



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**¿ES EL COLOR DEL HUEVO DEL BOBO
ENMASCARADO UNA DEFENSA
ANTIBACTERIANA?**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

DIANA ANGÉLICA ROBLEDO RUÍZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. LAURA ROXANA TORRES AVILÉS**

CIUDAD UNIVERSITARIA , D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno
Robledo
Ruíz
Diana Angélica
56 50 05 32
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
104002872
2. Datos del Tutor
Dra.
Laura Roxana
Torres
Avilés
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Luis David
Alcaraz
Peraza
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Blanca Estela
Hernández
Baños
5. Datos del sinodal 3
Dr.
Alejandro
Córdoba
Aguilar
6. Datos del sinodal 4
Dr.
Fausto René
Beamonte
Barrientos
7. Datos del trabajo escrito
¿Es el color del huevo del bobo enmascarado una defensa antibacteriana?
53 pp.
2014

A mi madre.

¡Revolución, libertad y conciencia! ¡Revolución, libertad y conciencia!

¡Arriba! ¡Arriba!

¡¡¡La Facultad de Ciencias!!!

(Consciente, libre y rebelde)

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, mi *alma mater*, por darme el honor de llamarme *puma* y de gritar a todo pulmón-corazón la *goya*. Al pueblo de México por mantenerla pública, gratuita, autónoma. A la **Facultad de Ciencias**, esa cornucopia de vida, de reflexión, de lucha, de diversidad, de pensamiento crítico.

A mi **madre**, que siempre será mi hogar, por ser mi inspiración y mi fuerza. A mi **hermano** (*¿qué, tú qué?*) por su genialidad, insolencia y por ser mi diseñador personal. A mi **familia**, los que están y los que se fueron.

Agradezco especialmente a **Rox**, por ser la asesora más compatible que pude encontrar, por enseñarme en cada paso cómo es un investigador productivo y pleno, y por dejarme aprender tanto de ella. Significaron mucho para mí sus repetidas muestras de confianza y su comprensión en los momentos difíciles. Por la tesis y por los proyectos futuros.

A mis sinodales, **Blanca, Luis, Alex y René**, por acceder a ser mis sinodales y por sus atinados comentarios. A **Cheko**, por ser el profe de Bioestadística que le mostró a la niña Diana de tercer semestre el objeto brillante llamado *Ecología de la conducta*.

A la enorme luna llena de mi primera noche en Isla Muertos. A **Isa**, por su amistad incondicional, por la alegría de las transmisiones radiofónicas de *Muertos en Pérez*, por su asesoría en el trabajo de campo y por enseñarme a mantener mi mente en la pregunta. A **Juanto** (*que la n no sea el problema*) y a **Miguel** (*¿te asfixio con mi amor?*), por los silencios cómodos y las sonrisas siempre devueltas. Gracias a los tres por hacer del trabajo de campo unas de las mejores semanas de mi vida en un paraíso de arena blanca y agua turquesa, Arrecife Alacranes.

Gracias a Rox, Isa y Juanto por su guía y apoyo en la búsqueda del anhelado futuro académico.

A **Luisa Falcon**, por su guía y entusiasta disposición a colaborar en este proyecto. Agradecimientos especiales a **Ro** por su ayuda y enseñanzas en el trabajo de laboratorio, sin ella este trabajo no hubiera sido posible. También agradezco a **Toñito, Moni y Paty**. A los chicos del labo, en especial a **Vic, Bibi, Sayuri y Tino**, por las discusiones enriquecedoras, por las dudas resueltas, por los chismes y por las charlas en francés.

A los **conscientes**, por ser mis amigos y maestros, por enseñarme que hay cosas por las que es necesario luchar, por estar –literalmente– siempre que los necesité y por moldearme, con risas y reflexión, en la mujer que soy ahora. A **Carlos**, por todo lo que vivimos juntos, por Linux y por ser ese tercer consejero no reconocido que siempre ha estado al pie del cañón. A **Daniel**, el mejor hermano-consejero que pude tener (*para eso somos dos*), por las luchas hombro a hombro que nos volvieron fuertes y por la *joie de vivre*. Al equipo de trabajo, **Tania O., Tania L., Angie, Gaby, Viri, Ferchis y Lalo**. A la sesión del Consejo Técnico del 6 de junio de 2013, el día más terrorífico e intenso de mi vida donde derrotamos a *Voldemort*. A la **comunidad de la Facultad de Ciencias** por permitirme defender sus legítimos derechos y por los momentos que me marcaron profundamente.

A mis amigos **Ramón** (*¡osito!*), **Gladys** (*¿qué es la vida?*), **Meli** (*¡es el amor verdadero!*), **Tux** (*Rukísimo de mi vida y de mi amor*) y **Amir** (mi amigo el artista) por los abrazos y la amistad dados con el corazón. A los excelentes **profesores de la Facultad de Ciencias** que me enseñaron a pensar como bióloga.

A los **bobos**, porque gracias a ellos pude trabajar con huevos, es decir, con muchas ganas.

A la *Biología*, por hacerme dichosa.

Índice

9 RESUMEN

10 INTRODUCCIÓN

10 EL COLOR DE LOS HUEVOS

13 EL COLOR COMO DEFENSA ANTIBACTERIANA

15 BOBO ENMASCARADO

16 OBJETIVOS

16 HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

17 MÉTODOS

17 PROTOCOLO DE MUESTREO DE BACTERIAS

19 ESTIMACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA

20 PROTOCOLO DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

21 ESTIMACIÓN DE LA RIQUEZA Y DIVERSIDAD BACTERIANA

22 DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD BACTERIANA

23 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

23 CARACTERÍSTICAS DE LOS HUEVOS

24 DESCRIPCIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA

24 ANÁLISIS CANÓNICO DE CORRESPONDENCIA

24 RELACIÓN DEL COLOR DEL HUEVO CON LA COMUNIDAD BACTERIANA

26 RESULTADOS

26 CARACTERÍSTICAS DE LOS HUEVOS

27 DESCRIPCIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA

28 ANÁLISIS CANÓNICO DE CORRESPONDENCIA

30 ¿SE RELACIONA EL COLOR DEL HUEVO CON LA COMUNIDAD BACTERIANA?

37 DISCUSIÓN

37 CARACTERÍSTICAS DE LOS HUEVOS

38 DESCRIPCIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA

39 ¿SE RELACIONA EL COLOR DEL HUEVO CON LA COMUNIDAD BACTERIANA?

42 OTRAS IMPLICACIONES

43 CONCLUSIONES

44 REFERENCIAS

49 ANEXO 1

52 ANEXO 2

53 ANEXO 3

Resumen

La coloración de los huevos de las aves es un rasgo al que se le han atribuido diversas funciones estructurales y de señalización. Recientemente se propuso que los pigmentos del cascarón, protoporfirina y biliverdina, tienen actividad antibacteriana que protege a los huevos de infecciones que pueden ser causa de mortalidad del embrión. Nosotros evaluamos la posible función antibacteriana de la biliverdina buscando la relación del color azul-verde del huevo del bobo enmascarado (*Sula dactylatra*) con la comunidad bacteriana en la superficie de su cascarón. Encontramos que el color del huevo no está relacionado con una disminución en la abundancia total de bacterias, en la riqueza o diversidad bacteriana, ni en la abundancia relativa de bacterias Gram-negativas, pero sí con una disminución en la abundancia relativa de las bacterias patógenas Gram-positivas, *Staphylococcus* y *Enterococcus*. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la biliverdina tiene un efecto antibacteriano sobre los patógenos Gram-positivos en los huevos de bobo enmascarado.

Robledo-Ruíz D A. 2014. ¿Es el color del huevo del bobo enmascarado una defensa antibacteriana? Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 53pp.

Introducción

El color de los huevos

La enorme variación en el color de los huevos de las aves (i.e. color base y patrones de manchas) ha recibido gran atención por décadas (Cherry y Gosler, 2010; Kilner, 2006; Maurer et al., 2011; McGraw, 2006; Underwood y Sealy, 2002). Dicha variación parece coincidir con el origen y diversificación de las aves (Maurer et al., 2011) y está distribuida de forma desigual entre los taxa de la Clase (Kilner, 2006). Se ha sugerido que el color blanco es el color ancestral de los huevos, dada su distribución filogenética en la Clase Aves (Kilner, 2006) y que los huevos de los reptiles son blancos (Solomon, 1987; Underwood y Sealy, 2002). Sin embargo, las posibles funciones adaptativas de la coloración de los huevos de las aves siguen generando un gran debate.

Sólo dos pigmentos son responsables de la diversidad en la coloración de los huevos: la **protoporfirina**, responsable de colores cafés-rojizos, y la **biliverdina**, asociada a colores azul-verdosos (Kennedy y Vevers, 1976; Cassey et al. 2012; Fig. 1 a-c). Ambos son compuestos porfirínicos tetrapirrólicos (i.e. formados por cuatro anillos aromáticos nitrogenados) involucrados en la biosíntesis y catabolismo del grupo hemo (Bulmer et al., 2008; McGraw, 2006; Fig. 1d), que juega un papel primordial en el transporte de gases y en el metabolismo aerobio (Furuyama et al., 2007). Tales pigmentos son sintetizados *de novo* en la glándula del cascarón (Reynolds et al., 2009) y depositados en la última etapa de formación del huevo (~4 horas antes de la puesta), por lo que están presentes en la capa de calcita y en la cutícula del cascarón (With, 1973; Solomon, 1987).

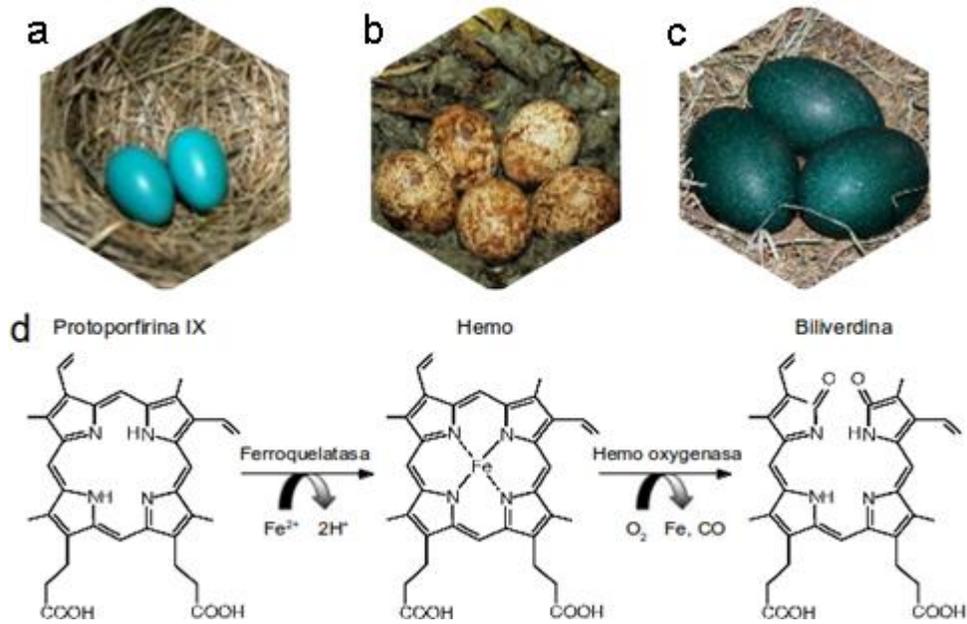


Figura 1 Variación en el color de los huevos (a) *Cyanocitta cristata*, (b) *Falco tinnunculus*, (c) *Dromaius novaehollandiae*. (d) Metabolismo de la protoporfirina a grupo hemo y a biliverdina.

Se han formulado varias hipótesis para tratar de explicar el significado adaptativo del color de los huevos (revisadas en Cherry y Gosler, 2010; Kilner, 2006; Maurer et al., 2011; McGraw, 2006; Underwood y Sealy, 2002). Estas hipótesis pueden ser organizadas en dos grupos: aquellas que lo consideran una **señal** y otras que le atribuyen una función **estructural** (Reynolds et al., 2009). Entre las hipótesis que consideran el color del huevo como una señal, se ha sugerido que el color del huevo puede tener una función de crípsis ocultando el huevo de depredadores. Una revisión hecha por Underwood y Sealy (2002) revela que sólo 6 de los 19 estudios experimentales publicados apoyan esta hipótesis. También se ha sugerido que la coloración permite a las aves diferenciar los huevos propios de los ajenos en casos de anidación en colonia o de parasitismo de puesta (inter y/o intraespecífico). Tal hipótesis ha obtenido apoyo para algunas especies (*Uria aalge*: Tschanz, 1959; *U. lomvia*; Gaston et al., 1993) pero no para otras (*Pygoscelis adeliae*: Bartholomew y Howell, 1964; *Phoebastria immutabilis*: Frederickson y Weller, 1972; *Ph. nigripes*: Davis y McCaffrey, 1989).

Una de las hipótesis de señalización más apoyadas es el color del huevo como una señal sexual que refleja la calidad de la hembra y que los machos usan para ajustar su inversión (Moreno y Osorno, 2003). Se ha encontrado que el color verde del huevo (asociado a la biliverdina) se

correlaciona con la disponibilidad de alimento (Moreno et al., 2006) y de carotenoides en la dieta (Morales et al. 2011), que se asocia con la condición de la hembra (Siefferman et al., 2006; Soler et al., 2008), que afecta la coordinación de los padres en la incubación (Morales et al., 2010), que incrementa el esfuerzo paterno en la alimentación de los pollos (Soler et al., 2008), y que refleja la probabilidad de supervivencia de las crías (Moreno et al., 2006).

Entre las hipótesis relacionadas con las posibles funciones estructurales del color del huevo, se ha sugerido que el color del cascarón podría tener una función de termorregulación debido a que los pigmentos impiden el sobrecalentamiento de los huevos cuando son expuestos a la luz. De acuerdo con la idea anterior, Bakken y colaboradores (1978) encontraron que los cascarones con protoporfirina y biliverdina de 25 especies de aves reflejan un alto porcentaje de las ondas infrarrojas del espectro en comparación con el pigmento melanina de las plumas. También se ha sugerido una función estructural que no ha sido experimentalmente probada en aves y que propone que los pigmentos en el cascarón cumplen la función de filtrar la radiación solar para proteger al embrión de la radiación UV-B que daña el ADN (Maurer et al., 2011). Finalmente, la evidencia alrededor de la función de los pigmentos en el reforzamiento del cascarón, es contradictoria (Underwood y Sealy, 2002). Se ha encontrado que los huevos blancos de codorniz se rompen más fácilmente que los pigmentados (Briggs y Williams, 1975), sin embargo, la coloración de los huevos de gallina no se correlaciona con su gravedad específica, grosor del cascarón, deformación o resistencia al quiebre (Washburn y Potts, 1975).

Recientemente, Ishikawa y colaboradores (2010) propusieron una nueva función estructural del color de los huevos. Ellos encontraron que las preparaciones hechas con cascarones pigmentados reducen la supervivencia de cultivos bacterianos, lo que indica una actividad fotodinámica antimicrobiana de los pigmentos porfirínicos (protoporfirina y biliverdina). De esta forma, sugirieron la posibilidad de que la asignación de pigmentos en los cascarones del huevo haya evolucionado como un sistema de defensa del huevo contra infecciones.

El color como defensa antibacteriana

Los huevos de las aves son susceptibles al ataque de microbios después de la puesta, cuando se ven expuestos a los microorganismos presentes en el nido, polvo, tierra y heces del ambiente. Se ha reportado que varios cientos a millones de bacterias de numerosas especies están presentes normalmente en la superficie del cascarón (Board, 1995; Bruce y Drysdale, 1994). Aquellos patógenos que logran atravesar el cascarón y sus membranas son causa de mortalidad del embrión en aves de corral (Bruce y Drysdale, 1994) y de vida libre (Cook et al., 2005a; Pinowsky et al., 1994). También, se sabe que la probabilidad de infecciones incrementa con la abundancia de microorganismos presentes en la superficie del cascarón (Cook et al., 2003, 2005a). Las bacterias que han sido reconocidas como patógenos porque se han encontrado repetidamente en huevos no eclosionados o en descomposición (principalmente en huevos de aves de corral) pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y a los géneros *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Pseudomonas* (Baggot y Graeme-Cook, 2002; Board, 1995; Bruce y Drysdale, 1994; Burley y Vadehra, 1989; Cook et al., 2003; Houston et al., 1997; Pinowski et al., 1994). De forma notable, Bruce y Drysdale (1991) encontraron que los huevos inoculados con cultivos de *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Escherichia coli* presentaron un porcentaje de eclosión de 0%, 0% y 10%, respectivamente, en comparación al 85% de los huevos del grupo control.

Dado que las infecciones bacterianas representan una presión selectiva que reduce el éxito de eclosión (Bruce y Drysdale, 1994), las aves han desarrollado defensas **físico-químicas** inherentes al huevo y defensas **conductuales** de los padres (Board, 1995; Burley y Vadehra, 1989; Wellman-Labadie et al., 2008). El huevo de las aves posee dos defensas naturales, el cascarón (i.e. cutícula, cascarón calcificado y membranas), que actúa como una barrera física que impide la entrada de agua y las bacterias transportadas por ella; y la clara, que presenta un sistema de proteínas endógenas antibacterianas (e.g. lisozimas, ovotransferina, antiproteasas y proteínas ligadas a vitaminas; Baron y Réhault, 2007) capaces de matar bacterias y detener su crecimiento (Baggot y Graeme-Cook, 2002; Board, 1995; Bruce y Drysdale, 1994; Burley y Vadehra, 1989). Por otro lado, se ha propuesto que la incubación es una conducta que protege al huevo de infecciones al modular la presencia de bacterias en la superficie del huevo, pues aumenta su temperatura y reduce la humedad (Cook et al., 2003; 2005a; 2005b; Shawkey et al., 2009), y que la elección del sitio de anidación en función de la densidad de individuos también puede influir en la probabilidad de infecciones (Patterson y Ruckstuhl, 2013). Además, la incorporación de materiales con actividad antibacteriana en el nido, como plantas verdes (Baggot y Graeme-Cook, 2002) o plumas (Peralta-Sánchez et al., 2010), también ha sido asociada con la disminución de bacterias potencialmente patógenas en el cascarón.

Los pigmentos del huevo, la protoporfirina y la biliverdina, son compuestos porfirínicos que poseen un sistema de enlaces dobles conjugados y átomos de hidrógeno reactivos (Kaur et al., 2003). Dada su estructura reactiva, se les han atribuido importantes propiedades antioxidantes (Bauer y Bauer, 2002; Fang et al., 2003; McDonagh, 2001; McGraw, 2005) y antinitrosantes (Kaur et al., 2003). Se ha propuesto que estos pigmentos se sintetizan *de novo* en el epitelio de la glándula del cascarón (Zhao et al., 2006) y son depositados primero en la matriz de calcita y después, de forma más abundante, en la cutícula del cascarón (With, 1973; Solomon, 1987). En los últimos años, las porfirinas han sido el grupo de **fotosensibilizadores** más estudiado (Dolmans et al., 2003). Un fotosensibilizador es una molécula aromática que, al ser combinada con luz, llega a un estado excitado capaz de transferir la energía adquirida a otras moléculas. Como consecuencia, se forman moléculas excitadas de larga duración, o bien, especies reactivas de oxígeno (ROS) que tienen efectos deletéreos sobre las células. Los daños inducidos a las células abarcan citotoxicidad, daño al ADN, ruptura de ácidos nucleicos, peroxidación de lípidos, lisis celular, necrosis y apoptosis. A este fenómeno se le llama **efecto fotodinámico** (Dolmans et al., 2003). De este modo, las porfirinas han sido usadas en tratamientos como la Terapia Fotodinámica (PDT) y Quimioterapia Fotodinámica Antimicrobiana (PACT), para eliminar células cancerosas y patógenos (Castano et al., 2006; Dolmans et al., 2003; Malik, 1990; Wainwright, 1998).

En 2010, Ishikawa y colaboradores propusieron que los pigmentos del huevo (biliverdina y protoporfirina) constituyen una defensa antibacteriana contra bacterias Gram-positivas por medio de su actividad fotodinámica. Encontraron que las preparaciones hechas con cascarones de huevos verdes, cafés y blancos que fueron expuestas a la luz redujeron la supervivencia de cultivos de *Staphylococcus aureus* a 1.31%, 0.41% y 38.85%, respectivamente. También encontraron que las preparaciones disminuyeron significativamente la supervivencia de bacterias Gram-positivas (*S. aureus* y *Bacillus cereus*) pero no la de bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*). La supervivencia bacteriana fue determinada realizando diluciones seriales que después fueron cultivadas en placas para contar las UFC. Recientemente, Fargallo et al. (2014) pusieron a prueba esta hipótesis en un estudio de campo realizado con nidadas de *Falco tinnunculus* en el que los huevos del grupo experimental fueron manipulados para retirar los pigmentos (protoporfirina y biliverdina) de su superficie. En ese estudio no se encontraron diferencias significativas en la probabilidad de eclosión, mortalidad, condición corporal, respuesta inmune o probabilidad de reclutamiento de los pollos del grupo experimental en comparación con el grupo control (Fargallo et al. 2014). Sin embargo, en el trabajo anterior no se estudió la composición ni la proliferación de la comunidad bacteriana, y tampoco se midieron las variables ambientales y características del huevo que pueden influir en ésta.

Bobo enmascarado

El bobo enmascarado (*Sula dactylatra*) es una especie que pertenece a la Familia *Sulidae* del Orden Pelecaniforme. Se trata de un ave marina de distribución pantropical que anida en islas oceánicas formando colonias de tamaño y densidad variable. Se reproduce anualmente y su temporada reproductiva dura 33-40 semanas: 3-6 semanas de cortejo, 6 de incubación, 23-26 de cuidado de las crías y 3 o más de estadía post-crianza (Nelson, 1978). El bobo enmascarado construye un nido simbólico (sin valor estructural) creando una ligera hondonada en el suelo a la que puede agregarle ramas, guijarros y plumas. Generalmente, el tamaño de la puesta es de dos huevos que son puestos con un intervalo de 5.6 días e incubados por ambos padres (Nelson, 1978; Nelson, 2005).

Los huevos recién puestos del bobo enmascarado son de un tono azul-verde que, después de la puesta, se cubre con una capa blanca (presumiblemente de vaterita; Sparks, 1994) que puede ser retirada para acceder al color azul (observación personal). La presencia de biliverdina sólo ha sido confirmada en los huevos del bobo de patas azules (Morales et al., 2010). No obstante, el bobo de patas azules (*Sula nebouxii*), el enmascarado (*S. Dactylatra*), el peruano (*S. variegata*), el de patas rojas (*S. Sula*) y el café (*S. leucogaster*) forman un grupo monofilético (Friesen y Anderson, 1997) cuyos huevos presentan la misma coloración azul-verde (Nelson 1978). Lo anterior sugiere que la presencia de biliverdina en los huevos es un rasgo compartido de este clado y que se trata de una simplesiomorfía, porque también está presente en las familias Anhingidae, Phalacrocoracidae y Ardeidae (Kilner, 2006). En este trabajo nos propusimos evaluar la posible correlación entre la coloración azul-verde (biliverdina) y la comunidad bacteriana presente en la superficie del huevo.



Figura 2 Pareja de bobos enmascarados.

Objetivos

Evaluar correlativamente el efecto que el color azul-verde de los huevos del bobo enmascarado tiene sobre:

- 1) la abundancia de bacterias,
- 2) la riqueza y diversidad de bacterias, y
- 3) la estructura de la comunidad bacteriana en la superficie del cascarón.

Hipótesis y Predicciones

Los pigmentos azul-verdes (biliverdina) de los huevos del bobo enmascarado tienen actividad antibacteriana en la superficie del cascarón.

Si la hipótesis es correcta esperamos que los huevos más azules-verdes presenten:

- 1) menor abundancia de bacterias,
- 2) menor riqueza y diversidad de bacterias, y
- 3) menor abundancia relativa de bacterias patógenas Gram-positivas (pero no de bacterias patógenas Gram-negativas) en la superficie del cascarón.

Métodos

El estudio se realizó en diciembre de 2012 en la colonia reproductiva del bobo enmascarado (*Sula dactylatra*) localizada en la Isla Muertos dentro del Parque Nacional Arrecife Alacranes, Yucatán, México (22°24'N 89°42'W). La Isla Muertos cuenta con una extensión aproximada de 15.6 has y en ella se ubica la colonia de pájaro bobo enmascarado más grande del Atlántico (CONANP-SEMARNAT, 2006).

Se utilizaron, en total, 49 puestas de dos huevos distribuidas en la zona suroeste de la isla. Para reducir la perturbación a las aves y evitar el abandono de los nidos, los huevos incubados fueron intercambiados por otro par de huevos de bobo enmascarado mientras se realizaban las mediciones y muestreos bacterianos fuera del nido. El tiempo de manipulación fue de alrededor de 5 minutos. Todos los huevos fueron devueltos a su nido original y se constató que fueran incubados por sus padres. Dada la duración del trabajo de campo, no conocimos la edad de los huevos.

Protocolo de muestreo de bacterias

Para estimar la cantidad de bacterias presentes en la superficie del cascarón se siguió una versión modificada del protocolo de Peralta-Sánchez et al. (2010). Todos los muestreos bacterianos se realizaron entre las 15 y las 18 hrs durante cuatro días consecutivos.

Con el objetivo de mantener condiciones estériles y evitar la contaminación de un nido a otro, la manipulación de los huevos se llevó a cabo con guantes de nitrilo esterilizados con etanol al 96%. Inmediatamente después de sacar los huevos del nido se midió su temperatura poniendo simultáneamente en contacto ambos huevos con un termómetro digital JR-1 (± 1 °C) para estimar la

temperatura de incubación del nido. El muestreo bacteriano consistió en frotar suavemente toda la superficie de cada huevo con un hisopo estéril de asa plástica previamente humedecido en una solución salina de buffer sodio-fosfato (0.2 M, pH 7.2) y 50% de glicerol que fue esterilizada a 120 °C por 15 min. La punta del hisopo fue depositada en un tubo Eppendorf con 1 mL de la misma solución estéril (50% buffer sodio-fosfato y 50% glicerol) y almacenada en nitrógeno líquido hasta su procesamiento en el laboratorio.

Una vez terminado el muestreo bacteriano y marcados los polos del huevo con plumón indeleble no tóxico, se frotó cuidadosamente una pequeña área de la superficie del cascarón (~1 cm²) con una tela humedecida en agua para retirar la cubierta de carbonato de calcio. Se registró su color colocando un espectrofotómetro (Konica Minolta CD-2600) directamente frente al área azul. El espectro de reflectancia para cada huevo fue obtenido automáticamente promediando tres medidas consecutivas. De las curvas de reflectancia se calcularon tres índices de color según Montgomerie (2006): (1) el color azul-verdoso del huevo (“Croma azul-verde”, CAV) fue calculado como la proporción de reflectancia de los colores azul y verde del espectro ($R_{400-570}/R_{360-700}$) (Morales et al., 2010), (2) se calculó la reflectancia total del huevo (“Brillo”) sumando todos los valores de reflectancia del espectro de 360 a 700 nm y, (3) el pico máximo de reflectancia (“Tono”) como la longitud de onda con mayor reflectancia del espectro (Fig. 3). De este modo, el brillo y el CAV se relacionan negativamente ($r = -0.65$, $P < 0.0001$, $N = 98$). Es decir, un valor de CAV más grande indica un color azul-verde menos brillante (i.e. un azul-verde más oscuro).

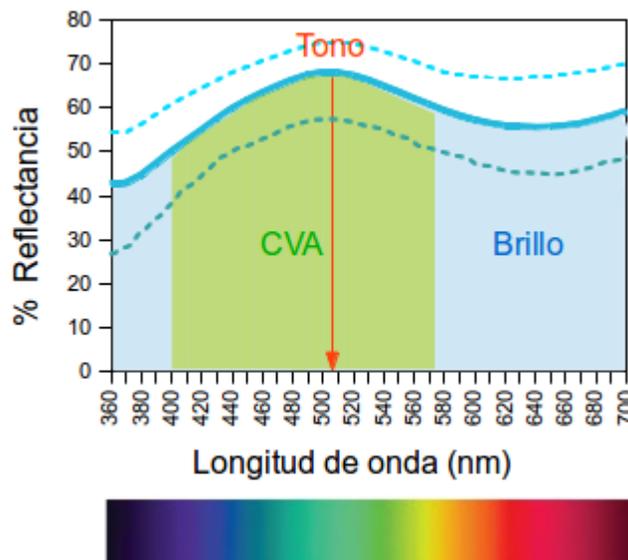


Figura 3 Variación en el color de los Curva promedio de reflectancia y rango de variación natural del color de los huevos. Representación de los índices de color Croma Azul-Verde, Brillo y Tono.

Se midió el peso del huevo con una balanza digital (± 0.01 g) y su largo y ancho con un vernier (± 1 mm) para calcular su volumen en mm^3 usando la fórmula (Hoyt, 1979):

$$\text{Volumen} = 0.51 \times \text{Largo} \times \text{Ancho}^2$$

Finalmente, para cada nido se midió y promedió la distancia a los 5 nidos más cercanos para obtener un estimado de la densidad de nidos alrededor del nido; de aquí en adelante nos referiremos a esta variable como densidad de vecinos.

Para conocer el cambio de la comunidad bacteriana a través del tiempo, después de 7 días del primer muestreo (Muestreo 1) se llevó a cabo un segundo muestreo bacteriano (Muestreo 2) en cada huevo, excluyendo los nidos en los que se presentó eclosión o pérdida de algún huevo, o que fueron abandonados. El segundo muestreo se realizó en 37 nidos.

Estimación de la Carga Bacteriana

Con el objetivo de evitar la contaminación, todo el procesamiento de las muestras fue realizado en campana de flujo laminar. Cada tubo fue agitado en vórtex 3 veces por 10, 5 y 5 s para liberar las bacterias recolectadas en el hisopo. Para cada muestra se realizó una dilución 1:20 con solución salina estéril (0.9 %) y se sembraron 100 μL que fueron esparcidos con esferas de vidrio estériles en una caja de Petri con medio de cultivo Agar Soya-Triptona (TSA) para bacterias mesofílicas. El medio de cultivo TSA es uno de los mejores medios generales para cultivar organismos aerobios y anaerobios (Cook et al., 2005b), incluyendo los géneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* y *Escherichia* que son conocidos patógenos de los huevos (Baggott y Graeme-Cook, 2002; Bruce y Drysdale, 1994; Houston et al., 1999; Pinowski et al., 1994).

Para cada huevo se procesó la Muestra 1 y Muestra 2, y para cada muestra se sembraron dos placas. En cada sesión de siembra se realizaron 3 placas controles: (1) 100 μL de solución salina esparcidos con perlas de vidrio, (2) sólo perlas de vidrio y (3) exposición al medio en la campana. Todas las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas y terminado el tiempo se refrigeraron (4 °C) por 48-72 horas para detener su crecimiento, hasta su procesamiento. La dilución utilizada y el tiempo de incubación fueron ajustados mediante un pilotaje con 5 muestras en que se hicieron diferentes diluciones (1:10, 1:20, 1:30, 1:50, 1:100) que fueron incubadas y revisadas cada 6 horas. Se eligió la concentración y el tiempo en que las UFC de todas las cajas fueron contables.

Para estimar la Carga Bacteriana se tomó una fotografía de cada caja para hacer un conteo de las UFC presentes. Se estimó la carga bacteriana (CB) de cada Muestreo promediando el número de UFC de las dos cajas sembradas y estandarizándola por cm² de la superficie del huevo. El área del cascarón se calculó con la fórmula de Narushin (2005):

$$\text{Área} = (3.155 - 0.0136 \times \text{Largo} + 0.0115 \times \text{Ancho}) \times \text{Largo} \times \text{Ancho}$$

El cambio en la Carga Bacteriana (Δ CB) fue calculado como la diferencia entre el Muestreo 2 y el Muestreo 1. De esa forma los valores positivos indican aumento en la carga bacteriana y los negativos, decremento.

Protocolo de identificación bacteriana

Para identificar las bacterias encontradas, se describieron aquellas colonias que eran diferentes entre sí, identificándolas como *morfos* de acuerdo a su color, tamaño, forma y textura (Anexo 1). Posteriormente, se contaron las UFC correspondientes a cada *morfo*.

Con el objetivo de identificar taxonómicamente los *morfos* encontrados, se seleccionó aleatoriamente una submuestra de 33 huevos de nidos diferentes cuyos *morfos* fueron aislados tomando una pequeña porción de una colonia representativa de cada *morfo* que fue cultivada individualmente en tubos Eppendorf con 1 mL de medio de cultivo TSA. Dichos tubos fueron incubados a 37°C por 24 horas y después se refrigeraron (4°C) para detener su crecimiento hasta su análisis. Posteriormente, se amplificó selectivamente un fragmento del 16S rRNA de cada *morfo* para después ser secuenciado (Anexo 1). Primero se realizaron ampliaciones por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de cada colonia, esto es, se agregó una pequeña porción de la colonia a una mezcla de PCR y durante el primer paso de desnaturalización en el termociclador (94 °C, 10 min) se lisaron las células para liberar los ácidos nucleicos que fueron empleados como templado.

Se empleó el primer universal para Bacteria y Archaea Tx9 (Ashby et al. 2007) (5'-GGA TTA GAW ACC CBG GTA GTC-3') y 1391R (5'-GAC GGG CRG TGW GTR CA-3') que amplifica un fragmento del gen 16S rRNA de ~600pb que incluye las regiones hipervariables V5 y V6 (Centeno et al., 2012). Cada reacción de PCR consistió en un volumen final de 25 µL que contenía, además de las células agregadas con un palillo, 2.5 µL de 10× Buffer de PCR (Invitrogen), 2.0 mM de MgCl₂, 0.4 µM de primer, 0.2 mM de cada desoxirribonucleótido-trifosfato, 1.5 U de DNA polimerasa Taq

recombinante (Invitrogen), 0.5 mg/mL de albúmina de suero bovino y 5% de dimetil sulfóxido. Las condiciones de termociclado incluyeron un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 10 min, seguido de 38 ciclos de amplificación que consistieron en un paso de desnaturalización a 94 °C por 30 s, un paso de alineamiento del primer a 55 °C por 30 s, y uno de amplificación a 72 °C por 45 s, y finalmente, un último paso de terminación a 72 °C por 15 min. La amplificación fue confirmada por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% y bromuro de etidio (0.83 µg/mL), observados bajo radiación UV. Las reacciones de PCR en donde se observó producto fueron secuenciadas en un secuenciador ABI 3730xl DNA (Applied Biosystems) empleando el primer directo Tx9.

Se comenzó el análisis de las secuencias verificando cualitativamente la señal de los cromatogramas obtenidos (96), y conservando sólo aquellas de buena calidad (86), es decir, aquellas en las que el cromatograma mostraba picos bien definidos y sin sobrelape. Se recortaron ~30 pb en cada extremo para eliminar los fragmentos de mala calidad (aquellos en los que la señal del cromatograma era tenue y poco definida) y como resultado, se recuperaron secuencias con una longitud de ~550 pb (552.63 ± 0.28 , Anexo 2). Un primer análisis consistió en comparar las secuencias con la base de datos del Ribosomal Database Project (RDP-II), empleando como referencia solamente secuencias obtenidas de cepas aisladas y caracterizadas, para posteriormente ser comparadas de forma más exhaustiva con las secuencias de la base de datos del GenBank (Anexo 3). Cada secuencia fue identificada en base al porcentaje máximo de identidad con las secuencias de referencia reportadas. Se asignó la identidad de especie cuando el porcentaje de similitud fue superior al 97%, y de género cuando fue mayor a 95% (Roselló-Mora y Amann, 2001).

Para reportar la concordancia en la identificación de los *morfos*, se compararon las características morfológicas (color, tamaño, forma y textura colonial) con la identificación molecular (afiliación de la secuencia 16S rRNA) obtenida (Anexo 3).

Estimación de la riqueza y diversidad bacteriana

La riqueza específica (S) de cada huevo fue calculada sumando todas las especies diferentes asignadas a los *morfos* presentes en cada muestreo, de este modo se obtuvo el estimado “superior” de riqueza para cada huevo en el muestreo 1 y 2. De forma similar, se emplearon los estimados superiores de riqueza específica para estimar la diversidad bacteriana, considerando que las especies asignadas a un morfo estaban igualmente distribuidas en cada muestra. Se calculó el índice de Shannon (H') (Hill et al., 2003):

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

Y el índice de Simpson (D) (Dunbar et al., 1999):

$$D = 1 - \sum p_i^2$$

donde p_i es la proporción que cada especie representa del total.

Determinación de la estructura de la comunidad bacteriana

Como un estimador de la estructura de la comunidad, las especies bacterianas se agruparon de acuerdo a características fenotípicas o ecológicas que pudieran influir en la comunidad o en la probabilidad de infección del huevo. De este modo, se separaron las bacterias patógenas en Gram-negativas y Gram-positivas (donde una bacteria patógena de los huevos es aquella que ha sido encontrada reiteradamente en huevos no eclosionados y que es capaz de disminuir su probabilidad de eclosión; Baggott y Graeme-Cook, 2002; Cook et al., 2003; Bruce & Drysdale, 1994; Board, 1995; Houston et al., 1997; Pinowski et al., 1994), y se formó un tercer grupo con las bacterias no patógenas que suelen encontrarse en el suelo (Lee et al., 2006; Meng et al., 2013; Raza et al., 2008; Wietz et al., 2011; Yoon et al., 2004). Para cada grupo se calculó su carga bacteriana en el Muestreo 1 y en el Muestreo 2. Finalmente, la carga de cada grupo fue estandarizada calculando la proporción que representaba con respecto a la Carga Bacteriana total del huevo (Carga Bacteriana total = 1).

Análisis Estadístico

Se utilizaron los programas R v3.0.3 (R Core Team, 2014) y SAS/STAT® para realizar los análisis estadísticos. Se reportan media aritmética \pm 1 error estándar, a menos que se indique otro caso.

Características de los huevos

De la muestra total de 49 nidos, en 15 el orden de puesta (primer huevo/segundo huevo) era conocido. En estas puestas de orden conocido, el primer huevo era más grande que el segundo en 14 de 15 casos (93.3%). Por lo anterior, usando como criterio una diferencia de una desviación estándar según la variación de las puestas de orden conocido ($2842.22 \pm 1436.50 \text{ mm}^3$), se clasificó como “Huevo 1”, al huevo más grande y como “Huevo 2” al huevo más pequeño de las puestas de orden desconocido. Este criterio permitió asignar claramente el orden de puesta en 31 de los 34 nidos en que el orden era desconocido, para los 3 restantes se asumió que el huevo más grande era el Huevo 1. De este modo, los Huevos 1 de los nidos con orden de puesta conocido son 11.6% más grandes (± 7.4 , Prueba de *t*-pareada, $t = 3.93$, $P = 0.001$), y en los nidos con orden asignado son 14.2% más grandes (± 8.68). Los Huevos 1 también son más pesados (Prueba de *t*-pareada, $t = 9.74$, $P < 0.001$, $N = 49$), pero no difieren de los huevos 2 en CAV (H1: 0.55 ± 0.01 , H2: 0.54 ± 0.01 ; Prueba de *t*-pareada: $t = 0.83$, $P = 0.41$) ni en Brillo (H1: 2023.46 ± 122.11 , H2: 2040.06 ± 144.73 ; Prueba de *t*-pareada: $t = -1.51$, $P = 0.14$).

Para evaluar si existe una relación entre el CAV y las demás características del huevo, se utilizó un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) con una distribución de error normal en el que se incluyó como variable de respuesta el CAV y como factor aleatorio la identidad del nido. Como

variables predictoras se incluyeron el peso, el orden de puesta, las variables ambientales que posiblemente están relacionadas con la calidad de los padres (temperatura de incubación y densidad de vecinos) y todas las interacciones de primer orden. La significancia del factor aleatorio se estimó mediante una prueba de razón de verosimilitud restringida (RLRT) con 1000 simulaciones (Wiencierz et al., 2011). Para obtener el modelo mínimo se utilizó el método de simplificación en reversa usando un $\alpha = 0.05$.

Descripción de la comunidad bacteriana

Para analizar si existía una relación entre los índices de riqueza y diversidad, se hicieron pruebas de correlación de Spearman. Por otro lado, se calculó el cambio (Δ) en la abundancia de los tres grupos bacterianos (Patógenos Gram-negativos, Patógenos Gram-positivos y No-patógenos) como la diferencia entre el Muestreo 2 y el Muestreo 1. Con dichos cambios, se hicieron pruebas de correlación de Spearman para analizar si existía alguna relación entre el cambio de los grupos de bacterias.

Análisis Canónico de Correspondencia

Con el objetivo de realizar un análisis exploratorio de las comunidades bacterianas en el Muestreo 1 y Muestreo 2, se realizó un Análisis Canónico de Correspondencia (CCAs) para cada Muestreo. Los CCAs son análisis multivariados que permiten conocer la proporción de la variación en la composición de la comunidad que es explicada por las variables ambientales asociadas. Su representación gráfica muestra los patrones dominantes en la composición de la comunidad y su relación con las variables ambientales más importantes (Greenacre, 2007; Ter Braak, 1986). En ambos CCA se incluyó, como “comunidad” la abundancia de los géneros encontrados en cada huevo y como “variables ambientales” se utilizaron el CAV, el volumen, el orden de puesta, la densidad de vecinos y la temperatura de incubación.

Relación del color con la comunidad bacteriana

Para evaluar la posible correlación del color del cascarón del huevo con la comunidad bacteriana se usaron Modelos Lineales Mixtos de medidas repetidas (LMMs). Se ajustaron modelos independientes

para analizar la Carga Bacteriana (transformada a logaritmo base 10), los índices de riqueza (S, transformada a raíz cuadrada) y diversidad bacteriana (índice de Shannon H' y Simpson D, ambos transformados a su inverso), y la abundancia relativa de los Patógenos Gram-positivos (transformadas con logaritmo natural) y No-patógenos (transformadas con raíz cuadrada). En todos los modelos, la medida repetida fue la variable de respuesta en el Muestreo 1 y 2 y la distribución de errores fue normal. Los modelos incluyeron como variables para evaluar los efectos inter-sujetos: CAV, orden de puesta, volumen, temperatura y densidad de vecinos. Los efectos intra-sujetos se evaluaron incluyendo las interacciones de primer orden de los efectos principales con la variable Muestreo, y todas las interacciones de segundo orden del Muestreo y CAV, y Muestreo y orden de puesta con las demás variables. Debido a que en el Análisis Canónico de Correspondencia la temperatura y el color del huevo parecen tener efectos antagonistas sobre la comunidad bacteriana, para los análisis con modelos de medidas repetidas de los grupos bacterianos probamos modelos que incluían la temperatura y modelos donde esta variable fue excluida de los efectos intra-sujetos.

Debido a que en más de la mitad de los 33 huevos analizados no se cultivaron y detectaron bacterias Patógenas Gram-negativas, la proporción de este grupo bacteriano fue convertida en variable binaria (presencia/ausencia). Para analizar la presencia/ausencia de bacterias Patógenas Gram-negativo se utilizó un GLMM de medidas repetidas con distribuciones de errores binomial y una función de enlace logit. El modelo inicial incluyó CAV, orden de puesta, volumen, temperatura y densidad de vecinos, como efectos inter-sujetos; y las interacciones de primer orden de la variable Muestreo con CAV, orden de puesta, volumen, temperatura, y densidad de vecinos, y las interacciones de segundo orden del Muestreo con CAV y orden de puesta como efectos intra-sujeto.

Todos los LMMs fueron ajustados con el paquete estadístico SAS/STAT® y se discriminó entre modelos utilizando el método de simplificación en reversa hasta que los elementos del modelo fueran significativos ($\alpha = 0.05$) y se verificó que tuvieran el menor AIC (Criterio de Información de Akaike).

Resultados

Características de los huevos

En el bobo enmascarado los huevos más pesados presentan un color azul-verde menos brillante, es decir, más oscuro. El CAV de los huevos se relacionó positivamente con el peso del huevo ($\beta = 0.0002$, $t = 2.35$, $P = 0.023$; Fig. 4), y se encontraron diferencias significativas entre nidos en el CAV de los huevos (RLTP = 18.28, $P < 0.0001$, $N = 49$ nidos). Sin embargo, no se detectaron diferencias entre el CAV de los huevos 1 y huevos 2, y la variación en CAV no se relacionó con la temperatura de incubación o la distancia promedio a los nidos vecinos (términos principales e interacciones de primer orden, todas las $P > 0.10$). De forma interesante, aunque el peso y el volumen del huevo están estrechamente relacionados ($r = 0.93$, $P < 0.0001$), el CAV no se relaciona con el volumen del huevo cuando se elimina el peso del análisis ($P = 0.135$).

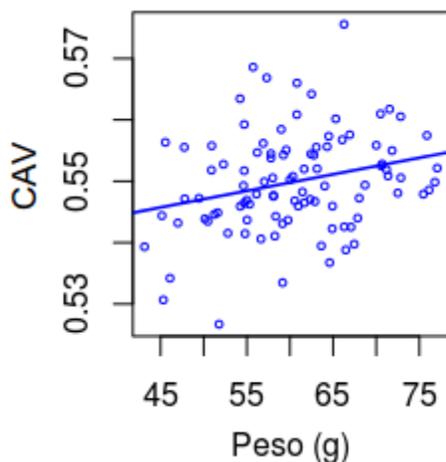


Figura 4 Relación entre el croma azul-verde (CAV) y el peso de los huevos.

Descripción de la comunidad bacteriana

Abundancia

Los 33 huevos en los que se estudió la comunidad bacteriana presentaron una considerable variación en la carga bacteriana: el coeficiente de variación del primer muestreo (Carga bacteriana 1, CB₁) fue 82.3% (0.39 ± 0.03, rango 0.02 - 1.19 UFC/mm²) y del segundo muestreo (CB₂) fue 118.34% (0.55 ± 0.065, rango 0.04 - 3.18 UFC/mm²).

Riqueza y Diversidad

Se obtuvieron un total de 96 secuencias de las cuales se recuperaron 61 secuencias únicas de buena calidad con una longitud de ~550 pb (Anexo 2). Las secuencias obtenidas mostraron un porcentaje de identidad >90% (98.9% ± 0.16, rango 90 – 99%), las cuales se agruparon en 30 diferentes ribotipos (Anexo 3). Dichos ribotipos fueron asignados con una confiabilidad >80% (95% ± 1.83, rango 80 - 100%) a 22 *morfos* descritos (Anexo 1). Los 30 ribotipos identificados pertenecen a tres diferentes filos (Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria), 3 clases, 5 órdenes, 10 familias y 12 géneros. El género con más especies presentes fue *Bacillus* con 9 especies que representan 30% del total, seguido de *Staphylococcus* con 4 especies equivalentes al 13.3%.

Se encontró que la riqueza (S) se correlaciona positivamente con la diversidad bacteriana en el Muestreo 1 (Índice de Shannon-Wiener, H': $r_S = 0.72$, $P < 0.0001$; Índice de Simpson, D: $r_S = 0.57$, $P = 0.001$) y en el Muestreo 2 (H': $r_S = 0.64$, $P < 0.0001$; D: $r_S = 0.51$, $P = 0.002$). También se encontró que los índices de diversidad se relacionan positivamente entre sí en ambos muestreos (M1: $r_S = 0.96$, $P < 0.0001$; M2: $r_S = 0.93$, $P < 0.0001$).

Estructura

Las 30 especies (ribotipos) bacterianas identificadas fueron asignadas a 3 grupos que conforman la estructura de la comunidad e incluyen Patógenos Gram-negativos, Patógenos Gram-positivos y bacterias No-patógenas (Tabla 1).

También se encontró que el cambio en la abundancia de los grupos bacterianos era independiente al cambio en los demás grupos, es decir, no se encontraron correlaciones significativas entre el cambio de las bacterias patógenas Gram-negativas y las patógenas Gram-positivas ($r_S = 0.13$, $P = 0.46$, $N = 33$), entre patógenas Gram-negativas y no patógenas ($r_S = 0.23$, $P = 0.19$, $N = 33$) o entre patógenas Gram-positivas y no patógenas ($r_S = 0.24$, $P = 0.17$, $N = 33$).

Tabla 1 Grupos bacterianos encontrados en la superficie del huevo.

Grupo	Géneros	Especies
Patógenas Gram-negativas	<i>Kluyvera</i>	<i>K. intermedia</i>
	<i>Pantoea</i>	<i>P. agglomerans</i> , <i>P. eucalypti</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. putida</i>
	<i>Psychrobacter</i>	<i>P. faecalis</i>
Patógenas Gram-positivas	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermis</i> , <i>S. gallinarum</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. sciuri</i>
	<i>Enterococcus</i>	<i>E. durans</i>
No patógenas	<i>Bacillus</i>	<i>B. aquimaris</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B.adius</i> , <i>B. firmus</i> , <i>B. fordii</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. niacini</i> , <i>B. pseudofirmus</i>
	<i>Arthrobacter</i>	<i>A. aurescens</i> , <i>A. creatinolyticus</i>
	<i>Paenibacillus</i>	<i>P. camelliae</i>
	<i>Sporosarcina</i>	<i>S. koreensis</i> , <i>S. saromensis</i>
	<i>Terribacillus</i>	<i>T. goriensis</i>
	<i>Virgibacillus</i>	<i>V. halodenitrificans</i>

Análisis Canónico de Correspondencia

Los análisis exploratorios de la comunidad bacteriana del Muestreo 1 y 2 sugieren que las variables ambientales medidas explican ~25% de la variación en la composición de la comunidad: 24.5 y 26.6%, respectivamente (Tabla 2).

En el CCA del Muestreo 1 las bacterias fecales *Psychrobacter faecalis* y *Enterococcus durans* son las que más contribuyen a la variación representada en el primer eje que se relaciona con el volumen del huevo. Las enterobacterias *Kluyvera* y *Pantoea*, por su parte, contribuyen con la variación del segundo eje relacionado negativamente con la distancia a los nidos vecinos (Tabla 2). De esta forma, los huevos más grandes presentan, proporcionalmente, más bacterias fecales *P. faecalis* y *E. durans*, mientras que los huevos de nidos en zonas más densas presentan más enterobacterias *Kluyvera* y *Pantoea*. Además, el análisis muestra que los géneros no patógenos *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Arthrobacter* y *Virgibacillus* se agrupan cercanamente con los géneros patógenos *Pseudomonas* y *Staphylococcus* (Fig. 5a).

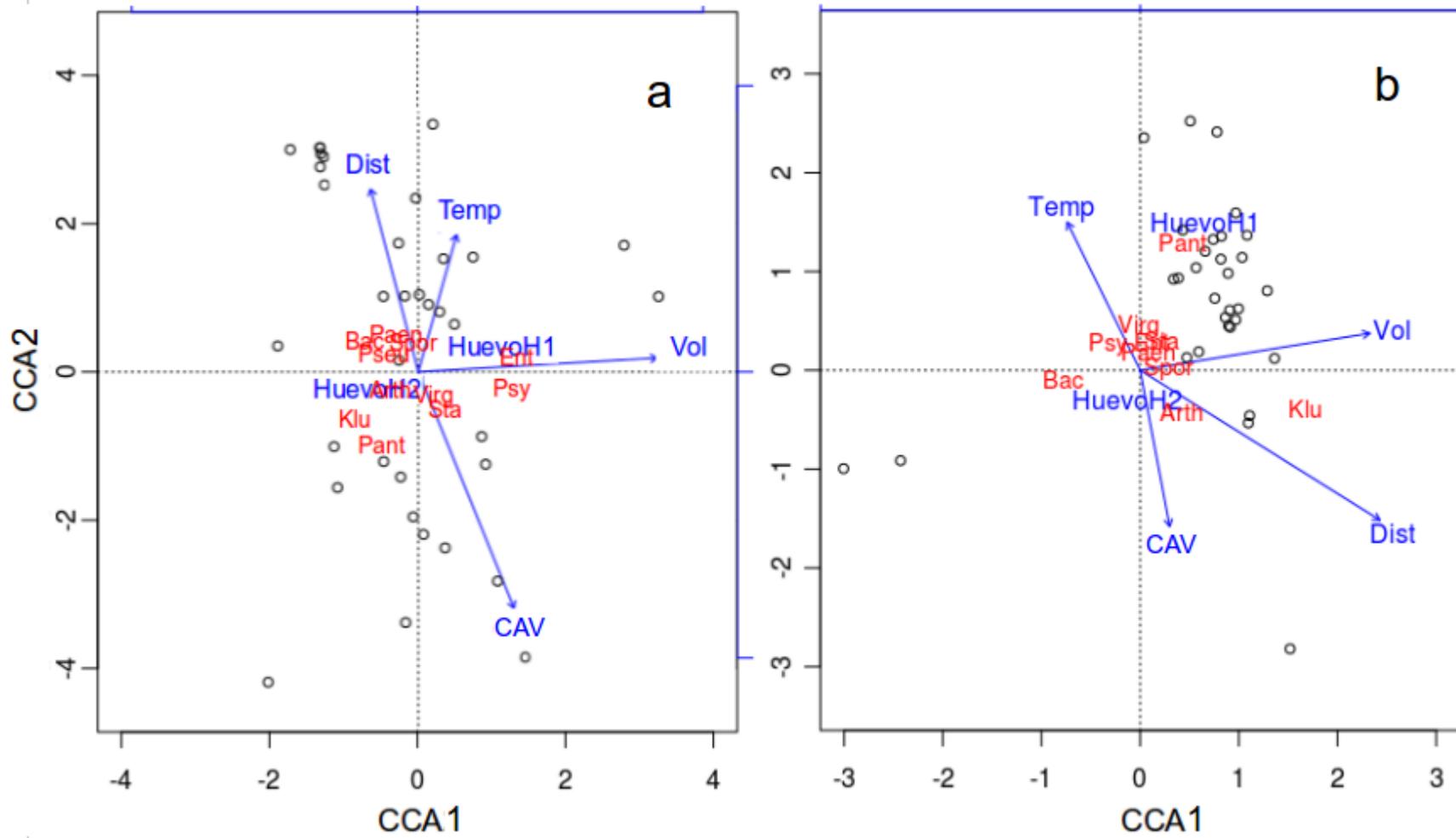


Figura 5 Triplot de los Análisis Canónico de Correspondencia (CCA) de la comunidad bacteriana por huevo (puntos) y sus variables ambientales (flechas) en el (a) Muestreo 1 y (b) Muestreo 2. Las especies bacterianas son: *Arthrobacter* (Arth), *Bacillus* (Bac), *Enterococcus* (Ent), *Kluyvera* (Klu), *Paenibacillus* (Paen), *Pantoea* (Pant), *Pseudomonas* (Pseu), *Psychrobacter* (Psy), *Sporosarcina* (Spor), *Staphylococcus* (Sta), *Virgibacillus* (Virg).

Tabla 2 Análisis Canónico de Correspondencia (CCA) de la comunidad bacteriana (11 géneros) en el Muestreo 1 y Muestreo 2 (N = 33).

	M1		M2	
Inercia total	1.245 (100%)		1.210 (100%)	
Inercia restringida	0.305 (24.5%)		0.322 (26.6%)	
Inercia no-restringida	0.940 (75.5%)		0.889 (73.4%)	
	CCA 1	CCA 2	CCA 1	CCA 2
Eigenvalor	0.195	0.049	0.221	0.069
Proporción restringida explicada	63.9%	16.3%	68.5%	21.4%
	Coef.	Coef.	Coef.	Coef.
CAV	0.353	-0.379	0.076	-0.499
Orden puesta	-0.823	-0.318	-0.298	-0.634
Volumen	0.820	0.189	0.718	0.041
Temperatura	0.114	0.403	-0.218	0.509
Distancia	0.619	-0.714	-0.719	0.440

En el Muestreo 2, la enterobacteria *Kluyvera* es la que más contribuye con la variación del primer eje relacionado con el volumen del huevo y *Pantoea* contribuye a la variación del segundo. Así, los huevos más grandes y los Huevos 1 presentan proporcionalmente más enterobacterias. En contraste, los demás géneros tienden a agruparse (Fig. 5b).

La comparación entre el CCA del Muestreo 1 y el del Muestreo 2 sugiere que en el primer muestreo las comunidades de los huevos son más diferentes entre sí y en Muestreo 2 son más parecidas: los puntos que representan la comunidad de cada huevo están más cerca unos de otros en el Muestreo 2 (Fig. 5) En adición, en ambos muestreos el volumen del huevo explica mayoritariamente la variación del primer eje, mientras que el CAV del huevo y la temperatura de incubación contribuyen de forma opuesta a la variación explicada por el segundo eje (Tabla 2).

¿Se relaciona el color del huevo con la comunidad bacteriana?

Relación del color del huevo con la carga bacteriana

Se encontró una relación entre el cambio en la CB y el CAV que depende de la densidad de vecinos (Tabla 3). La CB de los huevos de nidos en zonas de mayor densidad de vecinos no se relaciona con el CAV, pero en los nidos aislados los huevos de color azul-verde más oscuro aumentan su CB con el

tiempo (Fig. 6a). Además, se encontró que la CB del huevo 2 aumenta con el tiempo, pero no la del huevo 1 (Fig. 6b).

Tabla 3 Modelo Lineal Mixto (LMM) de medidas repetidas ajustado a la Carga Bacteriana (CB) del Muestreo 1 y Muestreo 2 (AIC = 79.5, N = 33 huevos).

<i>Inter-sujetos</i>		
Variable	F	P
CAV	0.05	0.82
Orden	0.01	0.93
Volumen	5.50	0.03
Distancia	0.52	0.475
<i>Intra-sujetos</i>		
Muestreo	3.40	0.08
Muestreo*CAV	3.43	0.075
Muestreo*Orden	5.25	0.03
Muestreo*Distancia	8.21	0.01
Muestreo*CAV*Distancia	4.39	0.02

Modelo inicial: CAV + Orden + Volumen + Distancia + Temperatura + Muestreo + Muestreo*CAV + Muestreo*Orden + Muestreo*Volumen + Muestreo*Distancia + Muestreo*Temperatura + Muestreo*CAV*Orden + Muestreo*CAV*Distancia + Muestreo*CAV*Temperatura + Muestreo*Orden*Volumen + Muestreo*Orden*Temperatura + Muestreo*Orden*Distancia

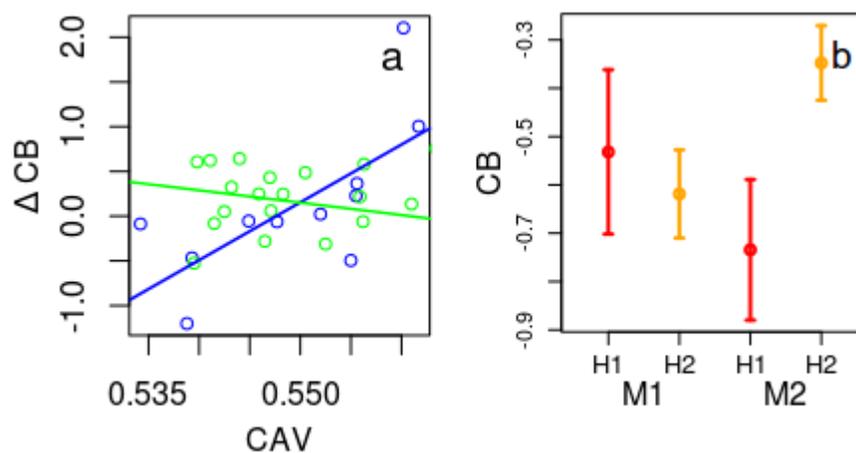


Figura 6 (a) Relación entre el cambio en la carga bacteriana (ΔCB) y el cromatismo azul-verde (CAV) en sitios de alta (verde) y baja (azul) densidad de vecinos. (b) Diferencias (media \pm EE) en la CB entre Huevo 1 (H1) y Huevo 2 (H2) en el Muestreo 1 (M1) y Muestreo 2 (M2).

Relación del color del huevo con la riqueza y diversidad bacteriana

En todos los casos, los índices de riqueza (S; Fig. 7a) y diversidad (H' y D; Fig. 7b y c) producen resultados similares. No se encontró relación en el cambio en riqueza/diversidad entre el Muestreo 1 y 2 y el CAV del huevo. Sin embargo, existe una correlación entre el cambio en la riqueza/diversidad y la distancia a los nidos vecinos (i.e. densidad de nidos); aunque para la diversidad estimada mediante el índice de Shannon (H') el efecto es sólo marginalmente significativo (Tabla 4). Los huevos de nidos de sitios de baja densidad aumentan más su riqueza y diversidad en comparación a los nidos de zonas más densas (Fig. 7). Por otra parte, a pesar de que la riqueza y diversidad son menores en el Muestreo 1 (S: 0.12 ± 0.02 ; H': 1.48 ± 0.08 ; D: 0.7 ± 0.03) que en el Muestreo 2 (S: 0.19 ± 0.03 ; H': $1.92 \pm .07$; D: 0.8 ± 0.02), no se encontraron diferencias significativas entre muestreos (Tabla 4).

Tabla 4 Modelos Lineales Mixtos (LMMs) de medidas repetidas ajustados a los índices de riqueza (S) y diversidad (H', D) en el Muestreo 1 y Muestreo 2 ($AIC_S = 132$, $AIC_H = 21.0$, $AIC_D = 254.7$; N = 33).

<i>Inter-sujetos</i>						
Variable	S		H'		D	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Distancia	0.52	0.476	0.46	0.502	1.63	0.211
<i>Intra-sujetos</i>						
Muestreo	0.38	0.541	0.70	0.410	0.01	0.949
Muestreo*Distancia	6.15	0.019	3.81	0.06	4.87	0.035

Modelo inicial: CAV + Orden + Volumen + Distancia + Temperatura + Muestreo +
Muestreo*CAV + Muestreo*Orden + Muestreo*Volumen + Muestreo*Distancia + Muestreo*Temperatura +
Muestreo*CVA*Orden + Muestreo*CAV*Distancia + Muestreo*CAV*Temperatura + Muestreo*Distancia*Temperatura +
Muestreo*Orden*Volumen + Muestreo*Orden*Temperatura + Muestreo*Orden*Distancia

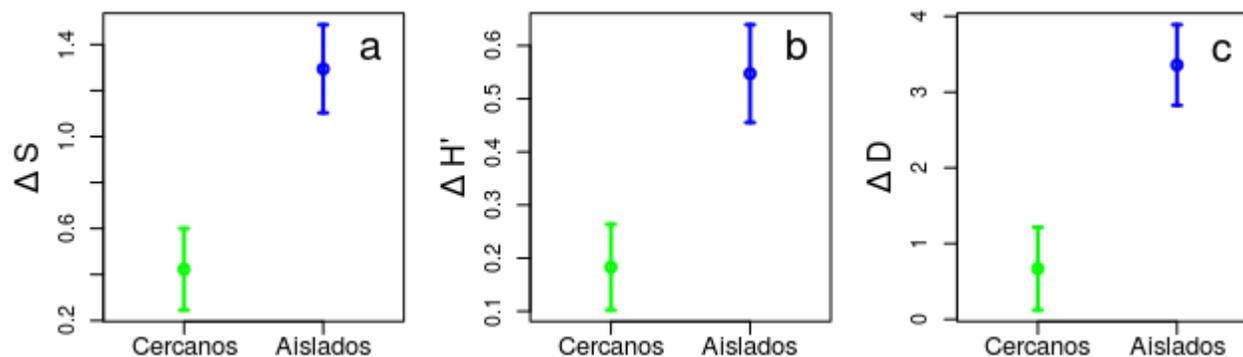


Figura 7 Diferencias (media \pm EE) en el cambio en (a) riqueza y (b,c) diversidad en sitios de alta (verde) y baja (azul) densidad de vecinos.

Relación del color del huevo con la estructura de la comunidad bacteriana

El modelo de medidas repetidas ajustado a la presencia de Patógenos Gram-negativos sugiere que el CAV no influye en el cambio en la presencia de este grupo bacteriano (Tabla 5). Se encontró que en el Muestreo 2 el número de nidos con presencia de Patógenos Gram-negativos aumentó ($F_{1,61} = 4.39$, $P = 0.04$; Fig. 8). No obstante, ninguna variable ni interacción se relacionó con dicho aumento (Tabla 5).

Tabla 5 Modelo Lineal Mixto (LMM) de medidas repetidas ajustado a lo Patógenos Gram-negativos en el Muestreo 1 y Muestreo 2, con distribución binomial (AIC = -108.2; N = 33).

<i>Inter-sujetos</i>		
Variable	<i>F</i>	<i>P</i>
CAV	4.59	0.036
Temperatura	4.72	0.034
<i>Intra-sujetos</i>		
Muestreo	4.39	0.04

Modelo inicial: CAV + Orden + Volumen + Distancia + Temperatura + Muestreo + Muestreo*CAV + Muestreo*Orden + Muestreo*Volumen + Muestreo*Distancia + Muestreo*Temperatura + Muestreo*CAV*Orden

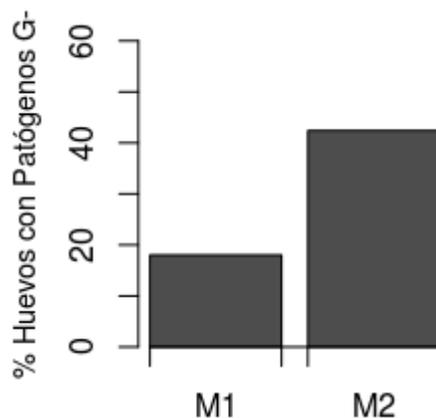


Figura 8 Porcentaje de huevos con presencia de Patógenos Gram-negativos en el Muestreo 1 (M1) y Muestreo 2 (M2) (N = 33).

En cuanto a los otros dos grupos bacterianos, se encontró una correlación entre el cambio en la proporción de Patógenos Gram-positivos y No-patógenos con la temperatura de incubación que depende de la distancia a los nidos más cercanos, es decir, de la densidad de vecinos (Tabla 6a).

Pruebas *post hoc* muestran que en zonas de mayor densidad, la proporción de ambos grupos bacterianos no se correlaciona con la temperatura de incubación (Patógenos Gram-positivos: $\beta = -0.003$, $t = -0.25$, $P = 0.79$; No-patógenos: $\beta = -0.01$, $t = -0.23$, $P = 0.82$). En contraste, en zonas de baja densidad, los huevos incubados a mayor temperatura disminuyen significativamente su proporción de Patógenos Gram-positivos ($\beta = -0.04$, $t = -2.60$, $P = 0.03$) y aumentan la de No-patógenos ($\beta = -0.11$, $t = 2.62$, $P = 0.03$; Fig. 9).

Tabla 6 Modelos Lineales Mixtos (LMMs) de medidas repetidas ajustados a los Patógenos G+ y No-patógenos en el Muestreo 1 y Muestreo 2, con distribución normal (N = 33). En el análisis intra-sujetos (a) se incluyó la temperatura (AIC = -1.1, AIC = 249.13) (b) se excluyó la temperatura (AIC = -49.9, AIC = 249.13).

		<i>Inter-sujetos</i>			
		Patógenos G+		No-patógenos	
	Variable	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
a	CAV	5.82	0.023		
	Orden			5.91	0.02
	Distancia	1.88	0.182	6.66	0.015
	Temperatura	2.08	0.161	1.52	0.23
	<i>Intra-sujetos</i>				
	Muestreo	1.48	0.23	3.28	0.08
	Muestreo*Distancia	6.15	0.02	9.30	0.005
	Muestreo*Temperatura	1.37	0.25	3.16	0.09
	Muestreo*Distancia*Temperatura	6.01	0.007	7.64	0.002
		<i>Inter-sujetos</i>			
	CAV	0.19	0.67	0.12	0.73
	Orden	1.97	0.17	1.41	0.24
		<i>Intra-sujetos</i>			
b	Muestreo	0.06	0.80	0.02	0.89
	Muestreo*CAV	0.07	0.79	0.02	0.08
	Muestreo*Orden	5.00	0.03	5.21	0.03
	Muestreo*CAV*Orden	3.39	0.048	3.21	0.055

(a) Modelo inicial: CAV + Orden + Volumen + Distancia + Temperatura + Muestreo + Muestreo*CAV + Muestreo*Orden + Muestreo*Volumen + Muestreo*Distancia + Muestreo*Temperatura + Muestreo*CVA*Orden + Muestreo*CAV*Distancia + Muestreo*CAV*Temperatura + Muestreo*Distancia*Temperatura + Muestreo*Orden*Volumen + Muestreo*Orden*Temperatura + Muestreo*Orden*Distancia

(b) Modelo inicial: CAV + Orden + Volumen + Distancia + Temperatura + Muestreo + Muestreo*CAV + Muestreo*Orden + Muestreo*Volumen + Muestreo*Distancia + Muestreo*CAV*Orden + Muestreo*CAV*Distancia + Muestreo*Orden*Volumen + Muestreo*Orden*Distancia

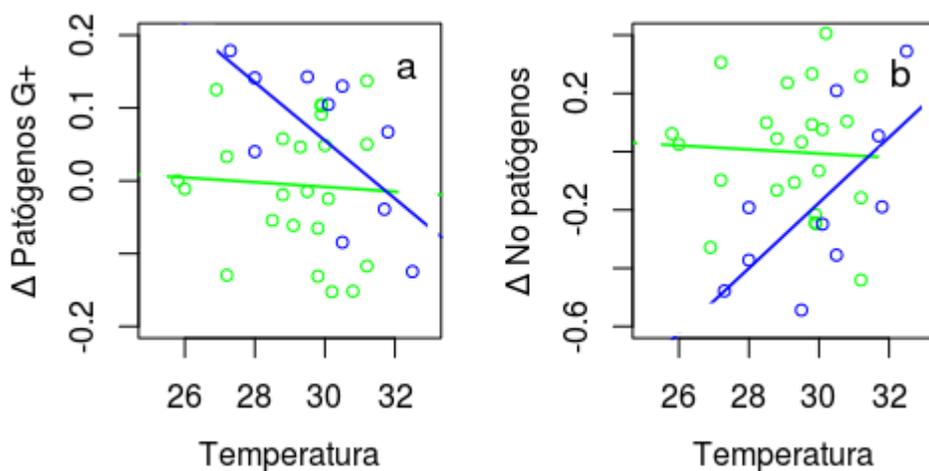


Figura 9 Relación de la temperatura con (a) Δ Patógenos Gram-positivos y (b) Δ No-patógenos en sitios de alta (verde) y baja (azul) densidad de vecinos.

Sin embargo, cuando se eliminó la temperatura de incubación del análisis, se encontró que el CAV se relaciona con el cambio en los grupos bacterianos y que dicha relación depende del orden de puesta (Tabla 6b). Las pruebas *post hoc* indican que, en los Huevos 1, el CAV no se relaciona significativamente con la proporción de los grupos bacterianos (Patógenos Gram-positivos: $\beta = 4.53$, $t = 1.47$, $P = 0.18$; No-patógenos: $\beta = -11.15$, $t = -1.23$, $P = 0.25$). En cambio, en los Huevos 2, existe una relación marginalmente significativa entre el CAV y los grupos bacterianos: hay una tendencia a que los huevos de un azul-verde más oscuro presenten menor proporción de Patógenos Gram-positivos ($\beta = -3.59$, $t = -1.76$, $P = 0.09$) y mayor proporción de bacterias No-patógenas ($\beta = 0.91$, $t = 2.05$, $P = 0.053$; Fig. 10). Por lo tanto, en los Huevos 2 el CAV tiene el efecto predicho de disminuir la abundancia relativa de patógenos.

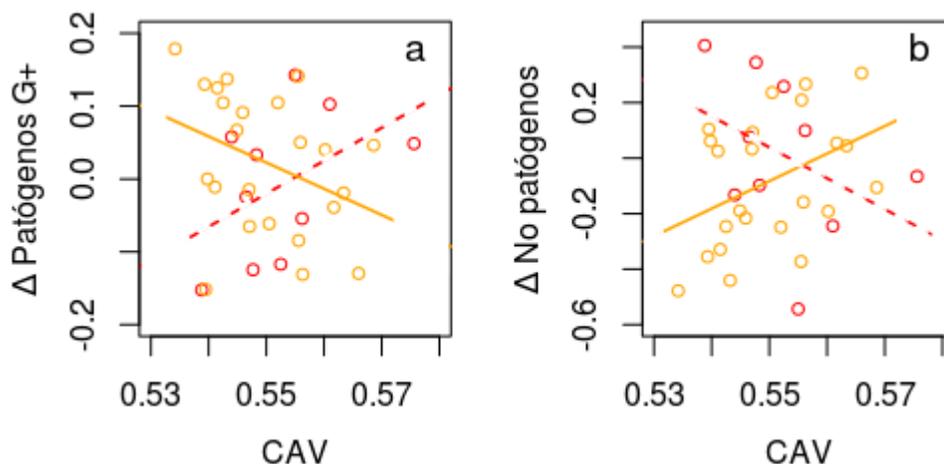


Figura 10 Relación del croma azul-verde (CAV) y (a) Δ Patógenos Gram-positivos y (b) Δ No-patógenos en Huevos 1 (rojo) y Huevos 2 (naranja).

En resumen, los resultados muestran que los huevos de un azul-verde más oscuro son también los más pesados, aunque no son de mayor volumen, y que sólo en los Huevos 2 aumenta la abundancia de bacterias con el tiempo. Los resultados también muestran que en sitios de mayor densidad de vecinos (i.e. menor distancia a los nidos vecinos) la abundancia, riqueza/diversidad y estructura de la comunidad bacteriana prácticamente no cambian a través del tiempo. Por el contrario, en zonas de baja densidad: (1) los huevos de un azul-verde más oscuro aumentan su Carga Bacteriana, (2) la riqueza y diversidad bacteriana aumentan, (3) los huevos incubados a mayor temperatura disminuyen sus Patógenos Gram-positivos y aumentan sus bacterias No-patógenas. La exploración de las comunidades bacterianas sugiere que el color de los huevos y la temperatura de incubación influyen de forma opuesta en las comunidades y que, al pasar el tiempo, las comunidades bacterianas se parecen más entre sí. Finalmente, al separar la influencia de la temperatura, sólo en los Huevos 2 el color del huevo muestra un efecto sobre las comunidades bacterianas. Así, los Huevos 2 de color azul-verde más oscuro disminuyen sus patógenos Gram-positivos y aumentan sus No-patógenos.

Discusión

Características de los huevos

En aves, el tamaño y peso del huevo han sido asociados con el desarrollo del embrión, el éxito de eclosión, el tamaño del pollo al eclosionar y su supervivencia (revisado en Williams, 1994). En nuestro estudio encontramos que los huevos de un azul-verde más oscuro fueron también los más pesados. A pesar de que el peso del huevo disminuye con el tiempo debido a que pierde agua por razones metabólicas, nuestro resultado podría sugerir que el color del huevo es un indicador de su calidad. De acuerdo con esta idea, se ha reportado que en el papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*) el color del huevo se relaciona positivamente con la cantidad de anticuerpos maternos en la yema del huevo y con la probabilidad de supervivencia de las crías (Moreno et al., 2006). En el bobo de patas azules, una especie del mismo género que el bobo enmascarado, el peso y volumen del huevo se correlacionan positivamente con el éxito de eclosión, el peso de los pollos al eclosionar y su probabilidad de supervivencia (D'Alba y Torres, 2007). Mas aún, en el bobo de patas azules el color azul-verde de los huevos parece influir en división del esfuerzo parental durante la incubación, pues las parejas que tienen huevos más azul-verde dividen los turnos de incubación de forma más equitativa que las parejas que tienen huevos menos azules (Morales et al., 2010). En el bobo enmascarado estudios futuros podrían evaluar si efectivamente los huevos más pesados y con un croma azul-verde mayor tienen una mayor probabilidad de eclosionar y la posible función del color de los huevos como señal en los conflictos intrafamiliares (Morales y Velando, 2013).

Es interesante notar que en nuestro estudio, sólo el peso del huevo, y no su volumen, se relacionó con el color del huevo. Morales et al. (2010) encontraron que la suplementación de las hembras de bobo de patas azules con carotenoides se asocia positivamente con el color del huevo pero no con su volumen. De hecho, nosotros encontramos que el coeficiente de variación del peso fue mayor que el del volumen (13.29 y 11.37%, respectivamente). Lo anterior podría ser un signo de que el tamaño del huevo es una característica altamente repetible e individual de las hembras (Christians, 2002) y que, por tanto, la hembra es capaz de manipular la composición relativa del huevo asignando mayor cantidad de pigmentos en el cascarón (biliverdina) y en la yema (carotenoides) de acuerdo a la disponibilidad de nutrientes en la dieta (Houston et al., 2002).

Descripción de la comunidad bacteriana

La composición de la microbiota encontrada en los huevos de bobo enmascarado, dominada por bacilos Gram-positivos y cocos Gram-positivos, es similar a la reportada en huevos de gallinas en cautiverio (Cook et al., 2003), de azulejo (*Sialia mexicana*), de golondrina bicolor (*Tachycineta bicolor*) y de golondrina verdemar (*T. thalassina*) (Wang et al., 2011). Por el contrario, difiere marcadamente de la encontrada en huevos de saltapared norteño (*Troglodytes aedon*) y azotador de ojos perlados (*Magarops fuscatus*) que presentaron en su mayoría especies de la familia Pseudomonadaceae y proporcionalmente pocos bacilos (Potter et al., 2013; Shawkey et al., 2009). Estas diferencias en la composición no parecen ser resultado del método de identificación bacteriana empleado. En los estudios de Cook et al. (2003), Wang et al. (2011) y Potter et al. (2013), al igual que en el nuestro, se emplearon medios de cultivo; en contraste, sólo Shawkey et al. (2009) utilizaron técnicas moleculares de identificación independientes de cultivos (i.e. extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación). Las diferencias en las comunidades bacterianas tampoco parecen estar asociadas a factores filogenéticos o al tipo de anidación. En nuestro estudio, el bobo enmascarado es un Suliforme que anida en el suelo y no construye nido, mientras que en los otros estudios se analizaron con un Galliforme (Cook et al. 2003), y cinco Paseriformes que anidan en cajas nido. Dado el pequeño número de estudios realizados en condiciones naturales (o seminaturales, como el caso de las cajas nido), no se pueden hacer todavía análisis comparativos para proponer hipótesis formales. Sin embargo, es posible que las diferencias en la composición bacteriana de los huevos se deban al efecto combinado de características ambientales y sistemas de defensa de las especies.

¿Se relaciona el color del huevo con la comunidad bacteriana?

Relación del color del huevo con la carga bacteriana

Contrario a nuestras predicciones, nuestros resultados sugieren que la abundancia de bacterias aumenta con el color azul-verde de los huevos. No obstante, esto sólo ocurre en zonas con baja densidad de nidos vecinos. Los resultados también sugieren que el orden de puesta influye en la abundancia de bacterias: en los Huevos 2 la Carga Bacteriana aumenta significativamente con el tiempo, pero no es así en los Huevos 1. A pesar de que desconocemos las consecuencias de un incremento en la abundancia total de bacterias, el hecho de que en varias especies de súlidos la probabilidad de eclosión disminuye con el orden de puesta (e.g. bobo de patas azules; D'Alba y Torres, 2007; bobo café, Montoya y Torres, en rev), sugiere que una mayor carga bacteriana podría estar relacionada con mayor mortalidad de embriones en los Huevos 2.

Relación del color del huevo con la riqueza y diversidad bacteriana

En nuestro estudio encontramos que la riqueza y diversidad bacterianas aumentan de forma independiente a la coloración del huevo, por lo que el color azul-verde del huevo parece no tener el efecto predicho de disminuir la riqueza/diversidad de bacterias. No obstante, la densidad de vecinos parece tener una influencia importante en las comunidades bacterianas de los huevos. En el bobo enmascarado encontramos que en zonas de alta densidad de vecinos, la abundancia y riqueza/diversidad (y también la proporción de Patógenos Gram-positivos y proporción de No-patógenos) se mantienen más o menos estables a través del tiempo y no se relacionan con las variables ambientales (Fig. 11).

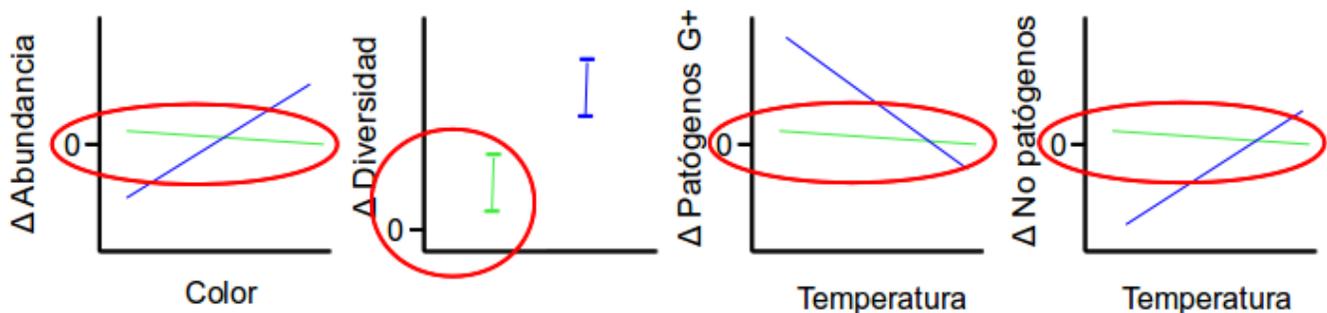


Figura 11 Representación de la relación de la comunidad bacteriana con la densidad (verde) alta y (azul) baja de nidos.

Aunque no tenemos una explicación clara de por qué no cambia la microbiota en sitios densos y sí en sitios de baja densidad, esto podría deberse a que la gran abundancia de heces y plumas en zonas muy densas (y las bacterias en ellas) podrían influir de forma constante y uniforme sobre la comunidad bacteriana de los huevos, ocultando el efecto de las demás variables ambientales. Esto podría implicar que la presencia de bacterias ambientales influye en la elección del sitio de anidación, de modo que sólo los individuos capaces de enfrentar los costos asociados a la vida en grupos (e.g. el incremento en la probabilidad de infecciones; Patterson y Ruckstuhl, 2013) son los que anidan en zonas de alta densidad de nidos, es decir, los individuos de buena calidad.

Relación del color del huevo con la estructura de la comunidad bacteriana

Nuestros resultados sugieren que el color del huevo no se relaciona con la proporción de Patógenos Gram-negativos. Por tanto, los huevos más azules-verdes no presentan menor abundancia relativa de éstos patógenos, como habíamos predicho dada la nula sensibilidad de las bacterias Gram-negativas al efecto fotodinámico de las porfirinas (Ishikawa et al., 2010). De hecho, no encontramos que la presencia de este grupo bacteriano se relacionara con ninguna variable ambiental, sólo encontramos que el porcentaje de huevos con presencia de estas bacterias aumenta con el tiempo. No obstante, la baja abundancia encontrada de estos Patógenos Gram-negativos (la cual nos llevó a convertirla en una variable binomial de presencias/ausencias) probablemente nos impidió ver su relación con las variables ambientales. Resulta particularmente notorio que, a pesar de que el medio de cultivo empleado (TSA) permite el crecimiento de *Pseudomonas* y *Escherichia* según las especificaciones de Sigma-Aldrich© y del Manual Difco™ & BBL™ (Zimbro et al., 2009), la presencia del primer género fue muy baja (presente en menos del 45% de los huevos) y el segundo estuvo ausente. Hay algunos escenarios que pueden explicar este fenómeno: (1) que la abundancia de bacterias Gram-negativas sea baja en los huevos de esta población de bobo enmascarado, (2) que el método dependiente de cultivos haya permitido el crecimiento de sólo algunas cepas cultivables de *Kluyvera*, *Pantoea*, *Pseudomonas* y *Psychrobacter*, e impedido la proliferación de otros géneros como *Escherichia*, (3) una combinación de baja abundancia de estas bacterias y las limitaciones del medio de cultivo. En este sentido, un estudio descriptivo de la comunidad bacteriana en los huevos de esta ave que utilice métodos independientes de cultivos, podría brindar un mejor conocimiento de la microbiota y ayudar a mejorar las metodologías empleadas en futuros estudios.

Por otro lado, encontramos que la temperatura se relaciona negativamente con los Patógenos Gram-positivos. En sitios con baja densidad de nidos, la proporción de Patógenos Gram-positivos disminuye cuando la temperatura de incubación aumenta. En 2009, Shawkey y colaboradores encontraron que la incubación mantiene la composición de la microbiota de los huevos “estática” en el

tiempo, y que no inhibe el crecimiento de bacterias patógenas (e.g. enterobacterias) o promueve el de bacterias no patógenas (e.g. bacilos Gram-positivos). No obstante, no encontraron bacterias de la familia Staphylococcaceae o Enterococaceae en los huevos de *M. fuscatus*, por lo que no evaluaron el efecto de la incubación en estos patógenos Gram-positivos (Shawkey et al., 2009). Nuestros resultados sugieren un efecto de la temperatura de incubación sobre la abundancia relativa de los géneros *Staphylococcus* y *Enterococcus*.

A pesar de que los resultados anteriores sugerían que el color azul-verde del huevo no se relaciona con la proporción de Patógenos Gram-negativos, el análisis exploratorio de las comunidades bacterianas (CCA) sugirió que el color de los huevos y la temperatura de incubación influyen de forma opuesta en las bacterias de la superficie del huevo (Fig. 12). Por esta razón, realizamos otros análisis donde separamos el efecto de la temperatura y en los que encontramos que el color del huevo sí se relaciona con la abundancia relativa de los Patógenos Gram-positivos y los No-patógenos. De hecho, los AIC señalan que los modelos mejoran cuando la temperatura es eliminada de los análisis. De este modo, encontramos que los Huevos 2 de color azul-verde más oscuro presentan una menor abundancia relativa de Patógenos Gram-positivos, como fue predicho. Por tanto, a pesar de que los huevos más azules-verdes no presentan menor abundancia de bacterias, menor riqueza/diversidad bacteriana, ni menor proporción de Patógenos Gram-negativos, nuestros resultados sí apoyan la hipótesis de que la biliverdina tiene un efecto antibacteriano sobre los géneros *Staphylococcus* y *Enterococcus*, como fue propuesto por Ishikawa y colaboradores (2010). Ellos encontraron que las preparaciones de huevos café de gallina (*Gallus gallus domesticus*) redujeron significativamente la supervivencia de cultivos de *S. aureus* pero no de *Salmonella enteritidis* o *Escherichia coli*, por lo que propusieron que el efecto fotodinámico de los pigmentos en los huevos actúa sobre bacterias Gram-positivas pero no sobre bacterias Gram-negativas (Ishikawa et al., 2010).

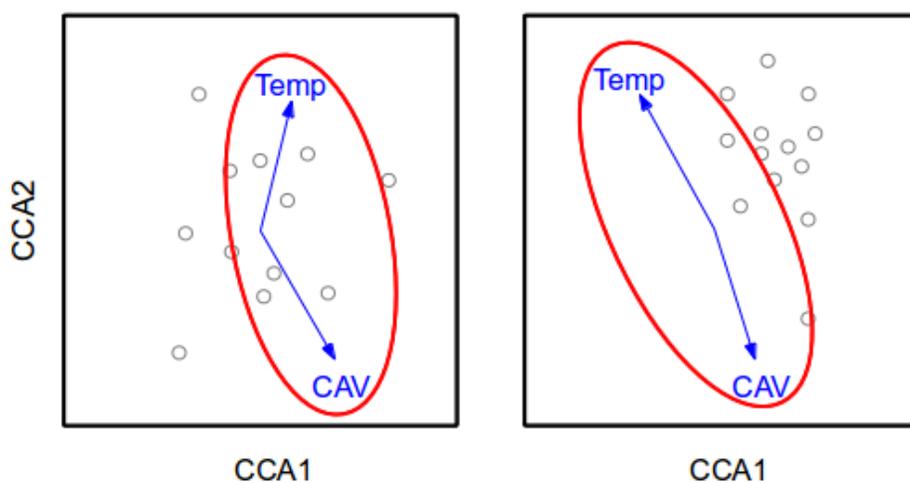


Figura 12

Representación del efecto antagonista del color del huevo (CAV) y la temperatura de incubación (Temp) encontrado en los CCAs.

Otras implicaciones

El análisis exploratorio de las comunidades bacterianas indica que las comunidades de los huevos se vuelven más parecidas entre sí con el tiempo (Figura 12). En consecuencia, cabe la posibilidad de que el efecto de los pigmentos y de la incubación no sea disminuir la carga bacteriana total, la riqueza/diversidad o la abundancia de patógenos, sino estimular la composición “ideal” de la microbiota. Si es el caso, entonces aquellos huevos cuyas comunidades no alcancen tal composición podrían ver aumentada su probabilidad de infección y su mortalidad.

En adición, el que la temperatura de incubación y el CAV influyan de forma opuesta en la comunidad bacteriana pero que, con el paso del tiempo, las microbiotas de los huevos lleguen a parecerse, sugiere que las hembras de bobo enmascarado adoptan dos estrategias equivalentes: invertir en los pigmentos depositados en el huevo o invertir en el esfuerzo de incubación. En este sentido, la biliverdina ha demostrado tener fuertes propiedades antioxidantes (Bauer y Bauer, 2002; Fang et al., 2003; Kaur et al., 2003; McDonagh, 2001; McGraw, 2005) por lo que la deposición del pigmento en el huevo puede constituir un costo fisiológico (Moreno y Osorno, 2003). La incubación, por otro lado, tiene costos energéticos sobre el metabolismo (Croxall, 1982) y sobre la masa corporal (Erikstad y Tveraa, 1995), y se sabe que el aumentar experimentalmente el esfuerzo de incubación aumentando el tamaño de puesta, disminuye la probabilidad de supervivencia de los pollos (Reid et al., 2000). Por lo tanto, ambos son recursos costosos que pueden representar un *trade-off* para las hembras de bobo enmascarado.

Finalmente, nuestros resultados sugieren que las características del huevo (i. e. color y orden de puesta) y las variables ambientales (i. e. densidad de nidos y temperatura de incubación) se relacionan de forma compleja con la comunidad bacteriana de la superficie del huevo. Estudios futuros podrían investigar, simultáneamente, el efecto que tienen estas variables sobre las bacterias del huevo y sobre su éxito de eclosión. En particular, para estudiar detalladamente la actividad antibacteriana de los pigmentos del huevo, podrían realizarse experimentos en el laboratorio donde se manipule la concentración de los pigmentos en el cascarón y se averigüe su efecto sobre diferentes grados de abundancia de bacterias. Además, puesto que las variables medidas explican aproximadamente un cuarto de la variación en la composición de las comunidades, nuestros resultados también apuntan a que existen otras variables que influyen en las bacterias de los huevos. La comunidad bacteriana de la cloaca de la hembra y del plumaje de los padres, así como sus características fenotípicas, son ejemplos de factores que podrían tomarse en cuenta en nuevos estudios.

Conclusiones

Los huevos más azules-verdes no presentan menor abundancia de bacterias, menor riqueza o diversidad bacteriana, ni menor proporción de Patógenos Gram-negativos, pero sí presentan menor abundancia relativa de Patógenos Gram-positivos, cuando son el segundo huevo puesto. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la biliverdina del cascarón tiene actividad antibacteriana sobre las bacterias patógenas Gram-positivas, *Staphylococcus* y *Enterococcus*, influyendo en la estructura de la comunidad bacteriana de la superficie del huevo. Nuestros resultados también sugieren que el color del huevo, su orden de puesta, la densidad de nidos y la temperatura de incubación se relacionan de forma compleja con la comunidad bacteriana de los huevos, y que estas variables pueden estar moldeadas por la calidad de los padres. Finalmente, los resultados sugieren que existen otras variables ambientales que influyen en las comunidades bacterianas de los huevos del bobo enmascarado.

Referencias

- Ashby M N, Rine J, Mongodin E F, Nelson K E y D Dimster-Denk.** 2007. Serial analysis of rRNA genes and the unexpected dominance of the rare members of microbial communities. *Applied Environmental Microbiology* **73**: 4532-4542.
- Baggot G K y K Graeme-Cook.** 2002. Microbiology of Natural Incubation. En: Deeming D C (Ed.) *Avian Incubation: Behaviour, Environment and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Bakken G S, Vanderbilt V C, Buttemer W A y W R Dawson.** 1978. Avian eggs: thermoregulatory value of very high near-infrared reflectance. *Science*, **200** (4339): 321-323.
- Baron F y S Réhault.** 2007. Compounds with antibacterial activity. En: Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M y R Schade (Eds.) *Bioactive egg compounds*. Springer, Berlín.
- Bartholomew G A y T R Howell.** 1964. Experiments on nesting behaviour of Laysan and Black-footed albatrosses. *Animal Behaviour* **12** (4): 549-558.
- Bauer M y I Bauer.** 2002. Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* **4** (5): 749-758.
- Blount J D, Surai P F, Nager R G, Houston D C, Moller A P, Trewby M L y M W Kennedy.** 2002. Carotenoids and egg quality in the lesser black-backed gull *Larus fuscus*: a supplemental feeding study of maternal effects. *Proceedings of the Royal Society of London B* **269** (1486): 29-36.
- Board R G** 1995. The Microbiology of Eggs. En: Stadelman W J, Newkirk D y L Newby (Eds.) *Egg Science and Technology*. CRC Press.
- Bonet F y J Rzedowski.** 1962. La vegetación de las islas del Arrecife Alacranes, Yucatán (México). *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, vol. XI.
- Briggs D M y E Teulings.** 1974. Correlation and repeatability between chicken egg-shell color and breaking strength. *Poultry Science* **53** (5): 1904-1904.
- Bruce J y E M Drysdale.** 1991. Egg hygiene: routes of infection. En: Tullet S G (Ed.) *Avian Incubation*. Poultry Science Symposium, Northants.
- Bruce J y E M Drysdale.** 1994. Trans-shell transmission. En: Board R G y R Fuller (Eds.) *Microbiology of Avian Eggs*. Chapman & Hall, London.

- Bulmer A C, Ried K, Blanchfield J T y K H Wagner.** 2008. The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutation Research* **658**: 28-41.
- Burley R W y D V Vadehra.** 1989. *The Avian Egg: Chemistry and Biology*. Wiley, Nueva York.
- Castano A P, Mroz P y M R Hamblin.** 2006. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer* **6** (7): 535-545.
- Cherry M I y A G Gosler.** 2010. Avian eggshell coloration: new perspectives on adaptive explanations. *Biological Journal of the Linnean Society* **100**: 753-762.
- Christians J K.** 2002. Avian egg size: variation within species and inflexibility within individuals. *Biological Reviews* **77**: 1-26.
- Cook M I, Beissinger S R, Toranzos G A, Rodriguez R A y W J Arendt.** 2003. Trans-shell infection by pathogenic micro-organisms reduces the shelf life of non-incubated bird's eggs: a constraint on the onset of incubation? *Proceedings of the Royal Society of London* **270**: 2233-2240.
- Cook M I, Beissegger S R, Toranzos G A y W J Arendt.** 2005a. Microbial infection affects egg viability and incubation behavior in a tropical passerine. *Behavioral Ecology* **16**: 30-36.
- Cook M I, Beissinger S R, Toranzos G A y W J Arendt.** 2005b. Incubation reduces microbial growth on eggshells and the opportunity for trans-shell infection. *Ecology Letters* **8**: 532-537.
- CONANP-SEMARNAT.** 2006. *Programa de Conservación y Manejo Parque Nacional Arrecife Alacranes*. México, 173pp.
- Croxall J P.** Energy costs of incubation and molt in petrels and penguins. *Journal of Animal Ecology* **51**: 177-194.
- D'Alba L y R Torres.** 2007. Seasonal egg-mass variation and laying sequence in a bird with facultative brood reduction. *The Auk* **124** (2): 643-652.
- Davis L S y F T McCaffrey.** 1989. Recognition and parental investment in adelic penguins. *Emu* **89**: 155-158
- Dolmans D E, Fukumura D y R K Jain.** 2003. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer* **3** (5): 380-387.
- Erikstad K E y T Tveraa.** 1995. Does the cost of incubation set limits to clutch size in common eiders *Somateria mollissima*? *Oecologia* **103**: 270-274.
- Fargallo J A, López-Rull I, Miksik I, Eckhardt A y J M Peralta-Sánchez.** 2014. Eggshell pigmentation has no evident effects on offspring viability in common kestrels. *Evolutionary Ecology* **28** (4): 1-11.
- Fang J, Sawa T, Akaike T, Akuta T, Sahoo S K, Khaled G, Hamada A y H Maeda.** 2003. In Vivo Antitumor Activity of Pegylated Zinc Protoporphyrin Targeted Inhibition of Heme Oxygenase in Solid Tumor. *Cancer Research*, **63** (13): 3567-3574.
- Fredrickson L H y M W Weller.** 1972. Responses of Adelie Penguins to colored eggs. *The Wilson Bulletin*, 309-314.
- Friesen V L y D J Anderson.** 1997. Phylogeny and evolution of the Sulidae (Aves: Pelecaniformes): A test of alternative modes of speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **7** (2): 252-260.
- Furuyama K, Kaneko K y P D Vargas.** 2007. Heme as a Magnificent Molecule with Multiple Missions: Heme Determines Its Own Fate and Governs Cellular Homeostasis. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* **13**: 1-16.

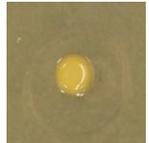
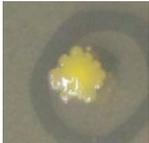
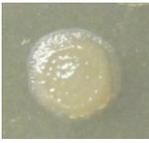
- Gaston A J, de Forest L N, Gilchrist G y D N Nettleship.** 1993. Monitoring thick-billed murres populations at colonies in northern Hudson Bay, 1972–92. *Can. Wild. Serv. Occas. Paper* **80**: 1–16.
- Greenacre M.** 2007. Correspondence Analysis in Practice. Chapman & Hall, Nueva York.
- Hill T, Walsh K A, Harris J A y B F Moffett.** 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* **43**: 1-11.
- Houston C S, Saunders J R y R D Crawford.** 1997. Aerobic Bacterial Flora of Addled Raptor Eggs in Saskatchewan. *Journal of Wildlife Diseases*, **33** (2): 328-331.
- Hoyt D F.** 1979. Practical methods of estimating volume and fresh weight of bird eggs. *The Auk*, **90** (4): 827-839.
- Ishikawa S, Suzuki K, Fukuda E, Arihara K, Yamamoto Y, Mukai T y M Itoh.** 2010. Photodynamic antimicrobial activity of avian eggshell pigments. *FEBS Letters* **584**: 770-774.
- Kaur H, Hughes M N, Green C J, Naughton P, Foresti R y R Motterlini.** 2003. Interaction of bilirubin and biliverdin with reactive nitrogen species. *FEBS Letters*, **543** (1): 113-119.
- Kennedy G Y y H G Vevers.** 1976. A survey of avian eggshell pigments. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **55**: 117-123.
- Kilner R M.** 2006. The evolution of egg colour patterning in birds. *Biological Reviews* **81**: 383-406.
- Kilpi M y P Byholm.** 1995. The odd colour of the last laid egg in herring gull *Larus argentatus* clutches: does it reflect egg quality? *Ornis Fennica* **72**: 85-88.
- Lee J S, Lim J M, Lee K C, Lee J C, Park Y H y C J Kim.** 2006. *Virgibacillus koreensis* sp. nov., a novel bacterium from a salt field, and transfer of *Virgibacillus picturae* comb. nov. with emended descriptions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 251–257.
- Malik Z, Hanania J y Y Nitzan.** 1990. New trends in photobiology bactericidal effects of photoactivated porphyrins: An alternative approach to antimicrobial drugs. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **5** (3): 281-293.
- Maurer G, Portugal S J y P Cassey.** 2011. Review: an embryo's eyes view of avian eggshell pigmentation. *Journal of Avian Biology* **42**: 494-504.
- McDonagh A F.** 2001. Turning green to gold. *Nature Structural & Molecular Biology* **8** (3): 198-200.
- McGraw K J.** 2005. The antioxidant function of many animal pigments: are there consistent health benefits of sexually selected colourants?. *Animal Behaviour*, **69** (4): 757-764.
- McGraw K J.** 2006. Mechanics of Uncommon Colors: Pterins, Porphyrins, and Psittacofulvins. En: Hill G E y K J McGraw (Eds.) *Bird Coloration. Volume I Mechanisms and Measurements*. Harvard University Press, Londres.
- Meng L, Xiaohui C y G Hongxian.** 2013. Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **76**: 81-85.
- Morales J, Torres R y A Velando.** 2010. Parental conflict and blue egg coloration in a seabird. *Naturwissenschaften* **97**: 173-180.
- Morales J y A Velando.** 2013. Signals in family conflicts. *Animal Behaviour* **86**: 11-16.
- Morales J, Velando A y R Torres.** 2011. Biliverdin-based coloration is enhanced by carotenoid supplementation. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **65**: 197-203.

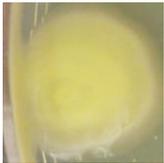
- Moreno J y J L Osorno.** 2003. Avian egg colour and sexual selection: does eggshell pigmentation reflect female condition and genetic quality? *Ecology Letters* **6**: 803-806.
- Moreno J, Lobato E, Morales J, Merino S, Tomás G, Martínez-de la Puente J, Sanz J J, Mateo R y J J Soler.** 2006. Experimental evidence that egg colour indicates female condition at oviposition in a songbird. *Behavioral Ecology* **17**: 651–655.
- Nelson J B.** 1978. *The Sulidae: gannets and boobies*. Oxford University Press, Oxford.
- Nelson J B.** 2005. *Pelicans, cormorants and their allies*. Oxford University Press, Nueva York.
- Peralta-Sánchez J M, Møller A P, Martin-Platero A M y J J Soler.** 2010. Number and colour composition of nest lining feathers predict eggshell bacterial community in barn swallow nests: an experimental study. *Functional Ecology* **24**: 426-433.
- Pinowsky J, Barkowska M, Kruszewicz A H y A G Kruszewicz.** 1994. The causes of the mortality of eggs and nestlings of *Passer* sp. *Journal of Biosciences* **19** (4): 441-451.
- Potter B A, Carlson B M, Adams A E y M A Voss.** 2013. An Assesment of the Microbial Diversiy Present in Naturally Incubated House Wren Eggs. *The Open Ornithology Journal* **6**: 32-39.
- R Core Team.** 2014. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- Raza W, Yang W y Q-R Shen.** 2008. *Paenibacillus polymyxa*: antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assesment. *Journal of Plant Pathology* **90** (3): 419-430.
- Reid J M, Monaghan P y G D Ruxton.** 2000. Resource allocation between reproductive phases: the importance of thermal conditions in determining the cost of incubation. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences* **267**(1438): 37-41.
- Reynolds S J, Martin G R y P Cassey.** 2009. Is sexual selection blurring the functional significance of eggshell coloration hypotheses? *Animal Behavior* **78**: 209-215.
- Roselló-Mora R y R Amann.** 2001. The species concept for prokaryotes. *FEBS Microbiology Reviews* **25**: 39-67.
- Shawkey M D, Firestone M K, Brodie E L y S R Beissinger.** 2009. Avian Incubation Inhibits Growth and Diversification of Bacterial Assemblages on Eggs. *PLoS ONE* **4** (2): e4522.
- Siefferman L, Navara K y G Hill** 2006. Egg coloration is correlated with female condition in eastern bluebirds (*Sialia sialis*). *Behavioural Ecology and Sociobiology* **59**: 651-656.
- Soler J, Navarro C, Pérez Contreras T, Avilés J y J Cuervo.** 2008. Sexually Selected Egg Coloration in Spotless Starlings. *The American Naturalist* **171** (2): 183-194.
- Solomon S E.** 1987. Egg shell pigmentation. En: Wells R G y C G Belyavin (Eds.) *Egg Quality: Current Problems and Recent Advances*. Poultry Science Symposium. Series 20.
- Ter Braak C J F.** 1986. Canonical Correspondence Analysis: A New Eigenvector Technique for Multivariate Direct Gradient Analysis. *Ecology* **67** (5): 1167-1179.
- Tschanz B.** 1959. Zur Brutbiologie der Trottellumme (*Uria aalge* aalge Pont.). *Behaviour*, **14**: 1–100.
- Underwood T J y S G Sealy.** 2002. Adaptive significance of egg colouration. En: Deeming D C (Ed.) *Avian Incubation: Behaviour, Environment and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.

- Wainwright M.** 1998. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of antimicrobial chemotherapy* **42** (1): 13-28.
- Wang J M, Firestone M K y S R Beissinger.** 2011. Microbial and environmental effects on avian egg viability: do tropical mechanisms act in a temperate environment? *Ecology* **92**: 1137-45.
- Washburn K W y P L Potts.** 1975. Effect of strain and age on the relationship of oviposition time to shell strength. *British Poultry Science*, **16** (6): 599-606.
- Wellman-Labadie O, Picman J y M T Hinckie.** 2008. Antimicrobial activity of cuticle and outer eggshell protein extracts from three species of domestic birds. *British Poultry Science* **49** (2): 133-143.
- Whit T K.** 1973. Porphyrins in Egg Shells. *Biochemical Journal* **137**: 597-598.
- Wiencierz A, Greven S y H Küchenhoff.** 2011. Restricted likelihood ratio testing in linear mixed models with general error covariance structure. *Electronic Journal of Statistics*, 5: 1718-1734.
- Wietz M, Mansson M, Bowman J S, Blom N, Ng Y y L Gram.** 2011. Wide Distribution of Closely Related, Antibiotic-Producing *Arthrobacter* Strains throughout the Artic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, **12**: 2039-2040.
- Williams T D.** 1994. Intraspecific-variation in egg size and egg composition in birds: effects on offspring fitness. *Biological Reviews* **68**: 35-59.
- Yoon J H, Oh T K y Y H Park.** 2004. Transfer of *Bacillus halodenitrificans* Denariáz *et al.* 1989 to the genus *Virgibacillus* as *Virgibacillus halodenitrificans* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**: 2163–2167.
- Zhao R, Xu G-Y, Liu Z-Z, Li J-Y y N Yang.** 2006. A Study on Eggshell Pigmentation: Biliverdin in Blue-Shelled Chickens. *Poultry science*, **85** (3): 546-549.
- Zimbro B S, Power D A, Miller S M, Wilson G E y J A Johnson.** 2009. *Manual Difco™ & BBL™: Manual of Microbiological Culture Media*. Segunda edición, Maryland.

Anexo 1

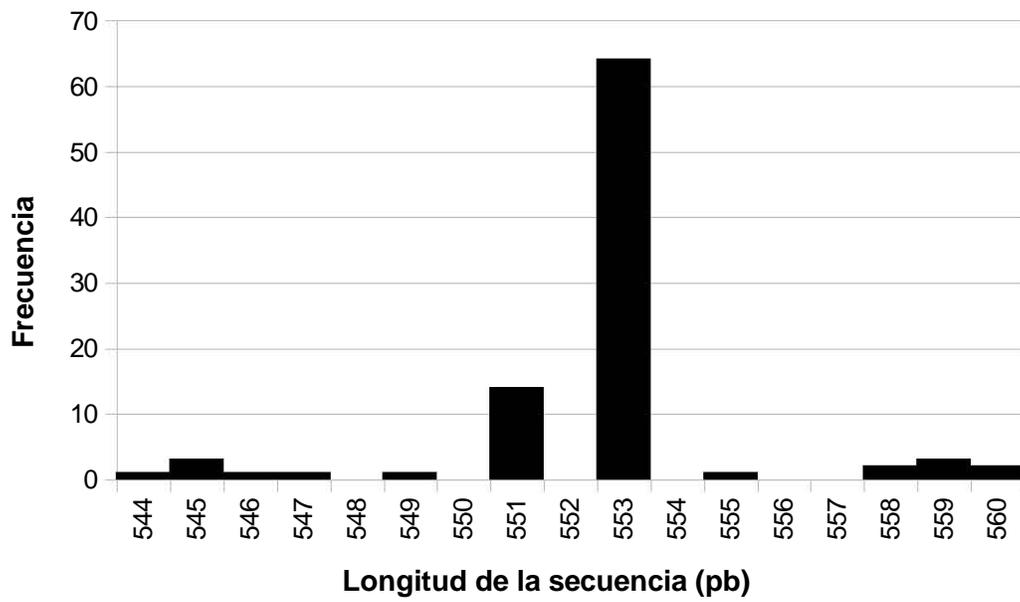
Morfo (Secuencias obtenidas)	Descripción	Especie	No. de acceso (GenBank)	Imagen
1 (3)	Colonia circular de diámetro aproximado de 5 mm, textura rugosa y color transparente, elevación plana y margen rizado.	<i>Terribacillus goriensis</i>	DQ519571.1	
		<i>Virgibacillus halodenitrificans</i>	AY543169.1	
		<i>Bacillus aquimaris</i>	KC920912.1	
2 (2)	Colonia circular de diámetro aproximado de 4 mm, textura rugosa y color naranja opaco, elevación convexa y margen entero.	<i>Enterococcus durans</i>	KC202800.1	
3, 4 (10)	Colonia circular de diámetro aproximado de 4 mm, textura lisa y color blanco lechoso, naranja o rosa, elevación umbonada y margen entero.	<i>Sporosarcina koreensis</i>	KC355327.1	
		<i>Sporosarcina saromensis</i>	AB243864.1, AB682135.1	
5 (2)	Colonia puntiforme, textura húmeda y color transparente, elevación convexa y margen entero.	<i>Arthrobacter creatinolyticus</i>	JQ344115.1	
		<i>Arthrobacter aurescens</i>	EU333870.1	
6, 17 (10)	Colonia circular de diámetro aproximado de 5mm, textura rugosa y color transparente o blanco opaco, elevación crateriforme y margen rizado.	<i>Bacillus firmus</i>	JX559760.1	
		<i>Bacillus niacini</i>	KC315764.1	
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KF254632.1	

7, 15 (10)	Colonia circular de diámetro aproximado de 2 mm, textura rugosa y color blanco o naranja opaco, elevación convexa y margen entero.	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	AP008934.1, KC503908.1	
8 (2)	Colonia circular de diámetro aproximado de 8 mm, textura viscosa y color blanco translúcido, elevación convexa y margen entero.	<i>Bacillus fordii</i>	NR_025786.1	
10, 20 (9)	Colonia circular de diámetro aproximado de 3 mm, textura húmeda y color opaco naranja o amarillo, elevación convexa y margen entero.	<i>Staphylococcus sciuri</i>	EU095646.1	
11 (9)	Colonia circular de diámetro aproximado de 4 mm, textura lisa y color blanco opaco, elevación plana y margen entero.	<i>Bacillus badius</i>	EU169170.1	
12 (1)	Colonia irregular de diámetro aproximado de 4 mm, textura seca y color naranja translúcido, elevación convexa y margen ondulado.	<i>Pseudomonas putida</i>	KF443801.1	
13 (1)	Colonia circular de diámetro aproximado de 4 mm, textura rugosa y color naranja opaco, de elevación convexa y margen ondulado.	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	NR_036903.1	
14 (6)	Colonia circular de diámetro aproximado de 4 mm, textura rugosa y color transparente, elevación crateriforme y margen entero.	<i>Bacillus cereus</i>	AY129651.1	
		<i>Bacillus pseudofirmus</i>	AB201799.1	
		<i>Bacillus sp.</i>	AF548879.1, AY557616.1	
16 (2)	Colonia circular de diámetro aproximado de 8 mm, textura viscosa y color transparente, elevación convexa y margen entero.	<i>Psychrobacter faecalis</i>	KC244343.1	

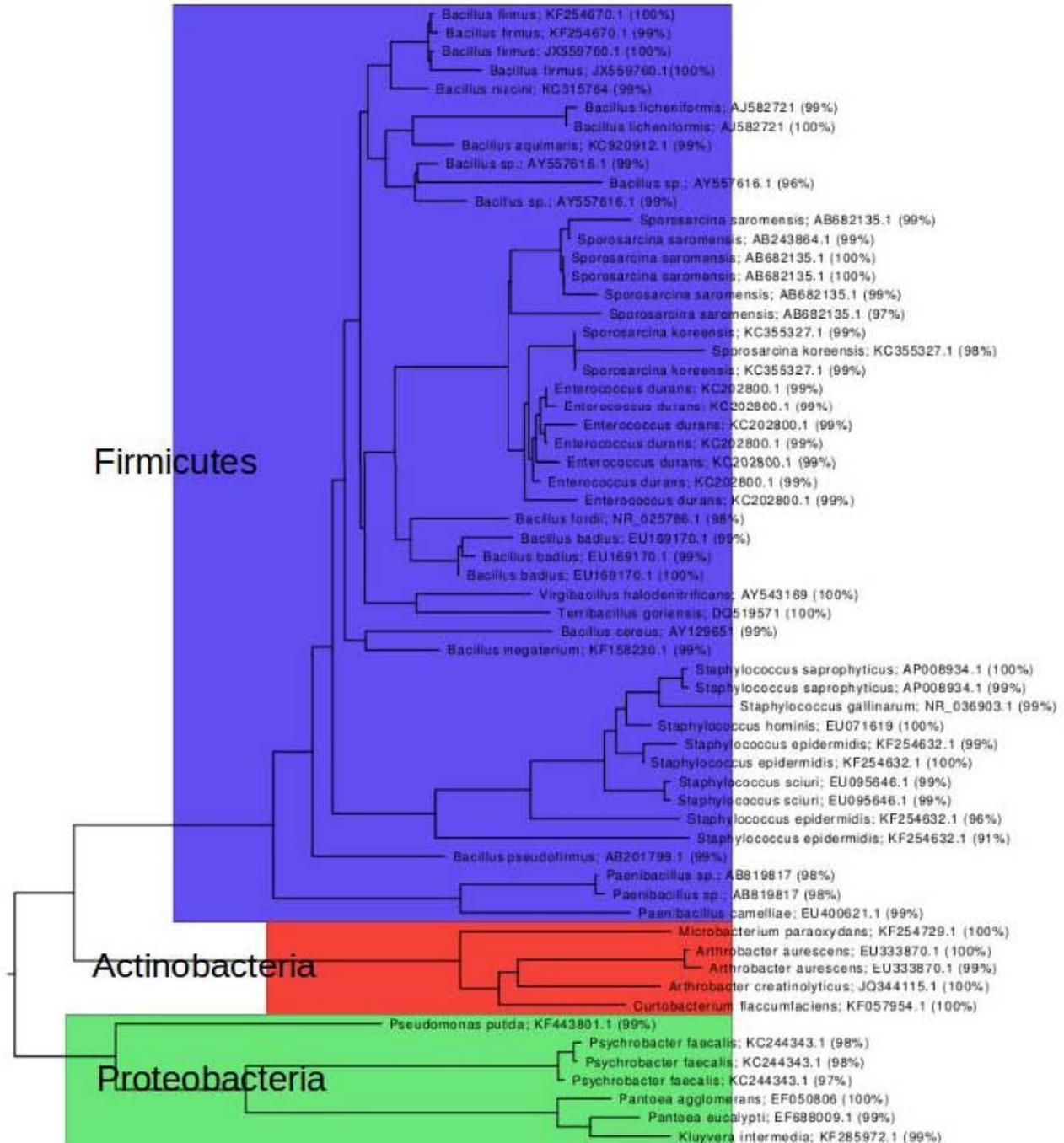
18, 19 (6)	Colonia circular de diámetro aproximado de 6 mm, textura rugosa y color blanco opaco o transparente, elevación crateriforme y margen rizado.	<i>Paenibacillus camelliae</i>	EU400621.1	
		<i>Paenibacillus sp.</i>	AB819817.1	
21 (2)	Colonia circular de diámetro aproximado de 11 mm, textura viscosa y color amarillo o anaranjado opaco, elevación convexa y margen entero.	<i>Pantoea agglomerans</i>	EF050806.1	
		<i>Pantoea eucalypti</i>	EF688009.1	
22 (2)	Colonia irregular de diámetro aproximado de 6 mm, textura arrugada y color blanco translúcido, elevación pulvinada y margen rizado.	<i>Kluyvera intermedia</i>	KF285972.1	

Anexo 2

Histograma de la longitud de las secuencias obtenidas



Anexo 3



Árbol filogenético de las secuencias obtenidas de 16S rRNA de las bacterias en la superficie de los huevos. Se incluye el número de acceso del GenBank y el porcentaje de identidad con la secuencia de referencia.