



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterización de la microbiota fecal del murciélago**  
*Myotis velifer*

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A:**

**Hanya Denis Arellano Hernández**

**DIRECTOR**

**Dr. José Antonio Guerrero Enríquez**

**CODIRECTORA**

**Dra. Leslie Mariella Montes Carreto**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**ABRIL, 2024**

## Agradecimientos

Agradezco profundamente a mis padres, Jelsy y Styve, por su amor incondicional, apoyo constante y sacrificios para brindarme la oportunidad de perseguir mis sueños. Su ejemplo de dedicación y esfuerzo ha sido mi mayor inspiración.

A mis hermanas, Galilea y Camila, les agradezco por su cariño, comprensión y aliento en cada paso de este camino. Su apoyo inquebrantable ha sido fundamental para mantenerme motivada.

A mis queridos abuelos maternos y paternos, su sabiduría, amor y aliento han sido un faro de luz en mi vida. Su legado perdurará en cada logro que alcance.

A Dylan Zepeda, no hay palabras suficientes para expresar mi gratitud por tu amor incondicional, tu apoyo constante y tu infinita paciencia. Tu presencia fue mi fortaleza y motivación en este viaje académico y en la vida.

A la Dra. Leslie Montes y al Dr. José Antonio Guerrero, les estoy profundamente agradecida por su orientación experta, valiosos comentarios y motivación durante el proceso de elaboración de esta tesis. Sus enseñanzas han enriquecido enormemente mi experiencia académica.

A Michel Ochoa y al M. Luis Gerardo, les agradezco sinceramente por su colaboración, apoyo técnico y amistad a lo largo de este proyecto.

A la Dra. Osiris Gaona, fuente de inspiración para este proyecto, le agradezco sinceramente por su sabiduría y pasión por la investigación. Su guía y ejemplo han sido fundamentales en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Esperanza Martínez por acogerme en su laboratorio, por su apoyo y por sus sabios consejos a lo largo de este proyecto.

A Marco Antonio Rogel, por su asistencia técnica y amabilidad durante el desarrollo de esta investigación en el laboratorio de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

A mis amigos, quienes han estado a mi lado en cada etapa de este viaje, les agradezco por su compañía, ánimo y comprensión. Su presencia ha hecho que este camino sea más significativo y memorable.

A UNAM, por el apoyo financiero de una subvención del PAPIIT UNAM IN206124 a Esperanza Martínez Romero.

Un tal Dumbledore dijo una vez que "la felicidad se puede encontrar incluso en los momentos más oscuros, si uno recuerda encender la luz de la amistad". La presencia de todos ustedes ha sido la luz que ha iluminado mis días más sombríos y ha hecho que los momentos felices lo sean aún más. Espero sinceramente que sigan siendo parte de este largo viaje llamado vida, porque su compañía es un tesoro que valoro más que cualquier otra cosa en el mundo. Como dice la canción de Bill Withers, "Lean on Me", ustedes siempre han estado ahí para mí, y espero que yo también pueda estar ahí para ustedes en todo momento. Anhele que el destino continúe cruzando en mi camino a personas tan extraordinarias, maravillosas y admirables como cada uno de ustedes.

Cada uno de ustedes ocupa un lugar muy especial en mi corazón...

# Índice

<b>1</b>	<b>Resumen.....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>8</b>
<b>3.1</b>	<b>Microbiota.....</b>	<b>8</b>
3.1.1	Microbiota intestinal.....	8
<b>3.2</b>	<b>Microbioma.....</b>	<b>9</b>
3.2.1	Microbioma intestinal.....	10
<b>3.3</b>	<b>Importancia de los murciélagos insectívoros.....</b>	<b>10</b>
<b>3.4</b>	<b><i>Myotis velifer</i>.....</b>	<b>11</b>
3.4.1	Generalidades.....	11
3.4.2	Dieta y reproducción.....	13
3.4.3	<i>Myotis velifer</i> en la cueva el Salitre.....	13
<b>4</b>	<b>Antecedentes.....</b>	<b>14</b>
<b>4.1</b>	<b>Técnicas de caracterización de microbioma.....</b>	<b>14</b>
4.1.1	Secuenciación completa – Shotgun.....	14
4.1.2	Secuenciación dirigida por amplicones.....	15
<b>4.2</b>	<b>Microbiota de murciélagos.....</b>	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>Justificación.....</b>	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>21</b>
<b>7</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>21</b>
<b>7.1</b>	<b>Sitio de estudio.....</b>	<b>21</b>
<b>7.2</b>	<b>Colecta de individuos y heces.....</b>	<b>22</b>
7.2.1	Aislamiento de bacterias a partir del saco de manta.....	22
7.2.2	Extracción de ADN de las bacterias cultivadas.....	23
7.2.3	Amplificación y secuenciación sanger.....	23
7.2.4	Análisis filogenéticos.....	23
<b>7.3</b>	<b>Extracción de ADN a partir de las heces.....</b>	<b>24</b>

7.4	Secuenciación .....	24
7.5	Análisis bioinformáticos .....	25
7.6	Análisis de la diversidad alfa y beta.....	25
<b>8</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>26</b>
8.1	Análisis bioinformáticos .....	26
8.2	Controles negativos.....	26
8.2.1	Análisis del control genómico .....	26
8.2.2	Análisis del control cultivable .....	29
8.3	Análisis de la cobertura del muestreo .....	29
8.4	Microbiota fecal de <i>Myotis velifer</i> .....	30
8.5	Microbiota fecal por sexo .....	33
8.6	Análisis de la diversidad alfa .....	37
8.7	Análisis de la diversidad beta.....	38
<b>9</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>39</b>
<b>10</b>	<b>Conclusión .....</b>	<b>42</b>
<b>11</b>	<b>Perspectivas .....</b>	<b>43</b>
<b>12</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>44</b>
<b>13</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>45</b>

# 1 Resumen

Las investigaciones de la microbiota en la vida silvestre han ganado popularidad, debido a su potencial para moldear la evolución y la ecología del huésped. En este trabajo caracterizamos el microbioma fecal de siete machos y siete hembras de *Myotis velifer*. Las muestras fecales se colectaron en la cueva de “El Salitre”, México. Se amplificaron las regiones V3-V4 del marcador molecular 16S ARNr y se secuenciaron con la tecnología Illumina. Se realizaron análisis bioinformáticos en Qiime2 para obtener las variantes de secuencias de amplicón, que se asignaron taxonómicamente a nivel de género. Se estimaron la diversidad alfa taxonómica y filogenética para ambos sexos, se usaron análisis de coordenadas principales y de similitud para medir la diversidad beta taxonómica y filogenética entre machos y hembras. Se obtuvieron 164 variantes de secuencias de amplicón, identificándose siete filos, 17 familias y 21 géneros para las hembras y nueve filos, 30 familias y 40 géneros para los machos. El filo Synergistota es el primer reporte para murciélagos. Los filo más abundantes fueron Pseudomonadota, y Fusobacteriota. Los machos tienen una riqueza taxonómica mayor que las hembras ( $q_0=40$ ,  $q_0=21$ , respectivamente), pero la diversidad taxonómica (machos:  $q_1=13.44$ ,  $q_2=7.76$ ; hembras:  $q_1=11.24$ ,  $q_2=8.76$ ) y filogenética son similares en ambos sexos; el análisis de coordenadas principales de la diversidad beta filogenética usando la distancia unifrac ponderada y el ANOSIM entre grupos mostraron que no hay diferencias en la composición filogenética y taxonómica de la microbiota de machos y hembras. El estudio revela que la microbiota fecal de *M. velifer* posee una composición diversa y distintiva en comparación con otros murciélagos de diferentes gremios estudiados previamente, destacando la dominancia de los filos Pseudomonadota, Fusobacteriota, Bacillota y Synergistota, la identificación de 33 familias y la abundancia de los géneros *Cetobacterium* y *Haematospirillum*.

## 2 Abstract

Microbiota investigations in wildlife have gained popularity, due to their potential to shape host evolution and ecology. In this work we characterized the fecal microbiome of seven males and seven females of *Myotis velifer*. Fecal samples were collected in the “El Salitre” cave, Mexico. The V3-V4 regions of the 16S rRNA molecular marker were amplified and sequenced with Illumina technology. Bioinformatic analyzes were performed in Qiime2 to obtain amplicon sequence variants, which were taxonomically assigned at the genus level. Taxonomic and phylogenetic alpha diversity were estimated for both sexes, principal coordinate and similarity analyzes were used to measure taxonomic and phylogenetic beta diversity between males and females. 164 amplicon sequence variants were obtained, identifying seven phyla, 17 families and 21 genera for females and nine phyla, 30 families and 40 genera for males. The phylum Synergistota is the first reported for bats. The most abundant phyla were Pseudomonadota, and Fusobacteriota. Males have greater taxonomic richness than females ( $q_0=40$ ,  $q_0=21$ , respectively), but taxonomic (males:  $q_1=13.44$ ,  $q_2=7.76$ ; females:  $q_1=11.24$ ,  $q_2=8.76$ ) and phylogenetic diversity are similar in both sexes; Principal coordinate analysis of phylogenetic beta diversity using weighted unifrac distance and ANOSIM between groups showed that there are no differences in the phylogenetic and taxonomic composition of the microbiota of males and females. The study reveals that the fecal microbiota of *M. velifer* has a diverse and distinctive composition compared to other bats from different guilds previously studied, highlighting the dominance of the phyla Pseudomonadota, Fusobacteriota, Bacillota and Synergistota, the identification of 33 families and the abundance of the genera *Cetobacterium* and *Haematospirillum*.

## **3 Introducción**

### **3.1 Microbiota**

Habitualmente, los mamíferos establecen relaciones simbióticas con organismos microscópicos que habitan en diversas áreas de su cuerpo, por ejemplo, la piel, las mucosas, el tracto gastrointestinal, entre otros (Muegge et al., 2011). Esta relación integral entre el huésped y los microbios ha llevado a la conceptualización de los animales como "holobiontes", es decir, entidades similares a un superorganismo compuesto por el huésped y su microbiota (Hammer et al., 2017). La microbiota se define como una comunidad de microorganismos que habitan en una región anatómica, que de manera autónoma regula su abundancia y dinámica metabólica, y a su vez, esta puede influir en el estado de salud de su huésped (Montes-Carretero et al., 2021). Varios parámetros como la dieta, el estilo de vida, la genética y el estado inmunitario del huésped, dan forma a la composición de la microbiota, con diversas consecuencias en la fisiología del huésped (Sommer & Bäckhed, 2013).

#### **3.1.1 Microbiota intestinal**

La microbiota intestinal se considera como un componente principal en la salud de los huéspedes (Ley et al., 2008). Se sabe que diversos factores como la dieta, la fisiología y la historia evolutiva, influyen en la composición de la comunidad microbiana intestinal (Amato et al., 2013). Sin embargo, el principal factor que modula la diversidad de la microbiota intestinal son los hábitos alimenticios (Bäckhed et al., 2005; De Filippo et al., 2010; Carrillo-Araujo et al., 2015) ya que puede afectar significativamente el ambiente intestinal, incluido el tiempo de tránsito intestinal y el pH.

La microbiota intestinal es necesaria para el desarrollo y la maduración del epitelio intestinal y del sistema inmune del huésped (Sommer & Bäckhed, 2013). Influye en las propiedades de la capa mucosa, promueve el crecimiento de estructuras linfoides, regula la activación y diferenciación de diversas poblaciones de linfocitos y equilibra la producción de inmunoglobulina A y péptidos antimicrobianos (Sommer & Bäckhed, 2013). Además, apoya al metabolismo y la adiposidad del huésped al expandir la disponibilidad de nutrientes, la producción de vitaminas esenciales y la eficiencia del metabolismo

xenobiótico (Smith et al., 2007; Sommer & Bäckhed, 2013). Por otra parte, también auxilia en la organogénesis, la vascularidad intestinal, la homeostasis de los tejidos, la carcinogénesis, la masa ósea y en la conducta del organismo (Sharon et al., 2010; Verhulst et al., 2011; Sommer & Bäckhed, 2013).

Por lo anterior, la investigación en esta área se ha centrado recientemente en la caracterización y el análisis de los miembros de la comunidad microbiana intestinal (Sommer & Bäckhed, 2013). Se ha documentado la manera en la que la microbiota intestinal ha coevolucionado con los mamíferos, moldea y complementa su biología en maneras mutuamente beneficiosas (Bäckhed et al., 2005), por ejemplo, codificando las enzimas necesarias para la degradación de los alimentos que ingieren (Scott et al., 2013). Por lo tanto, se ha comenzado a comprender cómo trabajan ciertos grupos clave (como bacterias, virus, hongos, etc.) de la microbiota para mantener la estabilidad y la adaptabilidad funcional de esta comunidad microbiana (Bäckhed et al., 2005).

### **3.2 Microbioma**

Microbioma es el término que se utiliza para designar al genoma de la microbiota (Montes-Carretero et al., 2021). Los genomas de la comunidad microbiana codifican funciones metabólicas que no se han desarrollado el hospedero, incluida la capacidad de obtener energía y nutrientes de la dieta que de lo contrario serían inaccesibles y llevarían a la muerte al hospedero (Bäckhed et al., 2005; Ley et al., 2008-a). El microbioma es de vital importancia para los vertebrados ya que, además de asistir a la digestión y promover la extracción y el acaparamiento de energía, ayuda en el crecimiento y desarrollo de órganos, maduración del sistema inmune, comportamiento y defensa contra algunos patógenos (Dinan et al., 2015; Hird, 2017). El microbioma influye en la elección de pareja y el éxito del apareamiento, vinculando directamente la evolución del microbioma con el huésped (Brucker & Bordenstein, 2012; Hird, 2017).

Las investigaciones del microbioma en la vida silvestre han ganado popularidad recientemente debido al potencial del microbioma para moldear la evolución y la ecología del huésped (Ley, Lozupone, et al., 2008; Amato et al., 2013; Ingala et al., 2018; Gaona

et al., 2020). Con el desarrollo de las técnicas metagenómicas independientes de cultivo, se ha revolucionado la ecología microbiana. Esto ha permitido a los investigadores evaluar la composición, diversidad, estructura y funcionalidad de los microorganismos asociados con sus huéspedes (Phillips et al., 2012; Ingala et al., 2018).

### **3.2.1 Microbioma intestinal**

El microbioma intestinal de los vertebrados está estrechamente relacionado con la fisiología, la nutrición y la salud del huésped (The Human Microbiome Project Consortium, 2012; Sommer & Bäckhed, 2013; Mosca et al., 2016; Ingala et al., 2018). Los recientes avances metodológicos han permitido a los investigadores secuenciar el ADN de los miembros de estas comunidades microbianas sin cultivar primero cada organismo, y hacerlo a un costo razonable. Lo anterior ha impulsado el conocimiento y la investigación de la importancia de los microbiomas en la evolución de los huéspedes (Hird, 2017).

La obtención adecuada de las muestras para iniciar la investigación del papel que juega el microbioma intestinal en el huésped resulta fundamental para alcanzar el objetivo (Ingala et al., 2018). En ese sentido, la recolección de heces ha demostrado ser el método no invasivo más conveniente, ya que permite el muestreo de individuos a lo largo del tiempo, por repetidas veces, garantizando una rápida colecta y conservándolas integra (Carrillo-Araujo et al., 2015; Ingala et al., 2018).

### **3.3 Importancia de los murciélagos insectívoros**

Los murciélagos son el segundo grupo de mamíferos más diversos y ecológicamente relevantes, después de los roedores. Además, albergan varias comunidades de microorganismos que van desde bacterias, virus hasta hongos que pueden ser benéficos o patógenos (Li et al., 2018, p. 20; Sun et al., 2020). En México se han reportado 142 especies de murciélagos, de las cuales 100 son insectívoras (Ceballos & Oliva, 2005; Coates et al., 2017). Estos murciélagos insectívoros son grandes consumidores de insectos nocturnos, algunas especies llegan a consumir del 50 al 150% de su peso corporal en el transcurso de la noche (Hutson et al., 2001). Por otro lado, brindan diversos beneficios ecosistémicos para la humanidad. Dentro de estos beneficios

se encuentra el control de plagas, al consumir numerosas cantidades de insectos, aportan beneficios económicos, sociales y de salud, ya que incluyen en su dieta plagas de cultivos y vectores de diversas enfermedades con importancia médica (Gandara et al., 2006; Russo et al., 2021). Su acción reduce la necesidad de aplicar pesticidas químicos a los cultivos, contribuyendo significativamente a la protección del medio ambiente y al ahorro económico. Al no contaminar el ambiente con químicos nocivos para la salud de los seres vivos es un atractivo turístico que trae consigo diversos beneficios económicos remunerables como la producción de alimentos orgánicos (Gandara et al., 2006).

Otro de los beneficios poco conocido es como fertilizadores, ya que las colonias de murciélagos de las cavernas, producen grandes cantidades de guano que son ricas en nitrógeno y fósforo, contienen oligoelementos (micronutrientes) y microorganismos biorremediadores que ayudan a limpiar las toxinas, nematicidas que inhiben las poblaciones de algunos nematodos dañinos y fungicidas, por consiguiente, grandes cantidades pueden usarse como fertilizantes en campos de cultivo o jardinería (Zárate et al., 2012).

### **3.4 *Myotis velifer***

#### **3.4.1 Generalidades**

El murciélago insectívoro *Myotis velifer* fue descrito por J.A. Allen en 1890, pertenece al reino Animalia, al filo Chordata, a la clase Mammalia, al orden Chiroptera y a la familia Vespertilionidae. Se encuentra dentro de la categoría de preocupación menor, de acuerdo con la IUCN debido a su amplia distribución y a que el tamaño de sus poblaciones es grande. Se distribuye en diferentes áreas naturales protegidas por su tolerancia a cambios de hábitat y por que es poco probable que disminuya su población al ritmo requerido para calificar para ser catalogado como en peligro de extinción (Solari, 2018).

Su color varía, desde más pálido y marrón en el este de su área de distribución hasta mucho más oscuro en el oeste, tiene las membranas de las alas oscuras y la cara y las orejas oscuras (Taylor, 2019). Su cresta craneal está desarrollada y el cráneo es

corto mientras que el rostro está ampliado, lo cual lo hace que se distinga de otras especies del género (Elizalde-Arellano & López-Vidal, 2022). Las hembras son de mayor tamaño que los machos (Fitch et al., 1981).

Esta especie se distribuye desde Honduras y Guatemala hasta el norte de Kansas; se le considera como una especie nativa en Belice, El Salvador, Guatemala, Honduras, México y Estados Unidos (Arizona, California, Kansas, Nevada, Nuevo México, Oklahoma, Texas) (Fitch et al., 1981; Solari, 2018). En México se ha registrado en los estados de Aguascalientes, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Colima, Chiapas, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Estado de México, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sinaloa, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas (Campillo-Castro et al., 2005).

Se encuentra por lo regular en bosques de pino-encino con elevaciones medias a altas (2,850-3,550 m.s.n.m.), o bien, en elevaciones bajas (1,100 m.s.n.m.) en lugares ribereños o cerca de matorrales desérticos y es activa en temperaturas de 18 a 26 °C. Sus numerosas poblaciones se resguardan en cuevas, túneles de minas, edificios y bajo puentes (Hayward, 1928; Ayala-Berdon et al., 2017); en México sus colonias pueden tener entre 100 y 10,000 individuos (Arita, 1993). Suelen dejar su refugio aproximadamente 30 minutos antes de la puesta del sol e ir directamente a beber agua antes de comenzar su búsqueda de alimento. Generalmente, las hembras suelen regresar a la cueva de 2 a 3 horas después y vuelven a salir a alimentarse de nuevo antes del amanecer (Solari, 2018). Su longevidad va desde los 6 a los 12 años (Fitch et al., 1981; Solari, 2018).

Dentro de las principales amenazas que enfrenta la especie se encuentran perturbaciones y daños en cuevas o minas, cierre de minas, reactivación minera y pérdida de hábitat para forrajear debido a la urbanización (Solari, 2018).

### **3.4.2 Dieta y reproducción**

Las hembras y machos de *M. velifer* poseen una dieta especializada a base de insectos que va desde lepidópteros, coleópteros, homópteros, hemípteros y hasta dípteros (Kunz, 1974). El tamaño de sus presas va desde los 4 mm hasta 12 mm (Kunz, 1974). Puede llegar a consumir el 80% de su requerimiento diario total en sus primeras dos horas de búsqueda de alimento (Taylor, 2019). En comparación de otros murciélagos del género *Myotis*, este quiróptero insectívoro posee un tamaño corporal relativamente grande, lo que les permite recorrer nuevos lugares a una distancia considerable de su refugio y explotar sus respectivos recursos (Kunz, 1974).

Es una especie monoéstrica (es decir, que tiene un único evento reproductivo por año) y monotoca (da a luz a una sola cría) (Vela Hinojosa, 2013). Con el propósito de brindar a la descendencia una mayor probabilidad de supervivencia, los murciélagos insectívoros con un patrón reproductivo estacional como *Myotis velifer* han desarrollado diferentes estrategias reproductivas, como la fecundación postergada; que consiste en la suspensión de la ovulación y en el almacenamiento de esperma en el trato genital (útero) durante el invierno, con el propósito de que la fecundación y la gestación resulten en los nacimientos de sus crías en la temporada de primavera (Vela Hinojosa, 2013). En el caso de los machos, durante el otoño se observa la máxima actividad reproductiva, como el almacenamiento de esperma en el epidídimo, la libido y el comienzo de las cópulas (Martínez Méndez, 2014).

### **3.4.3 *Myotis velifer* en la cueva el Salitre**

La cueva el Salitre se ubica en el municipio de Tlaltizapán, al centro-sur del estado de Morelos (Hoffmann et al., 1986). Alberga siete especies de murciélagos, una de ellas es *Myotis velifer*.

Cada año llegan a la cueva el Salitre desde diferentes partes templadas del centro de México para formar una colonia de maternidad con la finalidad de obtener un refugio óptimo para la gestación y la lactancia de sus crías (Kunz, 1974; Ávila Torresagatón, 2008). La estimación que se tiene del tamaño de la colonia es de entre 9 mil a 50 mil

individuos (Fuentes Vargas, 2011), por consiguiente, es el refugio con mayor abundancia y por lo tanto de importancia en el estado de Morelos (Ávila Torresagatón & Fuentes Vargas, 2020).

A finales de marzo comienza la llegada de algunos individuos de *Myotis velifer*. En abril, el refugio ya alberga una gran cantidad de hembras preñadas, y a principios de mayo, dan a luz. En junio, se tiene el registro con mayor cantidad de hembras lactantes, en julio el destete y en agosto las crías, ya adultas, y las madres abandonan el refugio (Fuentes Vargas, 2011).

## **4 Antecedentes**

### **4.1 Técnicas de caracterización de microbioma**

#### **4.1.1 Secuenciación completa – Shotgun**

La secuenciación completa – *Shotgun*, es una secuenciación metagenómica que hace uso de técnicas conocidas como secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) (Franzosa et al., 2015). Este método va más allá que la secuenciación del ARNr 16S, ya que esta técnica nos revela la diversidad y la función de la comunidad microbiana sin necesidad de cultivarlas en el laboratorio (Barone et al., 2014; Solli et al., 2014). Además, permite el estudio de microorganismos que no se pueden cultivar que de otro modo serían difíciles o imposibles de analizar. Con este método, se pueden caracterizar comunidades microbianas enteras y generar borradores de genomas de cada miembro de la comunidad (Barone et al., 2014; Illumina, 2021; Solli et al., 2014).

La secuenciación metagenómica completa implica tres pasos básicos: preparación de la biblioteca, secuenciación y análisis. El proceso empieza cortando el ADN extraído en fragmentos aleatorios. Luego, los adaptadores se deben ligar a los extremos 5' y 3' de los fragmentos de ADN para unir un sustrato específico de secuencia y permitir el reconocimiento de este fragmento. Esto resultará en biblioteca que se secuenciará mediante NGS de alto rendimiento. Los investigadores pueden combinar múltiples muestras en una sola ejecución y secuenciar miles de organismos de forma paralela. Este método permite realizar otros muestreos, a partir de este, que sean más profundos

para detectar cantidades muy pequeñas de miembros de comunidades microbianas que de otro modo podrían perderse (Gweon et al., 2019; Illumina, 2021).

La precisión de los datos es fundamental para revelar la complejidad de las poblaciones microbianas dentro de una muestra. En algunos casos, se utiliza una sola lectura de secuencia para identificar un gen específico o un taxón, lo que hace que la especificidad y la sensibilidad de los datos sean fundamentales para descubrir la variación genética que hay en la muestra. Para proporcionar la alta precisión de datos y los resultados requeridos por la secuenciación completa, se realizan lecturas de longitudes cortas para que la secuenciación sea profunda y rentable, que si se realizara con lecturas largas (Gweon et al., 2019; Illumina, 2021).

Las ventajas de la aplicación de la secuenciación metagenómica *shotgun* incluyen: la identificación y clasificación de comunidades microbianas complejas sin necesidad de cultivo, la detección rápida de nuevos marcadores de virulencia o resistencia a antibióticos, la evaluación precisa de la biodiversidad bacteriana y abundancia relativa dentro y entre muestras, y caracterización de nuevas especies, nuevos conjuntos de genomas, nuevas enzimas con nuevas funciones metabólicas que podrían tener aplicaciones industriales o médicas (Barone et al., 2014; Solli et al., 2014; Gweon et al., 2019; Illumina, 2021).

#### **4.1.2 Secuenciación dirigida por amplicones**

El gen del ARN ribosomal 16S es un locus genético que se puede utilizar para evaluar la diversidad bacteriana en muestras para estudios relacionados a filogenia y taxonomía (McDonald et al., 2012, 2018). El gen 16S ARNr tiene una longitud de aproximadamente 1500 pares de bases y contiene nueve regiones hipervariables (V1-V9) intercaladas entre regiones conservadas (Valenzuela-González et al., 2015). El locus 16S puede distinguir taxones microbianos, y a su vez permiten clasificar taxonómicamente las bacterias dentro de comunidades heterogéneas para evaluar la diversidad que existe y comparar la abundancia relativa de muestras similares (Illumina, 2020).

Por lo anterior, se hace uso de la NGS, la cual está basada en la secuenciación dirigida por amplicones, es decir, que se analiza la variación genética en regiones específicas del gen 16S. Esta técnica utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar una parte específica del gen 16S de múltiples bacterias a la vez. A continuación, la región amplificada se investiga mediante la secuenciación del ADN (Illumina, 2020; Klindworth et al., 2013).

En comparación con otros métodos, la secuenciación dirigida por amplicones ofrece diversas ventajas que van desde el análisis simultáneo de centenas de amplicones 16S diferentes de una única muestra, identificación de bacterias indetectables por métodos de cultivo convencionales, el proceso es rápido y con un alto rendimiento, permitiendo una identificación y comparación de las poblaciones bacterianas más rápidamente dentro de una o varias muestras de microbiomas (McDonald et al., 2012; Espinosa-Asuar et al., 2014), hasta el enfoque, el cual va dirigido específicamente al nivel de reino (Illumina, 2020).

Con base en lo anterior, se puede hacer una clara diferenciación entre la secuenciación completa – *Shotgun*, la cual estudia los genomas funcionales de la comunidades microbianas (Illumina, 2021), mientras que la secuenciación 16S proporciona un estudio taxonómico de la diversidad de un único gen, el ARNr 16S (Illumina, 2020).

#### **4.1.2.1 Región V3/V4 del marcador molecular 16S de ARN ribosomal**

El ácido ribonucleico ribosómico 16S se presentó como una opción adecuada para registrar la biodiversidad bacteriana utilizando la taxonomía y también es una herramienta importante para reconstruir las relaciones filogenéticas (McDonald et al., 2012). El ARNr 16S es un polirribonucleótido de un tamaño aproximado de 1500 pares de bases, esta molécula se encuentra en todos los organismos conocidos y, por lo tanto, se reconoce como un potente marcador universal (Valenzuela-González et al., 2015). Su estructura parece ser independiente durante largos periodos de tiempo y su función no

cambia, por lo que los cambios de secuencia pueden ser aleatorios. Contiene nueve regiones (V1-V9) que están menos conservadas o son muy variables, proporcionan la información más útil para estudios filogenéticos y taxonómicos. Sin embargo, la región V4 es la más efectiva para clasificar la microbiota intestinal (Valenzuela-González et al., 2015). Según Nossa y colaboradores (2010), con base en una selección que realizaron cuidadosamente del conjunto de cebadores, encontraron que la región del gen 16S ARNr que proporciona la mayor precisión de clasificación fue la región hipervariable V3-V4 que cubren las bases 361-784, esta mostró resultados prometedores, y por lo tanto, su uso se ha extendido en posteriores trabajos.

## 4.2 Microbiota de murciélagos

En los últimos cinco años, es posible citar diversos estudios que han enfocado sus investigaciones en identificar, comparar y analizar las especies bacterianas obtenidas principalmente de muestras fecales de murciélagos, y secuenciadas mediante la técnica de secuenciación dirigida principalmente hacia las regiones hipervariables V3-V4 o V4.

En el sur de China, Li y colaboradores (2018) realizaron un estudio para determinar la relación que existe entre la dieta y la microbiota intestinal de murciélagos fitófagos (nectarívoros y frugívoros) e insectívoros. Para ello analizaron muestras fecales de las siguientes especies: *Myotis ricketti*, *Hipposideros larvatus*, *Tylonycteris pachypus*, *Pipistrellus abramus*, *Scotophilus heathi*, *Hipposideros armiger*, *Rousettus leschenaultii*, *Cynopterus sphinx* y *Eonycteris spelaea*. En cada muestra se realizó una secuenciación dirigida a la región hipervariable V4 del gen ARNr 16S (Li et al., 2018). Encontraron que en ambos gremios los filos dominantes fueron Pseudomonadota, Bacillota, Tenericutes y Bacteroidetes. Sin embargo, la composición fue diferente, en murciélagos fitófagos; las familias más representativas fueron Mycoplasmataceae, Leuconostocaceae y Clostridiaceae, y los géneros Enterobacter, Fructobacillus, Ureaplasma, Klebsiella y Weissalla. En cambio, en los murciélagos insectívoros fueron las familias Enterococcaceae, Flavobacteriaceae, Lactobacillaceae, Streptococcaceae, Peptostreptococcaceae, Bacillaceae y Fusobacteriaceae, y los géneros *Plesiomonas*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Bacillus*. A partir de esos resultados concluyeron que la

microbiota bacteriana central en los murciélagos es similar, a pesar de las variaciones que existen en las dietas, la geografía, las especies y la historia de vida.

Vengust y colaboradores (2018) describieron la microbiota fecal de los murciélagos a partir de muestras recolectadas durante su migración otoñal por Europa central. En dicho trabajo, colectaron heces de 92 murciélagos en Eslovenia, que constaban de 12 especies diferentes (*Barbastella barbastellus*, *Miniopterus schreibersii*, *Myotis bechsteinii*, *Myotis emarginatus*, *Myotis myotis*, *Myotis nattererii*, *Rhinolophus ferrumequinum*, *Myotis daubentonii*, *Rhinolophus hipposideros*, *Plecotus auritus*, *Pipistrellus pipistrellus*, *Myotis blythii*). Analizaron la microbiota bacteriana mediante la secuenciación dirigida de la región V4 del gen 16S ARNr. Sus resultados, mostraron que no existía una diferencia significativa en las abundancias relativas de ningún filo entre las especies, y que existía una diferencia significativa entre adultos y juveniles, pero no entre sexos. Por lo anterior, concluyeron que los quirópteros poseen una microbiota compleja y diversa con una abundancia relativa compuesta en su mayoría por Pseudomonadotas. En cuanto a las diferencias observadas, infieren que es un resultado de los diferentes gremios tróficos y exposiciones al ambiente.

Wu y colaboradores (2019) caracterizaron la microbiota intestinal en dos murciélagos insectívoros (*Rhinolophus sinicus* y *Myotis altarium*) en tres diferentes fuentes de muestreo (intestino delgado, intestino grueso y heces) a través de la secuenciación dirigida de la región V3-V4 del gen 16S ARNr. Sus resultados revelaron que la clase Gammaproteobacteria puede ser la más dominante y Fusobacteria la menos dominante, y que la fuente del muestreo afecta en la diversidad del microbiota, por lo tanto, no se puede hacer uso de las muestras fecales como representantes de la microbiota de otras regiones intestinales en animales silvestres.

En la India, Selvin y colaboradores (2019) realizaron un análisis de la microbiota intestinal de los murciélagos de herradura menor, tomando como muestras heces y guano. Dirigieron su secuenciación a las regiones V3-V4 del gen 16S ARNr, esta técnica les reveló que Pseudomonadota es el filo más abundante y el segundo es Bacillota en el

microbiota intestinal, en cuanto a la diversidad de bacterias que radican en el guano fueron los filos Actinobacteria, Acidobacteria, y Dormibacteraeota. Concluyendo que las muestras de heces son mejores para realizar el análisis del microbioma con la finalidad de indagar la dieta del huésped.

En China, Sun y colaboradores (2020) analizaron muestras fecales de cuatro especies de murciélagos (*Taphozous melanopogon*, *Myotis petax*, *Hipposideros armiger*, *Eonycteris spelaea*) para determinar la composición de su microbiota con ayuda de la secuenciación dirigida a las regiones V4-V5 del gen 16S ARNr, obteniendo que el microbiota de los murciélagos está dominado por los filos Bacillota y Pseudomonadota. Además, señalan que la microbiota general de los quirópteros es más similar al de los animales carnívoros.

Yin y colaboradores (2020) caracterizaron la microbiota intestinal de *Vespertilio sinensis*, desde un día hasta 6 semanas después del nacimiento. Utilizando la secuenciación dirigida a las regiones V3-V4 del gen 16S ARNr observaron que la microbiota intestinal durante el desarrollo de *V. sinensis* cambió y sugirieron que los cambios durante la semana 4 en la diversidad alfa y beta indican una transición alimentaria, lo que confiere una importancia significativa a la dieta en la composición de la microbiota intestinal durante el desarrollo de este organismo.

Edenborough y colaboradores (2020) examinaron los efectos del cautiverio en el microbioma bacteriano fecal del murciélago insectívoro *Mops condylurus*. Haciendo uso de la secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S ARNr, encontraron que la riqueza de la microbiota aumentaba estando el murciélago en cautiverio. Además, que los filos dominantes independientemente del estado de captura fueron Bacillota y Pseudomonadota. En estado de cautiverio la abundancia de Actinobacterias aumentó considerablemente, sin embargo, la de Clostridia presentaba fluctuaciones, que de igual manera se ha observado en otros mamíferos en cautiverio.

En México, Gaona y colaboradores (2019) analizaron la composición de la microbiota fecal del murciélago *Leptonycteris yerbabuena* en diferentes etapas reproductivas, utilizando la secuenciación dirigida a la región V4 del gen 16S ARNr. Con ello, encontraron que la diversidad de la microbiota es significativamente mayor en las hembras que están gestando o lactando que en los juveniles y los adultos no reproductivos; por lo tanto, sugirieron que las diferencias en la diversidad de la microbiota radican en la reproducción debido a la cantidad de energía que requieren las hembras en este estado y al reacomodo de los órganos principalmente el intestino tiene una superficie más grande para ser colonizado por microorganismos. Ese mismo año, realizaron una investigación sobre la microbiota del parche dorsal de *L. yerbabuena*, secuenciando la región V4 del 16S ARNr, e identificaron un total de 2847 filotipos microbianos (Gaona, Cerqueda-García, et al., 2019). Así mismo, Gaona y colaboradores (2020) analizaron la microbiota fecal de dos poblaciones de *Leptonycteris yerbabuena*, secuenciando la región V4 del gen 16S ARNr. Encontraron que existía una diferencia entre ambas poblaciones como consecuencia de la separación geográfica y la disponibilidad de recursos alimentarios.

Un año después, Víquez-R y colaboradores (2021) evaluaron los cambios en la composición de la microbiota durante la migración de *Leptonycteris yerbabuena*, utilizaron la secuenciación de la región V4 del gen 16S ARNr para demostrar que la variación de la localidad contribuye en la composición y la diversidad general de la microbiota intestinal de los murciélagos, y que los filos predominantes fueron Bacillota, Pseudomonadota y Actinobacteriota.

Fleischer y colaboradores (2022) examinaron la comunidad bacteriana intestinal del murciélago frugívoro *Artibeus jamaicensis* infectado por Astrovirus. Los datos que obtuvieron de la secuenciación del gen 16S ARNr de la región V4, indicaron que los filos predominantes fueron Pseudomonadota, Bacillota y Tenericutes. Por otro lado, Huang y colaboradores (2022) evaluaron sistemáticamente las bacterias potencialmente patógenas fecales de 5 murciélagos: *Rousettus leschenaultii*, *Taphozous perforates*, *Hipposideros cervinus*, *Rhinolophus macrotis* y *Myotis scotti*. Secuenciaron las regiones

V3-V4 del gen 16S ARNr y obtuvieron que los filos más abundantes fueron *Bacillota*, *Bacterioidetes*, *Pseudomonadota*, *Actinobacteria*, *Tenericutes*, *Fusobacteria* y *Nitrospira*. Además, identificaron 40 especies nuevas de bacterias que pueden ser potencialmente patógenas.

Con base en los estudios citados, se puede concluir que las familias de murciélagos más estudiadas fueron Vespertilionidae, Rhinolophidae e Hipposideridae, y en cuanto a los géneros fueron *Myotis*, *Rhinolophus* e *Hipposideros*. Cabe mencionar, que la caracterización de la microbiota fecal también se ha realizado en otros mamíferos como primates (Yildirim et al., 2010), elefantes (Budd et al., 2020) y lagomorfos (Montes-Carretero et al., 2021).

## 5 Justificación

El presente proyecto pretende identificar y entender cómo se comporta la comunidad bacteriana fecal del murciélago insectívoro *Myotis velifer*. Además, de sentar las bases para la futura caracterización metagenómica de microbiomas fecales de los murciélagos para explorar los vínculos que existan entre la microbiota y el huésped.

## 6 Objetivos

Describir la microbiota fecal del murciélago *Myotis velifer*, obtener su riqueza y abundancia.

Comparar la diversidad microbiana entre hembras y machos.

Comparar la diversidad microbiana entre individuos activos e inactivos.

Obtener la diversidad alfa y beta entre hembras y machos.

## 7 Metodología

### 7.1 Sitio de estudio

La recolección de las muestras se llevó a cabo en la cueva de “El Salitre”, ubicada en el municipio de Tlaltizapán en el estado de Morelos, México, con coordenadas 18° 45´00” N y 99°11´24” O. Está rodeada por parches de bosque caducifolio alternados con

vegetación secundaria, terrenos de cultivo y pastizales. Se encuentra a una altitud de 1,100 msnm. La cueva cuenta con una entrada de ~1.8 m de altura y ~3.5 m de ancho, consta de tres cámaras y tiene una longitud total de 225 m. La temperatura dentro de la cueva es de 20°-25°C y la humedad es de 79-99% (COESBIO, 2018).

## **7.2 Colecta de individuos y heces**

El día 26 de agosto del 2022 se realizó la captura de 14 individuos (7 machos y 7 hembras) de *Myotis velifer*, con una red de niebla de 6 m de largo colocada en la entrada de la cueva, entre las 22:00 y las 23:30 horas. Cada uno de los murciélagos capturados se colocó de manera individual en un saco de manta limpio, no estéril, para garantizar la circulación de aire y evitar la asfixia de los individuos. La colecta de las heces se comenzó a las 2:00 horas del día 27 de agosto del 2022, después de haber mantenido a los murciélagos en los sacos individuales por un tiempo aproximado de 2:30h. Las muestras se recolectaron con ayuda de guantes de nitrilo (para evitar la contaminación) en tubos Eppendorf estériles de 1,5 ml con DNA/RNA Shield para conservar la integridad del ADN de las muestras a temperatura ambiente hasta su llegada al laboratorio, donde se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

Antes de la liberación, de cada uno de los murciélagos se tomaron sus medidas morfológicas: longitud del antebrazo (Vernier electrónico en mm), masa corporal (con una balanza de resorte de 100 g), categoría de edad (juvenil o adulto) estimada según la osificación de los huesos de las alas (metacarpos y falanges) y la condición en la que se encontraban (Machos: testículos escrotados, inguinales o abdominales, Hembras: lactante, preñada o inactiva) (Tabla 1; Anexos). Finalmente, se liberaron dentro de la cueva.

### **7.2.1 Aislamiento de bacterias a partir del saco de manta**

Para valorar y evaluar la influencia en los resultados de la secuenciación del microbioma fecal y garantizar que las posibles contaminaciones cruzadas durante la manipulación de las muestras no son significativas, se realizaron dos controles negativos, uno genómico y otro por medio de aislamiento.

Para ello se inocularon 2 placas frotando el saco sobre el medio LB (medio Luria-Bertani) y dispersando a toda la placa con perlas de cristal para luego incubarlas a 35°C por 24h. Posteriormente, las colonias resultantes fueron aisladas y sembradas por estría cruzada sobre medio LB e incubadas a 35°C por 24h, este proceso se repitió hasta obtener un cultivo puro de cada colonia.

### **7.2.2 Extracción de ADN de las bacterias cultivadas**

El ADN de las bacterias se extrajo utilizando el kit Promega Wizard Genomic DNA siguiendo el protocolo de aislamiento de ADN genómico de bacterias Gram positivas y Gram negativas (siguiendo las instrucciones del fabricante). Finalmente, el ADN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop a longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm y la integridad del ADN se evaluó utilizando electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

### **7.2.3 Amplificación y secuenciación sanger**

Mediante PCR, se amplificó el gen 16S ARNr por muestra. Para ello, se usaron los cebadores específicos 518(5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG3')F y 800(5'TACCAGGGT ATCTAATCC-3')R. Las reacciones de PCR (25µL) contenían 3µL de ADN, 12µL de Mastermix verde Taq ADN polimerasa, 9 µL de agua libre de nucleasas y 0.5µL de cada cebador. Las muestras se amplificaron utilizando un protocolo de desnaturalización a 94 °C (5 min), seguido de 30 ciclos de 94 °C (60 s), 55 °C (60 s) y 72 °C (90 s), seguido de una extensión final (72°C, 10 min). Finalmente, los productos amplificados se enviaron a secuenciar a MacroGen para una secuenciación Sanger, en la cual, se obtuvieron secuencias de alta calidad de fragmentos largos de ADN ( ~900 pb).

### **7.2.4 Análisis filogenéticos**

Se utilizó el programa Unipro UGENE 46.0 (Okonechnikov et al., 2012) para alinear las secuencias, con base en las secuencias consensos obtenidas de BLAST (Altschul et al., 1990). Posteriormente, se realizó una alineación múltiple de las secuencias mediante el programa MAFFT 7.0 (Kato & Standley, 2013) para generar así

un árbol filogenético mediante máxima verosimilitud en el servidor de CIPRES (Miller et al., 2010).

### 7.3 Extracción de ADN a partir de las heces

Se realizó un control sin ADN del kit Promega Wizard Genomic DNA para corroborar que no exista contaminación por parte de este. Posteriormente, el ADN de las 14 muestras fecales y una muestra del saco de manta se extrajo utilizando el kit Promega Wizard Genomic DNA siguiendo el protocolo de aislamiento de ADN genómico (siguiendo las instrucciones del fabricante). Por cada una de las muestras de heces recolectadas en tubos estériles de 1,5 ml, se tomaron ~180 mg y se colocaron en un nuevo tubo para ser triturada utilizando un pistilo. Posteriormente, se purificaron las extracciones con el Kit High Pure PCR Product Purification, y finalmente, se cuantificó la concentración de ADN utilizando un espectrofotómetro NanoDrop a longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm y la integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

### 7.4 Secuenciación

Se amplificaron mediante PCR las regiones hipervariables V3-V4 del marcador molecular 16S ARNr por muestra. Para ello, utilizamos los cebadores específicos (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG3')F/(5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3')R (Klindworth et al., 2013). Las reacciones de PCR (50µL) contenían 2µL de ADN, 25µL de Mastermix verde Taq ADN polimerasa, 20.5 µL de agua libre de nucleasas, 0.25µL de albúmina de suero bovino (BSA), 1.25µL de dimetilsulfóxico (DMSO) y 0.5µL de cada cebador. Las muestras se amplificaron utilizando un protocolo de desnaturalización a 94 °C (5 min), seguido de 30 ciclos de 94 °C (60 s), 53 °C (60 s) y 72 °C (60 s), seguido de una extensión final (72°C, 10 min). Finalmente, los productos amplificados se enviaron a secuenciar a MacroGen con la tecnología illumina de extremos emparejados 2x300 pb, donde se le agregaron los adaptadores (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3')F/(5'-GTCTCGTGGGCTCGGAA TGTGTATAAGAGACAG-3')R (Klindworth et al., 2013).

## 7.5 Análisis bioinformáticos

Las lecturas crudas se procesaron mediante el programa FastQC v0.12.0 para evaluar su calidad, una vez terminado este proceso, se utilizó el programa Fastp v0.23.4 (Chen et al., 2018) para limpiar las secuencias, recortar adaptadores y filtrar por calidad con un Quality Score  $\geq$  Q28 para evitar los errores y ambigüedades en las lecturas. Con la herramienta QIIME2-2023.5 (Bolyen et al., 2019), se obtuvieron las variantes de secuencia de amplicón (ASV por sus siglas en inglés) usando DADA2 (Callahan et al., 2016). La asignación taxonómica de los ASV se obtuvo mediante feature-classifier (Bokulich et al., 2018), classify-sklearn (Bolyen et al., 2019; Edenborough et al., 2020) utilizando secuencias de longitud completa de Greengenes2-2022.10 (McDonald et al., 2022) como secuencias de referencia.

La abundancia relativa de taxones microbianos se calculó dividiendo el número total de secuencias de cada filo, familia y género, por el número total de secuencias de todos los grupos por cada nivel taxonómico, con la finalidad de reunir información detallada para reconocer los taxones más abundantes como miembros principales de la microbiota de *M. velifer*.

## 7.6 Análisis de la diversidad alfa y beta

La riqueza y diversidad taxonómica, y riqueza microbiana de machos y hembras a nivel de género se estimaron utilizando los números de Hill con el paquete iNEXT (Hsieh et al., 2016) utilizando como criterios el número máximo de contigs de las muestras (31,261 secuencias) y un intervalo de confianza del 95%.

La diversidad filogenética se estimó sumando la longitud de las ramas cubiertas por una sola muestra. Para comparar la diversidad filogenética entre machos y hembras se realizó una prueba no paramétrica de Wilcoxon mediante el paquete car (Fox & Weisberg, 2019).

En cuanto a la variación en la composición general para la diversidad filogenética, la métrica de diversidad beta weighted UniFrac (Lozupone et al., 2007), así como el

análisis de coordenadas principales (PCoA), se estimaron mediante diversity en QIIME2-2023.5 (Bolyen et al., 2019). Y para la diversidad beta taxonómica, se realizó un análisis de similitud (ANOSIM) entre grupos (machos y hembras) basado en la métrica de similitud de Bray-Curtis y con 1000 permutaciones, mediante el software R v4.0.3 (R Core Team, 2023).

## **8 Resultados**

### **8.1 Análisis bioinformáticos**

Se obtuvieron un total de 1,162,492 lecturas crudas de las 14 muestras, una vez que se realizó la limpieza, quedaron 1,109,032 lecturas, conservando en promedio el 95% de las secuencias por muestra. La longitud mínima de secuencia fue de 58 pb y la máxima de 481 pb. Una vez realizada la asignación taxonómica, se obtuvieron 164 variantes de secuencia de amplicón (ASV) con un rango de longitud de 423 pb.

### **8.2 Controles negativos**

Se obtuvieron un total de 80,062 lecturas crudas de la muestra, una vez que se realizó la limpieza, quedaron 76,354 lecturas, conservando en promedio el 95% de las secuencias. Una vez realizada la asignación taxonómica, se obtuvieron 67 variantes de secuencia de amplicón (ASV).

#### **8.2.1 Análisis del control genómico**

A través de análisis bioinformáticos, se obtuvieron 4 filos presentes en el saco de manta, de los cuales Pseudomonadota dominó con el 84%, bacterias no clasificadas con el 14% , Bacteroidota 1% y Bacillota con 1% (Figura 1).

### Control negativo del saco de manta a nivel filo

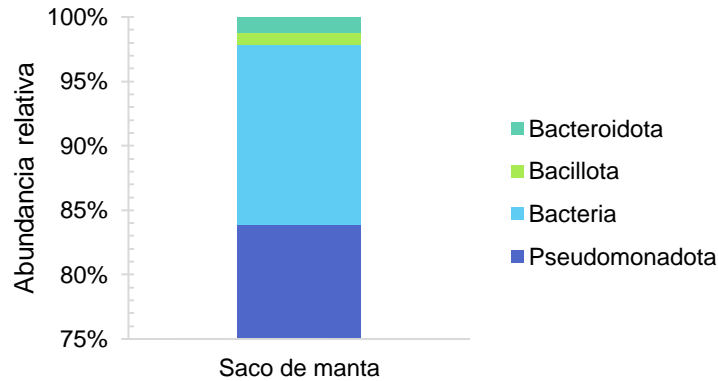


Figura 1 Abundancias relativas de los filos bacterianos presentes en el control negativo genómico del saco de manta.

A nivel de familia se hallaron 10, las más abundantes fueron Enterobacteriaceae (57%), seguido de bacterias no clasificadas (14%), Pseudomonadaceae (9%), Xanthomonadaceae (7%), Moraxellaceae (7%), Burkholderiaceae A (3%), Rhizobiaceae A (1%), Marinilabiliaceae (1%), Staphylococcaceae (1%) y Sphingomonadaceae (1%) (Figura 2).

### Control negativo del saco de manta a nivel familia

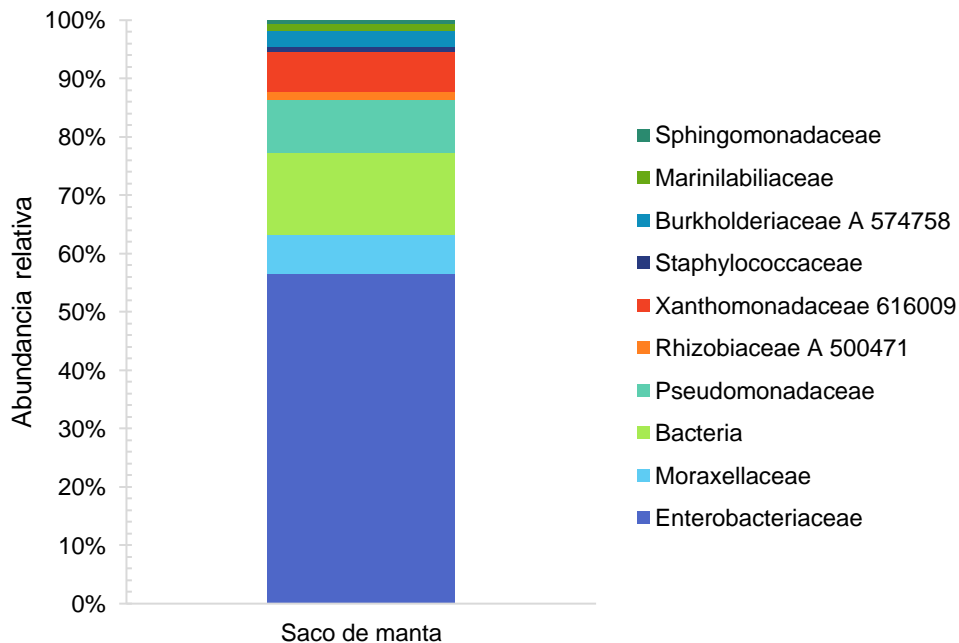


Figura 2 Abundancias relativas de las familias bacterianas presentes en el control negativo genómico del saco de manta.

Por último, a nivel de género se obtuvieron 19, de los cuales, los género con mayor abundancia fueron: un género de la familia Enterobacteriaceae (49%), bacterias no clasificadas (14%), *Stenotrophomonas A* (6%), *Acinetobacter* (6%), *Rahnella* (4%), *Pseudomonas E* (3%), *Massilia* (3%), *Pantoea A* (2%), *Pseudomonas A* (2%) y *Pseudomonas B* (2%) (Figura 3).

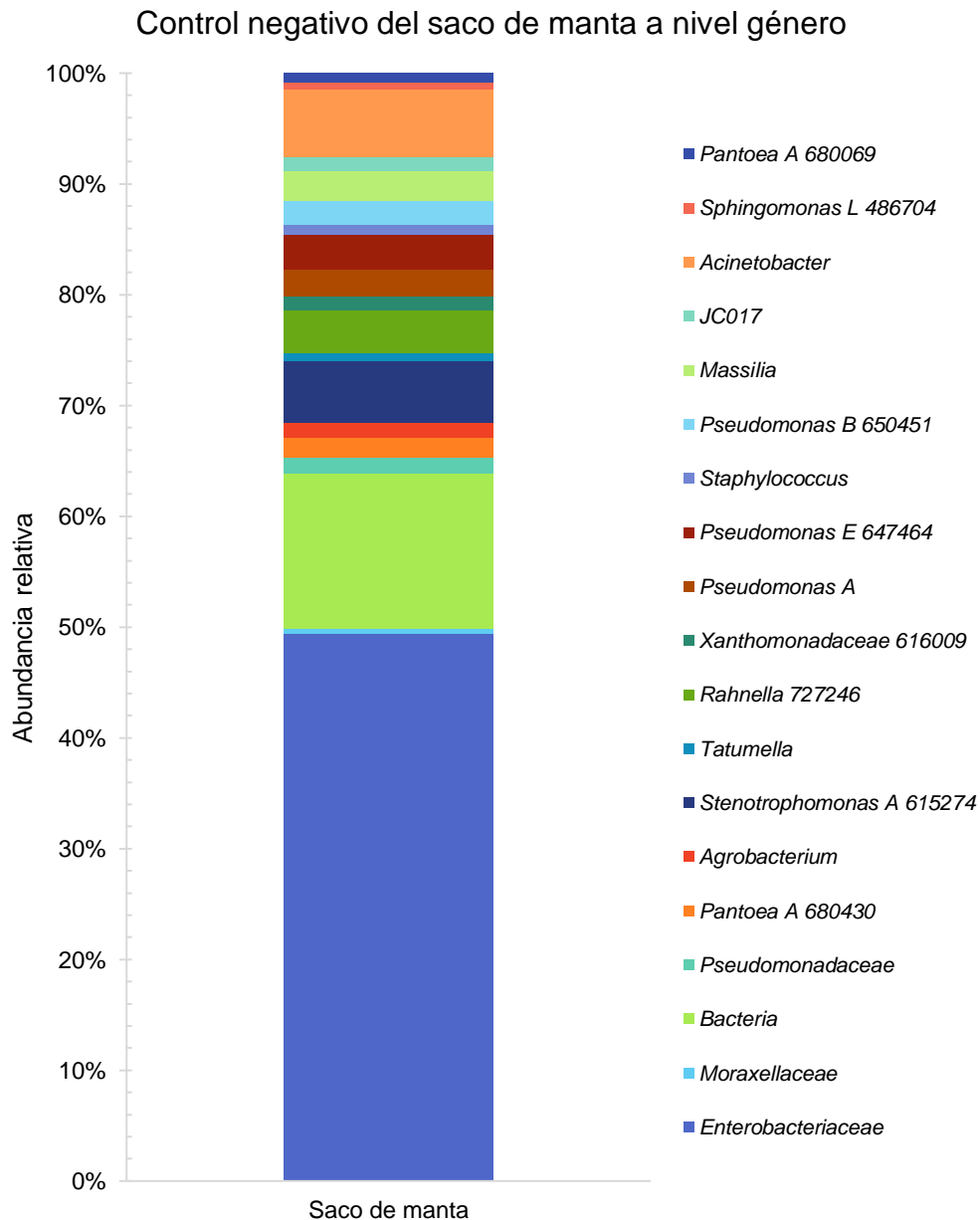


Figura 3 Abundancias relativas de los géneros bacterianos presentes en el control negativo genómico del saco de manta.

## 8.2.2 Análisis del control cultivable

Se aislaron un total de 9 bacterias a partir del saco de manta. El análisis de máxima verosimilitud indicó que las secuencias del gen ARNr 16S se situaron en los siguientes filos: El más abundante fue Bacillota (66.66%), seguido de Actinomycetota (33.33%). En cuanto a los géneros identificados, 3 pertenecen al género *Micrococcus*, 3 al *Bacillus*, 2 al *Oceanobacillus* y 1 al *Staphylococcus* (Figura 4).

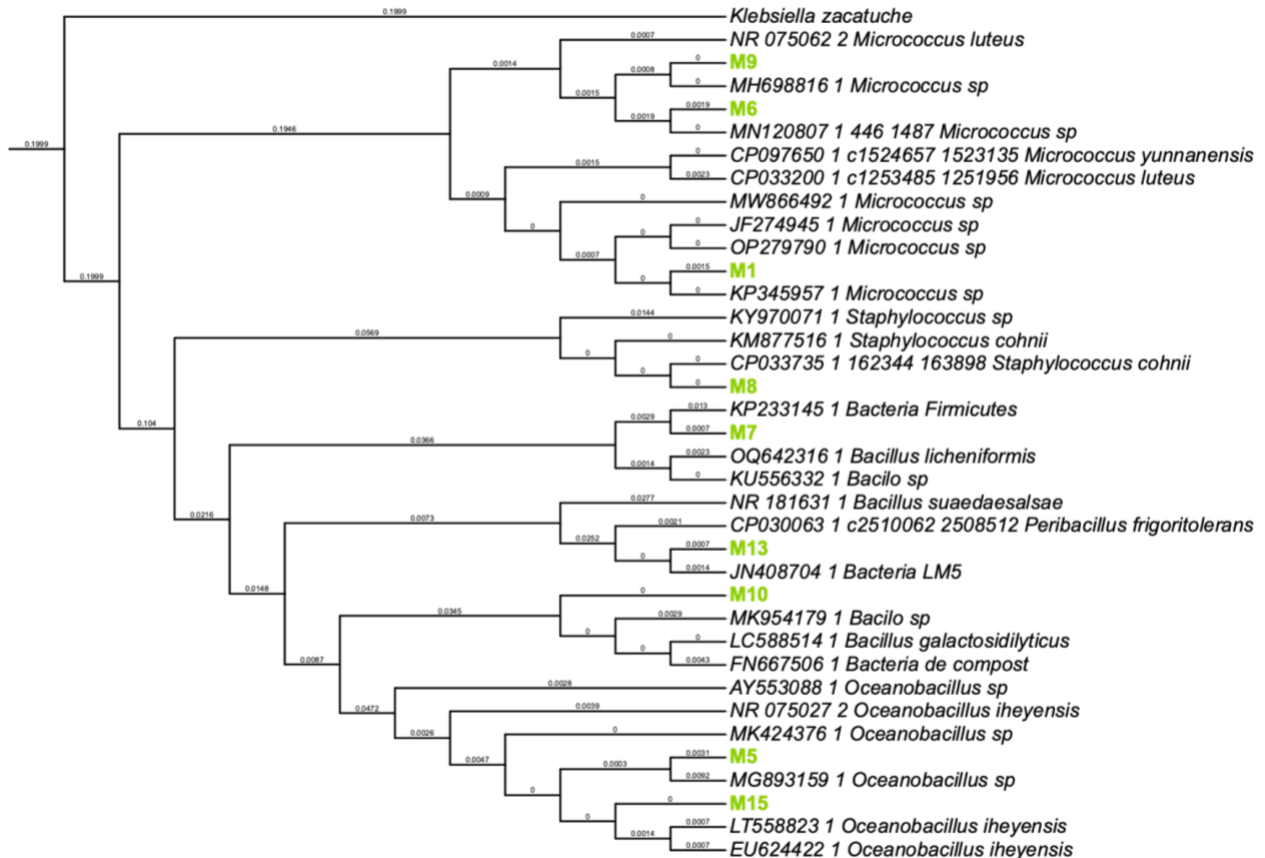


Figura 4 Árbol filogenético construido con el método de máxima verosimilitud correspondientes al gen 16S de las bacterias amplificadas del saco de manta. Los nombres clave de la secuencia de especies relacionados, muestra ID de acceso NCBI y nombre de la especie. En verde se observan las muestras obtenidas del saco de manta.

## 8.3 Análisis de la cobertura del muestreo

Tanto en las muestras de machos como de hembras, los géneros bacterianos mostraron una cobertura de muestra del 100% para la riqueza de especies. Demostrando que el muestreo está completo para todas las muestras (Figura 5).

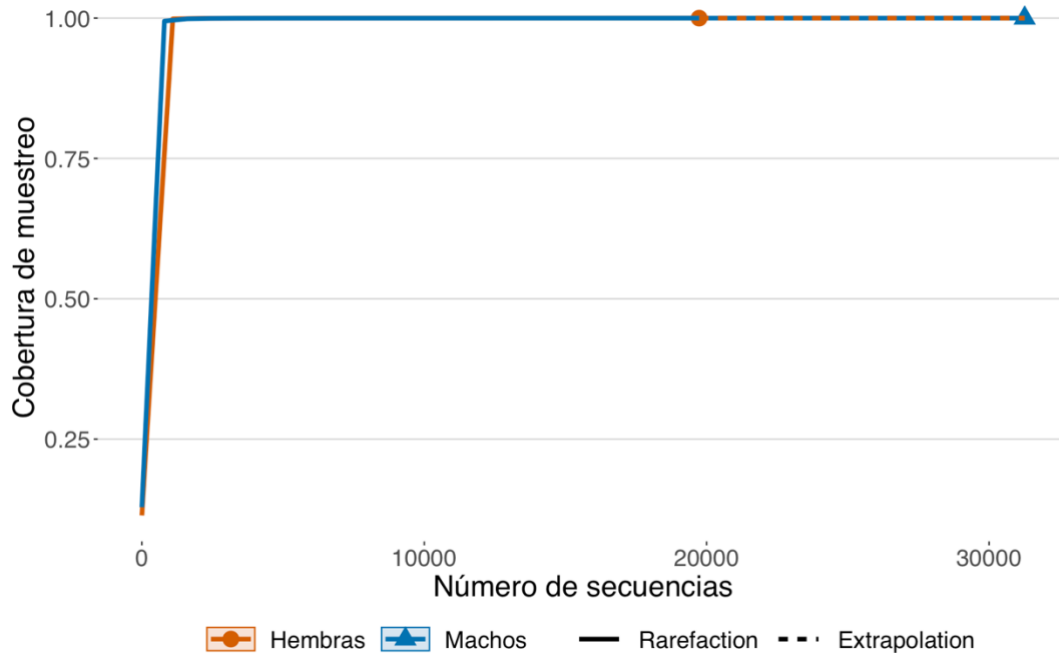


Figura 5 Curvas de rarefacción basadas en la cobertura de las muestras por sexo.

### 8.4 Microbiota fecal de *Myotis velifer*

Los filos encontrados en la microbiota fecal de *M. velifer* fueron 8, de los cuales, los más abundantes fueron Pseudomonadota (33%), seguido de Fusobacteriota (23%), Bacillota (19%), bacterias no clasificadas (14%), Synergistota (5%), Bacteroidota (3%), Desulfobacterota (2%) (Figura 6).

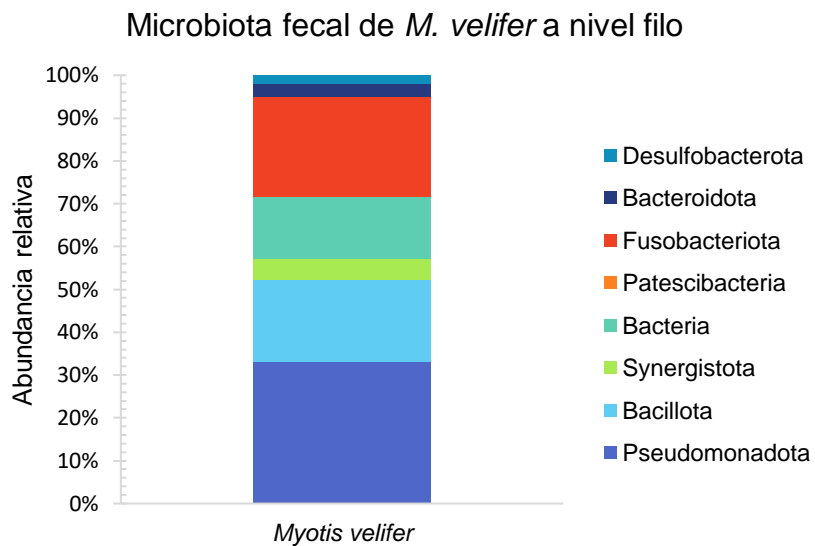


Figura 1 Distribución de la composición de filos bacterianos presentes en la microbiota fecal de *M. velifer*.

Mientras que las familias halladas fueron un total de 33, entre las más abundantes están, Fusobacteriaceae (23%), seguido de Enterobacteriaceae (16%), bacterias no clasificadas (14%), Rhodospirillaceae (11%), Peptostreptococcaceae (5%), Synergistaceae (5%), Paenibacillaceae (4%), Enterococcaceae (4%), Dysgonomonadaceae (3%), Aeromonadaceae (2%), Lachnospiraceae (2%), Acetobacteraceae (2%), Vagococcaceae (1%), Clostridiaceae (1%), Burkholderiaceae A (1%), Desulfobacteriaceae (1%) y Adiutricaceae (1%) (Figura 7).

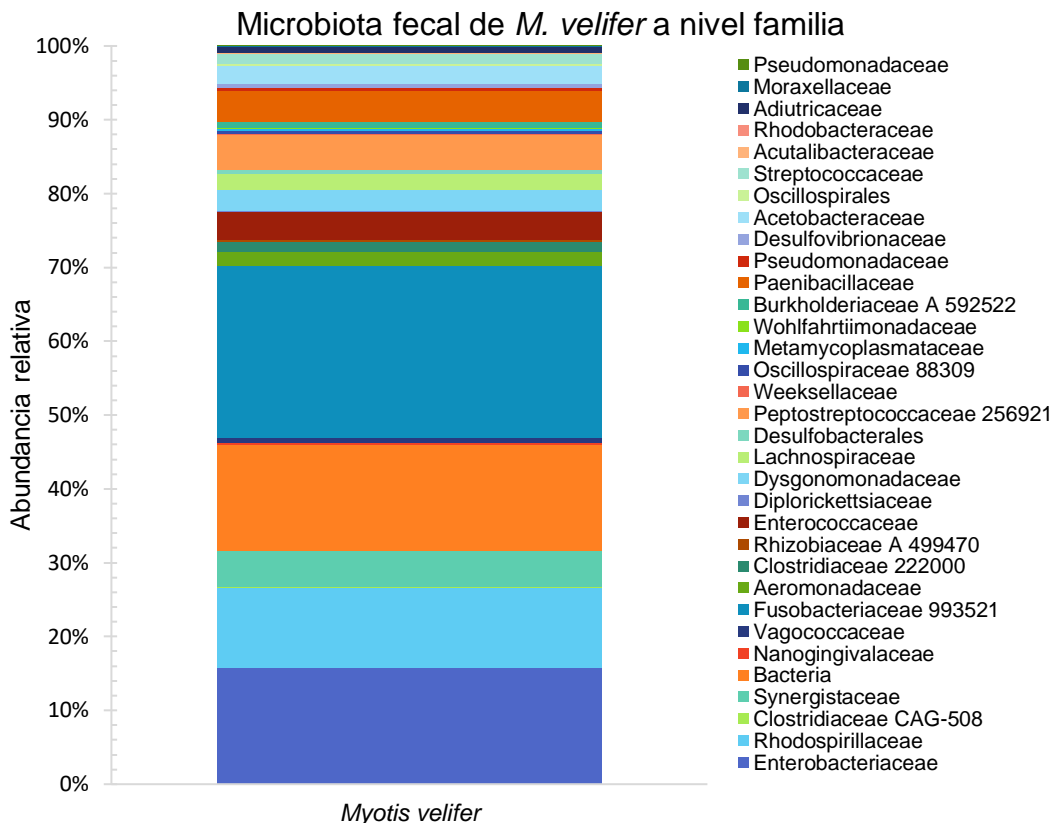
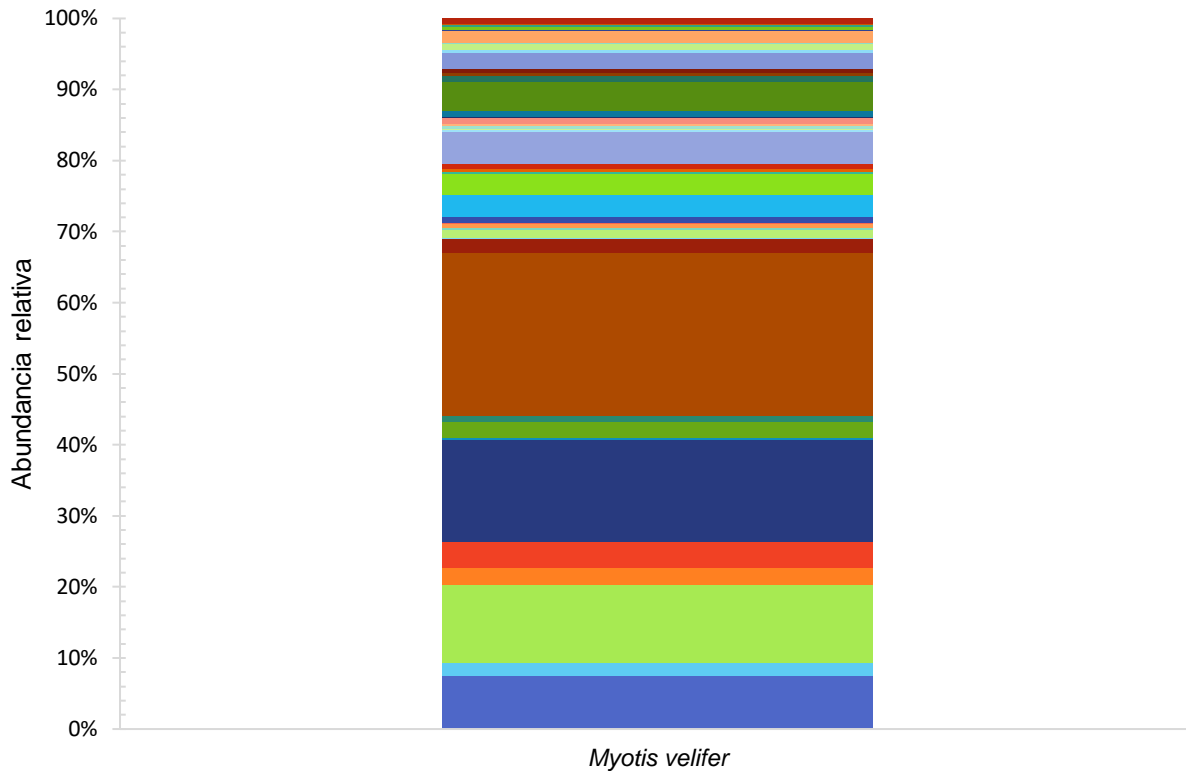


Figura 2 Distribución de la composición de familias bacterianas presentes en la microbiota fecal de *M. velifer*.

Por último, obtuvimos un total de 48 géneros en la microbiota fecal del vespertilionido *M. velifer*, algunos de los más dominantes fueron, *Cetobacterium* (23%), bacterias no clasificadas (14%), *Haematospirillum* (11%), género no identificado de la familia Enterobacteriaceae (7%), *Paraclostridium* (5%), *Escherichia* (4%), *Ammoniphilus* (4%), género no identificado de la familia Enterococcaceae (3%), *Dysgonomonas* (3%), *Providencia* A (2%), *Caccocola* (2%), *Entomobacter* (2%), *Enterocloster* (2%), género no identificado de la familia Synergistaceae (2%), *Aeromonas* (2%), *Vagococcus* B (1%),

*Clostridium P* (1%), *Enterococcus H* (1%), *Plesiomonas* (1%), *Morganella* (1%), *Saezia* (1%), *Orbus* (1%), *Adiutrix* (1%), *Lactococcus A* (1%) (Figura 8).

### Microbiota fecal de *M. velifer* a nivel género



- |                                       |                                |                               |
|---------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| ■ <i>Enterobacteriaceae</i>           | ■ <i>Providencia A 732258</i>  | ■ <i>Haematospirillum</i>     |
| ■ <i>Clostridiaceae CAG-508</i>       | ■ <i>Caccoccola</i>            | ■ <i>Escherichia 710834</i>   |
| ■ <i>Bacteria</i>                     | ■ <i>Nanogingivalis</i>        | ■ <i>Synergistaceae</i>       |
| ■ <i>Vagococcus B</i>                 | ■ <i>Cetobacterium A</i>       | ■ <i>Aeromonas</i>            |
| ■ <i>Pseudomonadaceae</i>             | ■ <i>Pantoea A 680430</i>      | ■ <i>Clostridium P</i>        |
| ■ <i>Bartonella</i>                   | ■ <i>Enterococcus H 360604</i> | ■ <i>Aquirickettsiella</i>    |
| ■ <i>Plesiomonas</i>                  | ■ <i>Enterococcaceae</i>       | ■ <i>Dysgonomonas</i>         |
| ■ <i>Fusobacterium A</i>              | ■ <i>Lachnospiraceae</i>       | ■ <i>Desulfobacterales</i>    |
| ■ <i>Paraclostridium</i>              | ■ <i>Klebsiella 711353</i>     | ■ <i>Apibacter</i>            |
| ■ <i>Oscillospiraceae 88309</i>       | ■ <i>Mycoplasma J 271639</i>   | ■ <i>Morganella</i>           |
| ■ <i>Wohlfahrtiimonadaceae</i>        | ■ <i>Saezia</i>                | ■ <i>Ammoniphilus</i>         |
| ■ <i>Orbus</i>                        | ■ <i>Pseudomonadaceae</i>      | ■ <i>FLUQ01</i>               |
| ■ <i>Entomobacter</i>                 | ■ <i>Oscillospirales</i>       | ■ <i>Lactococcus A 343473</i> |
| ■ <i>Peptostreptococcaceae 256921</i> | ■ <i>Enterocloster</i>         | ■ <i>Acinetobacter</i>        |
| ■ <i>UBA945</i>                       | ■ <i>Rhodobacteraceae</i>      | ■ <i>Lactococcus A 346120</i> |
| ■ <i>Clostridiaceae 222000</i>        | ■ <i>Klebsiella 724518</i>     | ■ <i>Adiutrix</i>             |

Figura 3 Distribución de la composición de géneros bacterianos presentes en la microbiota fecal de *M. velifer*.

## 8.5 Microbiota fecal por sexo

Este análisis se basa en una muestra de siete hembras (todas reproductivamente inactivas) y siete machos (3 activos y 4 inactivos). Se obtuvieron un total de 8 filos, de los cuales 8 estuvieron presentes en los machos y 6 en las hembras. El filo más abundante en la microbiota fecal de las hembras fue Pseudomonadota (36%), Bacillota (28%), seguido de Fusobacteriota (19%), Synergistota (6%), Bacteroidota (6%) y bacterias no clasificadas (4%); por otro lado, la microbiota de machos estuvo dominada por el filo Pseudomonadota (31%), seguido por Fusobacteriota (26%), bacterias no clasificadas (21%), Bacillota (14%), Synergistota (4%), Desulfobacterota (3%) y Bacteroidota (1%) (Figura 9).

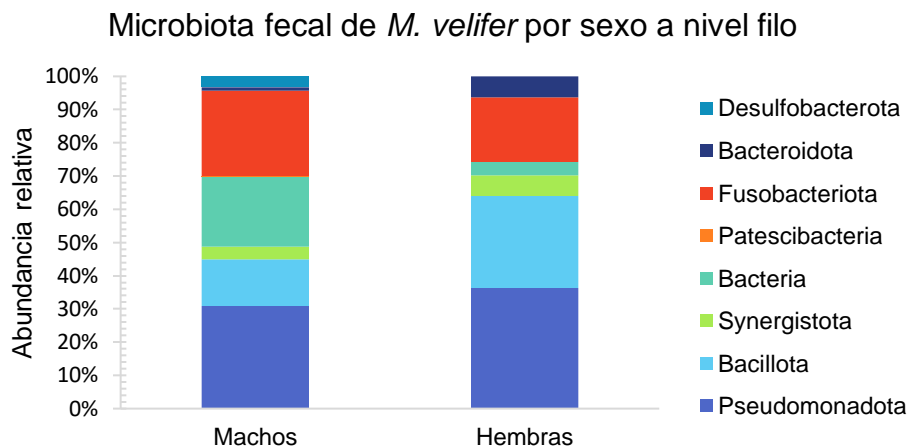


Figura 4 Abundancias relativas de los filos bacterianos presentes en la microbiota fecal de machos y hembras de *M. velifer*.

En cuanto a las familias, 30 se encontraron presentes en los machos y solo 17 en las hembras. Las familias más abundantes en la microbiota de las hembras fue Fusobacteriaceae (30%), seguido de bacterias no clasificadas (16%), Enterobacteriaceae (12%), Rhodospirillaceae (11%), Paenibacillaceae (7%), Synergistaceae (4%), Lachnospiraceae (3%), Acetobacteraceae (3%), Clostridiaceae (2%), Peptostreptococcaceae (2%), y Burkholderiaceae (2%). La microbiota de machos estuvo dominada por las familias Fusobacteriaceae (26%), bacterias no clasificadas (21%), Enterobacteriaceae (14%), Rhodospirillaceae (7%), Paenibacillaceae (6%), Synergistaceae (4%), Acetobacteraceae (4%), Aeromonadaceae (3%), Lachnospiraceae (3%) y Burkholderiaceae (2%) (Figura 10).

### Microbiota fecal de *M. velifer* por sexo a nivel familia

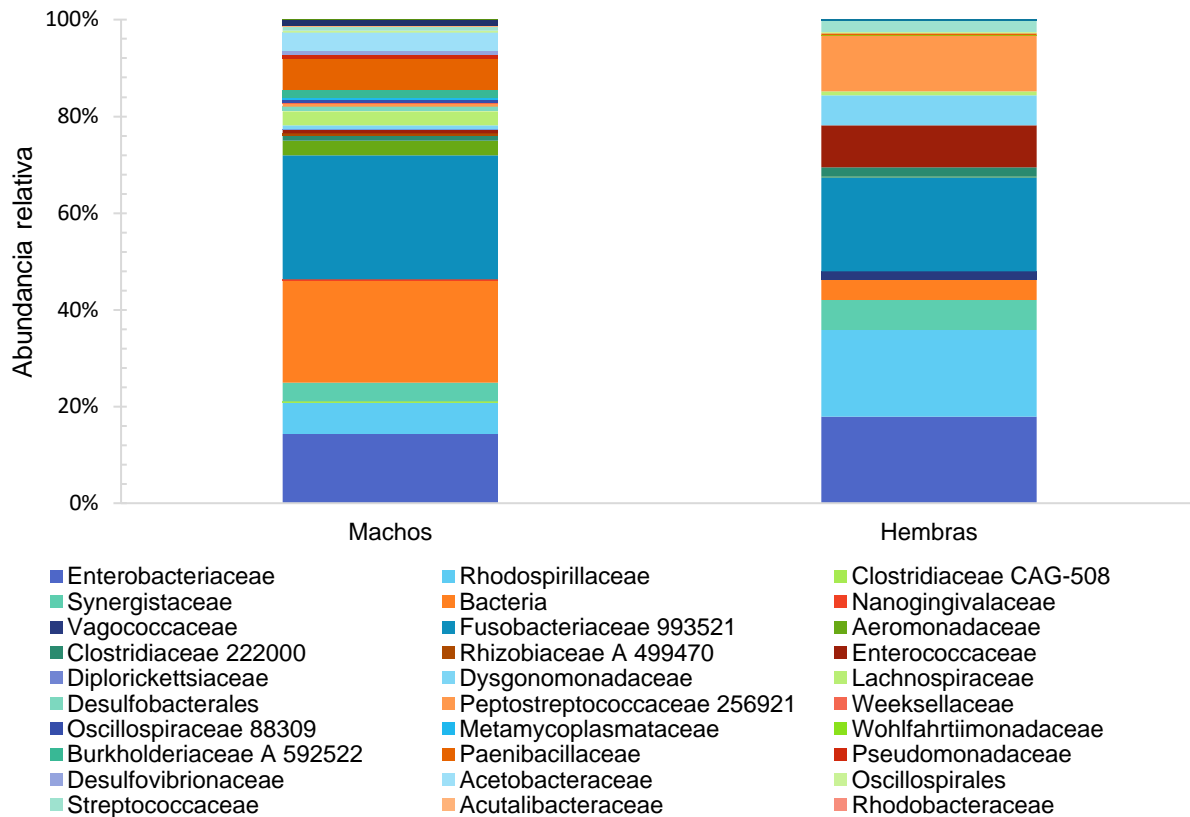


Figura 5 Abundancias relativas de las familias bacterianas presentes en la microbiota fecal de machos y hembras de *M. velifer*.

En la microbiota fecal de las hembras se hallaron 21 géneros y los dominantes fueron: *Cetobacterium* (19%), *Haematospirillum* (18%), *Paraclostridium* (12%), un género no identificado de la familia *Enterobacteriaceae* (11%), un género no identificado de la familia *Enterococcaceae* (7%), un género no identificado de la familia *Synergistaceae* (6%), *Dysgonomonas* (6%), *Providencia A* (5%), bacterias no clasificadas (4%), *Vagococcus B* (2%), *Clostridium P* (2%), *Morganella* (2%) y *Lactococcus* (2%). Por otro lado, en los machos se hallaron 40 géneros de los cuales, *Cetobacterium* (25%), bacterias no clasificadas (21%), *Haematospirillum* (7%), *Escherichia* (6%), *Ammoniphilus* (6%), un género no identificado de la familia *Enterobacteriaceae* (5%), *Caccocola* (4%), *Entomobacter* (4%), *Aeromonas* (3%) y *Enterocloster* (3%) (Figura 11). Cabe mencionar, que los 2 géneros más abundantes, *Haematospirillum* y *Cetobacterium*, se detectaron en 4 muestras. Sin embargo, en dos muestras diferentes se halló solo *Haematospirillum* representado con un 3% y en la otra solo *Cetobacterium* con un 74% (Figura12).

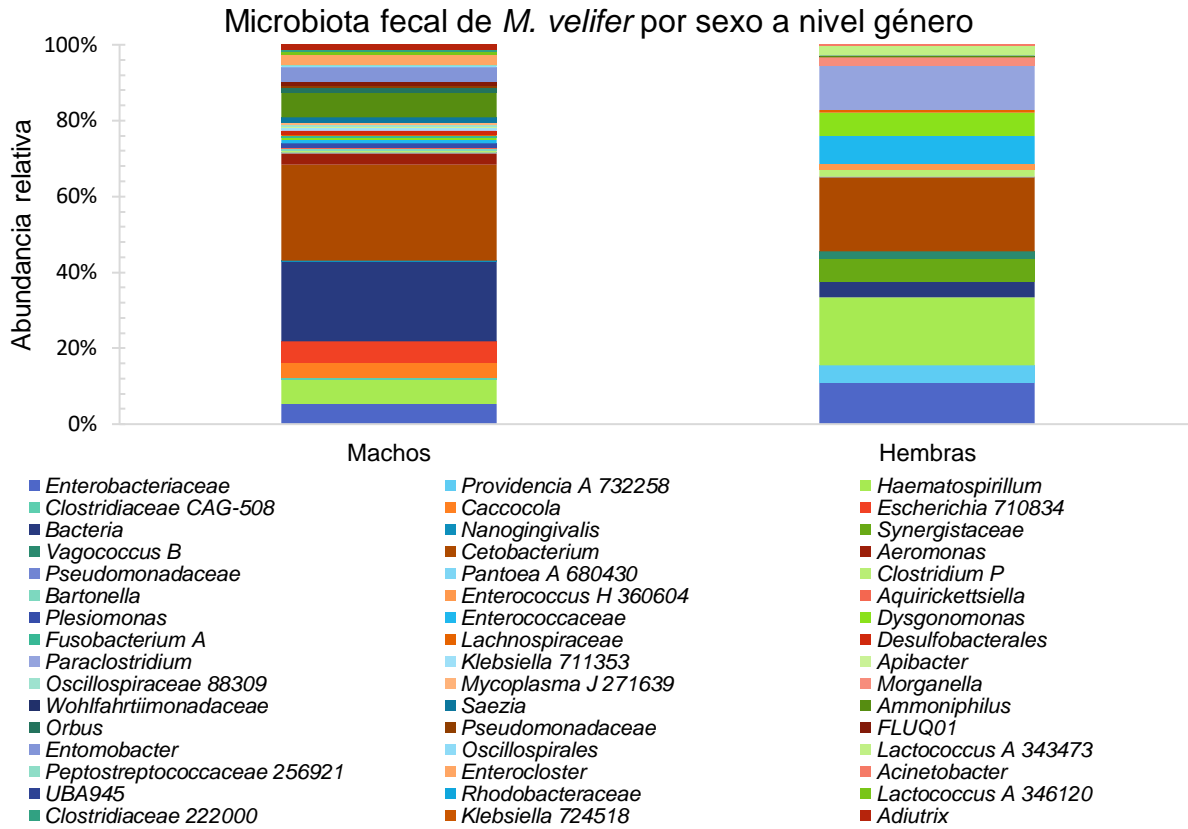


Figura 7 Abundancias relativas de los géneros bacterianos presentes en la microbiota fecal de machos y hembras de *M. velifer*.

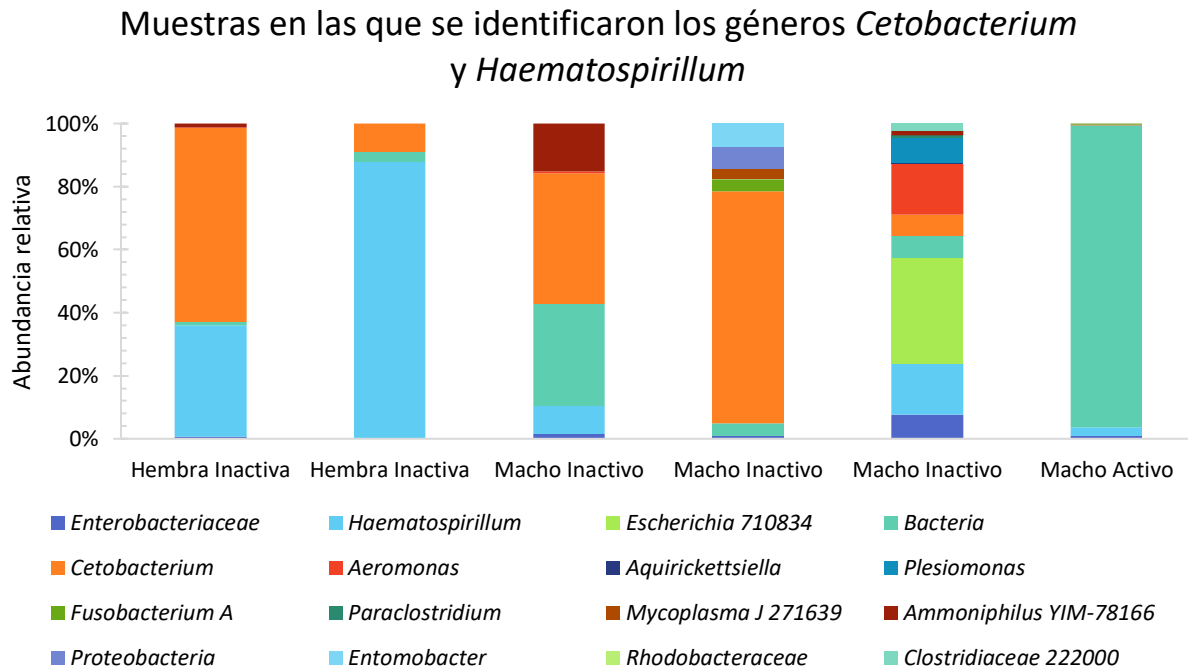


Figura 6 Muestras en las que se identificaron géneros bacterianos *Cetobacterium* y *Haematospirillum* presentes en la microbiota fecal de *M. velifer*.

Por último, para la microbiota fecal de los 3 machos reproductivamente activos, se hallaron un total de 8 filos; siendo Pseudomonadota (33%), Bacillota (16%), Synergistota (12%) y Desulfobacterota (10%), las dominantes; 25 familias; las abundantes fueron Enterobacteriaceae (16%), Synergistaceae (12%), Acetobacteraceae (10%) y Lachnospiraceae (9%); y 30 géneros, de los cuales, bacterias no identificadas (19%), *Caccocola* (12%), un género de la familia Enterobacteriaceae (10%), *Entomobacter* (10%), *Enterocloster* (8%) y *Saezia* (5%) fueron los más abundantes. En cuanto a las cuatro muestras de los machos sexualmente inactivos, se observó una riqueza de 16 géneros, de los cuales, 6 se comparten con los activos. Los géneros más abundantes para estos individuos fueron *Cetobacterium*, bacterias no identificadas, *Haematospirillum*, *Escherichia* y *Ammoniphilus* YIM 78166 (37%, 22%, 9%, 9%, 9%, respectivamente) (Figura 13).

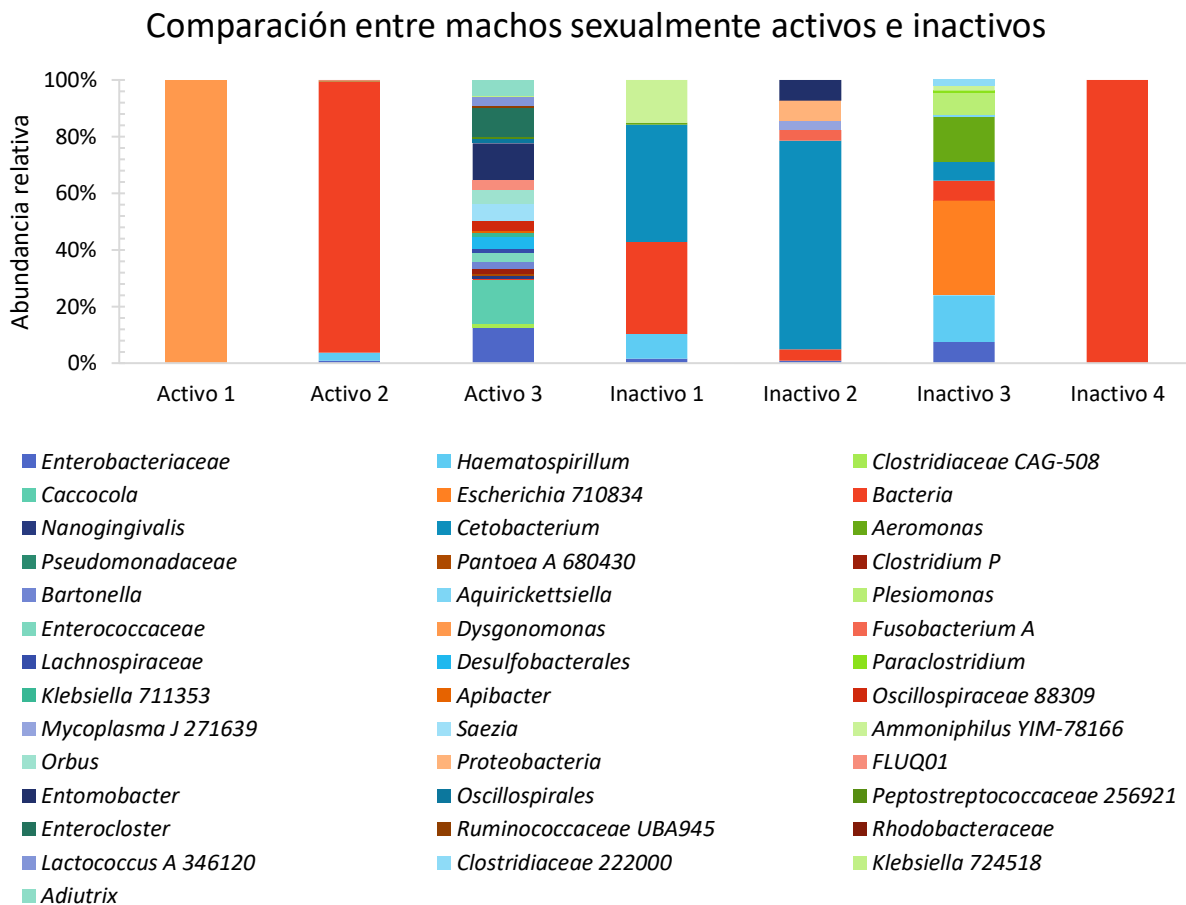


Figura 8 Comparación de abundancias relativas de géneros bacterianos presentes en la microbiota fecal de machos *M. velifer* reproductivamente activos.

## 8.6 Análisis de la diversidad alfa

La riqueza de especies ( $q=0$ ), el exponencial de Shannon ( $q=1$ ) e inverso de Simpson ( $q=2$ ) para hembras fueron 21, 11.24 y 8.76; y para machos 40, 13.44 y 7.76, respectivamente (Figura 14).

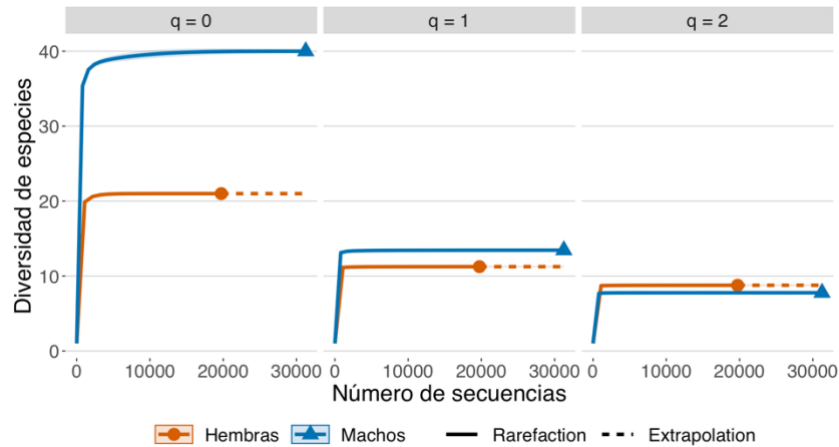


Figura 9 Curvas de rarefacción basada en el número de secuencias por sexo.

La diversidad filogenética para las siete hembras y los siete machos varió de 4.77 a 9.78 y de 4.82 a 9.14, respectivamente. Se realizó una prueba de rangos de Wilcoxon para determinar si el sexo tiene algún efecto sobre la diversidad filogenética de la microbiota fecal del murciélago *Myotis velifer*. El resultado de la prueba demostró que no hay diferencias significativas entre sexos con respecto a la diversidad filogenética ( $W = 32$ ,  $p = 0.3711$ ; Figura 15).

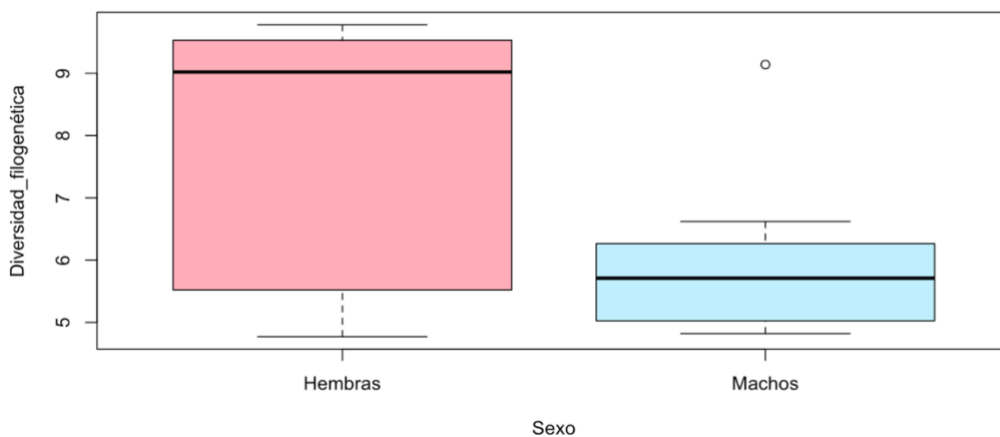


Figura 10 Diversidad filogenética entre machos y hembras.

## 8.7 Análisis de la diversidad beta

El análisis de coordenadas principales (PCoA) de la diversidad beta filogenética usando la distancia unifracs ponderada (medida cuantitativa de la disimilitud) no detectó diferencias entre la comunidad que incorpora relaciones filogenéticas entre las características de la microbiota fecal de machos y hembras de la especie *Myotis velifer* (Figura 16).

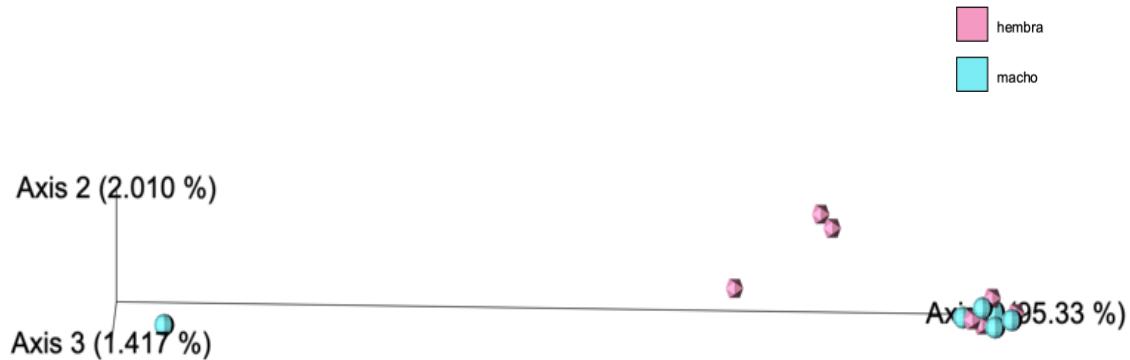


Figura 11 Análisis de componentes principales (PCoA) de la diversidad beta encontrada en la microbiota fecal de hembras y machos *M. velifer*, usando la distancia unifracs ponderada.

El análisis de similitud entre grupos (ANOSIM) de igual manera demostró que no hay diferencias significativas entre el grupo de machos y hembras con valores de  $r = -0.0301$  y  $p = 0.5085$  (Figura 17).

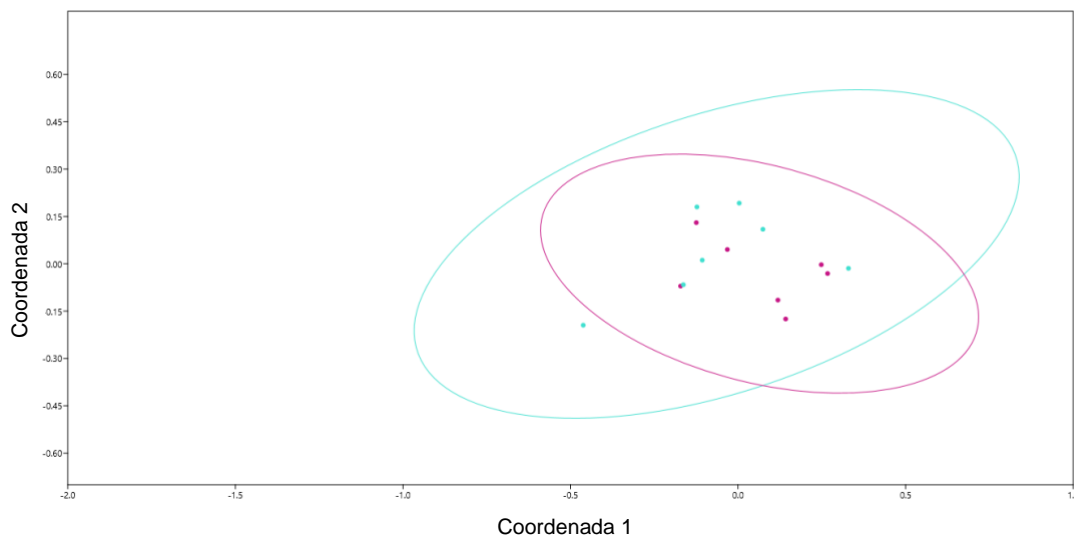


Figura 12 Análisis de similitud entre machos (azul) y hembras (rosa) (ANOSIM).

## 9 Discusión

Existen varios estudios sobre la microbiota fecal de murciélagos insectívoros silvestres, sin embargo, hasta donde sabemos, este es el primero en caracterizar la microbiota fecal del murciélago *Miotis* mexicano (*M. velifer*). Como insectívoro, el murciélago *Miotis* mexicano se alimenta de insectos que contienen comunidades de microorganismos que pueden llegar a formar parte de su microbiota intestinal.

Aquí se reporta que la microbiota fecal del murciélago *M. velifer* está dominada por los filos Pseudomonadota, Fusobacteriota, Bacillota, Synergistota, Bacteroidota y Desulfobacterota. Este hallazgo es consistente con estudios previos de la microbiota intestinal y fecal hallada previamente para otros murciélagos; por ejemplo, en la microbiota intestinal de los murciélagos fitófagos (nectarívoros y frugívoros) e insectívoros del sur de China, en ambos gremios, la microbiota estuvo dominada por Pseudomonadota, Bacillota y Bacteroidota (Li et al., 2018; Sun et al., 2020). En murciélagos de herradura menor domina Pseudomonadota, seguido de Bacillota (Selvin et al., 2019). En la microbiota bacteriana fecal del murciélago insectívoro *Mops condylurus*, fueron Bacillota y Pseudomonadota (Edenborough et al., 2020) y en dos murciélagos insectívoros (*Rhinolophus sinicus* y *Myotis altarium*) en tres diferentes fuentes de muestreo (intestino delgado, intestino grueso y heces) el filo más dominante fue Pseudomonadota, mientras que Fusobacteriota fue el menos dominante (Wu et al., 2019).

A diferencia de los resultados obtenidos de la investigación de Wu y colaboradores (2019), en este estudio se halló que el filo Fusobacteriota fue el segundo filo dominante con un 23% en la microbiota fecal de *M. velifer*. Por otro lado, el filo Bacteroidota presente en la microbiota fecal con un 3%, coincide con el estudio de Phillips, en el cual, Bacteroidota comprendía sólo el 1% de la microbiota total (Phillips et al., 2012), un filo con poca predominancia en murciélagos pero dominante en la mayoría de mamíferos terrestres (Sun et al., 2020). Ocupando el 2% de la microbiota fecal total, el filo Desulfobacterota es un grupo de bacterias que se han reportado en entornos marinos, realizando tareas vitales en los ciclos biogeoquímicos del carbono, azufre y nutrientes

(Langwig et al., 2022), y en los flagelados intestinales (interacción simbiótica intracelular entre *Adiutrix intracelularis* y *Trichonympha collaris*) que se encuentran considerablemente distribuidas en el tracto intestinal de termitas y cucarachas (Ikeda-Ohtsubo et al., 2016). Por lo anterior, se puede inferir que la presencia de este filo en la microbiota fecal de *M. velifer* se debió a la transferencia de las bacterias desde la presa y por su dieta (Galicía et al., 2014).

Un hallazgo notable en este estudio es el primer reporte del filo Synergistota en la microbiota de murciélagos. Este filo que comprendió el 5% de la microbiota fecal total de *M. velifer*, el cual se ha descrito solo en el tracto intestinal porcino (Leser et al., 2002), de termitas (Hongoh et al., 2003) y en la boca humana (Wade, 2013): Este grupo de bacterias se caracterizan por ser degradadoras anaeróbicas de aminoácidos, las cuales pueden estar involucradas en el intercambio de aminoácidos en los ecosistemas anaeróbicos naturales (Godon et al., 2005; Jumas-Bilak et al., 2007).

En cuanto a la composición a nivel de familia, se identificaron 33 familias, siendo Fusobacteriaceae, Enterobacteriaceae y Rhodospirillaceae las más abundantes. Las dos primeras caracterizadas por ser patógenos potencialmente oportunistas y reportados en diferentes proporciones en la microbiota oral, gastrointestinal (Daniel et al., 2013; Wu et al., 2019) y fecal (Li et al., 2018) de los murciélagos. Por otro lado, la tercera familia no ha sido reportada en murciélagos, este grupo de bacterias tienen una gran variedad de hábitats, que van desde tejidos vegetales, suelos contaminados con petróleo hasta en ambientes acuáticos como océanos y agua estancada (Baldani et al., 2014).

Nuestros resultados resaltan la dominancia del género *Cetobacterium*, también dominante en la microbiota fecal de peces de agua dulce, en donde fungen como productores de vitamina B12, la cual se distribuye en todo el tracto intestinal para su correcto funcionamiento (Tsuchiya et al., 2008; Ramírez et al., 2018). Por lo que, se puede especular que están realizando la misma función en el tracto intestinal de *M. velifer*, ya que esta vitamina no es sintetizada por animales o plantas, si no, por algunas bacterias y arqueas (Watanabe & Bito, 2018). Cabe mencionar, que este género se ha

aislado a partir de heces de mamíferos marinos (Foster et al., 1995) y humanos (Finegold et al., 2003).

El segundo género en dominar la microbiota fecal de *M. velifer* es *Haematospirillum*, descrito como un posible patógeno infeccioso emergente y aislado por primera vez en sangre humana por Humrighouse y colaboradores en el 2016, posteriormente fue hallado en la sangre de un ave insectívora (Hornok et al., 2018). Este hallazgo constituye la primera evidencia molecular de la aparición de esta especie en la microbiota fecal de murciélagos. Este género se distingue por producir sulfuro de hidrógeno, lo que sugiere que coadyuva en la descomposición de materia orgánica en la microbiota fecal (Humrighouse et al., 2016).

En cuanto a los machos reproductivamente activos e inactivos, se observaron diferencias en la composición y las abundancias relativas, esto podría deberse a que muchos de los factores internos y externos que dan forma al contenido y la composición de la microbiota, son difíciles de determinar debido al extremo dinamismo de las comunidades microbianas, tanto que estas pueden variar considerablemente entre los miembros de una sola especie, y en los individuos a lo largo del tiempo (Degnan et al., 2012). Por otro lado, los géneros bacterianos que dominaron la microbiota fecal de los individuos activos e inactivos, además de *Cetobacterium*, fueron *Caccocola*; la cual fue identificada a través de análisis metagenómicos en 2021 por Gilroy y colaboradores a partir de heces de gallina; *Entomobacter*; aislada a partir del intestino de la cucaracha sibilante de Madagascar (*Gromphadorhina portentosa*) (Guzman et al., 2021); *Enterocloster*; bacterias descritas como patógenos oportunistas y comúnmente halladas en el intestino de humanos (Haas & Blanchard, 2020); y *Saezia*, perteneciente al orden Burkholderiales, representados por organismos fijadores de nitrógeno, entre otros (Medina-Pascual et al., 2020). Tomando en cuenta lo anterior, estos géneros bacterianos no tienen más de 4 años que se describieron, por lo que este sería el primer reporte en la microbiota fecal de un murciélago insectívoro del continente americano.

Tanto en machos como hembras hubo diferencias en la composición de filos, familias y géneros. Los machos presentaron los 8 filos, 30 de 33 familias y 40 de 48 géneros, es decir, el 61% de la riqueza descrita para la microbiota fecal del murciélago *M. velifer*. Por otro lado, en las hembras se identificaron 6 de 8 filos, 17 de 33 familias y 21 de 48 géneros, lo que equivale al 39% de la riqueza total caracterizada. Cabe destacar que, Pseudomonadota fue el filo más abundante, este resultado es consistente con la investigación de Banskar y colaboradores en el 2016; así como Fusobacteriaceae y *Cetobacterium* fueron la familia y el género dominantes en ambos sexos, pero con diferencias en la abundancia relativa.

Por otro lado, los análisis tanto de diversidad alfa (filogenética y taxonómica) y beta (PCoA UNIFRAC y ANOSIM) indicaron que no existen diferencias significativas entre sexos, coincidiendo con los resultados obtenidos por Vengust y colaboradores (2018).

Una posible limitante de la caracterización de la microbiota fecal es el uso de sacos de manta no estériles para la recolección de los individuos y las muestras fecales. Sin embargo, para aminorar este sesgo se realizaron dos controles negativos, uno genómico y uno cultivable; en el análisis del control genómico se identificaron 4 filos en el saco de manta, siendo Pseudomonadota el más dominante (84%), por otro lado, en el análisis del control cultivable se aislaron un total de 9 bacterias del saco de manta, más de la mitad pertenecientes al filo Bacillota y 33.33% a Actinomycetota; los géneros identificados, como *Micrococcus* y *Bacillus* son consistentes con la contaminación ambiental común. Estos resultados respaldan la eficacia de los controles negativos y la calidad del análisis bioinformático.

## 10 Conclusión

El estudio detallado sobre la microbiota fecal del murciélago *Myotis velifer* usando técnicas de secuenciación masiva revela una composición diversa y distintiva en comparación con otros murciélagos estudiados previamente. La presencia dominante de los filos Pseudomonadota, Fusobacteriota, Bacillota, Synergistota, Bacteroidota y Desulfobacterota, junto con la identificación de 33 familias y la prevalencia de géneros

como *Cetobacterium* y *Haematospirillum*, proporciona una visión única de la microbiota de este insectívoro a lo largo de su extensa distribución geográfica. Aunque se observan similitudes con estudios previos en murciélagos, como la prevalencia de Pseudomonadota, este estudio destaca diferencias notables, como la presencia significativa de Fusobacteriota. Por otro lado, resulta notable la identificación de diferencias en la composición de la microbiota entre machos y hembras de *M. velifer*, a pesar de la ausencia de diferencias significativas en los análisis de diversidad alfa y beta. Además, esta investigación resalta la necesidad del trabajo constante en esta rama, ya que, conforme van surgiendo nuevas especies de bacterias, van surgiendo nuevos enigmas que resolver sobre la microbiota de estos mamíferos voladores.

Aunque se reconocen limitaciones, la presencia de bacterias no identificadas en una proporción significativa de la microbiota total señala áreas de incertidumbre y destaca la necesidad de investigaciones adicionales para comprender completamente la diversidad microbiana en este contexto.

## 11 Perspectivas

En última instancia, este estudio amplía significativamente nuestro entendimiento de la microbiota fecal del murciélago insectívoro *Myotis velifer* y sienta las bases para investigaciones adicionales sobre las implicaciones funcionales de estas comunidades microbianas en la fisiología y ecología de los murciélagos. Estos hallazgos pueden tener implicaciones no solo para la biología de *M. velifer*, sino también para tener una comprensión más amplia sobre la ecología y la salud de los quirópteros y sus roles en los ecosistemas en los que se desenvuelven.

Las diferencias observadas en la composición microbiana entre sexos y la presencia de filos poco comunes en murciélagos subrayan la necesidad de investigaciones adicionales para comprender completamente la complejidad de la interacción huésped-microorganismo.

## 12 Anexos

<b>Muestra</b>	<b>Sexo</b>	<b>Condición</b>	<b>Edad</b>
bat13h	Hembra	Inactivo	Adulto
bat14h	Hembra	Inactivo	Adulto
bat15h	Hembra	Inactivo	Adulto
bat18h	Hembra	Inactivo	Adulto
bat21h	Hembra	Inactivo	Adulto
bat25h	Hembra	Inactivo	Adulto
bat26h	Hembra	Inactivo	Adulto
bat9m	Macho	Activo	Adulto
bat11m	Macho	Activo	Adulto
bat16m	Macho	Activo	Adulto
bat23m	Macho	Inactivo	Adulto
bat27m	Macho	Inactivo	Adulto
bat28m	Macho	Inactivo	Adulto
bat12m	Macho	Indefinido	Indefinido

*Tabla 1* Datos de los murciélagos presentados en los resultados.

## 13 Bibliografía

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Amato, K. R., Yeoman, C. J., Kent, A., Righini, N., Carbonero, F., Estrada, A., Rex Gaskins, H., Stumpf, R. M., Yildirim, S., Torralba, M., Gillis, M., Wilson, B. A., Nelson, K. E., White, B. A., & Leigh, S. R. (2013). Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *The ISME Journal*, 7(7), 1344–1353. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.16>

Arita, H. T. (1993). Conservation Biology of the Cave Bats of Mexico. *Journal of Mammalogy*, 74(3), 693–702. <https://doi.org/10.2307/1382291>

Ávila Torresagatón, L. G. (2008). Estimación mediante un sistema audiovisual de las poblaciones de cuatro especies de murciélagos en cinco refugios cavernícolas de la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla, estado de Morelos, México [Licenciatura]. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Ávila Torresagatón, L. G., & Fuentes Vargas, L. (2020). La biodiversidad en Morelos, Estudio de Estado 2: Vol. III (1ra ed.). [https://biodiversidad.morelos.gob.mx/sites/biodiversidad.morelos.gob.mx/files/files/La%20biodiversidad%20en%20Morelos\\_Vol\\_III.pdf](https://biodiversidad.morelos.gob.mx/sites/biodiversidad.morelos.gob.mx/files/files/La%20biodiversidad%20en%20Morelos_Vol_III.pdf)

Ayala-Berdon, J., Solís-Cárdenas, V., Ayala-Berdon, J., & Solís-Cárdenas, V. (2017). New record and site characterization of a hibernating colony of *Myotis velifer* in a mountain ecosystem of central Mexico. *Therya*, 8(2), 171–174. <https://doi.org/10.12933/therya-17-469>

Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5717), 1915–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>

Baldani, J. I., Videira, S. S., dos Santos Teixeira, K. R., Reis, V. M., de Oliveira, A. L. M., Schwab, S., de Souza, E. M., Pedraza, R. O., Baldani, V. L. D., & Hartmann, A. (2014). The Family Rhodospirillaceae. En E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria* (pp. 533–618). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1\\_300](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_300)

Banskar, S., Mourya, D. T., & Shouche, Y. S. (2016). Bacterial diversity indicates dietary overlap among bats of different feeding habits. *Microbiological Research*, 182, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.10.006>

Barone, R., De Santi, C., Palma Esposito, F., Tedesco, P., Galati, F., Visone, M., Di Scala, A., & De Pascale, D. (2014). Marine metagenomics, a valuable tool for enzymes

and bioactive compounds discovery. *Frontiers in Marine Science*, 1. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2014.00038>

Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., & Gregory Caporaso, J. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>

Brucker, R. M., & Bordenstein, S. R. (2012). The Roles of Host Evolutionary Relationships (genus: *Nasonia*) and Development in Structuring Microbial Communities. *Evolution*, 66(2), 349–362. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01454.x>

Budd, K., Gunn, J. C., Finch, T., Klymus, K., Sitati, N., & Eggert, L. S. (2020). Effects of diet, habitat, and phylogeny on the fecal microbiome of wild African savanna (*Loxodonta africana*) and forest elephants (*L. cyclotis*). *Ecology and Evolution*, 10(12), 5637–5650. <https://doi.org/10.1002/ece3.6305>

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

Campillo-Castro, A., González, E., Aguilera, U., & Ramírez-Pulido, J. (2005). *Myotis velifer*. 293–295.

Carrillo-Araujo, M., Taş, N., Alcántara-Hernández, R. J., Gaona, O., Schondube, J. E., Medellín, R. A., Jansson, J. K., & Falcón, L. I. (2015). Phyllostomid bat microbiome composition is associated to host phylogeny and feeding strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6, 447. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00447>

Ceballos, G., & Oliva, G. (2005). Los mamíferos silvestres de México. Fondo de Cultura Económica.

Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>

Coates, R., Ramírez-Lucho, I., González-Christen, A., Coates, R., Ramírez-Lucho, I., & González-Christen, A. (2017). Una lista actualizada de los murciélagos de la región de Los Tuxtlas, Veracruz. *Revista mexicana de biodiversidad*, 88(2), 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.03.015>

COESBIO. (2018, abril 21). Área Natural Protegida Refugio de vida silvestre Cueva El Salitre. Biodiversidad, Morelos. COESBIO. <https://biodiversidad.morelos.gob.mx/cuevaelsalitre>

Daniel, D. S., Ng, Y. K., Chua, E. L., Arumugam, Y., Wong, W. L., & Kumaran, J. V. (2013). Isolation and identification of gastrointestinal microbiota from the short-nosed fruit bat *Cynopterus brachyotis brachyotis*. *Microbiological Research*, 168(8), 485–496. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.04.001>

De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., & Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14691–14696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>

Degnan, P. H., Pusey, A. E., Lonsdorf, E. V., Goodall, J., Wroblewski, E. E., Wilson, M. L., Rudicell, R. S., Hahn, B. H., & Ochman, H. (2012). Factors associated with the diversification of the gut microbial communities within chimpanzees from Gombe National Park. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(32), 13034–13039. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110994109>

Dinan, T. G., Stilling, R. M., Stanton, C., & Cryan, J. F. (2015). Collective unconscious: How gut microbes shape human behavior. *Journal of Psychiatric Research*, 63, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.02.021>

Edenborough, K. M., Mu, A., Mühldorfer, K., Lechner, J., Lander, A., Bokelmann, M., Couacy-Hymann, E., Radonic, A., & Kurth, A. (2020). Microbiomes in the insectivorous bat species *Mops condylurus* rapidly converge in captivity. *PLoS ONE*, 15(3), e0223629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223629>

Elizalde-Arellano, C., & López-Vidal, J. (2022). Compendio de los llamados de ecolocalización de los murciélagos insectívoros mexicanos.

Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Falcón, L. I., Bonilla-Rosso, G., Ramírez-Barahona, S., Eguiarte, L. E., & Souza, V. (2014). Comparación de tres métodos moleculares para el análisis de procariontes ambientales en el mar del canal de Yucatán, México. *Hidrobiológica*, 24(3), 257–270.

Finegold, S. M., Vaisanen, M.-L., Molitoris, D. R., Tomzynski, T. J., Song, Y., Liu, C., Collins, M. D., & Lawson, P. A. (2003). *Cetobacterium somerae* sp. Nov. From Human Feces and Emended Description of the Genus *Cetobacterium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(2), 177–181. <https://doi.org/10.1078/072320203322346010>

Fitch, J. H., Shump, K. A., Jr., & Shump, A. U. (1981). *Myotis velifer*. *Mammalian Species*, 149, 1–5. <https://doi.org/10.2307/3504035>

Fleischer, R., Schmid, D. W., Wasimuddin, Brändel, S. D., Rasche, A., Corman, V.

M., Drosten, C., Tschapka, M., & Sommer, S. (2022). Interaction between MHC diversity and constitution, gut microbiota and Astrovirus infections in a neotropical bat. *Molecular Ecology*, 31(12), 3342–3359. <https://doi.org/10.1111/mec.16491>

Foster, G., Ross, H. M., Naylor, R. D., Collins, M. D., Ramos, C. P., Fernandez Garayzabal, F., & Reid, R. J. (1995). *Cetobacterium ceti* gen. Nov., sp. Nov., a new gram-negative obligate anaerobe from sea mammals. *Letters in Applied Microbiology*, 21(3), 202–206. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1995.tb01041.x>

Fox, J., & Weisberg, S. (2019). *An R Companion to Applied Regression* (3rd ed.). <https://www.john-fox.ca/Companion/index.html>

Franzosa, E. A., Hsu, T., Sirota-Madi, A., Shafquat, A., Abu-Ali, G., Morgan, X. C., & Huttenhower, C. (2015). Sequencing and beyond: Integrating molecular ‘omics for microbial community profiling. *Nature reviews. Microbiology*, 13(6), 360–372. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3451>

Fuentes Vargas, L. (2011). Tamaño y composición de dos colonias de maternidad del murciélago *Myotis velifer* en el estado de Morelos [Licenciatura]. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Galicia, M. M., Buenrostro, A., & García, J. (2014). [Specific bacterial diversity in bats of different food guilds in Southern Sierra Oaxaca, Mexico]. *Revista De Biología Tropical*, 62(4), 1673–1681.

Gandara, G., Sandoval, A., & Cienfuegos, C. (2006). Valoración económica de los servicios ecológicos que prestan los murciélagos “*Tadarida brasiliensis*” como controladores de plagas en el norte de México. Escuela de Graduados en Administración Pública y Políticas Públicas, Campus Monterrey, Working Papers.

Gaona, O., Cerqueda-García, D., Falcón, L. I., Vázquez-Domínguez, G., Valdespino-Castillo, P. M., & Neri-Barrios, C.-X. (2019). Microbiota composition of the dorsal patch of reproductive male *Leptonycteris yerbabuena*. *PLoS ONE*, 14(12), e0226239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226239>

Gaona, O., Cerqueda-García, D., Moya, A., Neri-Barrios, X., & Falcón, L. I. (2020). Geographical separation and physiology drive differentiation of microbial communities of two discrete populations of the bat *Leptonycteris yerbabuena*. *MicrobiologyOpen*, 9(6), 1113–1127. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1022>

Gaona, O., Gómez-Acata, E. S., Cerqueda-García, D., Neri-Barrios, C. X., & Falcón, L. I. (2019). Fecal microbiota of different reproductive stages of the central population of the lesser-long nosed bat, *Leptonycteris yerbabuena*. *PLoS ONE*, 14(7), e0219982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219982>

Gilroy, R., Ravi, A., Getino, M., Pursley, I., Horton, D. L., Alikhan, N.-F., Baker, D., Gharbi, K., Hall, N., Watson, M., Adriaenssens, E. M., Foster-Nyarko, E., Jarju, S., Secka,

A., Antonio, M., Oren, A., Chaudhuri, R. R., La Ragione, R., Hildebrand, F., & Pallen, M. J. (2021). Extensive microbial diversity within the chicken gut microbiome revealed by metagenomics and culture. *PeerJ*, 9, e10941. <https://doi.org/10.7717/peerj.10941>

Godon, J.-J., Morinière, J., Moletta, M., Gaillac, M., Bru, V., & Delgènes, J.-P. (2005). Rarity associated with specific ecological niches in the bacterial world: The 'Synergistes' example. *Environmental Microbiology*, 7(2), 213–224. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00693.x>

Guzman, J., Sombolestani, A. S., Poehlein, A., Daniel, R., Cleenwerck, I., Vandamme, P., & Vilcinskis, A. (2021). *Entomobacter blattae* gen. Nov., sp. Nov., a new member of the Acetobacteraceae isolated from the gut of the cockroach *Gromphadorhina portentosa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(3), 004666. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004666>

Gweon, H. S., Shaw, L. P., Swann, J., De Maio, N., AbuOun, M., Niehus, R., Hubbard, A. T. M., Bowes, M. J., Bailey, M. J., Peto, T. E. A., Hoosdally, S. J., Walker, A. S., Sebra, R. P., Crook, D. W., Anjum, M. F., Read, D. S., Stoesser, N., Abuoun, M., Anjum, M., ... on behalf of the REHAB consortium. (2019). The impact of sequencing depth on the inferred taxonomic composition and AMR gene content of metagenomic samples. *Environmental Microbiome*, 14(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40793-019-0347-1>

Haas, K. N., & Blanchard, J. L. (2020). Reclassification of the *Clostridium clostridioforme* and *Clostridium sphenoides* clades as *Enterocloster* gen. Nov. And *Lacrimispora* gen. Nov., including reclassification of 15 taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), 23–34. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003698>

Hammer, T. J., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Jaffe, S. P., & Fierer, N. (2017). Caterpillars lack a resident gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(36), 9641–9646. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707186114>

Hayward, B. J. (1928). THE NATURAL HISTORY OF THE CAVE BAT, *MYOTIS VELIFER*. - ProQuest. <https://www.proquest.com/openview/de065f06c541bf3b75d7f8b6cff129a5/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>

Hird, S. M. (2017). Evolutionary Biology Needs Wild Microbiomes. *Frontiers in Microbiology*, 8, 725. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00725>

Hoffmann, A., Palacios-Vargas, G., & Morales-Malacara, B. (1986). (MANUAL DE BIOESPELEOLOGÍA (CON NUEVAS APORTACIONES DE MORELOS Y GUERRERO, MEXICO). 280.

Hongoh, Y., Ohkuma, M., & Kudo, T. (2003). Molecular analysis of bacterial

microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiology Ecology*, 44(2), 231–242. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00026-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00026-6)

Hornok, S., Ágh, N., Takács, N., Kontschán, J., & Hofmann-Lehmann, R. (2018). *Haematospirillum* and insect *Wolbachia* DNA in avian blood. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(3), 479–483. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0961-0>

Hsieh, T. C., Ma, K. H., & Chao, A. (2016). iNEXT: An R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution*, 7(12), 1451–1456. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12613>

Huang, Y., Sun, Y., Huang, Q., Lv, X., Pu, J., Zhu, W., Lu, S., Jin, D., Liu, L., Shi, Z., Yang, J., & Xu, J. (2022). The Threat of Potentially Pathogenic Bacteria in the Feces of Bats. *Microbiology Spectrum*, 0(0), e01802-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01802-22>

Humrighouse, B. W., Emery, B. D., Kelly, A. J., Metcalfe, M. G., Mbizo, J., & McQuiston, J. R. (2016). *Haematospirillum jordaniae* gen. Nov., sp. Nov., isolated from human blood samples. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109(4), 493–500. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0654-0>

Ikeda-Ohtsubo, W., Strassert, J. F. H., Köhler, T., Mikaelyan, A., Gregor, I., McHardy, A. C., Tringe, S. G., Hugenholtz, P., Radek, R., & Brune, A. (2016). ‘Candidatus *Adiutrix intracellularis*’, an endosymbiont of termite gut flagellates, is the first representative of a deep-branching clade of Deltaproteobacteria and a putative homoacetogen. *Environmental Microbiology*, 18(8), 2548–2564. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13234>

Illumina. (2020). 16S Sequencing Method Guide. [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/gated/10228\\_Targeted\\_Metagenomics\\_Methods%20Guide.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/gated/10228_Targeted_Metagenomics_Methods%20Guide.pdf)

Illumina. (2021). Shotgun Metagenomics Methods Guide. [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/gated/10143\\_Shotgun\\_Metagenomics\\_Methods\\_Guide.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/gated/10143_Shotgun_Metagenomics_Methods_Guide.pdf)

Ingala, M. R., Simmons, N. B., Wultsch, C., Krampis, K., Speer, K. A., & Perkins, S. L. (2018). Comparing Microbiome Sampling Methods in a Wild Mammal: Fecal and Intestinal Samples Record Different Signals of Host Ecology, Evolution. *Frontiers in Microbiology*, 9, 803. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00803>

Jumas-Bilak, E., Carlier, J.-P., Jean-Pierre, H., Citron, D., Bernard, K., Damay, A., Gay, B., Teyssier, C., Campos, J., & Marchandin, H. (2007). *Jonquetella anthropi* gen. Nov., sp. Nov., the first member of the candidate phylum ‘Synergistetes’ isolated from man. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(12), 2743–2748. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65213-0>

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>

Kunz, T. H. (1974). Feeding Ecology of a Temperate Insectivorous Bat (*Myotis Velifer*). *Ecology*, 55(4), 693–711. <https://doi.org/10.2307/1934408>

Langwig, M. V., De Anda, V., Dombrowski, N., Seitz, K. W., Rambo, I. M., Greening, C., Teske, A. P., & Baker, B. J. (2022). Large-scale protein level comparison of Deltaproteobacteria reveals cohesive metabolic groups. *The ISME Journal*, 16(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01057-y>

Leser, T. D., Amenuvor, J. Z., Jensen, T. K., Lindecrona, R. H., Boye, M., & Møller, K. (2002). Culture-Independent Analysis of Gut Bacteria: The Pig Gastrointestinal Tract Microbiota Revisited. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 673–690. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.673-690.2002>

Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P., Ramey, R. R., Bircher, J. S., Schlegel, Michael. L., Tucker, T. A., Schrenzel, M. D., Knight, R., & Gordon, J. I. (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5883), 1647–1651. <https://doi.org/10.1126/science.1155725>

Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2008). Worlds within worlds: Evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature reviews. Microbiology*, 6(10), 776–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1978>

Li, J., Li, L., Jiang, H., Yuan, L., Zhang, L., Ma, J., Zhang, X., Cheng, M., & Chen, J. (2018). Fecal Bacteriome and Mycobioime in Bats with Diverse Diets in South China. *Current Microbiology*, 75(10), 1352–1361. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1530-0>

Lozupone, C. A., Hamady, M., Kelley, S. T., & Knight, R. (2007). Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1576–1585. <https://doi.org/10.1128/AEM.01996-06>

Martínez Méndez, L. A. (2014, mayo 22). Determinación de marcadores serotoninérgicos en el testículo y epidídimo del murciélago *Myotis velifer* durante su ciclo reproductivo. Universidad Autónoma Metropolitana. <https://doi.org/10.24275/uami.1g05fb752>

McDonald, D., Hyde, E., Debelius, J. W., Morton, J. T., Gonzalez, A., Ackermann, G., Aksenov, A. A., Behsaz, B., Brennan, C., Chen, Y., DeRight Goldasich, L., Dorrestein,

P. C., Dunn, R. R., Fahimipour, A. K., Gaffney, J., Gilbert, J. A., Gogul, G., Green, J. L., Hugenholtz, P., ... Knight, R. (2018). American Gut: An Open Platform for Citizen Science Microbiome Research. *mSystems*, 3(3), e00031-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00031-18>

McDonald, D., Jiang, Y., Balaban, M., Cantrell, K., Zhu, Q., Gonzalez, A., Morton, J. T., Nicolaou, G., Parks, D. H., Karst, S., Albertsen, M., Hugenholtz, P., DeSantis, T., Song, S. J., Bartko, A., Havulinna, A. S., Jousilahti, P., Cheng, S., Inouye, M., ... Knight, R. (2022). Greengenes2 enables a shared data universe for microbiome studies (p. 2022.12.19.520774). *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.12.19.520774>

McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., DeSantis, T. Z., Probst, A., Andersen, G. L., Knight, R., & Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME Journal*, 6(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139>

Medina-Pascual, M. J., Monzón, S., Villalón, P., Cuesta, I., González-Romo, F., & Valdezate, S. (2020). *Saezia sanguinis* gen. Nov., sp. Nov., a Betaproteobacteria member of order Burkholderiales, isolated from human blood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(3), 2016–2025. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004010>

Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 1–8. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>

Montes-Carretero, L. M., Aguirre-Noyola, J. L., Solís-García, I. A., Ortega, J., Martínez-Romero, E., & Guerrero, J. A. (2021). Diverse methanogens, bacteria and tannase genes in the feces of the endangered volcano rabbit (*Romerolagus diazi*). *PeerJ*, 9, e11942. <https://doi.org/10.7717/peerj.11942>

Mosca, A., Leclerc, M., & Hugot, J. P. (2016). Gut Microbiota Diversity and Human Diseases: Should We Reintroduce Key Predators in Our Ecosystem? *Frontiers in Microbiology*, 7, 455. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00455>

Muegge, B. D., Kuczynski, J., Knights, D., Clemente, J. C., González, A., Fontana, L., Henrissat, B., Knight, R., & Gordon, J. I. (2011). Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6032), 970–974. <https://doi.org/10.1126/science.1198719>

Nossa, C. W., Oberdorf, W. E., Yang, L., Aas, J. A., Paster, B. J., DeSantis, T. Z., Brodie, E. L., Malamud, D., Poles, M. A., & Pei, Z. (2010). Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 16(33), 4135–4144. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i33.4135>

Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & the UGENE team. (2012). Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>

Phillips, C. D., Phelan, G., Dowd, S. E., McDONOUGH, M. M., Ferguson, A. W., Delton Hanson, J., Siles, L., Ordóñez-Garza, N., San Francisco, M., & Baker, R. J. (2012). Microbiome analysis among bats describes influences of host phylogeny, life history, physiology and geography. *Molecular Ecology*, 21(11), 2617–2627. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05568.x>

R Core Team. (2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing [Software]. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>

Ramírez, C., Coronado, J., Silva, A., & Romero, J. (2018). *Cetobacterium* Is a Major Component of the Microbiome of Giant Amazonian Fish (*Arapaima gigas*) in Ecuador. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 8(11), 189. <https://doi.org/10.3390/ani8110189>

Russo, D., Salinas-Ramos, V. B., Cistrone, L., Smeraldo, S., Bosso, L., & Ancillotto, L. (2021). Do We Need to Use Bats as Bioindicators? *Biology*, 10(8), 693. <https://doi.org/10.3390/biology10080693>

Scott, K. P., Gratz, S. W., Sheridan, P. O., Flint, H. J., & Duncan, S. H. (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research*, 69(1), 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.020>

Selvin, J., Lanong, S., Syiem, D., De Mandal, S., Kayang, H., Kumar, N. S., & Kiran, G. S. (2019). Culture-dependent and metagenomic analysis of lesser horseshoe bats' gut microbiome revealing unique bacterial diversity and signatures of potential human pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 137, 103675. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103675>

Sharon, G., Segal, D., Ringo, J. M., Hefetz, A., Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2010). Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(46), 20051–20056. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009906107>

Smith, K., McCoy, K. D., & Macpherson, A. J. (2007). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Seminars in Immunology*, 19(2), 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.10.002>

Solari, S. (2018). IUCN Red List of Threatened Species: *Myotis velifer*. IUCN Red List of Threatened Species. <https://www.iucnredlist.org/es>

Solli, L., Håvelsrud, O. E., Horn, S. J., & Rike, A. G. (2014). A metagenomic study of the microbial communities in four parallel biogas reactors. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0146-2>

Sommer, F., & Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota—Masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>

Sun, D.-L., Gao, Y.-Z., Ge, X.-Y., Shi, Z.-L., & Zhou, N.-Y. (2020). Special Features of Bat Microbiota Differ From Those of Terrestrial Mammals. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1040. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01040>

Taylor, M. (2019). *Bats an illustrated guide to all species (I)*. Ivy Press.

The Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>

Tsuchiya, C., Sakata, T., & Sugita, H. (2008). Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Letters in Applied Microbiology*, 46(1), 43–48. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02258.x>

Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., Vargas-Albores, F., Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., & Vargas-Albores, F. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias marinas*, 41(4), 297–313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>

Vela Hinojosa, C. (2013). Descripción histológica y expresión de la serotonina en la glándula mamaria del murciélago *Myotis velifer*: Aspectos relevantes durante la lactancia (p. 0c483j68r) [Maestría en Biología, Universidad Autónoma Metropolitana]. <https://doi.org/10.24275/uami.0c483j68r>

Vengust, M., Knapic, T., & Weese, J. S. (2018). The fecal bacterial microbiota of bats; Slovenia. *PLoS ONE*, 13(5), e0196728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196728>

Verhulst, N. O., Qiu, Y. T., Beijleveld, H., Maliepaard, C., Knights, D., Schulz, S., Berg-Lyons, D., Lauber, C. L., Verduijn, W., Haasnoot, G. W., Mumm, R., Bouwmeester, H. J., Claas, F. H. J., Dicke, M., Loon, J. J. A. van, Takken, W., Knight, R., & Smallegange, R. C. (2011). Composition of Human Skin Microbiota Affects Attractiveness to Malaria Mosquitoes. *PLOS ONE*, 6(12), e28991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028991>

Viquez-R, L., Speer, K., Wilhelm, K., Simmons, N., Medellín, R. A., Sommer, S., & Tschapka, M. (2021). A Faithful Gut: Core Features of Gastrointestinal Microbiota of Long-Distance Migratory Bats Remain Stable despite Dietary Shifts Driving Differences in Specific Bacterial Taxa. *Microbiology Spectrum*, 9(3), e0152521. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01525-21>

Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research*, 69(1), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.006>

Watanabe, F., & Bito, T. (2018). Vitamin B12 sources and microbial interaction. *Experimental Biology and Medicine*, 243(2), 148–158. <https://doi.org/10.1177/1535370217746612>

Wu, H., Xing, Y., Sun, H., & Mao, X. (2019). Gut microbial diversity in two insectivorous bats: Insights into the effect of different sampling sources. *MicrobiologyOpen*, 8(4), e00670. <https://doi.org/10.1002/mbo3.670>

Yildirim, S., Yeoman, C. J., Sipos, M., Torralba, M., Wilson, B. A., Goldberg, T. L., Stumpf, R. M., Leigh, S. R., White, B. A., & Nelson, K. E. (2010). Characterization of the Fecal Microbiome from Non-Human Wild Primates Reveals Species Specific Microbial Communities. *PLoS ONE*, 5(11), e13963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013963>

Yin, Z., Sun, K., Li, A., Sun, D., Li, Z., Xiao, G., & Feng, J. (2020). Changes in the gut microbiota during Asian particolored bat (*Vespertilio sinensis*) development. *PeerJ*, 8, e9003. <https://doi.org/10.7717/peerj.9003>

Zárate, D., Serrato, A., & López-Wilchis, R. (2012). Importancia ecológica de los murciélagos. 85, 19–27.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD  
DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Secretaría de Extensión

Licenciatura en Biología, Programa Educativo de Calidad.

Cuernavaca, Morelos a 10 de abril de 2024

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**

P R E S E N T E

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **Hanya Denis Arellano Hernández**, con el título del trabajo: **Caracterización de la microbiota fecal del murciélago *Myotis velifer***. En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis como lo marca el artículo 6° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: DR. EDGAR DANTAN GONZÁLEZ

---

SECRETARIO: DRA. ROSA GABRIELA BELTRÁN LÓPEZ

---

VOCAL: DR. JOSÉ ANTONIO GUERRERO ENRÍQUEZ

---

SUPLENTE: DRA. OSIRIS GAONA PINEDA

---

SUPLENTE: DRA. MARÍA ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO

---



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Unidad Biomédica,  
Tel. (777) 329 7047, 329 7000, Ext. 3527 / titulaciones.biologia@uaem.mx

**UAEM**  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**MARÍA ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO | Fecha:2024-04-11 18:33:45 | Firmante**

AAupb4mlpcc+Q908ONhgScKIbM2nQv+6sQpGDD3354llkqthU0GDNzwl76gM0sCt/ulLuhY3sOJK4MUrriNhp/t3XxJx8ew3XIQZGiyepRueTY9fqvGRwV+wcF+HVfndVK41N3tAYDQPK2JtFiMsbgyghpvFWhZrxEinalX/Gf+Ho2WWzS8XpN6aghl2fzKL9su6iui56wN0BSWZBh8IAZ+Q7o8n9GPehg9/OxjX2C9vQ4PINXJxrLowJx+zUFwvZX7N++zrOsXlq7aoR NhwU4KC0jx0kjd/r7MU8coTLAxXyresj7oB9Ty5w1hbwWZ4AO8hVvBKdt4AazmPraprQ==

**EDGAR DANTAN GONZALEZ | Fecha:2024-04-12 08:56:50 | Firmante**

S86j4w6brGklwl5M0odehO9bHPXDpjA6/COLpoVZdNq6vTBaUovWmSA3A0sqRZn5cYU2UVelDRTXQGaFNGHtFw7t/emU8nCAgWu3qTcjBw0pvhZxI8x4eh6J8X6F/Bvp8O5dH4Pkc9bPzrcCkXWfa1tU/MIMogYyPP9svqg276+JL8G+1acC4BJ14Q5LRnPFxdzJpPXQs8QU8lsQJtftUg0YgnYkDqyO80QZS/o6PQJ0NxtLycCuphzuN0GRyh3qno/7mSokGuKhjwr4aepNxCr9vCPxKdP2TJ66JY001lF0d9eRkNUORELacwbR/QwNRGJbjogFJKdPFQV8Z5N7g==

**OSIRIS GAONA PINEDA | Fecha:2024-04-16 15:07:57 | FIRMANTE**

JyJgPc6BIQgyvV5hkLsT8XE3xsJSkegLqdEjAfcRL2u/3UzFst4ap6wKtyxZ2yb3iPUzRjye3QMD7RUTwxzWLMRaZaA0T4glHAtS2ZqkqWA+b7nRYNjAJuUpwiNOllctWNcKiU+sazDY08HPaAP6nXzdS0dxufZ3J0vtFO585s7FY6bkhMfmCpBe544+iWTM3VKKIoV+fodP0BNQFyICEwdLlx6SdmUPd1ain606gL0e+npIQAxz0IHby6H9N4jCTcamQ8Ohg71mXJJDKwzlw7Xf8rRINhnO/V62+eJzqxM9KzFRiAo8yKS7ZmPLGHUOaFOgu0B592lRnrqourzQ==

**JOSE ANTONIO GUERRERO ENRIQUEZ | Fecha:2024-04-24 19:18:45 | FIRMANTE**

ixPu9GwK+9Y1qjEuhgvoFob87eK4Hd6iJv4y8jokxWDoqEKdK+PHzOIF6kgoIQ5FS9FTYdlh84A3lZrHS00VEmnPjHo6VqqhscK8cdAwlueWOWSmi6BQqrYigBFh2XBqjFwgdZ/S TcvSkriZX2SefwNQVDpmDWua5lYJgApPGWB7UHEQWplmUkV4q24yErf00Emav3w3+UYh0t2MdcTVp1bf7Nc9SpyQF5mBtS7J4A5SfY7xMVvd8jl/CVgyZK2qjrsNOejYKuMhWI QOfC6yCWDztSuqaVHwlojm3c6pzFpZvtTOK0ldnQBxrebuVMxTYK2p49hX5u7kVNRx6fY1A==

**ROSA GABRIELA BELTRAN LOPEZ | Fecha:2024-04-25 20:57:14 | FIRMANTE**

QOLOyGafcAA5i+ip+rM3PnWQ3Z5wjlx2Utn5emCXAIBVHoubNW29uoM/J34mgWfuQHtBpg0pOs63rWkHcPwGwRD3F4XxXPSd+jtVl0LJNt4Hv+EkG2Fjft2aDSI/TP4cDkSCW9j HMwJHCvliWFdMJe89z0JDqHZTF3mMRK3WYQWbGWtGTiSCUG3fP31touM962hO67YyYUlhRKLjDzWKZ71XdHpTl3hPQe+1FnyMlM1LbvdAi2qwOt4WWBI4gkcc7Xy95hZ mXL+WtAwSfp8HHznDn+YIEJyOpgHyAwywWi8t2Au7syoJVJVwj4UI45xVD+kul1v/DC5Gxtc0EJA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



IN3yKo1Jg

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/JQ3ZYOh6jvSjfPhmAu6MOIE1cfBzIXS>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029