anatomy and physiology. *Seminary Avian Exotic Pet Medicine*. (8), 42–50.
- Knight, R. (2012). Unlocking the potential of metagenomics through replicated experimental design. *Natural Biotechnology*. (30), 513–520.
- Kohl, K. K., (2012). Diversity and function of the avian gut microbiota. *Journal of Comparative Physiology*. (182), 591–602.
- Kuczynski, J. (2010). Direct sequencing of the human microbiome readily reveals community differences. *Genome Biology*. (11), 210.
- Leser, T. D., & Molbak, L. (2009). Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environmental Microbiology*, (11), 2194–2206.
- Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R., Gordon, J. I. (2008b) Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Review Microbiology* (6), 776–788
- Lewis, K., Epstein, S., D’Onofrio, A., & Ling, L. L. (2010). Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *Journal of Antibiotics*. (63), 468-476.
- Lombardo, M. P., (1998). On the evolution of sexually transmitted diseases in birds. *Journal of Avian Biology*. (29), 314–321.
- Lozupone, C. A., Micah., Hamady., Scott, T., Kelley., & Knight, R. (2007). Quantitative and Qualitative-Diversity Measures Lead to Different Insights into Factors That Structure Microbial Communities. *Applied and environmental microbiology*. (73), 5. 1576–1585.
- Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics Washington University School of Medicine, Genome Sequencing Center. *Trends in Genetics*, (24)3, 133 – 141.
- Plassart, C., Mauvais, F., Heurté, J., Sautereau, J., Legeay, C., Bouvet, P. (2013). First case of intra-abdominal infection with clostridium disporicum. *Anaerobe*. (19). 77-78.

- Pedroso, A. A., Hurley-Bacon, A. L., Zedek, A. S., Kwan, T. W., Jordan, A. P. O., Avellaneda, G., Hofacre, C. L., Oakley, B. B., Collett, S. R., Maurer, J. J., & Lee, M. D. (2013). Can probiotics improve the environmental microbiome and resistome of commercial poultry production. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. (10), 10. 4534-4559.
- Qu, A., Brulec, J. M., Wilson, M. K., Law, B. F., & Theoret, J. R. (2008). Comparative metagenomics reveals host specific metavirulomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome. *PLOS One*. (3), 2945.
- Rappe, M. S., & Giovannoni, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*. (57), 369–394.
- Revolledo, L. A., Ferreira, J.P., & Mead, G.C. (2006). Prospects in Salmonella Control: competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. *Journal Applied Poultry Research*. (15), 341-351.
- Robinson, C. J., Brendan, J. M., & Vincent B. Y. (2010). From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. (74),3, 453–476.
- Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K., Kent, A. D., Daroub, S. H., Camargo, F. A., Farmerie, W. G., Triplett, E. W. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME Journal*. (1), 283-290.
- Rossello-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Review*. (1),25, 39–67.
- Ruiz-De-Castañeda, R., Vela, A. I., Lobato, E., Briones, V., & Moreno, J. (2011) Bacterial loads on eggshells of the pied flycatcher: Environmental and maternal factors. *Condor*. (113), 200–208.
- Sanger, R. S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy Science*. (74),12, 5463-5467.
- Scupham, A. J. (2007). Succession in the intestinal microbiota of preadolescent turkeys. *FEMS Microbiology Ecology*. (60), 136–147.
- Shendure, J., Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *National Biotechnology*. (26), 1135-1145.
- Snel, B., Bork, P. & Huynen, M.A. (1999). Genome phylogeny based on gene content. *National Genetics*. (21), 108–110.

- Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Mark Welch, D., Huse, S. M., Neal, P. R., Arrieta, J. M., Herndl, G. J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. (103), 12115-12120.
- Stecher, B., & Hardt, W. D. (2011). Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Current Opinion Microbiology*. (14), 82–91.
- Tellez, G., Higgins, S. E., Donoghue, A. M., & Hargin, B. M. (2006). Digestive physiology and the role of microorganisms. *Journal Applied Poultry Research*. (15), 136–144.
- Torok, V. A., Kathy, O. K., Maylene, L., & Robert J. H. (2008). Application of Methods for Identifying Broiler Chicken Gut Bacterial Species Linked with Increased Energy Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. (7), 3. 783-791.
- Van der Wielen, P. W. J. J., Keuzenkamp, D. A., Lipman, J. A., van Knapen, F., Biesterveld, S. (2002). Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. *Microbiology Ecology*. (44), 286–293.
- Wagg, C. B., Benders, F. B., Widmer, F., & Marcel, G. A. (2014). Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Science*. (111),14. 5266–5270 .
- Wouter, F. D., Van-Dongen, J. W., Brandl, H. B., Moodley, Y., Merklings, T., Leclaire, S., Blanchard, P., Danchin, E., Hatch, S., & Wagner, R. (2013). Age-related differences in the cloacal microbiota of a wild bird species. *BioMedicine Central Ecology*, (13),11. 1472-6785.
- Xenoulis, P. G., Gray, P. L., Brightsmith, D., Palculict, B., Hoppes, S., Steiner, J. M., Tizard, I., & Suchodolski, J. S. (2010). Molecular characterization of the cloacal microbiota of wild and captive parrots. *Vet Microbiology*. (146), 320–325.
- Xu, J. (2006). Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molecular Ecology*. (15), 713-731.
- Yeo, J. K. (1977). Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic, or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. *Poultry Science*. (76), 381-385.
- Ziswiler, V. (1985). Function and structure of the alimentary tract as an indicator of evolutionary trends. *Fortschr Zool Journal*. (130), 295-303.
- Zoppi, G., & Shmerling, D. H. (1969). Intestinal disaccharidase activities in some birds, reptiles and mammals. *Comparative Biochemistry Physiology*. (29), 289-294.

9. ANEXOS

Anexo 1

En la siguiente tabla se muestran las características de cada muestra obtenida. Siendo MU para periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*), SC para canario (*Serinus canaria*) y NH para ninfas (*Nymphicus hollandicus*). Además de hacer una diferencia entre muestras tomadas en aves de mercado o aves de dueños particulares.

Número de Muestra	Cantidad de aves y origen	Aproximación de Edad (En meses)	Tipo de Alimentación	Cantidad de Machos/Hembras
MU1	9 - Particular	6-36	Alpiste	3/6
MU2	7- Particular	6-36	Alpiste	2/5
MU3	10- Particular	6-36	Alpiste	3/7
MU4	5 - Particular	3-24	Alpiste	2/3
MU5	3 - Particular	1	Alpiste, material fecal, alimentación por padres	1/2
MU6	3 - Particular	2-3	Alpiste	1/2
MU7	3 - Particular	6-24	Alpiste, vegetales frescos	1/2
MU8	6 - Particular	5-24	Mixtura canario	2/5
MU9	6 - Particular	5-24	Alpiste	2/5
MU10	8 - Mercado	4-8	Mixtura canario	3/5
MU11	33 - Mercado	6-24	Alpiste	Desconocido
MU12	7 - Particular	6-24	Mixtura canario	3/4
SC13	14 - Particular	24-36	Alpiste, frutas, vegetales, huevo duro	7/7
SC14	5 - Particular	24-36	Mixtura canario	3/2
SC15	6 - Particular	24-36	Mixtura canario, lechuga, brocoli	2/4
SC16	7 - Mercado	2-6	Mixtura canario, vegetales, frutas	7/0
SC17	15 - Mercado	12-36	Mixtura canario	15/0
SC18	8 - Mercado	12-36	Mixtura canario	0/8
NH19	6 - Particular	6-24	Mixtura de girasol (40%) frutas, vegetales	Desconocido
NH20	2 - Mercado	6-24	Mixtura de girasol	Desconocido
NH21	3 - Mercado	6-24	Mixtura canario y semilla de girasol	Desconocido
NH22	5 - Mercado	6-24	Mixtura de girasol	Desconocido

Anexo 2

Composición de microbiota fecal en 3 especies de aves de compañía a nivel taxonómico de Filo. Mu: *Melopsitaccus undulatus* (Perico australiano); Nh: *Nymphicus hollandicus* (Ninfas); Sc: *Serinus canaria* (Canarios). El axis y (porcentaje de secuencias) fue modificado para permitir la visualización de los filos poco abundantes. *Diferencia estadística $p < 0.05$.

Bacterias	Periquitos	Canarios	Ninfas	Promedio General
<i>Firmicutes</i>	84,07958699	69,33811196	61,15715377	75,89146958
<i>Proteobacteria</i>	4,242072324	21,7790376	5,924546094	9,330785357
<i>Tenericutes</i>	1,955135279	0,039852465	20,61516016	4,825517216
<i>Streptophyta</i>	4,554662429	3,661335538	1,06836898	3,677156286
<i>Actinobacteria</i>	4,58052968	1,149083169	0,430341073	2,890100885
<i>Cyanobacteria</i>	0,458024017	2,20537242	10,24819469	2,714604613
<i>Apicomplexa</i>	0,001368423	1,126851516	0,001306557	0,308307109
<i>Bacteroidetes</i>	0,051377851	0,495216898	0,041831014	0,170689076
<i>Spirochaetes</i>	0,003530847	0,005310921	0,486188703	0,091772296
<i>Fusobacteria</i>	0,037789853	0,000314869	0,000196408	0,020734231
<i>Deinococcus_thermus</i>	0,008121981	0,05169561	0,005398192	0,019510463
<i>Chloroflexi</i>	0,003680159	0,047143266	0,002440658	0,01530837
<i>Verrucomicrobia</i>	0,006310628	0,041613921	0,002835853	0,015307022

Anexo 3

Composición de microbiota fecal en 3 especies de aves de compañía
a nivel taxonómico de clase.

Bacterias	Periquitos	Canarios	Ninfas	Promedio General
<i>Bacilli</i>	81,289637	69,0646832	22,8083427	67,32259608
<i>Clostridia</i>	2,67989513	0,25572201	38,3480274	8,503871974
<i>Gammaproteobacteria</i>	1,88561792	17,0249666	3,85091442	6,371857824
<i>Erysipelotrichi</i>	0,1438943	0,04267353	19,746709	3,680436757
<i>Liliopsida</i>	3,67586585	2,90340813	0,59524966	2,905083527
<i>Chloroplast</i>	0,45802402	2,20463344	10,2481947	2,714403074
<i>Actinobacteria</i>	3,43210602	0,31491391	0,18473018	1,991530746
<i>Alphaproteobacteria</i>	1,34004023	1,93621762	1,98231675	1,619411612
<i>Mollicutes</i>	1,92129587	0,01488568	0,86923481	1,21008199
<i>Actinobacteria (Class)</i>	1,14448126	0,80267707	0,24470117	0,887665559
<i>Betaproteobacteria</i>	0,13181344	2,76980532	0,08246358	0,842293067
<i>Streptophyta</i>	0,87810861	0,75761736	0,47246463	0,771493907
<i>Epsilonproteobacteria</i>	0,88322419	0,04399335	0,00825772	0,495258241

Anexo 4

Composición de microbiota fecal en 3 especies de aves de compañía

a nivel taxonómico de orden

Bacterias	Periquitos	Canarios	Ninfas	Promedio General
<i>Lactobacillales</i>	80,79196881	68,68899393	21,98014371	66,79809837
<i>Clostridiales</i>	2,679895135	0,255722008	38,34802744	8,503871974
<i>Pseudomonadales</i>	1,008991344	13,55010546	0,459071766	4,329309815
<i>Erysipelotrichales</i>	0,143894299	0,042673527	19,74670897	3,680436757
<i>Embryophyta</i>	3,840027605	3,076120289	0,822106475	3,082976313
<i>Unidentified</i>	0,458024017	2,204633443	10,24819469	2,714403074
<i>Bifidobacteriales</i>	3,416334477	0,025559402	0,163860583	1,900218748
<i>Enterobacteriales</i>	0,812146459	2,380188376	3,370900856	1,705022327
<i>Rickettsiales</i>	0,912365778	1,507707953	1,840724091	1,243524246
<i>Mycoplasmatales</i>	1,92129587	0,014885681	0,869234814	1,21008199
<i>Actinomycetales</i>	1,143810398	0,80688857	0,236865296	0,887023518
<i>Burkholderiales</i>	0,122234988	2,664970066	0,082158724	0,808421598
<i>Caryophyllales</i>	0,714355653	0,584379363	0,245869689	0,593728308
<i>Bacillales</i>	0,49766816	0,374665948	0,828198992	0,524218617
<i>Campylobacterales</i>	0,883224191	0,043993352	0,008257725	0,495258241

Anexo 5

Composición de microbiota fecal en 3 especies de aves de compañía
a nivel taxonómico de familia

Bacterias	Periquitos	Canarios	Ninfas	Promedio General
<i>Lactobacillaceae</i>	74,49853635	65,9923805	20,3683964	62.3368320513944
<i>Lachnospiraceae</i>	0,027065046	0,14340525	26,7553462	4.91848167700009
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0,143894299	0,04267353	19,746709	3.68043675663954
<i>Tracheophyta</i>	4,553974456	3,66102549	1,06771429	3.67657743395894
<i>Clostridiaceae</i>	2,638366745	0,09720785	11,5830773	3.57163441724298
<i>Enterococcaceae</i>	4,896871034	2,19364835	0,27338812	3.31899522531781
<i>Pseudomonadaceae</i>	0,931147841	9,42284979	0,26956077	3.12677799515408
<i>Unidentified</i>	0,458024017	2,20463344	10,2481947	2.71440307362823
<i>Bifidobacteriaceae</i>	3,416334477	0,0255594	0,16386058	1.90021874835991
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,812146459	2,38018838	3,37090086	1.7050223270391
<i>Mitochondria</i>	0,909354055	1,50676235	1,83333794	1.24028065802379
<i>Mycoplasmataceae</i>	1,92129587	0,01488568	0,86923481	1.21008198984736
<i>Moraxellaceae</i>	0,077843503	4,12725567	0,18951099	1.20253181990768
<i>Streptococcaceae</i>	1,015325583	0,35447525	1,29622299	0.886165928782464
<i>Corynebacteriaceae</i>	1,067418394	0,16476243	0,1730525	0.658627515144014
<i>Campylobacteraceae</i>	0,881980087	0,02438659	0,00644187	0.488902184753911

Anexo 6

Composición de microbiota fecal en 3 especies de aves de compañía
a nivel taxonómico de género

Bacterias	Periquitos	Canarios	Ninfas	Promedio General
<i>Lactobacillus</i>	74,49542685	65,99155949	28,76024831	62,33459655
<i>Clostridium</i>	0,424942982	0,173159451	26,58897141	6,047092589
<i>Eubacterium</i>	0,031649653	0,025207757	16,51799536	3,613957357
<i>Enterococcus</i>	4,876279529	2,119138019	0,871303845	3,286378334
<i>Pseudomonas</i>	0,931147841	9,422849787	0,841004217	3,126777995
<i>Zea</i>	3,67465919	2,902623429	1,054497212	2,903658126
<i>Chloroplast</i>	0,458024017	2,204633443	8,741436365	2,714403074
<i>Candidatus_Arthromitus</i>	2,233636922	0,036702933	5,664406829	2,406343252
<i>Aeriscardovia</i>	3,24299509	0,022154613	0,481912658	1,802540524
<i>Mitochondria</i>	0,909354055	1,506762345	1,714726482	1,240280658
<i>Mycoplasma</i>	1,919311654	0,013938784	0,927138739	1,206568098
<i>Acinetobacter</i>	0,061788053	3,939584941	0,352046965	1,136487005
<i>Escherichia</i>	0,691335219	0,122369222	2,685869057	0,976503619
<i>Streptococcus</i>	1,009851589	0,140513433	1,19216261	0,822700553
<i>Tracheophyta</i>	0,87838778	0,75821709	0,532388408	0,77182165
<i>Corynebacterium</i>	1,067418394	0,164762432	0,270167505	0,658627515

Anexo 7

Composición de microbiota fecal en 3 especies de aves de compañía a nivel taxonómico de especie. Destacando la microbiota fecal de los canarios (*Serinus canaria*) compuesta en su mayoría por *Lactobacillus aviarius* (mediana: 74% de todas las secuencias, la mediana de todas las otras muestras: 0.2%). El patógeno *Clostridium colinum* se encontró presente en concentraciones altas sólo en muestras de ninfas (*Nymphicus hollandicus* mediana: 21.4%, la mediana de todas las otras muestras: 0.02%)

Bacterias	Periquitos	Canarios	Ninfas	Promedio General
<i>Lactobacillus Aviarius</i>	2,444454397	64,5030706	0,117384735	18,94642797
<i>Lactobacillus Johnsonii</i>	11,3235254	0,133384287	5,218927276	7,161741803
<i>Lactobacillus Spp.</i>	8,784248102	0,1172972	5,159132027	5,761422206
<i>Lactobacillus Kitasatonis</i>	9,072961574	0,031259408	1,763585621	5,278065355
<i>Clostridium Colinum</i>	0,023670173	0,114229006	26,6207508	4,884200878
<i>Lactobacillus Gallinarum</i>	8,156896015	0,027333556	1,141225602	4,664166178
<i>Eubacterium Dolichum</i>	0,031649653	0,024892887	19,74400487	3,613871483
<i>Lactobacillus Thermotolerans</i>	5,55970262	0,067403211	1,536809466	3,330367662
<i>Lactobacillus Hamsteri</i>	5,341962862	0,02527741	1,350509475	3,166238941
<i>Zea Mays</i>	3,67465919	2,902623429	0,592206983	2,903658126
<i>Chloroplast Unidentified</i>	0,458024017	2,204633443	10,24819469	2,714403074
<i>Lactobacillus Agilis</i>	4,706032224	0,069649586	0,011274105	2,587971846
<i>Candidatus_Arthromitus Spp.</i>	2,233636922	0,036702932	6,478922723	2,406343252

<i>Lactobacillus Reuteri F275</i>	4,103944921	0,065011334	0,692723671	2,382195533
<i>Enterococcus Termitis</i>	4,090074022	0,070553562	0,023086064	2,254388814
<i>Lactobacillus Vaginalis</i>	3,440848703	0,023835004	1,732428628	2,198314044
<i>Aeriscardovia Aeriphila</i>	3,24299509	0,022154613	0,151755692	1,802540524
<i>Lactobacillus Psittaci</i>	2,842946946	0,008168872	0,024612766	1,557401257
<i>Mycoplasma Spp.</i>	1,919311654	0,013938784	0,857281399	1,206568098
<i>Pseudomonas Putida</i>	0,571991257	2,829101963	0,158446061	1,112376869
<i>Clostridium Disporicum</i>	0,380824053	0,038629317	4,75852805	1,083444397
<i>Escherichia Coli</i>	0,691335219	0,122369222	3,113210415	0,976503619
<i>Acinetobacter Johnsonii</i>	0,024987019	3,201845068	0,138347539	0,912013854
<i>Mitochondria Lactuca Sativa</i>	0,706697569	0,658960775	1,643438717	0,863995016
<i>Lactobacillus Crispatus</i>	1,461342299	0,007073413	0,313661934	0,856054354
<i>Lactobacillus Pontis</i>	1,355885918	0,004733048	0,019694107	0,744445715
<i>Lactobacillus Panis</i>	1,285419704	0,013610412	0,166590974	0,735139219
<i>Pseudomonas Syringae Sau8</i>	0,017590113	2,465392095	0,011288981	0,684026811
<i>Tracheophyta Spinacia Oleracea</i>	0,714355653	0,584379363	0,245869689	0,593728308