



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Instituto de Biotecnología

**Análisis metagenómico de heces de la tortuga *Gopherus berlandieri*, y
comparación con otros microbiomas fecales reptilianos**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

P R E S E N T A:

LCG Leticia Berenice Jiménez Marín

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Esperanza Martínez Romero
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

COMITÉ TUTOR

Dra. Guadalupe Espín Ocampo
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Edmundo Calva Mercado
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Junio 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



LETICIA BERENICE JIMENEZ MARIN

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del día 06 de junio del 2017 el Subcomité Académico acordó nombrar el siguiente jurado para Examen de Maestría en Ciencias, con **No.de cuenta 407027204** con la tesis titulada, **"Análisis metagenómico de heces de tortuga *Gopherus berlandieri*, y comparación con otros microbiomas fecales reptilianos"** dirigida por la **Dra. María Esperanza Martínez Romero**.

Presidente	Dra.	Cinthia Ernestina Núñez López
Secretario	Dra.	Liliana Pardo López
Vocal	Dr.	Diego Cortez Quezada
Vocal	Dr.	Adrian Ochoa Leyva
Vocal	Dr.	Santiago Sandoval Motta

Sin más por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor. a 06 de junio de 2017

Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz
Coordinadora de Docencia

En un plazo máximo de tres semanas, contados a partir del momento en que el sinodal designado oficialmente reciba la tesis, éste deberá dar su voto fundamentado por escrito, el cual será comunicado al comité académico. Si considera que le será imposible cumplir con esta obligación deberá indicarlo al alumno para ser sustituido de inmediato



mdcbq@posgrado.unam.mx

**Les agradezco a todos. TODOS.
Porque de una forma u otra hicieron interesante el camino.**

Por amor al orden y la paz, dedico este trabajo (casi) en orden cronológico:

A mis papás. Porque me regalaron *Fantasia* en VHS y han sabido apoyarme y reír con mis curiosidades (siendo esta la más formal hasta ahora).

A mi abuelito. Porque quiero ser como él me ve.

A mi hermana. Porque *Bere no Pig, Bere die*.

Al Profesor Cosme. Porque le dio dimensión a mi imagen de la hermosa disciplina de la Biología.

A los amigos viejos. Porque crecer juntos es un privilegio y casi un milagro.

A los amigos no tan viejos. Porque me han sabido detener, impulsar, desordenar y ordenar.

A los amigos en general. Porque como Gandalf, han llegado justo en el momento.

A Checa, Marlene, Isaí y Juan. Porque vivieron este proceso junto conmigo.

A la UNAM. Por su generosidad.

A Fede. Porque me adoptó un día en Pujol.

AGRADEZCO inmensamente a la Dra. Esperanza Martínez Romero por ofrecerme una educación libre y relajada, al mismo tiempo que de altísima calidad. Gracias por confiar en mí.

Del mismo modo, agradezco a mi comité tutor por compartirme sus impresiones, críticas y consejos siempre en el tono más constructivo y enriquecedor.

Agradezco también a los ATIs, Iliana, Gloria y Toño por su extraordinaria disposición y capacidad para ayudar.

Finalmente, agradezco a la Biól. Mónica Salmerón Estrada por su apoyo como encargada del herpetario de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Este trabajo se ha vuelto posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

ÍNDICE

I.	RESUMEN	5
II.	INTRODUCCIÓN	
	<i>Generalidades sobre reptiles</i>	6
	<i>Generalidades y anatomía de tortugas</i>	6
	<i>Sobre <u>Gopherus berlandieri</u></i>	9
	<i>Sobre los estudios de diversidad microbiana</i>	11
III.	HIPÓTESIS	15
IV.	OBJETIVOS	
	<i>General</i>	15
	<i>Particulares</i>	15
V.	MÉTODOS	
	<i>Elección de organismos</i>	16
	<i>Toma de muestra</i>	17
	<i>Extracción de ácidos nucleicos</i>	17
	<i>Secuenciación</i>	19
	<i>Filtrado de datos</i>	20
	<i>Análisis taxonómico</i>	20
	<i>Comparación de métodos</i>	21
	<i>Análisis funcional</i>	21
VI.	RESULTADOS	
	<i>Elección de organismos</i>	22
	<i>Obtención de la muestra</i>	22
	<i>Extracción de ácidos nucleicos</i>	22
	<i>Secuenciación</i>	27
	<i>Filtrado de datos</i>	28

	4
<i>Análisis taxonómico</i>	28
<i>Comparación de métodos</i>	38
<i>Análisis funcional</i>	40
VII. DISCUSIÓN	
<i>Sobre el impacto de los métodos de extracción de ácidos nucleicos</i>	50
<i>Sobre la caracterización de la diversidad microbiana en heces de <u>G. berlandieri</u></i>	54
<i>Sobre la arquitectura de la microbiota fecal en un contexto más amplio</i>	60
<i>Sobre la batería génica de la microbiota fecal de <u>G. berlandieri</u></i>	65
VIII. CONCLUSIONES	70
IX. PERSPECTIVAS	71
X. REFERENCIAS	72
XI. MATERIAL SUPLEMENTARIO	81

I. RESUMEN

La metagenómica es una disciplina encargada de describir los genomas de las comunidades microbianas presentes en un ambiente de interés. Debido a su enfoque basado en la secuenciación masiva de ADN, no requiere de cultivo. Uno de los ambientes que la metagenómica aborda con mayor interés es el del intestino de diversos organismos, ya sea a través de biopsias, sacrificio del sujeto de estudio, o realizando una aproximación utilizando materia fecal. Las tortugas (Orden Chelonii o Testudinos) se distinguen en que incluyen más especies herbívoras existentes que otros clados reptilianos. *Gopherus berlandieri* pertenece al único género de tortugas terrestres que habita en América del Norte, y tiene una dieta herbívora. En este trabajo se utiliza un enfoque metagenómico para analizar la comunidad microbiana en las heces de un ejemplar de *G. berlandieri*. La comparación de los resultados obtenidos con los de estudios independientes en otras especies de reptiles enriquece el conocimiento con respecto a cómo y con qué magnitud los hábitos alimenticios influyen en la ecología microbiana de una especie. Entre las aportaciones de este trabajo se encuentran el desarrollo de un método de extracción de ADN de muestra fecal, la implementación de protocolos bioinformáticos para analizar los datos del microbioma fecal de *G. berlandieri* y los resultados con significado biológico resultantes dicho análisis.

II. INTRODUCCIÓN

Generalidades sobre reptiles

La clase Reptilia se desprende del phylum Chordata, y a él pertenecen varios amniotas – animales que usan estrategia de ya sea poner sus huevos en tierra o retener a los huevos fertilizados en el cuerpo de la madre. Existen múltiples conceptos taxonómicos para lo que es Reptilia (38) (ver una posible resolución filogenética en Fig. S. 1), por lo que puede considerársele hasta el momento un clado parafilético. Esta situación presenta un problema en términos de clasificación porque se traduce en que no se pueden realizar aseveraciones sobre los orígenes, características y relaciones ‘familiares’ entre las tortugas y los demás reptiles.

Debido al carácter no monofilético de Reptilia, es difícil definir este clado con base en sus características comunes. Si se consideran únicamente las especies existentes carentes de plumas o pelo, esta clase comprende a las familias de lagartos y serpientes (Squamata), cocodrilos (Crocodylia), Tuatara (Sphenodontia) y tortugas (Chelonii) (39).

Generalidades y anatomía de tortugas

Las tortugas son tetrápodos ovíparos cuya distribución comprende casi cualquier ambiente no ártico, tanto acuático como terrestre (38). Los testudinos, como también se les conoce, poseen como característica común que poseen una estructura rígida que protege casi la totalidad de su cuerpo y consiste en el plastrón – la parte inferior – y el caparazón, la parte superior, ambas conectadas por los lados. En la mayoría de las tortugas ambas estructuras están constituidas por tejido derivado de la epidermis y de hueso (38); así, estos animales poseen una excepcional estructura ósea, diferenciándose de las armaduras de otros

tetrápodos en que las tortugas poseen tanto vértebras como costillas transformadas unidas al caparazón (40).

Muchos detalles con respecto al origen y evolución de las tortugas son motivo de debate. La evolución del plastrón, así como el análisis comparativo de los mecanismos de respiración entre tortugas terrestres y acuáticas, ofrecen un indicio de que las tortugas poseen un origen acuático o semiacuático (41, 43). Con respecto a la posición taxonómica de los quelonios con respecto a los demás reptiles existen varias hipótesis: 1) que las tortugas se encuentran alejadas del resto de los reptiles; 2) que son un grupo hermano de los lagartos, serpientes y tuatara (reptiles endémicos de Nueva Zelanda); 3) que son un grupo hermano de los cocodrilos y aves, siendo esta última opción la más aceptada en la actualidad (40, 42).

Otra característica interesante es que, aunque son escasas las especies de reptiles existentes cuya dieta es considerada herbívora (9), esta preferencia alimentaria se observa especialmente en el clado que corresponde a las tortugas. El orden de los quelonios es considerado en general como omnívoro (14), y de hecho se ha planteado que quizás ninguna tortuga es absolutamente herbívora (de ofrecérseles fuentes importantes de proteína, es sumamente probable que las consumirán) (18). Sin embargo, la mayor cantidad de especies cuya alimentación es predominantemente vegetal está presente en la familia de los testudínidos, es decir, las tortugas terrestres (15, 16, 17) (Fig. S. 2). La dieta básica de la mayoría de las tortugas terrestres se compone de follaje verde, aunque éstas se comerán cualquier pedazo de carroña que se les ponga por delante (18) así como invertebrados y frutas, especialmente en el caso de tortugas cuyo hábitat es boscoso (17).

Los miembros de la familia Testudinidae corresponden en su totalidad a tortugas terrestres en diez géneros distribuidos en áreas tropicales y subtropicales en todos los continentes excepto Australia y la Antártida (18). Al igual que todos los quelonios, carecen de dientes, pero cuentan con poderosas mandíbulas que permiten cortar sus alimentos en trozos que puedan ser tragados fácilmente (17). Estas tortugas, además, poseen un tracto digestivo considerablemente más alargado que el de tortugas carnívoras, pudiendo ser hasta siete veces más largos que el caparazón en sí; sin embargo, el tracto digestivo no se encuentra muy especializado, y no poseen estructuras análogas a las de otros organismos herbívoros, como el rumen (17) (Fig. 1). El intestino delgado de las tortugas cumple mayormente con el proceso de absorción de la comida (14), y para compensar la falta de especialización, las tortugas poseen una tasa de digestión sumamente baja (17), misma que depende parcialmente de la temperatura corporal del individuo.

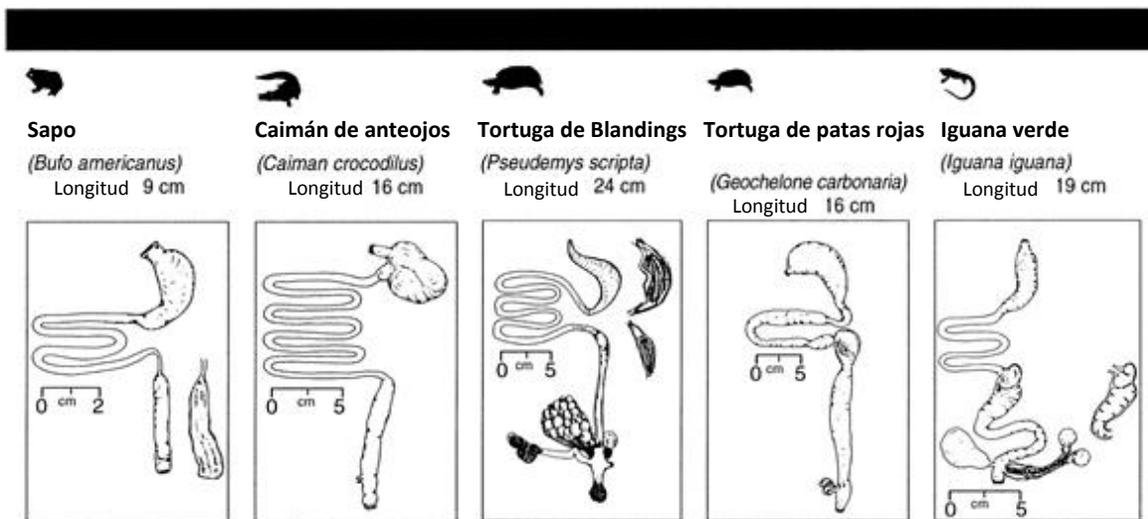


Fig. 1. Tractos gastrointestinales de un anfibio, un reptil carnívoro, un reptil omnívoro, una tortuga herbívora (*G. carbonaria*) y un reptil herbívoro. Nótese el volumen mayor de la sección posterior del intestino para los animales herbívoros. Modificado de (16).

El intestino grueso de las tortugas terrestres desemboca (como en todos los reptiles), en una cámara cloacal, subdividida en un coprodeo, que recibe las heces, y un urodeo, donde se concentran orina y productos de los órganos genitales (Fig. 2A). Estos desechos eventualmente alcanzan el proctideo, que es un tracto común a estas excreciones, y que está cerrado por un esfínter (14). La urea presente en la cloaca, se cree, puede ser reabsorbida para convertirse en ácido úrico posteriormente (14).

Sobre Gopherus berlandieri

Las tortugas del género *Gopherus* sobreviven en áreas donde el agua es sumamente escasa, por lo que extraen sus líquidos de su alimento, principalmente compuesto por materia vegetal, y son las únicas tortugas terrestres que se pueden encontrar en Norteamérica (17) (Fig. 2B). El género incluye 4 especies, distribuidas todas en territorio mexicano y estadounidense (17): *G. polyphemus*, *G. agassizii*, *G. flavomarginatus* y *G. berlandieri* (Fig. 3) (18). El hábitat de *Gopherus berlandieri* comprende parte de los EEUU-al sur de Texas- y el noreste de México (12).

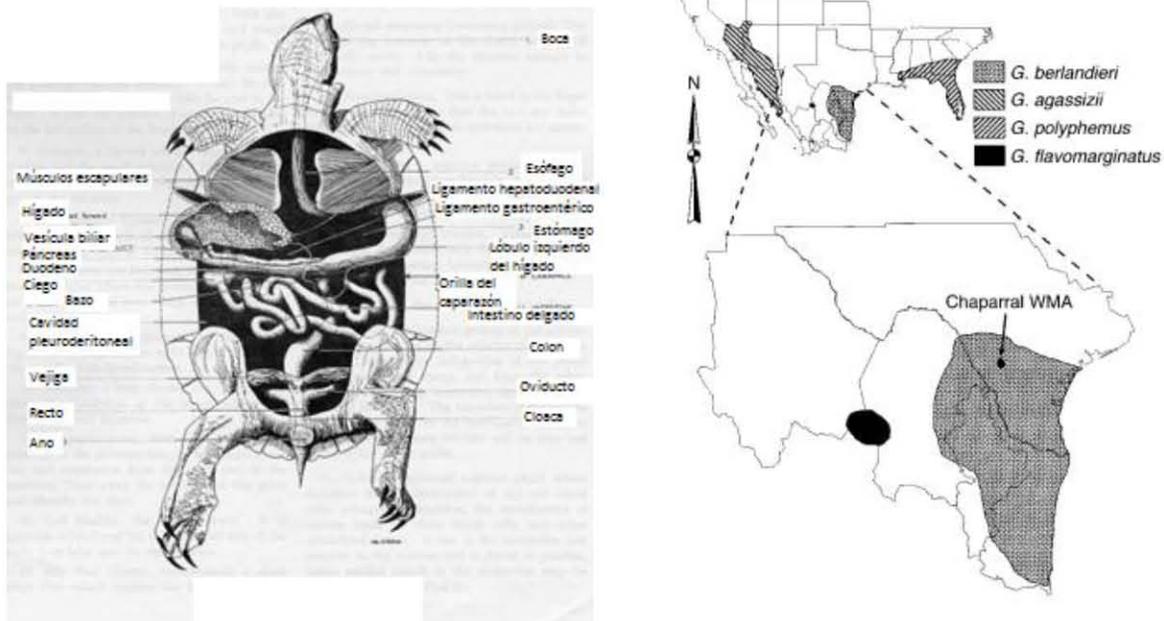


Fig. 2A. Aparato digestivo de tortuga. Modificado de (25).

Fig. 2B Distribución geográfica de miembros del género *Gopherus*. Obtenido de (26).

De acuerdo a la Biól. Mónica Salmerón, encargada del herpetario de la Facultad de Ciencias de la UNAM, durante los meses más fríos estas tortugas hibernan, mientras que en los meses más cálidos, estivan. En primavera las tortugas entran en celo y hacen su ovoposición (Salmerón, M. comunicación personal), aunque la posibilidad de reproducirse exitosamente parece ser mínima para individuos de menos de 10 años de edad (17). *G. berlandieri* posee, como todas las *Gopherus*, una dieta principalmente herbívora, alimentándose mayormente de cactáceas y pasto (10). Cabe mencionar que esta especie se establece en poblaciones muy aisladas, con poca interacción, lo cual puede deberse en parte a su limitado acceso a la comida (las fuentes de alimento se encuentran esparcidas en distancias que resultarían difíciles de cubrir para este animal) (17). En cautiverio, el galápagu tamaulipeco parece desarrollarse bien con una dieta únicamente de verduras (Salmerón, M. comunicación personal).



Fig. 3 Ejemplar de *G.berlandieri*. Obtenido de. (27).

Sobre los estudios de diversidad microbiana y su relevancia

La metagenómica describe los genomas de las comunidades microbianas que componen una muestra ambiental (1) y sienta las bases para el estudio de su fisiología y ecología (2).

Esta área de investigación se basa en que es posible extraer ácidos nucleicos de una muestra ambiental, mismos que pueden después someterse a secuenciación para obtener una caracterización molecular de los microorganismos que habitan dicho ambiente. Siendo así, es evidente que los resultados de todo estudio perteneciente a esta disciplina dependen tanto de que se logre una extracción exitosa de los ácidos nucleicos, como de que se utilice una plataforma de secuenciación cuyos resultados sean confiables y con calidad suficiente para realizar análisis bioinformáticos interpretables.

A raíz de la necesidad de obtener ácidos nucleicos con calidad para secuenciación provenientes de diversos ambientes, se ha desarrollado una pléyade de métodos de extracción de los mismos. Algunos de estos se comercializan como kits (19, 20, 28, 29), mientras que otros son desarrollados en función de las necesidades de distintos proyectos (32), acoplándose a las necesidades de la muestra a estudiar. La estandarización de este tipo de protocolos representa uno de los retos de la metagenómica, pues representa un paso que puede tener un impacto muy serio sobre los resultados a obtener.

Por otra parte, con el advenimiento de técnicas de secuenciación masiva, se ha presentado la oportunidad de generar una mayor cantidad de secuencias que con técnicas cultivables –es decir, aquellas que se basan en la manutención de microorganismos en medios nutritivos bajo condiciones de laboratorio (23). El rápido desarrollo de estas tecnologías ha ofrecido múltiples opciones de secuenciación para tratar distintas muestras, sobresaliendo las tecnologías de Roche/454 e Illumina. Entre las ventajas de esta última tecnología están: 1) la aportación de *contigs* (agrupamientos de secuencias) de calidad superior comparados a los obtenidos con 454, 2) una menor tasa de error y 3) un costo más accesible. Estas cualidades hacen de Illumina una tecnología ideal para estudios ambientales (24), mientras que la tecnología de 454 ha caído en desuso hasta el punto de la discontinuación (73).

Entre los ambientes que han sido objeto de análisis metagenómico se encuentran suelos, hábitats acuáticos, la cavidad oral y heces (3). El estudio de heces fecales como aproximación para caracterizar la comunidad microbiana intestinal de distintas especies responde a que ésta posee un importante rol en los procesos digestivos de su hospedero. De estudios en este último ambiente se han obtenido avances en la comprensión de las

características de los microbiomas de la región distal de intestino de distintos organismos, incluyendo el ser humano (4).

Los estudios de diversidad microbiana en los intestinos de distintos mamíferos han arrojado conclusiones interesantes, incluyendo una aparente correlación entre el carácter de la dieta y la diversidad de microorganismos encontrados, yendo ésta de menor en animales carnívoros a mayor, con los animales omnívoros con una diversidad intermedia y los herbívoros con la mayor diversidad (5). Además, el estudio de la microbiota intestinal de distintos organismos herbívoros ha tomado relevancia a partir del interés de encontrar microorganismos que tengan la capacidad de degradar materia orgánica, particularmente polisacáridos complejos como celulosa (6,7). Este tipo de procesos son de interés para el desarrollo de biocombustibles, biorremediación e incluso para potenciar las capacidades metabólicas de organismos monogástricos (63). A raíz de este interés, los análisis de la microbiota intestinal en animales herbívoros pertenecientes a distintos clados se han multiplicado.

Entre los casos más recientes de estudios en herbívoros no pertenecientes a Mammalia se encuentra el de análisis de la microbiota fecal en iguanas (8, 47). Cabe mencionar que otros reptiles han sido estudiados en los últimos años, incluyendo la serpiente pitón (13) y el aligátor americano (44), con el fin de ahondar sobre las características de la microbiota tras periodos largos sin consumir alimento y para conocer las características microbiológicas comunes a los tractos digestivos y materia fecal en tetrápodos respectivamente. Empero, no existe gran cantidad de trabajo metagenómico sobre tortugas, aunque este clado es el único otro además del que incluye a las iguanas que cuenta con especies herbívoras (9).

Se ha propuesto que los microorganismos presentes en el intestino de las tortugas se encuentran en la parte posterior del tracto, una vez que se ha procesado el alimento por influencia enzimática en el intestino delgado (17). Además, se sabe que estas comunidades incluyen múltiples endoparásitos intestinales, dominando anélidos y platelmintos, aunque parecen no representar en general un peligro para los reptiles. A pesar de que se sabe que su tracto intestinal puede ser colonizado por *Salmonella* (18), así como que pueden sufrir infecciones causadas por protozoarios (18), se desconoce qué otros microorganismos componen la fracción mayoritaria de la microbiota intestinal en estos reptiles.

Como se mencionó anteriormente, el clado con mayor número de especies herbívoras es el de las tortugas, y su metagenoma está pobremente caracterizado. Debido a ello, este estudio puede brindar perspectiva con respecto a las diferencias entre miembros de la clase Reptilia. El estudio de tortugas herbívoras, como *G. berlandieri*, enriquecerá lo que se sabe acerca de la forma en que los organismos se acoplan a la herbivoría, siendo así un punto de comparación para con otras especies con este hábito alimenticio. Adicionalmente, la microbiota de esta especie mexicana puede hablarnos más sobre sus hábitos y necesidades, así como de su impacto en el ecosistema.

III. HIPÓTESIS

El microbioma fecal de la tortuga *G. berlianderi* estará conformado por microorganismos que correspondan a clados encontrados en otros reptiles, pero cuya batería génica sea consistente con la de un animal herbívoro.

IV. OBJETIVOS

General

Identificar la microbiota fecal de la tortuga *Gopherus berlandieri* mediante metagenómica.

Particulares

- Desarrollar un protocolo para extraer ADN de heces de ejemplares de *G.berlandieri*
- Extraer ADN de heces de ejemplares de *G. berlandieri* para ser secuenciadas.
- Determinar la composición bacteriana en las heces de *G. berlandieri*
- Comparar esta composición con la de otros reptiles herbívoros.
- Identificar genes potencialmente ecofuncionales en dicha microbiota (e.g. genes para fijación de nitrógeno y degradación de celulosa).

V. METODOLOGÍA

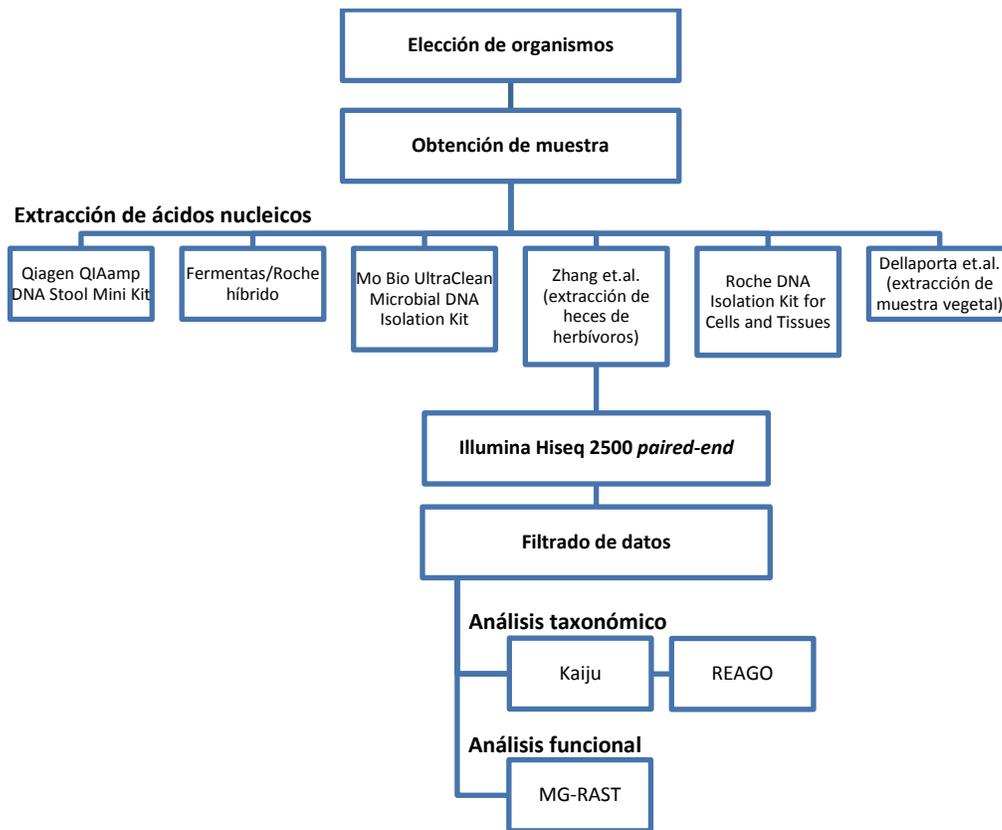


Fig. 4. Metodología utilizada. Se eligieron dos ejemplares de *G. berlandieri* del herpetario de la FC de la UNAM, de los cuales se obtuvieron muestras fecales. Estas muestras se sometieron a distintos métodos de extracción de ácidos nucleicos. Las extracciones realizadas con el método de Zhang et. al. Fueron las únicas con calidad suficiente para ser secuenciadas. Se realizó secuenciación exitosa de una muestra usando la plataforma Illumina. Los datos obtenidos se filtraron por calidad y se utilizaron tanto para efectuar análisis taxonómicos con dos *software* como para hacer un análisis funcional.

Elección de organismos

Para el presente trabajo se tomaron muestras de dos ejemplares de galápago tamaulipeco (*G. berlandieri*) pertenecientes al herpetario de la Facultad de Ciencias en Ciudad Universitaria, UNAM. Los dos ejemplares son hembras, y antes de pertenecer al herpetario fueron mascotas, o estaban en venta como tales. Ambas alcanzaron la madurez sexual (Tabla 1) y desde diciembre de 2011 no consumieron suplementos alimenticios ni se les

administraron antibióticos. Estas tortugas son alimentadas con verduras frescas: nopales, lechuga, zanahoria y tréboles.

Ejemplar	Edad aproximada (años)
GB012	6
GB013	30

Tabla 1. Edades aproximadas de especímenes de *G. berlandieri* en el herpetario FC, UNAM.

Toma de muestra

La toma de muestra se realizó en función de la frecuencia de excreción para los ejemplares muestreados (aproximadamente una vez cada mes y medio excepto durante enero de 2012, que las tortugas hibernaron) entre diciembre de 2011 y noviembre de 2012. Las muestras utilizadas fueron únicamente aquellas obtenidas una vez que los especímenes retomaron sus hábitos alimenticios usuales para retratar la microbiota tras ser remodelada. Las muestras fecales de los ejemplares fueron tomadas por la Biól. Mónica Salmerón, encargada del herpetario. Las tortugas fueron colocadas en recipientes plásticos durante el día, similar a lo que se hizo en (10) y una vez que excretaron, las deposiciones se colocaron en tubos Falcon estériles, para luego ser refrigerados. Las muestras refrigeradas se trasladaron al laboratorio en hielo, donde se bañaron en etanol absoluto, para después congelar a -20°C . A pesar de que se obtuvieron múltiples muestras de ambos ejemplares, el análisis metagenómico se obtuvo de una única muestra de GB012.

Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ADN de las muestras se realizó por varios métodos:

- a) *Qiagen QIAamp DNA Stool Mini Kit* (19)
- b) *Fermentas Genomic DNA Purification Kit* seguido de *Roche High Pure PCR Product Purification Kit* (20, 28)
- c) *Mo Bio UltraClean Microbial DNA Isolation Kit* (29)
- d) *Roche DNA Isolation Kit for Cells and Tissues* (30) / *Roche + Qiagen QIAquick Gel Extraction kit* (31)
- e) Extracción de ADN de plantas de Dellaporta, et. al. (32)
- f) Extracción de ADN de muestras fecales de Zhang et. al. (33)

Con base en los resultados obtenidos con los demás métodos probados, a este último método se le realizaron las siguientes modificaciones:

1. El lavado con etanol se realizó en hielo, con etanol frío. La centrifugación de la muestra se realizó a 4°C.
2. Se lisó la muestra usando nitrógeno líquido.
3. La incubación de muestra con proteinasa K se realizó por 4 horas a 45°C.
4. Se llevó a cabo una extracción usando un volumen de fenol (1:1 v/v siendo el resto de volumen el de la muestra), se agitó por inversión 10 minutos y se centrifugó 10 minutos a 3000 g.
5. Se hizo una segunda extracción usando un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v); se agitó por inversión y se centrifugó igual que en el paso anterior.

6. Se precipitó el ADN usando un volumen de isopropanol 99% (en refrigeración hasta el momento de usarse), y se dejó precipitar la muestra por la noche a -20°C . Luego, se centrifugó 30 minutos a 8000 g a 0°C y se decantó la muestra.

7. Se realizaron 2 lavados usando 1 mL de etanol 70%, y se dejó a secar el *pellet*.

8. Se resuspendió la muestra en 30 μL de buffer TE 10/1.

9. Se incubó con 10 μl RNAsa (1mg/mL).

Para evitar la presencia de residuos de Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (reconocible por una consistencia 'jabonosa' dejada por este detergente), se resuspendía en 100 μL de buffer TE, se sometía a una tercera extracción con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v); se agitaba por inversión brevemente y centrifugaba la muestra por 10 minutos a 16000 rpm. La muestra se precipitaba con un volumen de isopropanol frío, y se dejaba 3 horas a -20°C . A continuación, se centrifugaba por 20 minutos a 16000 rpm y se decantaba.

Se tomaron alícuotas de las soluciones resultantes para realizar electroforesis en gel de agarosa y para hacer análisis de pureza y concentración con *Nanodrop*. El resto del ADN obtenido se congeló a -20°C para su conservación hasta ser enviado a secuenciar.

Secuenciación

El ADN purificado de tres muestras se mandó a secuenciar usando el servicio de Macrogen, en Corea del Sur (54); sin embargo, el personal indicó que fue imposible obtener resultados positivos para las librerías. Una tercera muestra, perteneciente a GB012, se mandó a secuenciar usando la tecnología Illumina HiSeq2500, por método *paired-end*, usando el

servicio de BaseClear (46), ubicado en los Países Bajos. La realización de las librerías pareadas estuvo a cargo de esta misma empresa. Se utilizó medio carril de una placa para secuenciación.

Filtrado de datos

Se filtraron las lecturas obtenidas utilizando Sickle (48). Se consideró un valor PHRED de 25 como umbral de selección (pensando en no eliminar demasiadas secuencias) y se eliminaron lecturas con homopolímeros. Además, se conservaron únicamente pares concordantes de lecturas.

Análisis taxonómico

Se realizaron dos análisis para obtener el perfil taxonómico de la muestra:

1. Perfil taxonómico usando Kaiju. Este programa se basa en la traducción de lecturas de ADN a los posibles marcos de lectura y búsqueda de los máximos *matches* exactos contra una base de datos proteica. Si se encuentran *matches* contra muchas secuencias en la base de datos, se determina cuál es el último ancestro común y se asigna la lectura a dicho taxón (49). El conjunto de datos se sometió a caracterización taxonómica de acuerdo con las especificaciones por defecto del manual (51) con la base de datos no redundante de NCBI.
2. Reconstrucción de secuencias 16S usando REAGO (52). Se ensamblaron secuencias de 16S rRNA a partir del conjunto de datos obtenido tras el filtrado por calidad de acuerdo a las especificaciones por defecto del manual (53). Los ensamblados obtenidos se utilizaron para efectuar una comparación con los datos de Hong et. al. (8). Se realizó una reconstrucción de la distribución de los datos reportados en (8) por medio de Análisis de

Coordenadas Principales (PCoA por sus siglas en inglés) y con base en eso se realizaron subsiguientes PCoA incluyendo los 16S rRNA de *G. berlandieri*. El PCoA fue construido usando la función `cmdscale` del paquete base de R (50). Se tomó como entrada para la función una matriz de disimilitud creada a partir de la matriz de rarefacción de abundancia de OTUs en las muestras. La matriz de disimilitud se construyó utilizando la función `vegdist` del paquete `vegan` (71) utilizando la métrica de Bray-Curtis. Los mismos datos se utilizaron también para la generación de filogramas por medio de R (50) usando el paquete `ggplot2` (72).

Comparación de métodos

Se hizo un análisis de correlación de Spearman entre los datos de abundancia relativa resultantes de los análisis con Kaiju y con REAGO. Para este análisis se utilizaron únicamente datos de bacterias identificadas cuyo nombre fuera idéntico en ambos *outputs*. Este análisis se realizó por medio de R (50), y el gráfico correspondiente se creó con el paquete `ggplot2` (72).

Análisis funcional

Se utilizó la plataforma de análisis metagenómico MG-RAST (45) para obtener el perfil funcional de la muestra.

VI. RESULTADOS

Elección de organismos

Las dos tortugas de las cuales se obtuvieron heces permanecieron aparentemente sanas en el periodo entre diciembre de 2011 y noviembre de 2012, posibilitando la colecta de 11 muestras fecales de manera casi ininterrumpida (en el mes de enero las tortugas hibernaron, por lo que no se obtuvo nada) únicamente una vez que los especímenes se encontraban activos.

Toma de muestra

Las heces de esta tortuga, a simple vista, son muy similares entre sí. Frecuentemente, no van acompañadas de urea, y aun cuando ésta está presente es fácil separarle del resto de la deposición. Debido a que *G. berlandieri* es un reptil desértico, tampoco hay mucha humedad en la muestra. El peso de las deposiciones varía entre los 5 y 8 gramos.

Las muestras conservadas en etanol y bajo congelación resultaron mejor conservadas y más útiles (de acuerdo a la concentración y calidad del ADN extraído de ellas) para obtener material apto para secuenciación genómica. La muestra de la que se obtuvo el ADN con calidad para secuenciación y a partir de la cual se basa este análisis pertenecía a GB012, se obtuvo el 14 de febrero de 2012, y fue conservada en etanol y bajo congelación, de acuerdo a lo indicado en Métodos.

Extracción de ácidos nucleicos

Se logró extraer ADN de distintas muestras de cada individuo por los métodos previamente señalados. Como control se usaron muestras fecales de conejo o ratón. Sin embargo, todos

los métodos utilizados a excepción del modificado de Zhang *et. al.* fallaron en extraer ADN dado que no cubrían la cantidad y calidad suficiente para ser secuenciado (Tabla 2).

	Barrido	RNAsa+	ng/uL	Secuenciable
QIAGEN Stool	✓	✓	30-75	
Fermentas/Roche	✓	✓	60-130	
MoBio	✓	✓	N/A	
Roche Cells and Tissues	✓	✓	N/A	
QIAGEN Gel Extraction	✓	✓	8	
Dellaporta	✓	✓	N/A	
Zhang		✓	70-750	✓

Tabla 2. Resumen de resultados de extracción de ADN. Cada renglón corresponde a un método de extracción utilizado. Las columnas representan lo siguiente: 1. Presencia de degradación de ADN (visible como un barrido en geles de electroforesis). 2. Uso de RNAsa para eliminar otros ácidos nucleicos. 3. Concentración de ADN (si es que se midió) expresada como nanogramos por microlitro de solución. 4. Indica si la muestra fue considerada como apta para ser sometida a secuenciación.

a) *QIAamp DNA Stool mini kit*

Este método (19) se basa en lisado de la muestra usando detergentes (buffer ASL –de acuerdo al manual del kit, está desarrollado para remover sustancias que inhiban reacciones como la PCR). A este proceso se le denomina ‘secuestro de inhibidores’, y se logra por medio de una tableta denominada InhibitEX y centrifugación. Además, se realiza purificación del ADN por proteólisis (usando proteinasa K), separación del ADN vía unión a una membrana de sílice (*QIAamp Mini spin column*), lavado y elución. Las modificaciones a este método se encuentran en Material Suplementario.

Las muestras que se sometieron a extracción usando este kit dieron rendimientos en general bajos, entre 30 y 75 ng/μL a partir de 200 mg de materia fecal (usando *Nanodrop*). Empero en los geles se apreciaba una mancha similar a lo que se observa cuando hay

degradación de ADN. Se comprobó que lo que se mostraba como barrido en el gel no fue RNA porque la muestra se sometió a tratamiento con RNAsa en cada ocasión, y el barrido no desapareció al correr nuevos geles con la muestra ya tratada (Fig. 5, inciso a).

b) *Fermentas Genomic DNA Purification Kit-Roche High Pure PCR Product Purification Kit*

Este método se basa en lisado de la muestra usando detergentes (solución de lisis del kit de Fermentas) (28), extracción orgánica usando cloroformo, eliminación de ARN, y purificación del ADN de acuerdo al manual del kit de Roche (20), vía unión a una membrana de fibra de vidrio (*High Pure Filter Tubes*), lavado y elución. Para una descripción más completa, ver Material Suplementario.

Las muestras sometidas a este método sufrieron degradación de ADN. Este tratamiento dio rendimientos superiores en cuanto a concentración, con valores de entre 60 y 130 ng/μL a partir de 100 mg de materia fecal (Fig. 5, inciso b).

c) *MoBio UltraClean Microbial DNA Isolation Kit*

Este método (29) se basa en lisado de la muestra con una combinación de calor, detergentes y fuerzas mecánicas, precipitación de proteínas y separación del ADN por medio de unión a una membrana de sílice (*Mini spin filter*), lavado y elución.

Las muestras obtenidas por este método de extracción también sufrieron de una seria degradación. A partir de este punto, se decidió no tomar mediciones de concentración a menos que se juzgase que la integridad del ADN era suficiente (Fig. 5, inciso c).

d) *Roche DNA Isolation Kit for Cells and Tissues*

Este método (30) se basa en lisado de la muestra usando detergentes, proteólisis usando proteinasa K, eliminación de ARN, precipitación de proteínas, separación del ADN por precipitación, lavado y elución. Las modificaciones a este método se encuentran en Material Suplementario.

Las muestras también sufrieron de barridos (Fig. 5, inciso d).

Roche + QIAquick Gel Extraction kit

Este método (31) se basa en la escisión del fragmento de ADN de interés embebido en gel de agarosa, disolución del gel, y separación del ADN por medio de unión a una membrana de sílice (*QIAquick Column*), lavado y elución.

Debido a que se obtuvo lo que parecía una mayor cantidad de ADN en los geles con aislados resultantes del kit de Roche, se procedió a tomar el total de ADN y a aislarlo de banda usando el *QIAquick Gel Extraction kit*. Si bien se logró obtener ADN aislado y libre de degradación por esta vía, la concentración de ADN que se obtuvo fue de 8 ng/μL. Esto hubiera hecho necesaria una gran cantidad de ensayos para obtener la cantidad de material necesario para realizar la secuenciación.

e) Protocolo de Dellaporta et. al.

Este método (32) se basa en lisado de la muestra con una combinación de temperatura, detergentes y fuerzas mecánicas, precipitación de proteínas y separación del ADN por precipitación, lavado y elución.

Este método tampoco estuvo exento de dar como resultado ADN degradado.

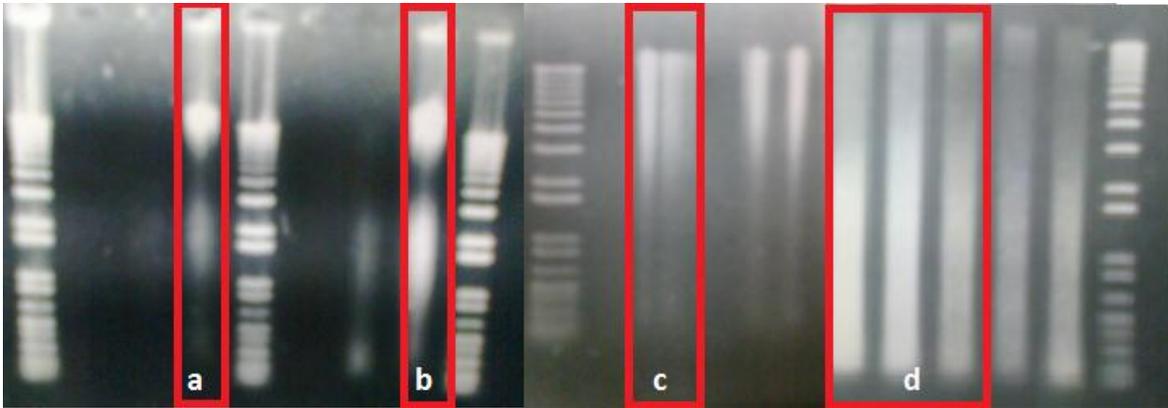


Fig. 5. Ejemplos de electroforesis en gel de agarosa de ADN extraído por distintos métodos. a) QIAamp DNA Stool mini kit. b) Fermentas Genomic DNA Purification Kit-Roche High Pure PCR Product Purification Kit. c) MoBio UltraClean Microbial DNA Isolation Kit. d) Roche DNA Isolation Kit for Cells and Tissues.

f) Protocolo de Zhang et. al.

Este método (33) se basa en lavado de la muestra (usando etanol) lisado usando detergentes, secuestro de inhibidores con almidón de papa, un lavado adicional con detergentes, extracción orgánica y precipitación del ADN. Es necesario hacer énfasis en que el protocolo original, en lugar de precipitar el ADN, lo extraía usando una membrana de sílice.

Usando este método se obtuvieron los mejores resultados. Aún al utilizar muestras únicamente congeladas (cuya conservación es menos buena), se obtuvieron barridos significativamente inferiores comparados con el ADN aislado usando los otros métodos. Para la muestra conservada en etanol y congelada, el barrido se eliminó por completo, de acuerdo a lo que se puede observar en gel de agarosa (Fig. 6). La concentración de ADN, sin embargo, fue muy variable, incluyendo valores entre 70 ng/ μ L y 750 ng/ μ L a partir de 500 mg de materia fecal.



Fig. 6. Ejemplo de electroforesis en gel de agarosa de ADN extraído (carril derecho) usando el método de Zhang *et.al.* modificado. Se muestra el marcador de peso molecular (carril izquierdo).

Secuenciación

Se realizaron dos intentos de secuenciación con muestras obtenidas por el método de Zhang *et. al.* usando los servicios de la empresa sudcoreana Macrogen (54). El personal indicó que fue imposible obtener resultados positivos para las librerías. Es importante indicar que, a pesar de que las muestras enviadas cumplían con los estándares de concentración, cantidad total y pureza de la muestra estipulados por dicha empresa, la medición obtenida con *Nanodrop* fue en muchas ocasiones significativamente distinta de la obtenida por el método fluorométrico que utiliza el personal de la unidad de secuenciación de esta empresa para analizar la muestra.

En vista de la imposibilidad de obtener datos de secuenciación por ese medio, se decidió enviarla a BaseClear BV (46), empresa holandesa. Como se indicó anteriormente, el ADN enviado a esta empresa fue obtenido en febrero de 2012 y correspondía a GB012, el ejemplar de 6 años de edad. Las librerías pareadas se hicieron exitosamente, y se

procedió a secuenciar usando la plataforma HiSeq2500 de Illumina. Como resultado de la secuenciación se obtuvieron 2 archivos FASTQ, sumando 169,943,724 lecturas con un contenido de G/C promedio de 52% y longitud promedio de 99 pb.

Filtrado de datos

87.64% de las lecturas fueron conservadas tras el filtrado de datos. Esto indica que la calidad de las secuencias obtenidas fue, en términos generales, muy alta. Este conjunto de datos fue utilizado como base para los análisis subsiguientes.

Análisis taxonómico

Se realizaron dos análisis taxonómicos sobre los datos metagenómicos filtrados. El primero, Kaiju, utiliza un enfoque independiente de ensamblado y se basa en la comparación entre secuencias de aminoácidos y una base de datos (49) (NR de NCBI en este caso). El segundo método se basa en la reconstrucción (ensamblado) de genes de 16S rRNA a partir de las lecturas metagenómicas utilizando información de secuencia y de conservación estructural (52).

1. Perfil taxonómico usando Kaiju

El análisis taxonómico arrojó que 0.84% de las secuencias identificadas pertenecen al dominio Eukarya, 1.26% a Archaea y 49.79% a Bacteria (Fig. S. 5). La comunidad viral está mínimamente representada (0.06%) (Fig. S. 3). Resulta notable que el 47.86% para la clasificación corresponde a organismos no identificados.

Eukaryota

El grueso de los organismos eucarióticos identificados por Kaiju corresponde a Fungi (Fig. 7). Dikarya, un subreino de Fungi, representa 0.9% de las muestras identificadas. Estudios previos sobre diversidad en reptiles herbívoros no mencionan datos con este respecto. Además, se encuentran secuencias asignadas a Ophisthokonta, es decir, a un grupo que contiene especies pertenecientes tanto a Fungi como a Metazoa (56). Resulta notable que no se identificaron secuencias correspondientes a Animalia.

Archaea

Al igual que en el estudio sobre iguana verde, marina, terrestre y tortuga Galápagos (8), se encontraron Arqueas metanógenas en la muestra. *Methanobrevibacter* es el género más representado (0.89%). Los géneros *Methanosarcina* (0.25%) y *Methanocorpusculum* (0.008%) también se identificaron (Fig. 8). Resulta interesante que tanto la proporción encontrada de Arqueas (1.26% para *G. berlandieri* contra 0.1-0.2% de las muestras de los 4 reptiles recién mencionados) como la presencia de *Methanobrevibacter* presentan diferencias entre ambos trabajos. La tortuga Galápagos no muestra presencia de este género (8), sino un dominio de *Methanocorpusculum*, mientras que el galápagos tamaulipeco se asemeja más a las iguanas terrestres (8), con dominancia de *Methanobrevibacter* y una pequeña proporción de *Methanocorpusculum*.

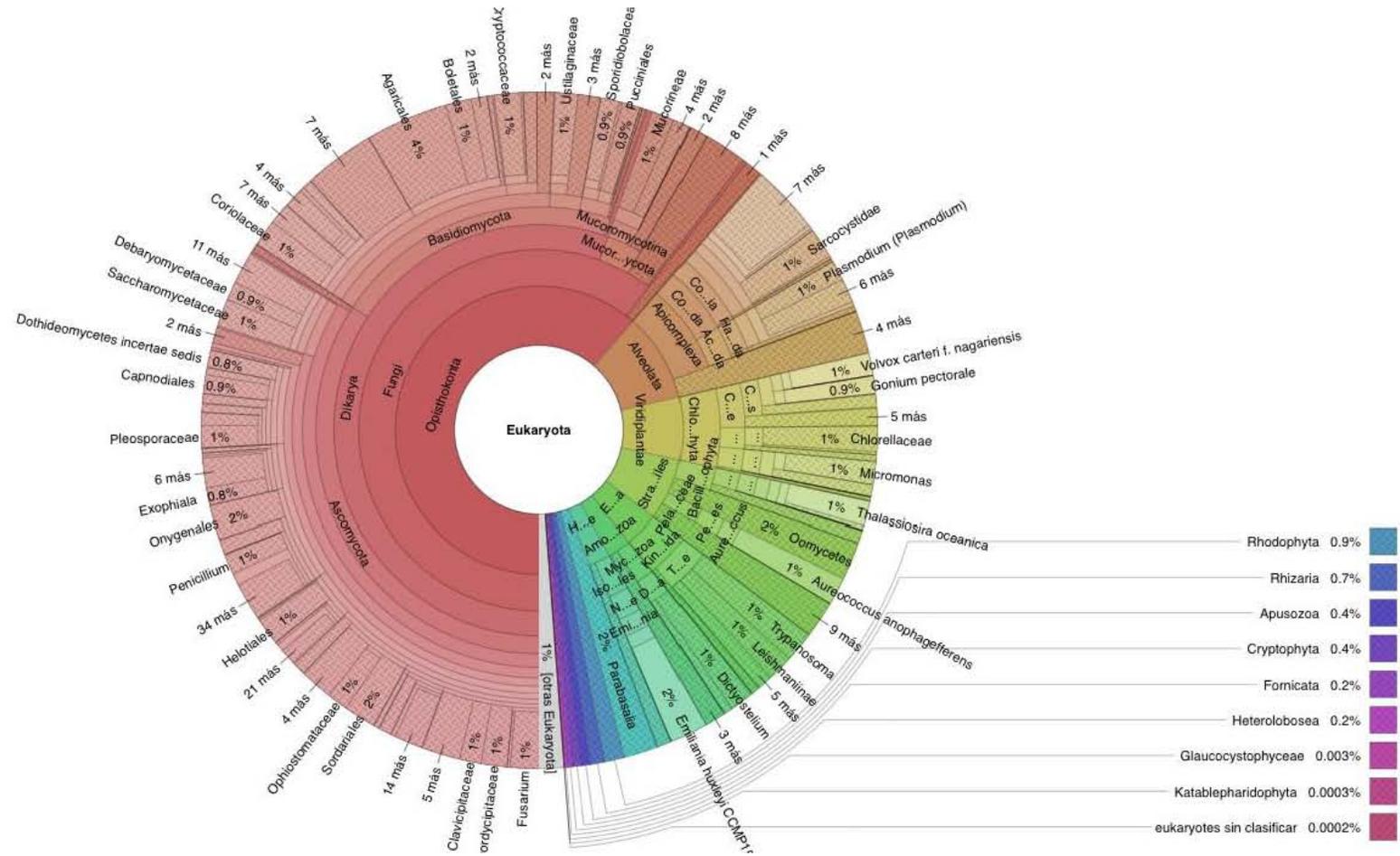


Fig. 7. Eucariontes identificados con Kaiju. Nótese ausencia de reino Animalia.

Bacteria

La comunidad bacteriana fecal identificada de *G. berlandieri* se acopla a la generalidad hasta ahora caracterizada para tetrápodos (5, 8, 13, 44). Ésta comprende principalmente Firmicutes (57.21%) y Bacteroidetes (11.05%) (Fig. 10). A nivel de clase, la comunidad bacteriana en *G. berlandieri* está claramente dominada por *Clostridia*. *Synergistia*, la segunda clase más abundante para el galápagos tamaulipeco, es mucho menos conspicua de acuerdo a Hong, et. al., excepto en las muestras de su análogo de las Galápagos (8) (Tabla 3, Fig. 9).

Clase	Abundancia % (total de secuencias)	Abundancia % (secuencias bacterianas identificadas)
Clostridia	20.93	43.80
Synergistia	3.82	7.99
Bacilli	2.65	5.55
Bacteroidia	2.56	5.36
Gammaproteobacteria	1.97	4.12
Actinobacteria	1.71	3.58
Deltaproteobacteria	1.1	2.30
Alphaproteobacteria	1	2.09
Methanobacteria	0.91	1.90
Negativicutes	0.84	1.76

Tabla 3. Las diez clases bacterianas más abundantes en *G. berlandieri*.

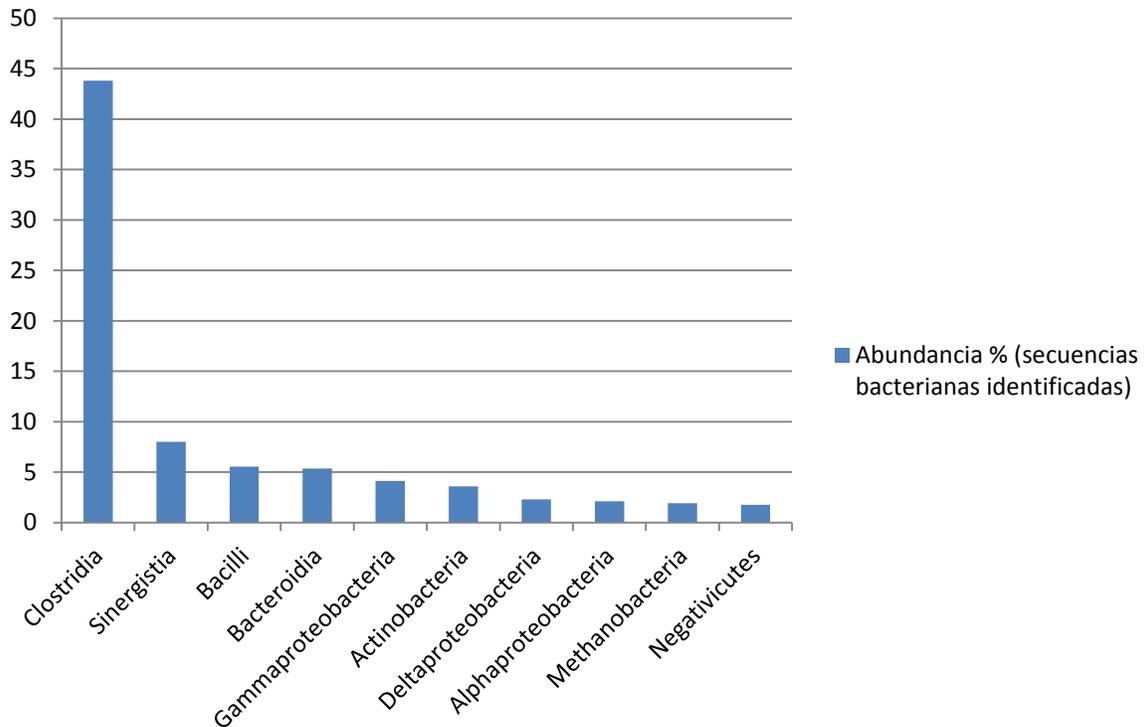


Fig.9. Las diez clases bacterianas más abundantes en las heces de *G. berlandieri* de acuerdo a Kaiju.

Las similitudes se extienden igualmente a que *Clostridiaceae* y *Ruminococaceae* conforman las familias Clostridiales más abundantes (identificadas) en los reptiles herbívoros reportados (8).

A nivel género, los cinco más abundantes son *Clostridium* (Firmicutes) con 4.79% – la única especie bacteriana identificada cuya abundancia supera al 1% del total de secuencias (1.51%), *Clostridium sp. CAG:1024*, pertenece a este género–, *Ruminococcus* (Firmicutes) con 1%, *Eubacterium* (Firmicutes) con 0.85%, *Methanobrevibacter* (Archaea) con 0.79%, *Bacteroides* (Bacteroidetes) con 0.69% y *Pyramidobacter* (Synergistetes) con 0.68%.

2. Reconstrucción de secuencias 16S rRNA con REAGO y comparación con la diversidad de otros reptiles herbívoros.

Dadas las interesantes semejanzas y diferencias en la microbiota entre las distintas especies analizadas, se efectuó una reconstrucción de secuencias de 16S rRNA para poder comparar más claramente nuestros resultados contra los reportados (8). Las relaciones entre los datos analizados en iguanas y tortuga Galápagos se replicaron exitosamente. Análisis de Coordinadas Principales, que se usó como referencia para hacer otros dos PCoA incluyendo la muestra.

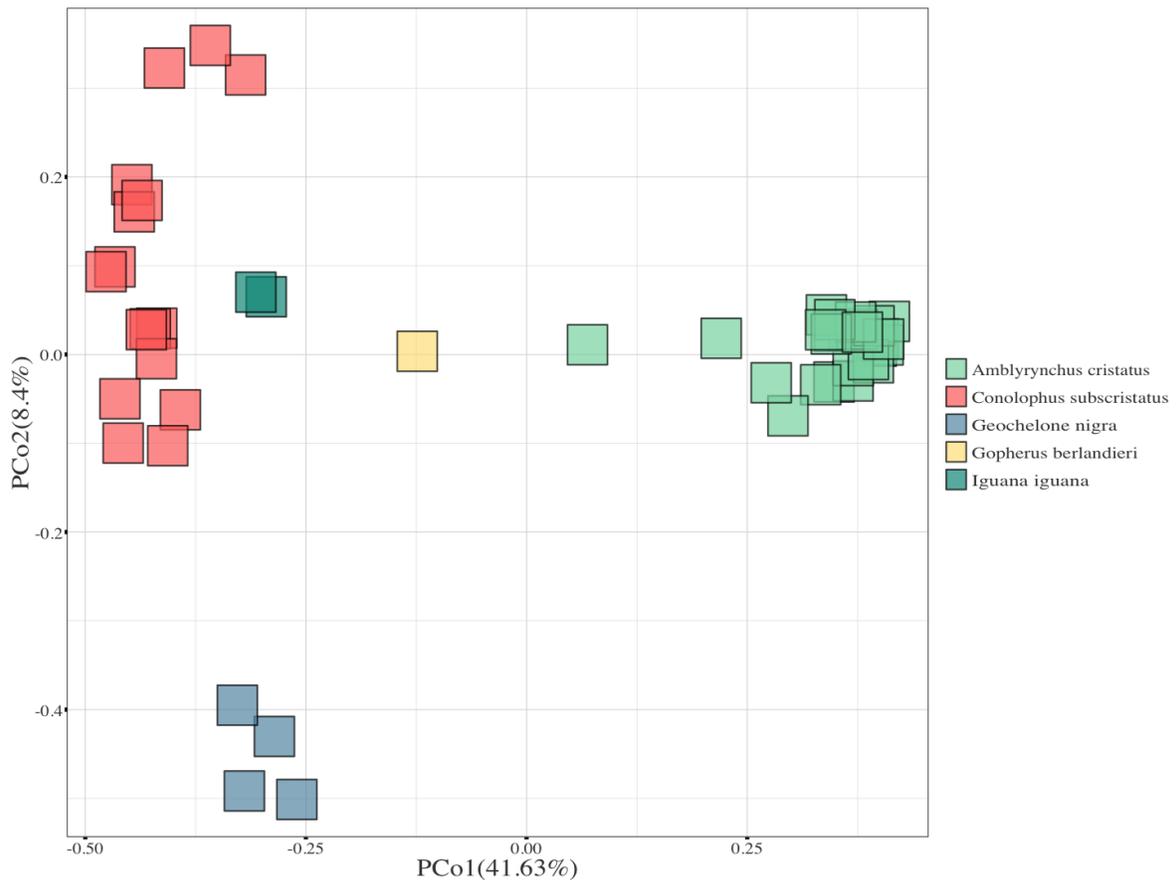


Fig. 11. Análisis de componentes principales 1 y 2 (*A. cristatus* = iguana marina, *C. subcristatus* = Iguana terrestre, *G. nigra* = tortuga Galápagos, *G. berlandieri* = galápagos tamaulipeco, *I. iguana* = iguana verde). Los datos correspondientes a todo reptil excepto *G. berlandieri* se obtuvieron tras contactar a la autora de (8).

Las coordenadas 1 y 2 recapitulan las diferencias en las comunidades microbianas para las distintas especies señaladas. El primer detalle notable en este análisis resulta de observar los agrupamientos por especie, que sugieren la existencia de una composición microbiana particular a cada una de éstas. Además, la coordenada 1 (fig. 11, eje horizontal) muestra una división entre las iguanas marinas (a la derecha, verde claro) y el resto. Esta división da cabida a la inferencia (probada para otros animales) (5) de que aquellos organismos con dietas similares compartirán más elementos de su microbiota. Es importante mencionar que la iguana marina es ficóvora (es decir, se alimenta de algas), mientras que el resto de los organismos estudiados son herbívoros. Es posible descartar que el origen –silvestre o no– constituya ninguna de las dos coordenadas, pues de ser así existiría una segregación severa entre el ejemplar de *G. berlandieri* (que no es silvestre) y el resto de las muestras. Del mismo modo, las diferencias metodológicas entre este estudio y el de Hong et. al. (8) seguramente no recapitulan esta segregación, pues también sería claramente distinguible una distancia entre las muestras obtenidas por amplificación de genes 16S rRNA (el caso de las iguanas y la tortuga Galápagos) y la muestra obtenida por *whole shotgun sequencing*, que corresponde a *G. berlandieri*.

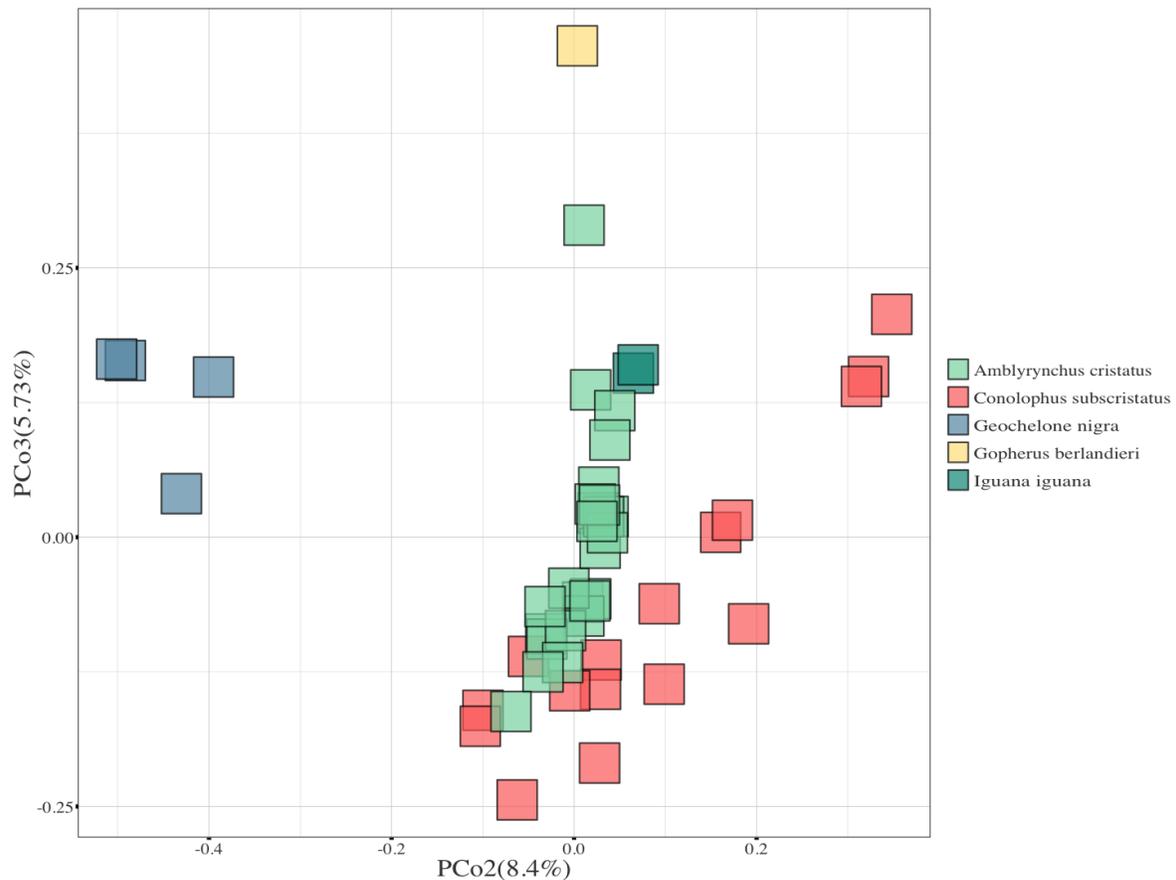


Fig. 12. Análisis de coordenadas principales 2 y 3 (*A. cristatus* = iguana marina, *C. subcristatus* = Iguana terrestre, *G. nigra* = tortuga Galápagos, *G. berlandieri* = galápago tamaulipeco, *I. iguana* = iguana verde). Los datos correspondientes a todo reptil excepto *G. berlandieri* se obtuvieron tras contactar a la autora de (8).

El componente 3 (Fig. 12, eje vertical) muestra también una segregación, pero en este caso de la muestra del galápago tamaulipeco. En este caso sí cabe la posibilidad de que este componente esté recuperando las diferencias en el origen, metodología, o incluso as diferencias entre la cantidad de bacterias no clasificadas entre las muestras de (8) y la muestra de galápago tamaulipeco. Es interesante que las muestras correspondientes a las tortugas Galápagos se segregan de aquellas de iguanas y de la muestra de *G. berlandieri* (Figs. 11 y 12, coordenada 2). Esto muestra que se requiere más información para poder obtener una comprensión más profunda respecto a los factores que influyen sobre la

capacidad para comparar de forma efectiva la diversidad microbiana para organismos relativamente emparentados con hábitos alimenticios similares.

Se realizaron filogramas para comparar en forma visual los perfiles taxonómicos para las microbiotas fecales de estos reptiles a nivel de phylum (Fig. 13). Es inmediatamente notable que, a diferencia del resto de las muestras, la correspondiente al galápaguense posee una proporción notable de bacterias no clasificadas.

Comparación de métodos

Se realizó un análisis de correlación de Spearman para evaluar la congruencia entre los resultados obtenidos de abundancia relativa utilizando Kaiju y REAGO (Fig. 14). Debido a que REAGO únicamente ensambla y clasifica secuencias correspondientes a genes de 16S rRNA, únicamente se utilizaron los datos de bacterias arrojados por Kaiju. Además, en vista de que cada método utiliza distintas bases de datos, únicamente se consideraron las bacterias cuyo nombre era idéntico para los resultados de ambos programas.

El coeficiente de correlación fue 0.79%. Esto quiere decir que, a pesar de las diferencias entre ambos métodos, las abundancias relativas para las bacterias encontradas son similares. Resulta interesante que en términos generales, las diferencias caen en la categoría de que Kaiju encontró mayor abundancia relativa que REAGO. Cabe mencionar que, entre los datos más divergentes, la mayoría pertenecen al phylum Proteobacteria. Estas diferencias podrían deberse a que exista una anotación más completa de genes 16S rRNA en comparación con la anotación de genes en general, misma que se vería reflejada en bases de datos.

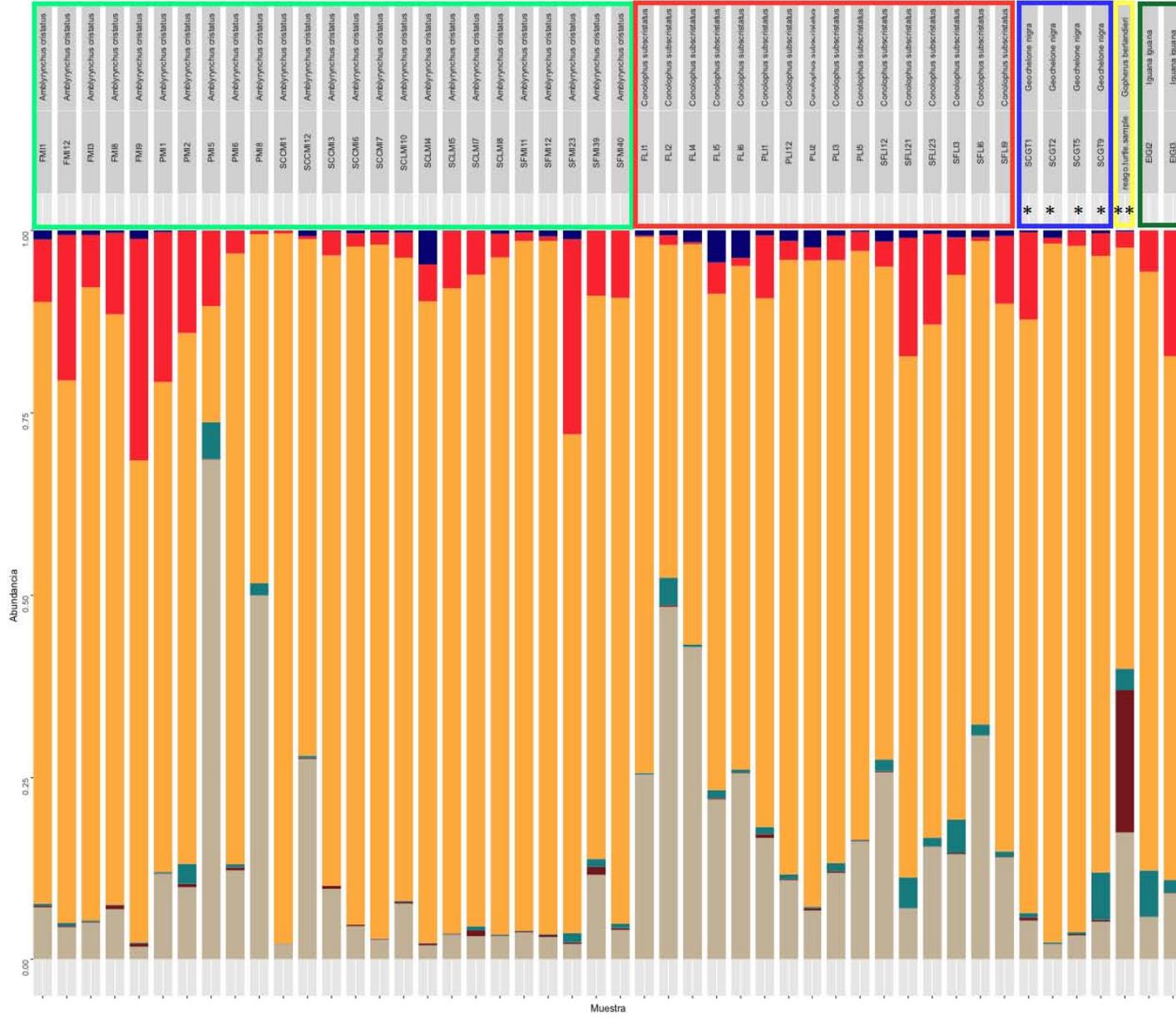


Fig. 13. Filograma para los individuos muestreados por Hong et. al. incluyendo a *G. berlandieri* (doble asterisco). Las tortugas están marcadas con asterisco, y los recuadros de colores representan a cada especie (turquesa = iguana marina, coral = Iguana terrestre, azul = tortuga Galápagos, amarillo = galápagos tamaulipeco, verde = iguana verde). Los datos correspondientes a todo reptil excepto *G. berlandieri* se obtuvieron tras contactar a la autora de (8).

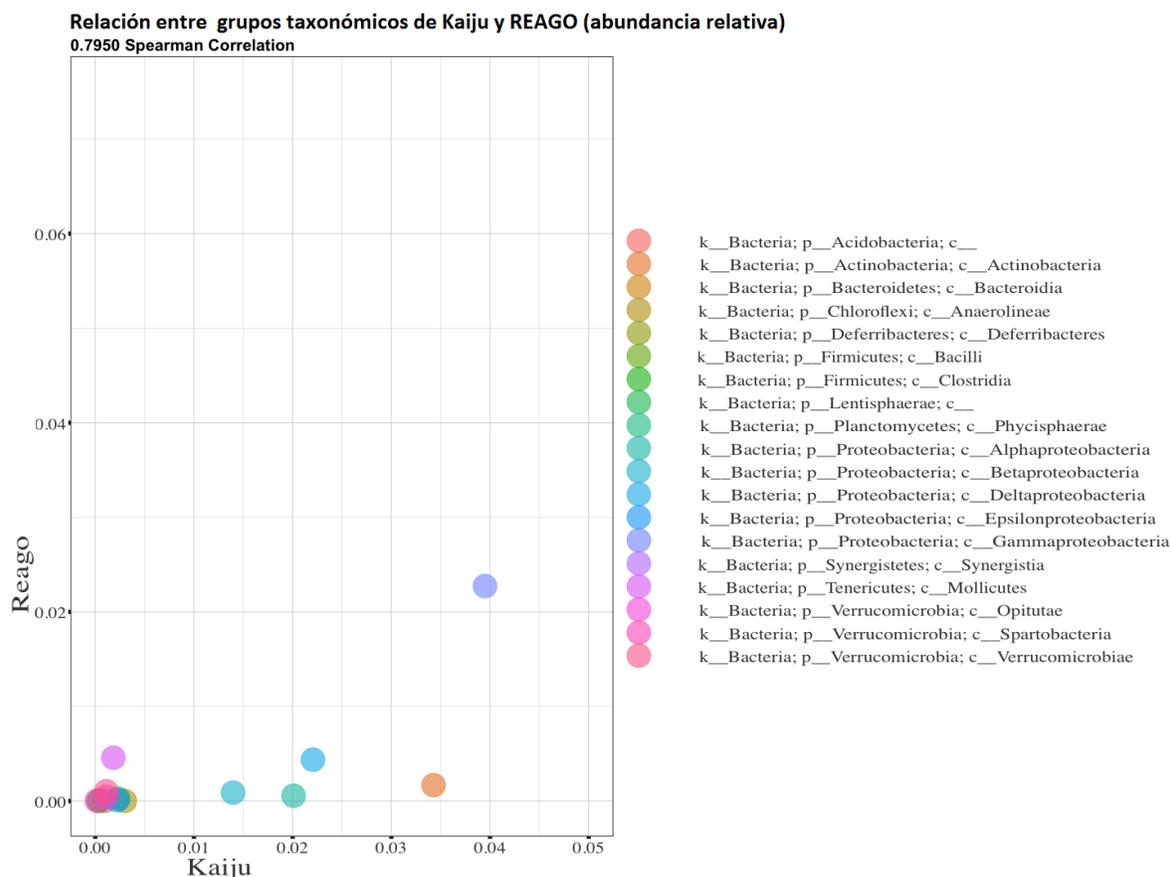


Fig. 14. Relación entre grupos taxonómicos obtenidos con Kaiju y REAGO (con base en su abundancia relativa). El coeficiente de correlación es de 0.79, indicando correspondencia entre los resultados arrojados por ambos métodos.

Análisis funcional

MG-RAST ofrece una *suite* de análisis funcional con la cual se anotaron diversas proteínas y se asociaron a categorías basadas en COG y SEED (45). A través de esta plataforma se predijo la existencia de 1,929,485 proteínas, de las cuales el 58.17% correspondió a proteínas anotadas con función conocida y 36.08% a proteínas anotadas cuya función se

desconoce. De acuerdo a COG, el 82.7% de las proteínas anotadas fue caracterizado apropiadamente. En orden, metabolismo (39.54%), procesamiento y guardado de información (24.16%) y procesos y señalización celulares (18.98%) ocuparon los niveles más generales de la categorización. El 17.33% de las proteínas anotadas se consideraron ‘pobremente caracterizadas’.

De acuerdo a SEED, metabolismo de proteínas (10.76%) y carbohidratos (10.06%) son las categorías caracterizadas más representadas. Otros subsistemas agrupados por *clustering* ocuparon el 16.91%. Dichos subsistemas corresponden a genes que están acoplados funcionalmente (es decir, que se encuentran en un mismo vecindario genético en distintas especies, por lo que se considera probable que posean funciones relacionadas pero cuya función se desconoce; el *clustering* se refiere a la colocación génica conservada para inferir función). Vitaminas, cofactores, grupos prostéticos y pigmentos ocuparon un 5.39%, y metabolismo del nitrógeno 0.8% de las proteínas identificadas (Fig. 15).

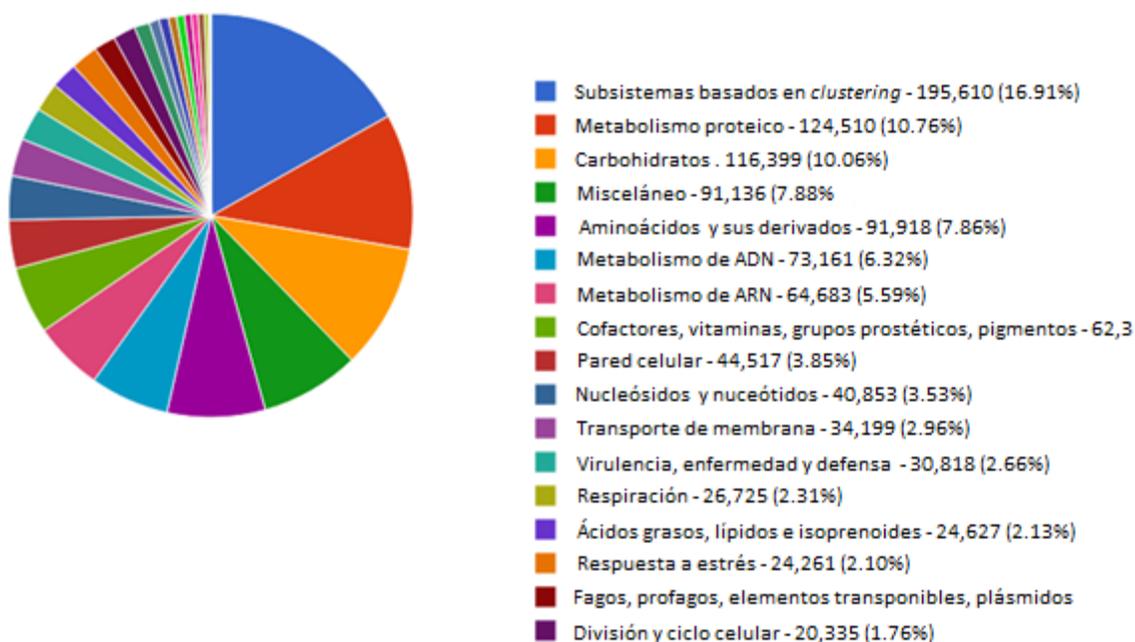


Fig. 15. Categorías funcionales basadas en proteínas anotadas de SEED.

1. Metabolismo proteico

Los procesos biosintéticos de proteínas dominan el paisaje funcional para metabolismo proteico (69%); el procesamiento, modificación, doblado y la producción de selenoproteínas comprenden otro 19% de las secuencias (9%, 8% y 3% respectivamente); se sabe que existen diversos microorganismos que usan selenoproteínas, como los Clostridiales (77). La degradación proteica ocupa el 12% restante.

En lo que a biosíntesis respecta, 80% de los genes encontrados corresponden a proteínas relacionadas con la traducción del ADN, principalmente bacteriana. El 20% restante pertenece a GTPasas universales, dominando el factor de elongación G (21%). Por otra parte, en lo que a degradación respecta, 57% de los genes fueron categorizados como

pertenecientes a proteólisis bacteriana dependiente de ATP, seguido de 24% para el proteosoma bacteriano. El 19% restante pertenece principalmente a proteasas, de las cuales menos de 1% se categoriza explícitamente como eucariótica o de arqueas.

2. Carbohidratos

El 29% de las secuencias en la categoría carbohidratos pertenecen al metabolismo central de los mismos; 11% a monosacáridos; 20% a metabolismo de un carbono, di y oligosacáridos (11% y 9%, respectivamente); 9% a fijación de CO₂; 7% a fermentación; 4% a polisacáridos y el resto a otros compuestos, incluyendo ácidos orgánicos, aminoazúcares, glucósido hidrolasas y alcoholes. Cabe mencionar que 10% de las lecturas no fueron categorizadas.

El 38% de las secuencias en metabolismo central de carbohidratos pertenecen a glucólisis y gluconeogénesis; de éstas, una pequeña fracción representa enzimas de Arqueas. El 12% corresponde a reacciones anapleróticas y 11% de las secuencias pertenecientes a 'metabolismo central de carbohidratos' forman parte de la vía de Entner-Douduroff, que es exclusivamente procariótica. El 8% cae en la categoría de la vía de la pentosa-fosfato; 7% en el Ciclo de Ácidos Tricarboxílicos y el resto en metabolismo de piruvato y otros compuestos. Un 90% de las secuencias no categorizadas fueron descritas como parte de las vías de utilización de azúcares en *Thermotogales* (Fig. 16).

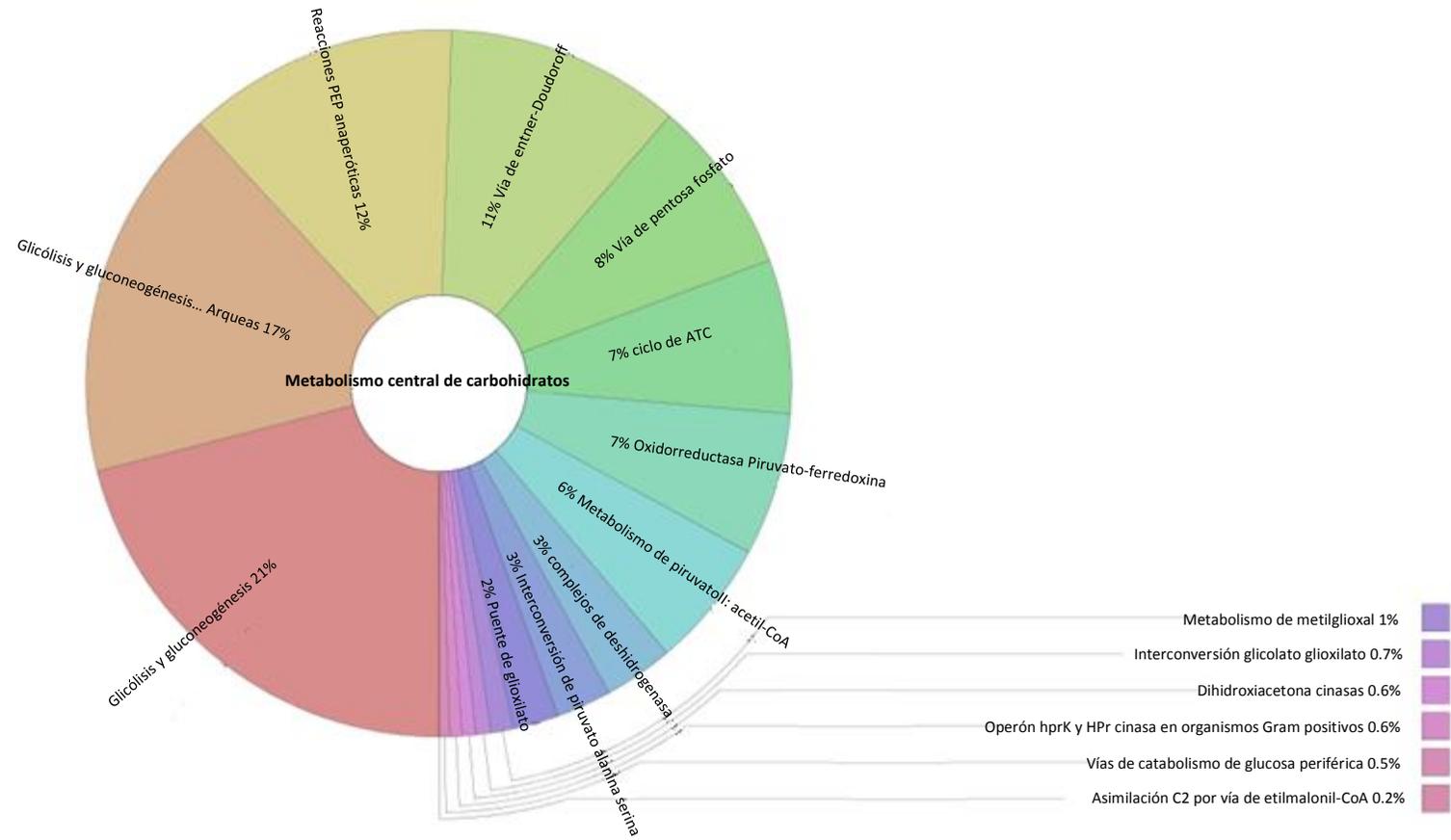


Fig. 16. Categorías funcionales anotadas sobre carbohidratos usando SEED.

En lo que a fermentación respecta, 22% de las secuencias se anotaron como parte de la vía de fermentación de Acetil CoA Butirato; 20% a síntesis de acetona, butanol y etanol; 16% a la biosíntesis de butanol; 13% de fermentación a lactato, y 30% a otros ácidos.

El 81% del metabolismo de polisacáridos pertenece a glucógeno. El 12% corresponde al celulosoma, un complejo de enzimas que permite a diversas bacterias degradar celulosa. El 98% de las secuencias que cayeron en esta categoría pertenecen a la enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano, necesaria para acumulación de glucógeno. El 2.4% corresponden a proteínas de la familia Sus (SusG –alfa-amilasa, 1%– SusA – Neopululanasa, 0.4%– y SusR – proteína regulatoria). Finalmente, 0.4% pertenece a la endoglucanasa J, el componente catalítico más grande del celulosoma.

3. Aminoácidos y sus derivados

El 98.8% de las secuencias categorizadas como pertenecientes a aminoácidos y sus derivados (e incluye tanto biosíntesis como degradación), corresponde a alanina, treonina, metionina y cisteína (34%); arginina, poliaminas, y ciclo de la urea (18%); alanina, serina y glicina (11%); aminoácidos de cadena ramificada (9%); glutamina, glutamato, aspartato, asparagina y asimilación de amoniaco (10%); aminoácidos aromáticos y sus derivados (10%); metabolismo de histidina (6%); prolina e hidroxiprolina (0.8%).

El 68.2% de las secuencias relacionadas con lisina, treonina, metionina y cisteína son biosintéticas, mientras 31% están asignadas a degradación y 1% para reciclaje de metionina. Por otra parte, 45% de los genes relacionados con alanina, serina y glicina son biosintéticos; el 40% tienen relación con utilización de glicina y serina y el 15% con catabolismo de glicina.

Las secuencias relacionadas con arginina, poliaminas, y ciclo de la urea pertenecen principalmente al metabolismo de arginina y ornitina (68%); 20% al metabolismo de poliaminas; 3.7% a descomposición de urea y ureasas y 32.8% a utilización de otros compuestos. En lo que a metabolismo de poliaminas respecta, el metabolismo de putrescina y espermidina son los dos procesos más abundantes (44.6%), seguidos por carbamato cinasas (16%).

Del porcentaje correspondiente a descomposición de la urea y ureasas (0.5% de las secuencias categorizadas entre aminoácidos y sus derivados), 31% pertenece a la subunidad alfa de la ureasa, pero también se encontraron lecturas correspondientes a las subunidades beta y gamma, que componen las ureasas bacterianas. También se incluyeron transportadores de la familia Urt y miembros de la familia Ure, necesarios para la activación de la ureasa.

4. Vitaminas y cofactores

El 56% de las secuencias se asignaron a la categoría de folatos y pterinas; 12% a NAD y NADP; 9% a biosíntesis de tetrapirroles; 7% a biosíntesis de piridoxina; 4% a biosíntesis de coenzima A, 4% de biotina, 3% de tiamina, 1% de riboflavina, FMN y FAD, y el resto a la producción de otras coenzimas. Estos descubrimientos concuerdan con nociones ya publicadas sobre el rol de la microbiota en la expansión de las capacidades metabólicas de los hospederos (67).

5. Virulencia y defensa

El 81% de los genes en esta categoría son de resistencia a antibióticos y compuestos tóxicos; 2% de detección; 8% no poseen categoría; 5% de adhesión; 3% de invasión y 0.8% de bacteriocinas, péptidos antimicrobianos, toxinas y superantígenos.

El 23% de las lecturas relacionadas con resistencia antibióticos representan resistencia a fluoroquinolonas; 12% a cobalto, zinc y cadmio, cuya presencia podría responder a que existe contaminación con metales pesados en verduras (74); 17% son bombas de eflujo de fármacos, y el 48% a resistencias relacionadas con metales, otras bombas de eflujo o resistencias particulares de clados como *Staphilococci*.

Las secuencias correspondientes a la categoría detección fueron asociadas a datos de MLST. En lo que compete a los genes de adhesión, 67% están relacionados con *Streptococcus*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, y Enterobacterias. Los genes relacionados con invasión pertenecen al *Listeria*.

5. Metabolismo de nitrógeno

El 56% de las lecturas caen en la categoría de asimilación de amoníaco; 23% en estrés nitrosativo; 7% en utilización de alantoína; 6% en amonificación de nitratos y nitritos; 4% en fijación de nitrógeno, y el resto en desnitrificación, nitrilasas, síntesis de óxido nítrico, y amidasas (Fig. 17).

Glutamino y glutamato sintetasas son las principales proteínas contra las que se encontraron secuencias relacionadas con asimilación de amonio (63.57%); en lo que a estrés Nitrosativo se refiere, 83% de las lecturas corresponden a hidroxilamina reductasas;

3.7% están relacionadas con reductasas de óxido nítrico (ya sea reguladores o las reductasas en sí), y el resto corresponde a oxidorreductasas o proteínas o caracterizadas (Fig. 14).

En cuanto a fijación de nitrógeno, 40% de las secuencias corresponden a cisteín desulfurasas (NifS); 18% a homocitrato sintasas; 32.1% a miembros de la familia nif (12% NifU, 7% NifA, 4% NifB, 3% NifH, 3% NifD, 2% NifX, 2% NifE, 1% NifM, 0.7% NifZ, 0.4% NifT), y el resto a subunidades de nitrogenasas hierro-hierro y vanadio-hierro (VnfA 0.7%, VnfH 0.4%).

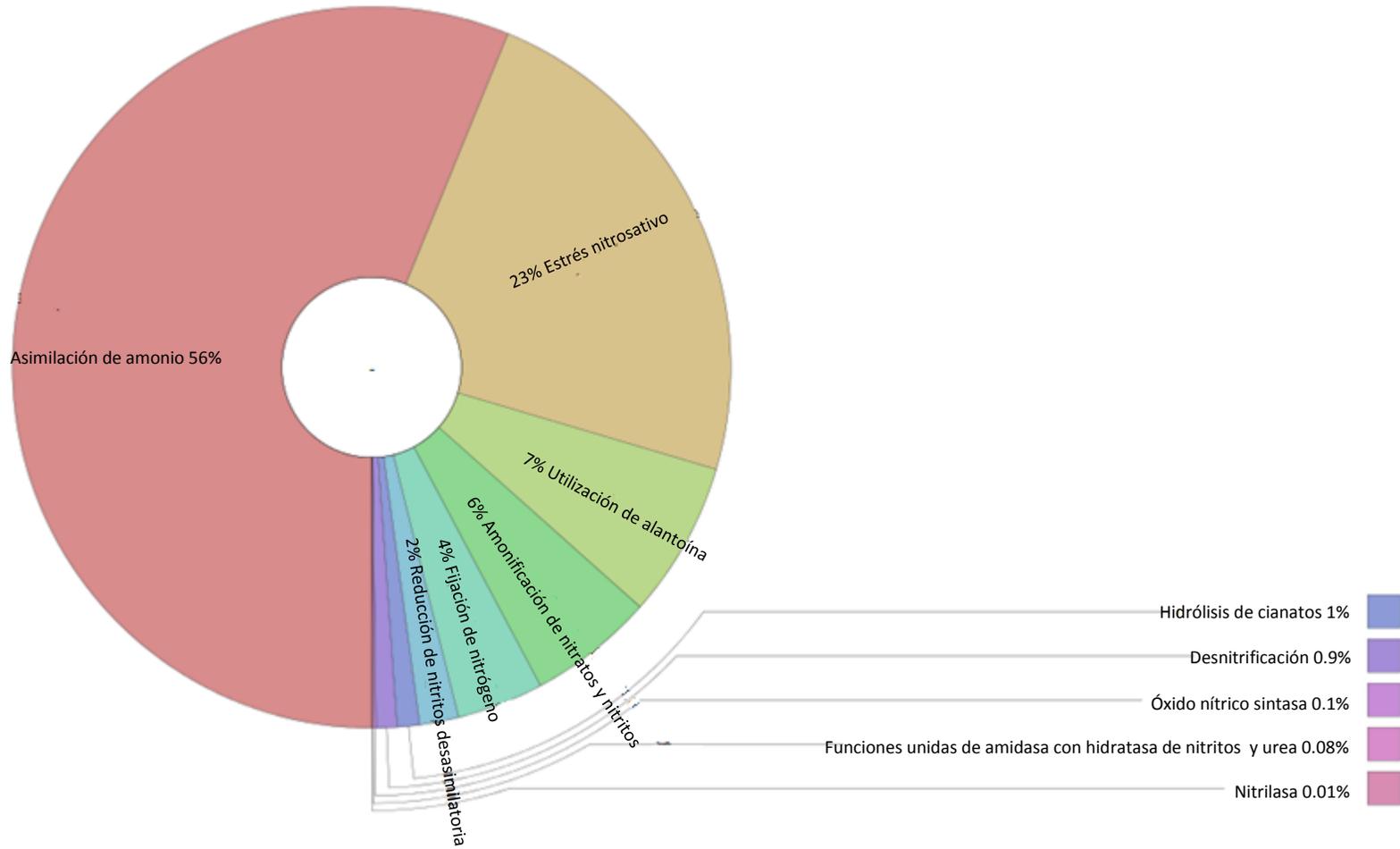


Fig. 17. Abundancia de genes en la categoría de metabolismo de nitrógeno.

VII. DISCUSIÓN

Sobre el impacto de los métodos de extracción de ácidos nucleicos

Las diferencias en la concentración de ADN obtenida usando el Kit de Qiagen, los kits de Fermentas-Roche, Mo Bio y Roche son notables, al igual que aquellas obtenidas usando los protocolos encontrados en la literatura. A pesar de que el kit de Qiagen está pensado para usarse con muestras fecales (21), deben existir sustanciales diferencias en la composición de las deposiciones de animales omnívoros y herbívoros que disminuyen drásticamente la calidad del producto al momento de realizar la extracción; este problema ha sido planteado anteriormente al comparar los resultados obtenidos por distintos métodos (11).

Debido a que los métodos empleados para realizar extracciones pueden en potencia extraer preferentemente ADN de determinados clados, se había planteado realizar las extracciones usando el kit de Qiagen y el protocolo de Fermentas-Roche, que ha dado buenos resultados en intestinos de insectos (Servín, L. comunicación personal). Lamentablemente, el ADN que se aisló usando estos métodos no cumplió con los requerimientos para ser secuenciado. A raíz de esto se incluyó entre los objetivos del presente proyecto el desarrollar un protocolo que permitiese obtener ADN con las características requeridas.

Se probaron extracciones usando el kit de Mo Bio, debido a que ha dado buenos resultados en trabajo con artrópodos (Bolaños, L. comunicación personal) y teóricamente está diseñado para optimizar el aislamiento de ADN microbiano. Este kit, no obstante, toma como muestra normalmente células microbianas de cultivo. Esto justifica que el resultado obtenido haya sido pobre, y alimenta la noción de que es indispensable hacer una limpieza de la muestra previa a la lisis, así como extremar precauciones una vez que se ha realizado

ésta. Los resultados obtenidos con el protocolo de extracción de ADN usando el kit de tejidos de Roche modificado por Marco Antonio Rogel (comunicación personal) dieron fuerza a lo que sugerían los resultados previos. Aunque realizar dos extracciones con solvente orgánico resultó de gran utilidad, estos resultados sugieren entonces que no todos los compuestos presentes en las heces son miscibles en solventes orgánicos. Además, algunos de estos compuestos podrían tener actividad similar a la de nucleasas, pues se pudo observar la persistencia de material genético degradado (como barridos en geles de electroforesis). Otra posibilidad que se planteó es que la concentración de polisacáridos en la materia fecal de estos reptiles fuese tan alta que una fracción de éstos se eluyese con el ADN, generando lecturas erróneas en los instrumentos, y quizás también afectando los geles. En adición a esto, los resultados fueron de particular interés porque aparentemente se obtenía una buena cantidad de ADN más íntegro, aunque el barrido que se observaba era notable. Debido a esto, se intentó obtener el ADN de mayor integridad realizando una extracción de banda con el kit QiaQuick de Qiagen, con éxito parcial, pues se perdió una gran cantidad de ADN en el proceso.

La presencia de polisacáridos no es únicamente nociva por las razones antes expuestas; éstos también son inhibidores de distintas reacciones, como la PCR (34). Por esto se utilizó a continuación un método para extracción de ADN de plantas (32), dado que, por su naturaleza, estas muestras deben ser liberadas de carbohidratos complejos presentes, por ejemplo, en la pared celular. En este método se realiza únicamente una extracción usando fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, y se usa acetato de potasio para precipitar proteínas y demás compuestos que se unen a los detergentes presentes en el buffer de extracción. Empero, dado que la degradación de ADN no se evitó, concluimos que

probablemente la muestra presente ambas características: contiene altas concentraciones de compuestos que influyen en el decaimiento de la integridad de la muestra, entre ellos nucleasas, compuestos no enzimáticos con actividad de nucleasa y carbohidratos abundantes. Esto tiene sentido si se considera que la muestra es en realidad el producto de digestión de un organismo y el arsenal enzimático requerido para degradar los alimentos es alto. Además, en el proceso de digestión se necesitan jugos gástricos que seguramente pueden permanecer en concentraciones aún no determinadas en la materia fecal. Aunado a esto, los reptiles (incluyendo *G. berlandieri*) son poco eficientes para degradar los carbohidratos complejos que se encuentran en su dieta (17).

Al buscar en la literatura un protocolo que incluyese pasos para eliminar carbohidratos y compuestos relacionados con la digestión, el protocolo de Zhang pareció cubrir estos requerimientos. A lo largo del proceso de extracción, se agregan a la muestra tres detergentes distintos, entre ellos CTAB. Además se usa almidón de papa para secuestrar bilirrubina (35, 36).

La inclusión de este paso resultó de particular interés porque el kit para extracción de muestras fecales de Qiagen incluye el uso de tabletas cuya función es “absorber inhibidores” (19). El comportamiento del almidón de papa se parece notablemente al observado con las tabletas del kit de Qiagen. Ante el resultado positivo al hacer extracciones con solventes orgánicos más de una vez, y tras hacer pruebas con fenol, fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y cloroformo, se incluyó en el protocolo una primera extracción con fenol, seguida de una con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico.

Otro fenómeno de interés fue que al resuspender la muestra, se podía apreciar una coloración café de intensidad variable. Aún tras realizar las extracciones con solventes orgánicos repetidamente, no se logró eliminar esta condición. Con protocolos que aprovechaban columnas cromatográficas para aislar el ADN resultó inferior el secuestro de los compuestos que dan color a la muestra, al menos comparado con lo que se obtenía por precipitación, por lo que preferimos aislar el ADN realizando precipitación con isopropanol frío. El uso de CTAB probó ser sumamente útil en este paso. Además de las propiedades antes mencionadas, su uso en conjunción con los demás reactivos dio por resultado ADN más limpio que otras muestras, si bien no en todos los casos se liberó al precipitado de una pequeña fracción de color oscuro.

Un factor adicional que parece jugar un papel importante es la forma en que se conserva la muestra. Las muestras conservadas en etanol y en frío dieron mejores resultados en lo que a integridad de ADN respecta al compararse con las muestras que sólo están congeladas, aún si se les somete a extracción con el mismo protocolo. Esto también ha sido revisado previamente en la literatura (37). Las muestras conservadas en etanol pronto liberan compuestos que confieren color al etanol en que están embebidos. Esto podría ser un factor que ayuda a mejorar calidad de las extracciones realizadas así como la confiabilidad de las mediciones de concentración, pues la muestra ya está parcialmente libre de compuestos que pudiesen afectar la integridad del ADN. Valdría la pena realizar una comparación de resultados empleando el kit de Mo Bio utilizado en (8) para poder realizar inferencias mejor sustentadas con respecto a los sesgos y limitaciones en los métodos de extracción.

Finalmente, muchas diferencias entre qué tan eficaz es la extracción recaen en que distintas muestras (Figs. 5 y 6) poseen características distintas. Esto se traduce en variaciones en peso, solidez, y consistencia, pudiendo ser arenosa, viscosa, o semejante a lodo. A su vez, esta diversidad morfológica seguramente responde a cambios en la acidez, concentración de ácidos biliares, y otros factores no analizados. Cabe mencionar que las diferencias en rendimiento también son notables para muestras que, visualmente, poseen características similares. Las diferencias observadas en, por ejemplo, la pureza de la muestra en lo que a color se refiere podrían ser un reflejo de estas diferencias entre diversas deposiciones tanto a través del tiempo para un individuo como entre individuos distintos.

Sobre la caracterización de la diversidad microbiana en heces de G. berlandieri

Los sesgos en la caracterización *completa* de las microbiotas de distintos organismos son comunes y poseen distintas fuentes. Diferencias en la alimentación, niveles de estrés e historia de vida se encuentran entre las abundantes variables que suponen un reto para interpretar los datos resultantes de todo estudio metagenómico. A éstas limitantes se añaden aquellas asociadas a los distintos métodos utilizados para caracterizar y comparar los datos obtenidos, desde errores en la secuenciación hasta fallas en la curación de anotaciones de genes en bases de datos. Todos estos elementos deben tenerse en cuenta si se espera comprender qué factores afectan en qué medida a la conformación de la microbiota.

1. El sesgo de muestreo

Un sesgo que es indispensable discutir para efectos de este trabajo es que toda conclusión a la que se pueda llegar recae sobre una única muestra obtenida de GB012. Como se indicó previamente, GB012 es una hembra que al tiempo del muestreo tenía seis años de edad, se

encontraba sana no consumía ninguna especie de suplemento; además, la muestra utilizada se obtuvo en condiciones de alimentación constante, pensando en evitar retratar la microbiota en estado de ayuno.

El herpetario que aloja a GB012 provee condiciones que le permiten un sano desarrollo, pero es imposible ignorar que esta tortuga no está expuesta a un ambiente comparable con el que encontraría un individuo silvestre de su misma especie:

- a) No se encuentra aislada de otros miembros de su especie ni de otras especies de reptil (aunque posee un terrario propio, éste se encuentra junto a los de otros animales).
- b) Su alimentación no es idéntica a la que tendría un galápago tamaulipeco silvestre.
- c) Las condiciones climáticas del herpetario no se asemejan a aquellas del norte de México; esto se traduce en tiempos distintos de hibernación y estivación.

Aunque se ha visto que en el caso de múltiples especies de mamífero no existen diferencias significativas en la composición de la microbiota cuando los sujetos de estudio son silvestres contra cuando están en cautiverio (5), esto podría no ser extensible para los reptiles, como es el caso del aligátor americano (44).

A pesar de que los datos en términos generales se acoplan a lo esperado tanto para un estudio reptiliano como para uno en tetrápodos, resulta más que claro que se requieren tomar más muestras y de más sitios para obtener un panorama más completo y confiable de las características de la comunidad microbiana que habita en las heces del galápago

tamaulipeco. Adicionalmente, sería pertinente muestrear otros miembros del género *Gopherus*.

2. Limitantes técnicas

Más allá de las limitaciones antes mencionadas asociadas a la extracción de ácidos nucleicos, los sesgos en lo que a anotación y estudio de todo tipo de microorganismos (por ejemplo, con mayor información sobre organismos patógenos) se refiere, necesariamente obligan a que un estudio de diversidad microbiana se vea coartado. Un claro ejemplo de esto reside en el diferencial de resultados que se puede apreciar de acuerdo a los métodos de análisis de datos que se empleen.

Kaiju posee la ventaja de ofrecer una clasificación taxonómica independiente de ensamblaje de las lecturas (49), lo que significa que existe una menor posibilidad de obtener errores o resultados erróneos (57) acumulados resultantes del uso de otros métodos que sí requieran de ensamblado (por ejemplo, el uso de Velvet). Existe una amplia variedad de métodos que dependen de ensamblaje por medio de k-meros (secuencias cortas extraídas de las lecturas que se usan como base para identificar empalmes entre las secuencias que a su vez permitan el ensamblado). Sin embargo, estos métodos requieren de una optimización meticulosa para evitar perder datos o incluir falsos positivos. Dado que se realizan comparaciones contra diversas bases de datos, estos métodos profundizan sobre las ya muy conocidas limitaciones en lo que a anotación diferencial de especies de interés médico contra aquellas de interés ecológico se refiere. Kaiju sacrifica la identificación de organismos a niveles muy profundos en favor de cubrir la mayor diversidad posible. Así, si

una lectura posee una secuencia de aminoácidos idéntica en dos especies del mismo género, dicha lectura se asignará al género (49).

Por otra parte, análisis realizados con métodos mejor explorados (por ejemplo, aquellos basados en ensamblaje de secuencias) puede proveer un importante complemento al uso de software novedoso. En el caso de la reconstrucción de secuencias de genes 16S rRNA, REAGO es superior como ensamblador porque está optimizado para datos metagenómicos (es decir, ataca problemas como abundancias distintas para diversos organismos, la dificultad de ensamblar lecturas con alta similitud –el caso general para 16S- y ausencia de genomas de referencia) (52). En vista de que los genes de 16S son un estándar para la clasificación bacteriana (58), representan un poderoso recurso si se desea minimizar la proporción de ‘elementos desconocidos’ en una muestra ambiental.

Las diferencias de rendimiento en lo que a identificación se refiere para Kaiju y REAGO (49.78% contra 19.62% respectivamente) demuestran la utilidad de usar el ‘estándar dorado’ de genes 16S rRNA para identificar bacterias. En un mar de genes no anotados, necesariamente resultará más difícil para Kaiju realizar identificaciones taxonómicas, aunque éstas sean confiables debido a la evasión de las limitaciones que vienen con la anotación y comprendan tanto a arqueas como a eucariontes.

Por otra parte, Kaiju posee la ventaja de no depender justamente de un recurso que posee limitantes a nivel de resolución, la homología existente para los genes de 16S rRNA. Conforme las tecnologías de secuenciación provean lecturas más largas con bajo índice de error, es probable que programas computacionales como Kaiju ocupen el nicho de los ensambladores. Sin embargo, esta posibilidad permanecerá subdesarrollada en tanto se

mantenga el déficit en anotación confiable de genes, especialmente dado el reto que representa lidiar con microorganismos no cultivables.

Es especialmente relevante indicar que las diferencias entre estos dos métodos no se traducen en que se obtengan resultados poco creíbles. A través de un análisis de correlación de Spearman (Fig. 14) utilizando aprox. 75% de la abundancia total bacteriana se demostró que la probabilidad de que los resultados sean producto de artefactos de cualquiera de los dos programas es pequeña. Debido a que cada método utiliza formas distintas de calcular la abundancia relativa para cada organismo, el que se obtengan porcentajes similares para distintos clados aumenta la confiabilidad de los resultados.

A pesar de esto, es igualmente interesante que miembros del phylum Proteobacteria se encuentren aislados en el gráfico de correlación. Los valores de abundancia arrojados por Kaiju (5.02%) son mayores que los de REAGO (2.94%), y ninguno es radicalmente distinto de los encontrados en las muestras de iguanas ni tortugas Galápagos (Fig. 18) (8), por lo que es imposible distinguir cuáles pueden ser las fuentes de error (diferencias en la capacidad de anotación aunadas a la variabilidad individual, por ejemplo).

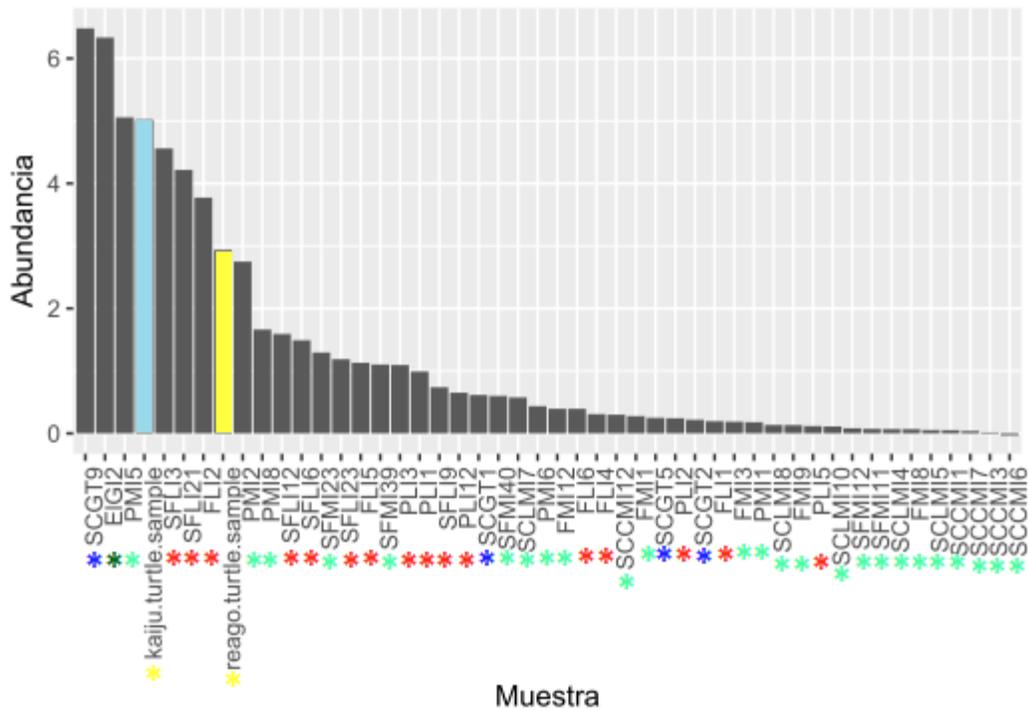


Fig. 18. Abundancia (%) de Proteobacteria en distintos reptiles. La barra azul corresponde a la abundancia obtenida con Kaiju y la amarilla a la obtenida con REAGO. Los recuadros de colores representan a cada especie (turquesa = iguana marina, coral = Iguana terrestre, azul = tortuga Galápagos, amarillo = galápagos tamaulipeco, verde = iguana verde). Los datos correspondientes a todo reptil excepto *G. berlandieri* se obtuvieron tras contactar a la autora de (8).

3. El sesgo de identificación

El énfasis en el estudio de bacterias como base de la microbiología y de la metagenómica queda en evidencia cuando contemplamos los resultados del análisis taxonómico con Kaiju.

El rol de la pléyade de microeucariontes y virus que cohabitan con el océano de bacterias en todo ambiente está severamente inexplorado, hasta el punto en que a menudo se considera a éstos como otros ‘cuerpos’ (-omas; viroma, por ejemplo) en lugar de como parte del microbioma en sí. Estas limitaciones enfatizan la dificultad de realizar inferencias con respecto al rol que dichos organismos puedan ejercer en el microambiente fecal (o en cualquier otro, en realidad). La pérdida de información asociada a este ‘sesgo bacteriano’

resulta especialmente clara al observar la diversidad de virus (Fig. S. 3). Aunque no es imposible que la extracción haya obliterado una fracción de las secuencias pertenecientes a éstos, es difícil imaginar que haya sido hasta tal grado que las secuencias virales difícilmente figuren en un mapa taxonómico completo.

Del mismo modo, resulta notable que Kaiju no haya identificado secuencia alguna perteneciente al reino animal. Una posibilidad es que una fracción de entre las muchas lecturas no caracterizadas pertenezca a este grupo, que incluye las secuencias provenientes del organismo hospedero. Aunque se ha encontrado que el ADN del hospedero puede encontrarse en fracciones pequeñas (75), es posible que esta proporción varíe tanto de acuerdo con el estado de salud del hospedero como entre especies.

Sobre la arquitectura de la microbiota fecal en un contexto más amplio

1. Diferencias metodológicas

Los datos obtenidos del trabajo de Hong et. al. Corresponden en su totalidad a análisis por amplificación de las regiones variables 4 y 5 de genes 16S rRNA (8, 76). Para disminuir las diferencias entre los resultados de otros estudios y aquellos del galápago tamaulipeco (obtenidos por WGS) se realizó la reconstrucción de secuencias 16S usando REAGO; sin embargo es necesario recalcar que esta aproximación desvanece sólo parcialmente la brecha metodológica existente.

2. Clados comunes entre reptiles

Las clases *Flavobacteria*, *Sphingobacteria*, *Bacteroidia*, *Bacilli*, *Clostridia* y *Erysipelotrichi* conforman el grueso de las bacterias presentes en heces de iguanas marinas,

terrestres, verdes y tortugas Galápagos (8). Estos resultados concuerdan sólo parcialmente con aquellos obtenidos para el galápago tamaulipeco, pues aunque todas pertenecen también a la microbiota de ésta, únicamente *Clostridia*, *Bacilli* y *Bacteroidia* se encuentran entre sus 10 clases más abundantes. Estas diferencias podrían deberse en parte a distinciones en los estilos de vida de estos reptiles, incluyendo diferencias en alimentación, hábitos (por ejemplo, la tortuga Galápagos no hiberna ni estiva; en cambio realiza migraciones de acuerdo a la temporada del año) (55) o al estatus de cautiverio de los ejemplares de *G. berlandieri* de los que se obtuvieron las muestras.

A pesar de estas diferencias, la presencia de *Clostridia* como clado dominante en estas microbiotas es un tema común. Las tres especies de iguana estudiadas, así como la tortuga Galápagos, poseen una muy alta proporción de estos organismos (8), y se pueden encontrar clostridios en todos los individuos estudiados. La dominancia clostridial se mantiene para otros reptiles: La pitón de Borneo y el aligátor americano también poseen una gran cantidad de clostridios (13, 44) (cabe mencionar que estos estudios también están basados en la amplificación de secuencias 16S). Dado que tanto el galápagos tamaulipeco como la pitón de Borneo y el aligátor americano pueden pasar periodos relativamente prolongados sin alimentarse, sería interesante ver qué paralelismos pueden encontrarse para la remodelación postprandial de su microbiota.

Aunque existe este terreno común, cabe indicar que, a diferencia de *G. nigra*, *G. berlandieri* posee una gran abundancia de *Ruminococaceae*. Estas diferencias a menor escala se pueden encontrar también en la otra clase bacteriana común a las iguanas y tortuga Galápagos: los Bacteroides; *Prevotellaceae* domina en *G. nigra*, mientras que *Bacteroidaceae* se encuentra en mayores números en *G. berlandieri*.

Otra diferencia reside en que no se encontraron secuencias pertenecientes a Archaea en ningún individuo de iguana marina, mientras que éstas sí se encontraron en las demás iguanas y en ambas especies de tortuga (Figs. S. 3 y 4). Además, los clados más representados dentro de este dominio corresponden a metanógenas. Estas diferencias podrían estar relacionadas con el diferencial en alimentación entre la primera y el resto. Finalmente, llama mucho la atención la abundancia de *Proteobacteria* en *G. berlandieri* en comparación con lo encontrado en general para las otras especies de reptil herbívoro analizadas. Si bien esto es llamativo, no es posible descartar que varias de estas diferencias se deban únicamente a las posibles variaciones individuales o a que el ambiente que habita el galápagu tamaulipeco muestreado (un herpetario, donde existe cierta posibilidad de contacto con otras especies reptilianas además de con los encargados de su cuidado) represente un diferencial significativo contra las condiciones naturales, y que se requiera de profundizar el muestreo.

3. Implicaciones para el estudio de microbiotas de tetrápodos

Los factores que componen y rigen las dinámicas dentro de los múltiples nichos que proveen los cuerpos y deposiciones de organismos hospederos son muchos, y aún se desconoce el impacto que los unos o los otros ejercen sobre las dinámicas y composición de las microbiotas.

Debido a las importantes diferencias en fisiología y conducta de los reptiles en comparación con los mamíferos, es esperable encontrar divergencias en la diversidad microbiana entre ellos. La ectotermia necesariamente representa un reto para los saurios anfitriones y sus cohabitantes, pues representa una variabilidad en temperatura puede

afectar sus capacidades metabólicas. Ese tipo de fenómenos no existe (en condiciones normales) en mamíferos ni aves, por lo que es imposible medir el peso de este factor a menos que se realicen estudios más extensivos en reptiles y anfibios.

Adicionalmente, los hábitos de ‘ayuno’ (13, 44) que siguen muchos reptiles involucran una modificación crónica a la microbiota. Esto lleva a pensar que ésta debe controlarse para limitar el riesgo de potenciales disbiosis. Se ha publicado que las poblaciones bacterianas que se desarrollan tras la remodelación postprandial en pitones de Borneo no provienen de la alimentación (13), lo cual apunta a la posibilidad de que existan mecanismos de ‘conservación’ de clados que se ven diezmados ante el cambio de las condiciones intestinales.

Los hábitos de ayuno, además, responden en general al estilo de vida y rol ecológico de los reptiles a estudiar en cuestión. La microbiota en ayuno de las serpientes pitón no se asemeja a aquella de los aligátors a pesar de que ambos son reptiles carnívoros (44). En vista de esto, puede juzgarse probable que las modificaciones en la microbiota del galápagu tamaulipeco también guardarán diferencias. El conocimiento y consideración de la historia natural de los reptiles jugará un factor determinante si se espera poder dar sentido a estos fenómenos tan ecológicamente relevantes.

El hábitat del hospedero es otro factor que moldea las microbiotas. A pesar de que en el caso de mamíferos (5) se han encontrado escasas diferencias entre animales en cautiverio y animales silvestres, esto no es necesariamente un fenómeno generalizable. El cuidado de reptiles en cautiverio todavía necesita desarrollarse, pues existen diferencias apreciables en las abundancias de diversos clados cuando se compara a aligátors en

cautiverio de aquellos en libertad (44). Es posible que estas diferencias se vean reflejadas principalmente en que la dieta de los reptiles en cautiverio no sea apropiada, pero este seguramente no es el único factor. Un estudio en larvas de salamandra menciona que el ambiente puede poseer un fuerte impacto en la microbiota (59). La evaluación del impacto ambiental para especies terrestres y/o en su adultez puede brindar resultados menos drásticos, pero de igual forma es virtualmente seguro que éste contribuye en el modelado de las comunidades microbianas.

En una escala menor, otro hábitat que se entiende guarda una inmensa relevancia es el que provee el propio hospedero. Distintas regiones corporales proveen ambientes radicalmente diferentes y albergan clados bacterianos igualmente divergentes. Aunque poseen la ventaja de ser poco invasivos, los estudios realizados sobre muestras fecales recapitulan sólo parcialmente a las poblaciones bacterianas que se pueden encontrar en distintas regiones del intestino reptiliano (44). Sin embargo, estos estudios sí permiten comparaciones generales con respecto a la arquitectura *grosso modo* entre especies distintas. El ejemplo más claro de esto reside en que los tetrápodos que se han estudiado (de hecho, con representantes del total de clados que los comprenden –reptiles, aves, anfibios y mamíferos) conservan la arquitectura *Firmicutes-Bacteroidetes* (cuando están alimentándose) (5, 8, 13, 44, 59, 60). Que esta arquitectura se sostenga a pesar de la diversidad de hábitats, hábitos, alimentación y fisiología, nos da una pista sobre la existencia de un componente evolutivo común; esto a su vez arroja luz sobre la necesidad de estudiar las microbiotas de otros vertebrados con el fin de observar si dicha estructura se mantiene.

En medio de esta apabullante complejidad, el factor que está quizás mejor estudiado es la alimentación. Es sabido que los hábitos alimenticios –carnivoría, omnivoría, herbivoría– del hospedero contribuyen a la composición de su microbiota intestinal y fecal (5). Este efecto se antoja generalizable para virtualmente todo grupo de organismos, y parece ser el caso también para reptiles. La divergencia entre la comunidad de la iguana marina, sus contrapartes terrestres y la tortuga Galápagos (8), luego comparada con el galápagos tamaulipeco, sugieren que una alimentación ficóvora (que podría considerarse una herbivoría estricta) es suficiente para establecer cambios observables en la microbiota. La alimentación claramente representa un factor de selección sumamente poderoso sobre la arquitectura microbiana de un organismo, pues especies tan dispares como lo son vacas y hoatzines, guardan similitudes entre sí (68). Realizar comparaciones entre mamíferos y reptiles con dietas similares ayudará a acotar la extensión del impacto de la dieta sobre la microbiota, a la luz de la falta de cámara de fermentación ‘formales’ entre reptiles y mamíferos. Del mismo modo, estas comparaciones podrían arrojar luz sobre la reestructuración y características en la microbiota de poblaciones que adquieren hábitos de vegetarianismo estricto (veganismo), sobre la cual existen ya algunas publicaciones usando distintos enfoques (70).

Sobre la batería génica de la microbiota fecal de G. berlandieri

Con base en la relevancia de la dieta como factor modelador de las microbiotas intestinales y fecales resulta esperable que el contenido de genes funcionales encontrados responda a las imposiciones metabólicas impuestas por la presencia de los contenidos proteicos, vitamínicos y de carbohidratos ingeridos por los hospederos. En (47) se indica que esta inferencia se sostiene para el caso de las iguanas terrestres, donde se comenta que la

similitud en dieta probablemente justifique la similitud entre estos organismos y mamíferos herbívoros.

1. Carbohidratos

Como se mencionó anteriormente, la fermentación es un proceso que seguramente depende en buena medida de que los reptiles hospederos en cuestión se mantengan a temperaturas adecuadas. Sin embargo, es esperable encontrar genes con esta función independientemente de si el proceso se está llevando a cabo en ese momento. De acuerdo con esta expectativa, 7% de los genes anotados en la categoría funcional de carbohidratos pertenece a fermentación. Se ha documentado que los productos resultantes de la fermentación bacteriana en reptiles son los mismos que aquellos que se han identificado en los tractos gastrointestinales de mamíferos (62), lo cual apoya la suposición de que la presión selectiva que impone la dieta lleva a que distintos clados bacterianos compartan una batería génica funcional.

De igual manera, se encontraron genes correspondientes a metabolismo de polisacáridos. Entre estos destacan aquellos que corresponden al celulosoma, un complejo de enzimas que permite a diversas bacterias degradar celulosa y lignina. Este complejo es producido por bacterias anaerobias celulolíticas (61), mismas que son de interés industrial para la producción de biocombustibles. Se ha publicado que es posible que para lograr una degradación eficiente de diferentes substratos por el celulosoma se requieran diferentes estructuras del mismo. La alta diversidad de clostridios encontrada en las muestras de todos los reptiles de (8) y en *G. berlandieri* podría responder en parte a esto. Resulta notable que *C. thermocellum*, presente en la comunidad de *G. berlandieri*, ha sido utilizado

para evaluar formas de mejorar la digestión en animales monogástricos (63). Dado el ambiente de temperatura variable en el que se desarrollan tantas bacterias con actividad celulolítica, se podría aspirar a encontrar enzimas cuya función no sea tan sensible a la temperatura como sus análogos funcionales exclusivos de mamíferos o aves.

2. Metabolismo de nitrógeno

El reciclaje de nitrógeno es necesario para muchos organismos herbívoros y se sabe que en el caso de insectos, reptiles y aves existe un reflujo de orina al intestino, donde queda expuesta a la microbiota (62). Además, la variedad de excreciones nitrogenadas es mayor entre estos organismos que en mamíferos. El metabolismo generalmente lento de los reptiles da pie a la posibilidad de que los sistemas de reciclaje de estos compuestos difieran grandemente de los de mamíferos. Aunque existe poca evidencia de reciclaje de urea y otros compuestos de desecho en reptiles, se encontraron genes correspondientes a descomposición de la misma. Diversas subunidades de ureasas bacterianas, así como otras proteínas necesarias para su activación conforman el paisaje funcional de la microbiota de *G. berlandieri*, ofreciendo un espacio a la posibilidad de que este proceso en efecto se lleve a cabo.

Debido a que existen eventos de simbiosis en la naturaleza (64) en los que es viable la fijación de nitrógeno al interior de los intestinos del hospedero (incluyendo casos en mamíferos) (65), se realizó una búsqueda de genes correspondientes a este proceso. Como resultado se encontraron NifS, U, A, B, H, D, X, E, M, Z y T, así como subunidades de nitrogenasas hierro-hierro y vanadio-hierro. Aunque no se puede descartar que este proceso también se dé en *G. berlandieri*, debe tomarse en cuenta que estas tortugas, en su estado

silvestre, llegan a consumir carroña si tienen la oportunidad (10). Esto, aunado al prospecto de que existan mecanismos de reciclaje de compuestos de desecho, que en (65) se indica que el nitrógeno fijado contribuye mínimamente a los requerimientos del hospedero, y que una fracción de las bacterias portadoras de estos genes probablemente pertenezcan a la microbiota de las plantas que sirven de alimento a la tortuga, sugieren que este proceso podría representar una aportación muy pequeña para el hospedero.

3. Virulencia

Uno de los elementos más relevantes y peor caracterizados en muchos estudios metagenómicos es la interacción entre los miembros participantes del ambiente a analizar. Si bien este trabajo tampoco analiza este punto, la importancia de estas interacciones se ve reflejada tanto para bien con las ventajas que puede representar tener una amplia diversidad de celulosomas como para mal si se revisan los genes de virulencia. La presencia de genes de bacteriocinas –péptidos que producen ciertas bacterias que funcionan como agentes antimicrobianos (66) y péptidos antimicrobianos, bombas de eflujo y genes de invasión sugieren que existen relaciones de competencia entre bacterias, así como interacciones con el hospedero de carácter infeccioso. Estos resultados dejan muchas preguntas con respecto a los mecanismos que poseen justo el efecto contrario, el del entrenamiento del sistema inmune por parte de los microorganismos comensales.

Por otra parte, la presencia de genes de resistencia a metales (cobre, zinc y cadmio), así como a diversos antibióticos, podrían encontrarse presentes en la muestra por cause del ambiente en el que el ejemplar que se utilizó se ha desarrollado. Vegetales regados con aguas tratadas, por ejemplo, acumulan cobre y zinc (74). Debido a que el ejemplar utilizado

se encuentra en cautiverio y come entre otras cosas zanahorias (que se sabe retienen estos metales) (74), podría estar seleccionando bacterias con la capacidad de lidiar este tipo de estrés. En lo que a antibióticos respecta, no se preguntó en el momento si algún otro u otros reptiles en el herpetario se encontraban bajo algún tipo de tratamiento con antibióticos, de manera tal que se volviera más probable la presencia de bacterias resistentes.

VIII. CONCLUSIONES

La caracterización de la microbiota fecal de *G. berlandieri* representa una interesante adición para el conocimiento sobre las características de la comunidad microbiana de las tortugas terrestres, los reptiles y los tetrápodos. Además, provee un marco de discusión que enriquece las nociones sobre el impacto de factores como la alimentación, hábitat, fisiología y hábitos del hospedero sobre su arquitectura.

Este estudio apoya nociones discutidas en otros trabajos con respecto a la naturaleza de la composición taxonómica y funcional de la comunidad microbiana fecal para diversos organismos; sin embargo, su mayor contribución reside en que también permite realizar preguntas que pertenecen a las áreas de evolución, bioquímica, biología molecular, biología reptiliana y bioinformática. Sutilezas como la existencia de una ‘firma microbiótica’ para cada especie estudiada, así como las convergencias funcionales entre especies que poseen pocas características en común se pueden apreciar con tan sólo comparar datos existentes de un puñado de clados, y seguramente apuntan a la existencia de fuerzas y mecanismos aún desconocidos que son justamente los que nos pueden ayudar a dar un carácter más formal a la *ecología* en el campo de la microbiología.

IX. PERSPECTIVAS

Para tener un carácter genuinamente concluyente, es importante extender el muestreo a ejemplares de *G. berlandieri* en mayor número y con diversas procedencias, con énfasis en animales silvestres. Más allá de recomendaciones metodológicas que permitan evaluar los diversos sesgos y fuentes de error a las que se somete todo estudio de esta naturaleza, también es relevante continuar con el esfuerzo de caracterización de otros miembros de Reptilia para poder diferenciar con claridad sus arquitecturas microbióticas de aquellas de otros clados, y con un fondo que no se limite a especies herbívoras.

Finalmente, un enfoque basado en métodos clásicos, como la evaluación de características fisicoquímicas de la materia fecal (acidez, temperatura, etc.) y la realización de tinciones sobre diluciones de la muestra con el fin de corroborar la presencia de morfotipos representativos de clados identificados computacionalmente, podrían proveer valiosos datos adicionales que complementen los resultados obtenidos con el enfoque metagenómico.

X. REFERENCIAS

1. Handelsman, J. Et. Al 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5:R245–49
2. Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Mol. Biol. Rev.* 68: 669-685
3. Reisenfeld, C.S Et. Al 2004. Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. *Annu. Rev. Genet.* 38:525-52
4. Gill, S.R. Et. al. 2006. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* 312: 1355-1359
5. Ley, R.E. Et. al. 2008. Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science.* 320: 1647-1651
6. Hess, M. Et. al. 2011. Metagenomic Discovery of Biomass-Degrading Genes and Genomes from Cow Rumen. *Science*, 331: 463-467
7. Warnecke, F. Et. al. 2007. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature*, 450: 560-565
8. Hong, P. Et. al. 2011. Phylogenetic analysis of the fecal microbial community in herbivorous land and marine iguanas of the Galápagos Islands using 16S rRNA-based pyrosequencing. *The ISME Journal* 5:1461-1470
9. Mackie, R.I. Et. Al, (1997) *Gastrointestinal Microbiology: Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations* Vol. 2. Chapman and Hall, EEUU. pp. 200

10. Texas Digital Library Institutional Repositories [electrónico]; Scalise, J.L. (2011) Food Habits and Selective Foraging by the Texas Tortoise [Tesis] <http://repositories.tdl.org/txstate-ir/bitstream/handle/10529/ETD-TXSTATE-2011-05-98/SCALISE-THESIS.pdf?sequence=1>
11. Yu, Z. Et. al. 2004. Improved Extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* 36:808-812
12. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. [electrónico] Tortoise & Freshwater Turtle Specialist Group 1996. *Gopherus berlandieri*. <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/9401/0>
13. Costello, E.K. Et. al. 2010. Postprandial remodeling of the gut microbiota in Burmese pythons. *The ISME Journal* 4: 1375-1385
14. Spellberg, I. (1982) *Biology of reptiles: an ecological approach*. Blackie and son, London
15. King G. (1996). *Reptiles and Herbivory*. Chapman and Hall, New York.
16. Stevens C. et al (1998). Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiol Rev* 78: 393–427.
17. Alderton, D. (1988) *Turtles and tortoises of the world*. Facts on file, New York.
18. Coborn, John (1995) *Guía completa de las tortugas (The proper care of turtles)* Traducción Luis Montalbetti Editorial hispano europea, Barcelona, España

19. Qiagen (2010) QIAamp ® DNA Stool Handbook, Second Edition [electrónico]
<http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/qiaampsysteq/qiaampdnastoolminikit.aspx#Tabs=t2>
20. Roche (2012) High Pure PCR Product Purification Kit [electrónico]
http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/napi_man/napi.htm
21. McOrist, AL. Et. al. 2002. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *J Microbiol Methods*; 50(2):131-9.
22. Turnbaugh,P. Et. al. 2007. The human microbiome project. *Nature*, 449, 804-810.
23. Hall, N. 2007. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *J Exp Biol* 210, 1518-1525.
24. Luo, C. Et. al. 2012. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS One*; 7(2):e30087.
25. Ashley, L. (1962) *Laboratory Anatomy of the Turtle*. McGraw-Hill, EE.UU.
26. Hellgren, E. Et. al. 2000. Variation in Tortoise Life History. *Ecology*, 81(5), 2000, pp. 1297–1310
27. Aber, J. (2012) *South Texas Coastal Wetlands*. [electrónico]. University of Emporia. http://academic.emporia.edu/aberjame/wetland/s_texas/texas.htm

28. Thermo Fisher Scientific (2012) Genomic DNA purification Kit [electrónico]
<http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/k0512-product-information.pdf>
29. Mo Bio Laboratories (2010) UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit [electrónico] <http://www.mobio.com/images/custom/file/protocol/12224.pdf>
30. Roche (2012) DNA Isolation Kit for Cells and Tissues [electrónico]
http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/napi_man/pdf/chapter%204/page%20148-155.pdf
31. Qiagen (2010) QIAquick® Gel Extraction Kit [electrónico]
<http://www.qiagen.com/products/dnacleanup/gelpcrsicleanupsystems/qiaquickgelextractionkit.aspx#Tabs=t2>
32. Dellaporta, S.L. Et. al. (1983) A Plant DNA Minipreparation; version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-22.
33. Zhang, B. Et. al. (2006) A Widely Applicable Protocol for DNA Isolation from Fecal Samples. *Biochemical Genetics*, Vol. 44, Nos. 11/12
34. Monteiro, L. et. al. (1997) Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J. Clin. Microbiol.* 35:995–998
35. Bianchini, F. et. al. (1989) Effect of dietary fat, starch and cellulose on fecal bile acids in mice. *J. Nutr.* 119:1617–1624.

36. Cheah, P. Y. Et. al. (1990) Colon cancer and dietary fiber: Cellulose inhibits the DNA-damaging ability of bile acids. *Nutr. Cancer* 13:51–57.
37. Cardona, S. et. al. (2012) Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. *BMC Microbiol.* 12:158.
38. Hutchison, J. (1996) Introduction to Testudines: The Turtles [electrónico] University of California Museum of Paleontology.
<http://www.ucmp.berkeley.edu/anapsids/testudines/testudineslh.html>
39. Uetz, P. et. al. (2013) The Reptile Database [electrónico]. German Herpetological Society. <http://www.reptile-database.org/>
40. Wang, Z. et. al. (2013) The draft genomes of soft-shell turtle and green sea turtle yield insights into the development and evolution of the turtle-specific body plan. *Nature Gen.* 45:701-706
41. Li, C. et. al. (2008) An ancestral turtle from the Late Triassic of southwestern China. *Nature* 456:497-501
42. Chiari, Y. et. al. (2012) Phylogenomic analyses support the position of turtles as the sister group of birds and crocodiles (Archosauria). *BMC Biology* 10:65
43. Rieppel, O. et. al. (1999) The origin and early evolution of turtles. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30:1-22
44. Keenan, SW. et. al. (2013) The alligator gut microbiome and implications for archosaur symbioses. *Nature Scientific Reports* 3:2877

45. Meyer, F. et. al.(2008) The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 2008, 9:386
46. BaseClear, Inc. Einsteinweg 52333 CC Leiden, Países Bajos [electrónico]
<http://www.baseclear.com/>
47. Hong, P. et. al.(2014) Metagenomic-Based Study of the Phylogenetic and Functional Gene Diversity in Galápagos Land and Marine Iguanas. *Microbial Ecology* 69(2):444-56
48. Joshi NA, et. al. (2011). Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software]. [Electrónico]
<https://github.com/najoshi/sickle>.
49. Menzel, P. et Al. (2016) Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nat. Commun.* 7:11257
50. R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Electrónico] www.R-project.org/
51. Menzel, P. et. al. (2016) Kaiju. [Electrónico] <https://github.com/bioinformatics-centre/kaiju/blob/master/README.md>
52. Yuan, C. et Al. (2015) "Reconstructing 16S rRNA genes in metagenomic data." *Bioinformatics* 31.12: i35-i43.

53. Yuan, C. et. al. (2015) REAGO. [Electrónico] <https://github.com/chengyuan/reago-1.1/blob/master/README.md>
54. Macrogen, Inc. 10F, 254 Beotkkot-ro, Geumcheon-qu, Seúl 08511, Corea del Sur. [Electrónico] http://foreign.macrogen.co.kr/eng/images/common/img/f_contact_img_1_3.gif
55. Van Denburgh, J. (1914). "The gigantic land tortoises of the Galapagos archipelago". *Proceedings of the California Academy of Sciences, Series 4*. 2 (1): 203–374.
56. Uniprot. Ophistokonta. [Electrónico] <http://www.uniprot.org/taxonomy/33154>
57. Jeffrey A.M., et. al.. (2011) Next-generation transcriptome assembly. *Nat. Rev. Genet.*, 12, 671–682.
58. Woese C.R., et al. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 4576–4579.
59. Bletz, M. (2016). Amphibian gut microbiota shifts differentially in community structure but converges on habitat-specific predicted functions. *Nat. Commun.* 7: 13699
60. Waite, D. W., & Taylor, M. W. (2015). Exploring the avian gut microbiota: current trends and future directions. *Frontiers in Microbiology*, 6, 673.
61. Artzi, L. et. al.(2017) Cellulosomes: bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 83–95

62. Singer, M. (2003) Do mammals, birds, reptiles and fish have similar nitrogen conserving systems? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 134-4: 543–558
63. Hall, J. et. al. (1993) Manipulation of the repertoire of digestive enzymes secreted into the gastrointestinal tract of transgenic mice. *Nat. Biotechnology* 11(3):376-9
64. Ohkuma, M. et. al. (1999) Phylogenetic Diversity of Nitrogen Fixation Genes in the Symbiotic Microbial Community in the Gut of Diverse Termites. *Appl. Environ. Microbiol.* 65,11: 4926-4934
65. Igai, K. et. al. (2016) Nitrogen fixation and nifH diversity in human gut microbiota. *Nat. Sci. Reports.* 6: 31942
66. Cotter, P. et. al. (2013) Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 95-105
67. Ramírez-Puebla, S. et. al. (2012) Gut and Root Microbiota Commonalities. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1: 2-9
68. Godoy-Vittorino, F. et. al. (2011) Comparative analyses of foregut and hindgut bacterial communities in hoatzins and cows. *ISME J.* 1–11
69. Crawford, N. et. al. (2015) A phylogenomic analysis of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evol.* 83: 250-257
70. Glick-Bauer, M. et. al. (2014) The Health Advantage of a Vegan Diet: Exploring the Gut Microbiota Connection. *Nutrients* 6(11):4822-4838

71. Vegan: community ecology package. R. Obtenido de <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>
72. Ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics. R. Obtenido de <https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/index.html>
73. GenomeWeb (2015) Roche shutting down 454 sequencing business. GenomeWeb [Electrónico]. Obtenido de <https://www.genomeweb.com/sequencing/roche-shutting-down-454-sequencing-business>
74. Arora, M. et. al. (2008) Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources. *Food Chemistry* 111 (4): 811-815
75. Perry, G. et. al. (2010) Genomic-scale capture and sequencing of endogenous DNA from feces. *Mol. Ecol.* 19 (24): 5332-5344
76. Baker, G. et. al. (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55(3): 541-555
77. Stock, T. et. al. (2009) Selenoproteins in Archaea and Gram-positive bacteria. *Quimica et Biophysica Acta* 1790 (11): 1520 - 1532

XI. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Extracción de ácidos nucleicos

Se realizaron extracciones de ADN adicionales con las siguientes modificaciones:

a) *Qiagen QIAamp DNA Stool Mini Kit:*

Se realizaron extracciones usando este kit con las siguientes modificaciones al protocolo original (19):

1. Se homogenizó manualmente la muestra, además de usar el *vortex*.
2. La temperatura utilizada durante las incubaciones fue de 80°C.
3. Durante la elución se usaron 50-80 µl de buffer AE.
4. Al eluir, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente la muestra, previo a la centrifugación.

b) *Fermentas Genomic DNA Purification Kit* seguido de *Roche High Pure PCR Product Purification Kit*

Se realizaron extracciones acoplando pasos de estos dos kits (20, 28) como sigue:

1. Se tomaron 200-220 mg de muestra fecal y se le añadieron 200 µl de *Lysis Solution* de Fermentas; se homogenizó la solución con un pistilo, y se incubó por 5 minutos a 65°C.
2. Se añadió 600 µl de cloroformo a cada tubo, se agitó con suavidad y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos la mezcla, para luego ser centrifugada por 2 minutos a 13,000 rpm.

3. Se tomó el sobrenadante y se le agregaron 10 μL de RNAsa A (1mg/mL); se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y esa mezcla se procesó de acuerdo al protocolo de Roche.

c) *Mo Bio UltraClean Microbial DNA Isolation Kit*

Las extracciones usando este kit se hicieron siguiendo el protocolo indicado por los fabricantes (29).

d) *Roche DNA Isolation Kit for Cells and Tissues*

Extracciones realizadas con este kit se hicieron con las siguientes modificaciones al protocolo original (30).

1. Se pesaron 250 mg de heces, y se congelaron usando nitrógeno líquido.
2. Se adicionaron 500 μL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) y se sometió a vortex la muestra por 2 minutos.
3. Al sobrenadante se le adicionaron 450 μL de buffer de lisis, y se sometió a vortex por 1 minuto.
4. Se agregaron 180 μL de buffer de precipitación, y se centrifugó la muestra por 10 minutos a máxima velocidad.
5. El sobrenadante se sometió a una segunda extracción con 500 μL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, como en el paso 2. Posteriormente, se centrifugó la muestra por 10 minutos a máxima velocidad.

6. Se adicionaron 500 μL de cloroformo al sobrenadante, tras mezclar por inversión, se centrifugó la muestra por 8 minutos a máxima velocidad.
7. Se precipitó el ADN del sobrenadante obtenido con 475 μL de isopropanol.
8. Se centrifugó la muestra por 15 minutos a máxima velocidad; se decantó el isopropanol y se lavó el *pellet* obtenido dos veces con 500 μL de etanol al 70%.
9. Se secó la muestra por 15 minutos en *Savant*, y se resuspendió en 30 μL de agua MilliQ.

e) *Qiagen QIAquick Gel Extraction kit*

Las extracciones usando este kit se hicieron siguiendo el protocolo indicado por los fabricantes (31).

Los protocolos tomados de la literatura en general están planteados tomando entre 0.5 y 2 g de heces. Para este trabajo, se ajustaron los volúmenes de reactivos para realizar extracciones con 0.5 gramos de muestra.

f) Extracción de DNA de plantas de Dellaporta, et. al.

Las extracciones usando este protocolo se realizaron de acuerdo a como se indica en la literatura original (32).

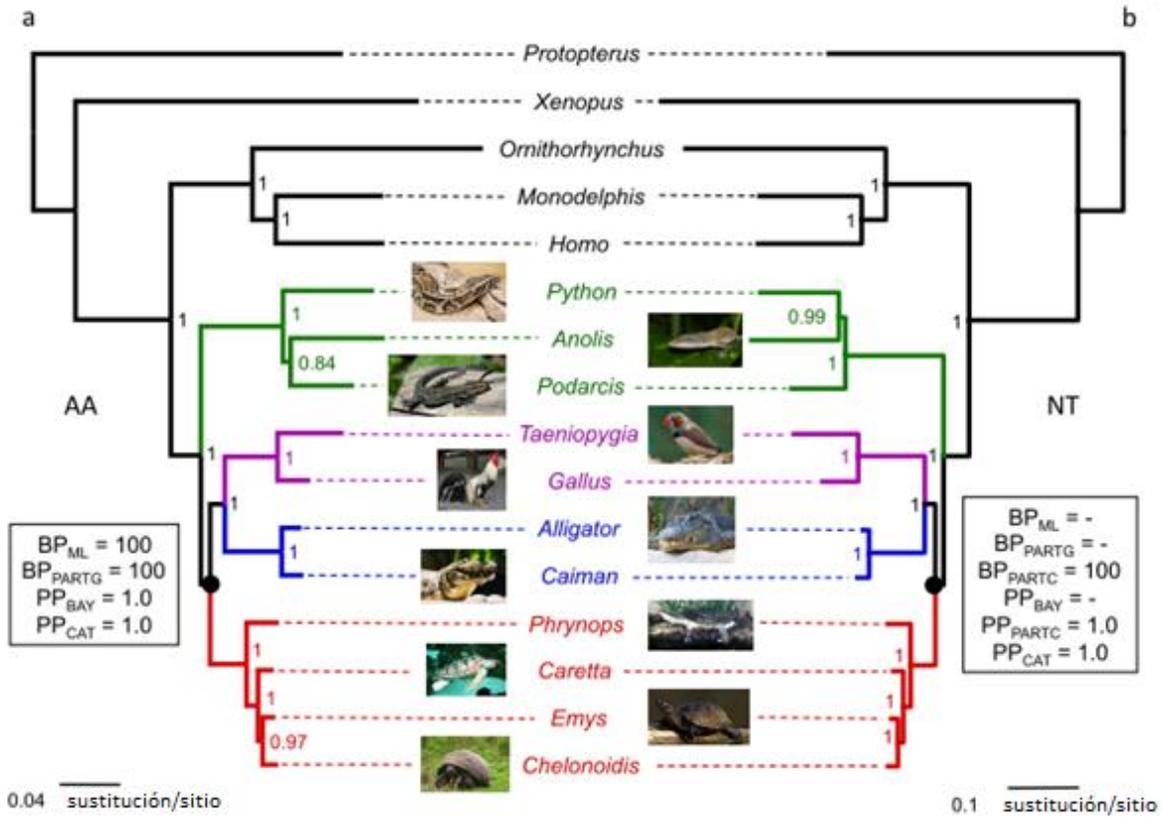


Fig. Suplementaria 1. Relaciones filogenéticas de amniotas. Modificado de (42).

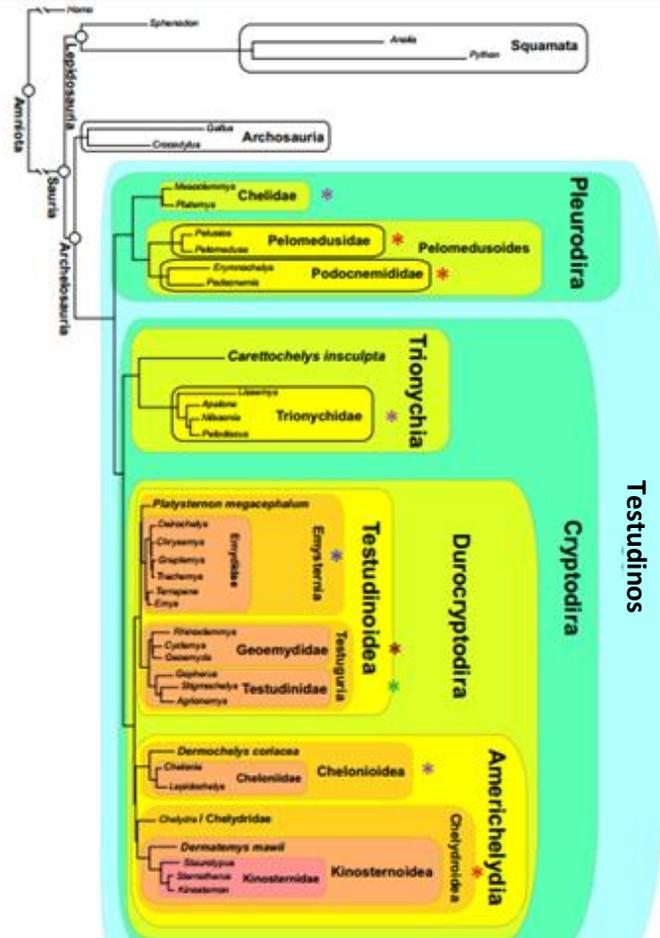


Fig. Suplementaria 2. Árbol filogenético de Testudines. Rojo: Fuerte predominancia de carnívoros. Morado: Predominancia de carnívoros, pero casos de herbívoros y/u omnívoros. Azul: Tanto carnívoros como herbívoros. Café: Predominancia de herbívoros, pero casos de omnívoros. Verde: Fuerte predominancia de herbívoros. Cabe mencionar que a este último rubro pertenece *G. berlandieri*. Modificado de (69).

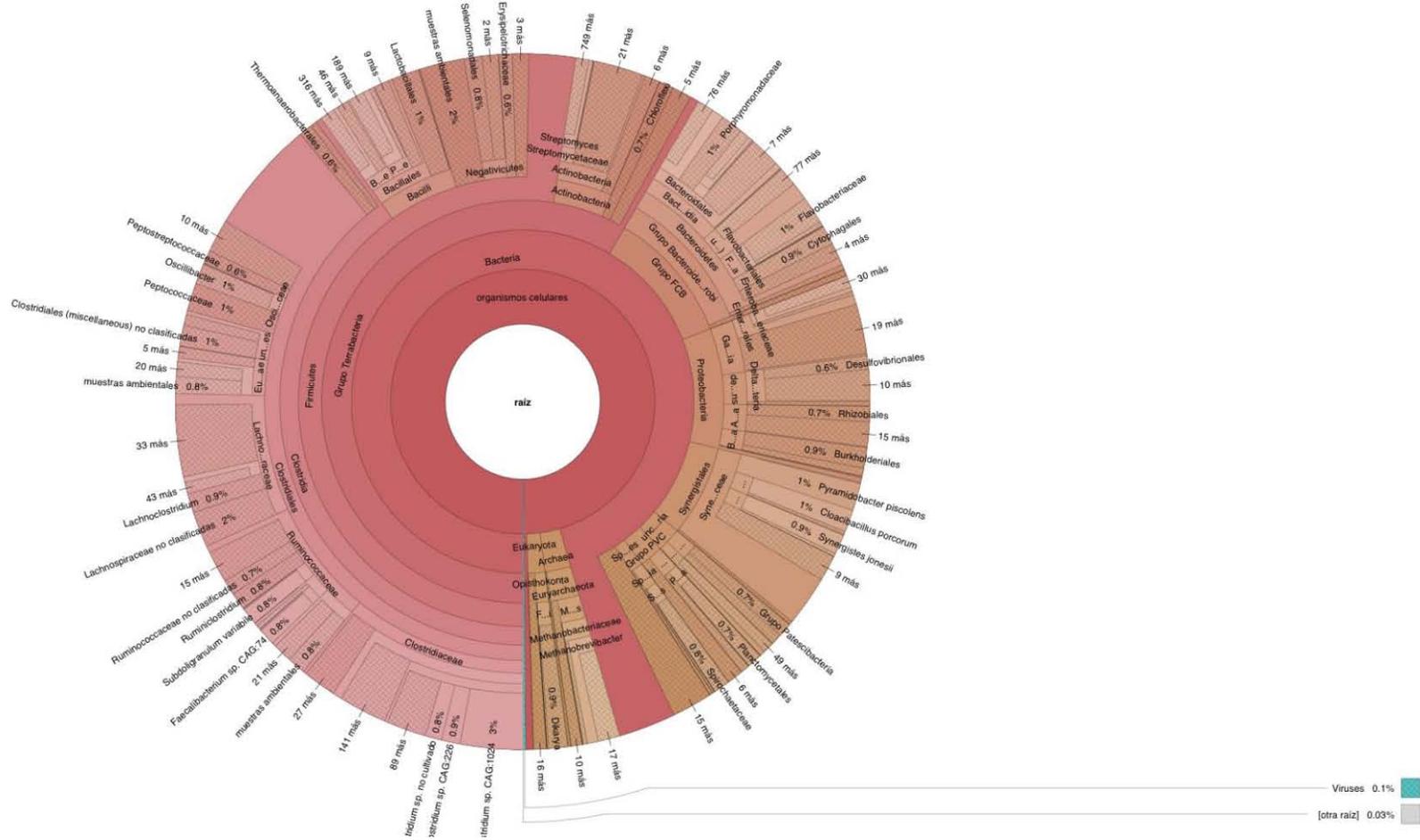


Fig. Suplementaria 3. Diversidad de microorganismos en muestra fecal de *G. berlandieri* obtenida con Kaiju.

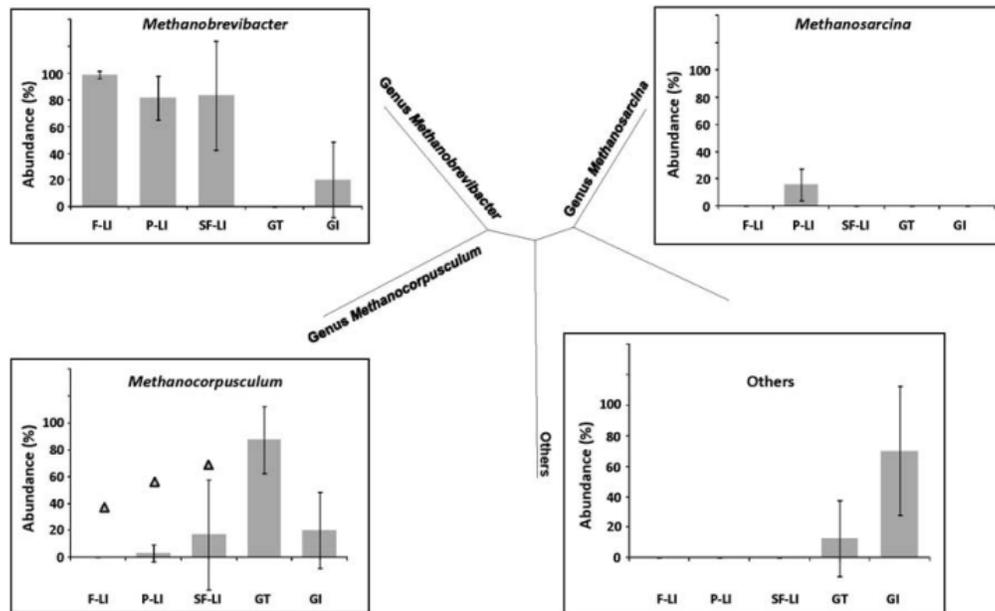


Figure 5 Archaeal population detected in fecal microbiota. No Archaea were detected in MI. The genus *Methanobrevibacter*, *Methanosarcina* and *Methanocorpusculum* were detected in the herbivorous reptiles that consumed terrestrial plant material. Triangles denote that only one LI at each location, respectively, was shown to harbor *Methanocorpusculum*. F-LI, land iguanas in Fernandina; P-LI, land iguanas in Plaza Sur; SF-LI land iguanas in Santa Fe.

Fig. Suplementaria 4. Arqueas encontradas en las muestras de Hong et. al. Obtenido de (8).

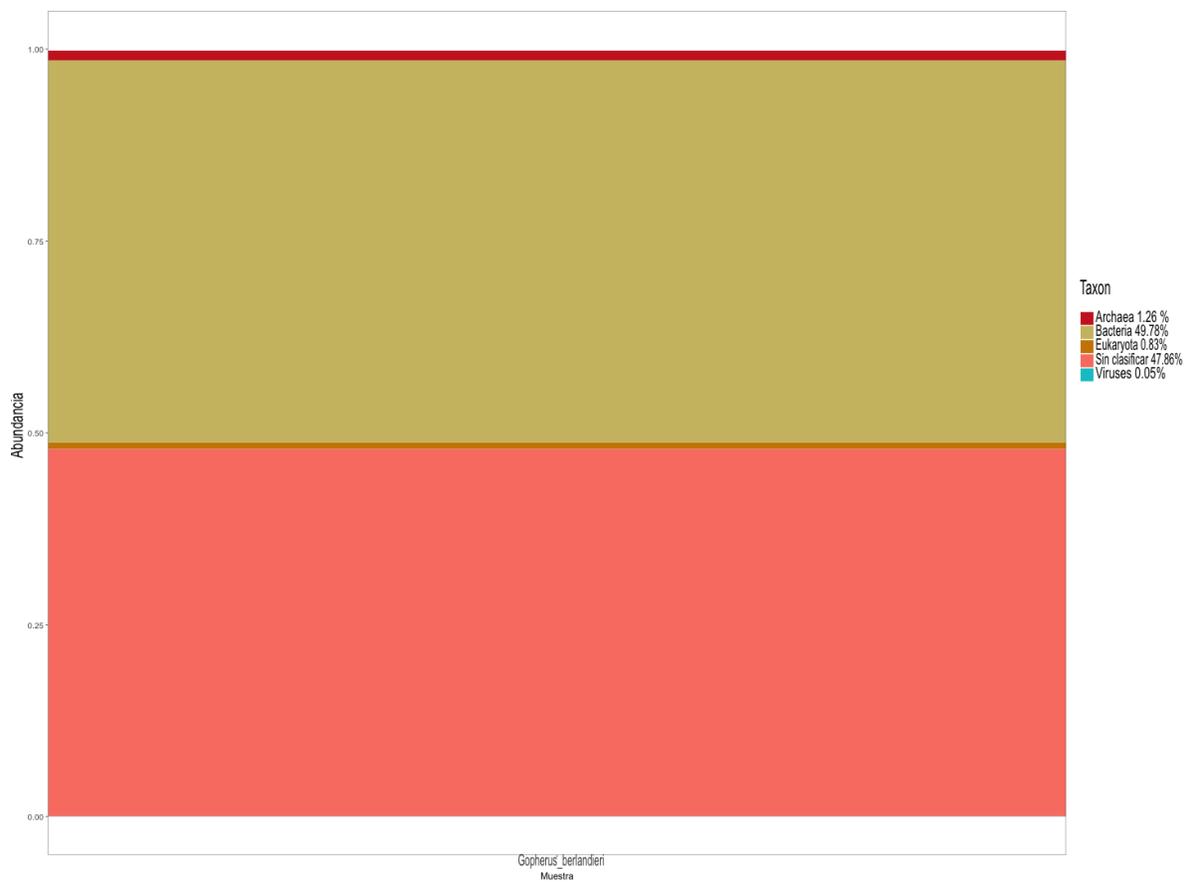


Fig. Suplementaria 5. Abundancia de distintos dominios en heces de *G. berlandieri* de acuerdo a Kaiju.