

Estudio preliminar de identificación bioquímica de Enterobacterias en heces de Coyote (*Canis latrans*) en vida salvaje y cautiverio

Preliminary study of Enterobacterias biochemical identification present in Coyote (Canis latrans) faeces in captive and wildlife

Estephanía Rustrían-Fernández¹, Dilan Ramírez-Martínez¹,
Gabriela Solano-García¹ y Martha Adriana De Anda-Hernández^{1,2}.

¹Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad Simón Bolívar, México

²Centro de Investigación y Estudios Avanzados, IPN, México.

estaphania08@gmail.com

dyl_retrovirus@hotmail.com.ar

gabysolanog_93@live.com.mx

deandahernandezmartha@gmail.com

Recepción: 17 de junio de 2013

Aceptación: 9 de octubre de 2013

(pp. 121 - 132)

Resumen

El Coyote (*Canis latrans*) es el carnívoro más estudiado de América debido a su amplia distribución territorial a través del continente. En México las investigaciones documentadas acerca del coyote se centran principalmente en los hábitos alimenticios del animal y no en su microbiota, específicamente en las Enterobacterias con las que interactúan. El presente trabajo tiene como objetivo principal la identificación bioquímica de Enterobacterias presentes en heces fecales de Coyote, analizando la posible relación con su microbiota en vida silvestre y condiciones de cautiverio. En muestras obtenidas de animales de vida libre, se encontró de manera abundante géneros como *Klebsiella* spp, *Enterobacter* sp y *Escherichia coli*, todas ellas relacionadas a una microbiota gastrointestinal fisiológica de acuerdo a su alimentación omnívora. Adicionalmente se reportan cepas levaduriformes pertenecientes a *Shizosaccharomycetales*. El género *Klebsiella* también está presente en muestras de animales en condiciones de cautiverio, y adicionalmente la posible presencia de bacterias patógenas asociadas a sus hábitos alimenticios. Este primer acercamiento al conocimiento de bacterias asociadas al tracto intestinal del coyote abre un área de estudio para monitoreo de la especie en dos condiciones de vida.

Palabras clave: *Canis latrans*, Enterobacterias, Pruebas bioquímicas, silvestre, confinamiento

Abstract

The Coyote (*Canis latrans*) is the most studied of American carnivore due to its wide geographical distribution across the continent. Mexico documented research about Coyote focus primarily on eating habits of the animal and not into bacterial interactions. The present study has as main objective the biochemical identification of Enterobacteriaceae present in Coyote feces, analyzing the possible relationship to their microbiota in the wild and captive conditions. We find a high presence of genera such as *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp

and *Escherichia coli*. All of them are related to physiological gastrointestinal microbiota, according to their omnivorous diet. In addition, the presence of yeast strains belonging to *Shizosaccharomycetales* in wildlife is reported. *Klebsiella sp* is also present in captive animal samples, but also suggest the presence of pathogenic related to a possible foodborne infection in captivity conditions. This initial study opens a new way of coyote monitoring in two different lifestyles.

Keywords: *Canis latrans*, *Enterobacteriaceae*, Biochemical tests, wild, confinement

Introducción

El término microbiota intestinal se refiere a la comunidad de microorganismos vivos residentes en el intestino (Icaza-Chávez, 2012). La familia *Enterobacteriaceae*, que forma parte de la microbiota intestinal, está conformada por bacilos Gram negativos. Son anaerobios facultativos que tienen como hábitat el suelo, cuerpos de agua y el intestino de una amplia variedad de animales, constituyendo el conjunto mayor y más heterogéneo de importancia médica (García *et. al.*, 1998; González *et. al.*, 2010). Se han descrito al menos 27 géneros con más de 110 especies. La clasificación de éstas se basa inicialmente en la determinación de diferentes enzimas involucradas en el metabolismo bacteriano. Por ello las pruebas bioquímicas consideran la presencia de dichas enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano.

Estas enzimas pueden ser evidenciadas en medios de cultivo específicos que contienen los substratos sobre los cuales ejercen su función metabólica, junto con un sistema indicador que pone de manifiesto la presencia de un metabolito específico. Las *Enterobacterias* no sólo son de importancia médica, sino también tienen una fuerte influencia en el área de la veterinaria. Se ha demostrado que existe una similitud importante entre la microbiota del humano con la de los perros (*Canis familiaris*) (Swanson *et. al.*, 2011), e incluso que esta relación tiene influencias en la salud humana (Thomson *et. al.*, 1994). A pesar de las investigaciones dirigidas al estudio de la microbiota específicamente del perro y su impacto en su crianza y salud (Simpson *et. al.*, 2002; O'Mahony *et. al.*, 2009), muy poco se sabe acerca de la microbiota de otros cánidos. Un estudio reciente tuvo como objetivo conocer la microbiota presente en materia fecal de lobos (*Canis lupus*), en donde se muestra por primera vez la diversidad bacteriana y además con diferencias de grupos taxonómicos predominantes

muy diversos a los mencionados para otros mamíferos (Zhang y Cheng, 2010). Mencionado lo anterior, es interesante el considerar cuál pudiera ser el caso de otros caninos de vida salvaje, como el coyote.

El coyote (*Canis latrans*) es el carnívoro más estudiado en América, principalmente en Estados Unidos y Canadá, debido a su amplia distribución en América del Norte (Aranda *et. al.*, 1995; Grajales *et. al.*, 2009). Algunos de los estudios enfocados al conocimiento de la interacción bacteriana con estos cánidos emplean el análisis de muestras de suero para identificar anticuerpos que reconozcan de manera específica bacterias patógenas con las que el coyote haya interactuado. Los resultados obtenidos por Chang y colaboradores (2001) mencionan que de muestras de suero obtenidas de 17 coyotes que vivían en condiciones salvajes, 8 de ellas presentaron resultados positivos en pruebas de microaglutinación para la detección de *Leptospira interrogans*, en lo que se sugiere la participación del coyote como un reservorio para esta bacteria (Hernández, 2010).

En un estudio similar pero en donde los animales a los cuales se les tomó la muestra se encontraban en condiciones de cautiverio, también se reportó la presencia de anticuerpos dirigidos al género *Leptospira sp.* (Luna, 1996). Por otra parte, durante 4 años se realizaron pruebas serológicas en los coyotes silvestres residentes en el Parque Nacional de Yellowstone, con el objetivo de analizar la presencia de anticuerpos en los coyotes ante diversos tipos de virus específicos de caninos y ante bacterias como *Brucella spp.* y *Leptospira interrogans*. Mientras que la totalidad de coyotes adultos presentaban dichos anticuerpos específicos, revelando la interacción de los coyotes con ambos géneros bacterianos en alguna etapa de su vida, sólo algunos resultados de los animales jóvenes fueron positivos a las pruebas

serológicas. Estos resultados sugieren que la interacción bacteriana de estos animales pudiera variar durante su desarrollo y que, eventualmente, tienen contacto con las bacterias mencionadas (Gese, 2011). Si bien estos estudios nos dan un primer acercamiento referente a las interacciones bacterianas que presentan los coyotes, no nos permiten relacionarlos con sus hábitos alimenticios. Conocer los hábitos alimenticios y la calidad de vida de estos animales nos daría herramientas no sólo para conocer mejor su importancia ecológica, sino para realizar un monitoreo de la población con fines veterinarios o epidemiológicos.

En México, no se ha realizado un estudio enfocado al coyote e interacción bacteriana. En un estudio inicial, Grajales y colaboradores realizaron una investigación sobre la dieta de estos animales donde se logró conocer por medio de las excretas de los cánidos los taxos animales y vegetales que fueron consumidos en las temporadas de verano e invierno (Grajales *et. al.*, 2003). Estos estudios arrojaron una primera evidencia acerca de los hábitos alimenticios de los coyotes en la región norte del país. Sin embargo, poco se sabe de la relación que tendría la dieta de estos animales con su microbiota intestinal, y de manera específica, con las Enterobacterias residentes en estos animales. Este trabajo abordó por primera ocasión la identificación de bacterias presentes en muestras fecales de coyote, considerando su posible diversidad debido a su tipo de alimentación basado en su lugar de vivienda.

Objetivo General

Identificar las posibles Enterobacterias presentes en la microbiota del Coyote (*Canis latrans*), a partir de análisis de excretas y su posible relación con su alimento y ecosistema.

Objetivos Específicos

Realizar la identificación bioquímica de Enterobacterias en excretas de *Canis latrans* en condiciones de cautiverio y de vida silvestre.

Analizar la posible relación que existe entre las condiciones de vida del coyote y la presencia de determinadas Enterobacterias en su microbiota.

Método

Se obtuvieron muestras de heces de coyote *Canis latrans* en diferentes condiciones de vida: la primera fue recolectada en el área natural protegida de Cuatro Ciénegas, Coahuila. La segunda muestra fue obtenida de coyotes en cautiverio residentes en el zoológico de los Coyotes, en la ciudad de México. Las muestras se transportaron y mantuvieron en refrigeración hasta su inoculación.

A partir de las muestras biológicas obtenidas de excretas de coyote *Canis latrans* en condiciones de cautiverio y vida silvestre se realizaron siembras bacteriológicas en medio de cultivo LB-Agar. Posteriormente las colonias obtenidas en estos crecimientos iniciales se sembraron en medios selectivos y diferenciales para distinguir las Enterobacterias, para lo cual se utilizaron medio Eosin-Methyl-Blue (EMB) y Mac Conkey. Una vez obtenidas cepas puras se prosiguió a elaborar las pruebas bioquímicas en los medios Citrato de Simmons, Agar SIM y caldo Rojo metilo-Vogues Proskauer (MR-VP). Como muestras de referencia se utilizaron cultivos axénicos de *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*

Al total de colonias aisladas se les realizó tinción Gram para su clasificación. Para la identificación de levaduras se utilizó el medio Agar Maíz elaborado con harina de maíz marca Maseca. A su vez, se realizaron tinciones con yodo y azul algodón.

Resultados

Las muestras obtenidas de los coyotes (figura 1) en vida silvestre se obtuvieron en los senderos recreativos cercanos a la Poza Azul, ubicada en el área natural protegida de Cuatro Ciénegas, Coahuila. De las características morfológicas a destacar de la muestra fue su riqueza en semillas de mezquite, su firme consistencia y color café claro. Por otro lado, las muestras obtenidas de animales en cautiverio fueron amablemente proporcionadas por la actual administración del Zoológico de los Coyotes, ubicado en la Ciudad de México. A diferencia de las características morfológicas observadas en la muestra antes mencionada, la materia fecal presentó una coloración más oscura, menor consistencia, ausencia evidente de semillas y olor fétido evidente.

La identificación bioquímica de Enterobacterias se determinó mediante el crecimiento de colonias y respuesta a las diferentes pruebas bioquímicas en diversos medios específicos y selectivos. Los datos obtenidos en el crecimiento bacteriano se ajustaron mediante 3 métodos experimentales; 1) por factor de crecimiento y propagación de colonias para Enterobacterias en Agar EMB, Agar Mac Conkey; 2) tinción Gram, para la selección de colonias Gram Negativos y 3) el crecimiento de cepas puras para la identificación en pruebas bioquímicas específicas tales como Citrato de Simmons, Rojo de metilo, Vogues- Proskauer, SIM (pruebas de Sulfito, Indol y Motilidad) Agar EMB y Agar Mac Conkey.

Figura 1. Área natural protegida Cuatro Ciénegas, Coahuila (A). Zoológico de los Coyotes, México D.F. (B). Imagen del Coyote (*Canis latrans*) residente en Cuatro Ciénegas, Coahuila (C)

A



B

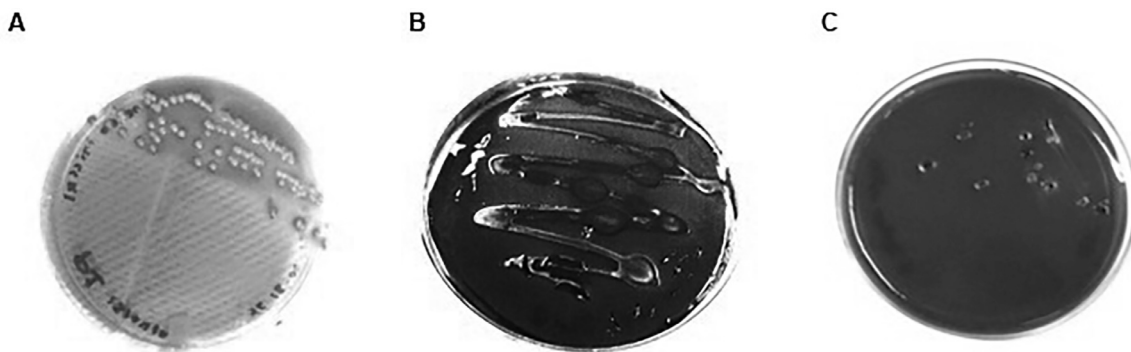


C



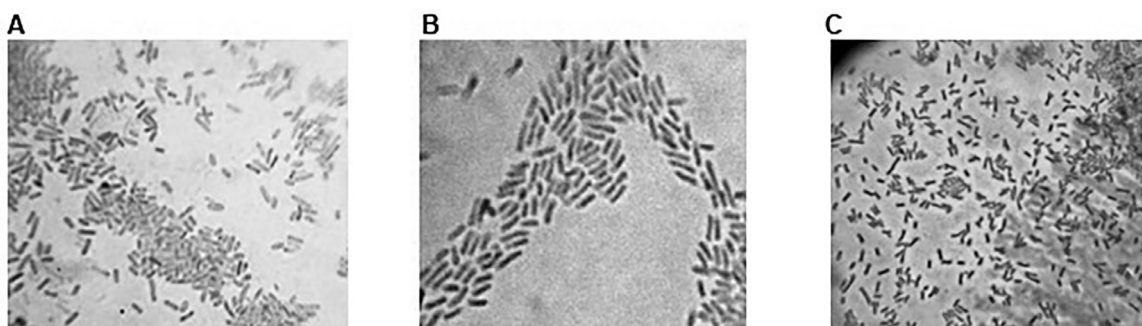
De acuerdo con la caracterización de las diferentes cepas obtenidas en las muestra de material fecal de animales en vida salvaje, se pudo determinar la presencia elevada de bacterias coliformes como *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli.* y *Enterobacter spp.* En la figura 2 se observa el crecimiento en placa de Agar Mac Conkey para *Klebsiella*, donde se observan colonias redondas de bordes lisos (figura 2A). En esta imagen también podemos observar placas de Agar EMB con crecimiento de colonias de coloración metálica correspondientes a *Escherichia coli* (figura 2B) y *Enterobacter sp.* (figura 2C).

Figura.2. Respuesta a crecimiento microbiano para medios específicos en Agar Mac Conkey y EMB A) *Klebsiella spp.* B) *Escherichia coli.*, C) *Enterobacter spp.*



Posteriormente, se realizó una tinción Gram para confirmar este crecimiento en placa, notándose la clásica morfología de bacilos Gram negativos para los tres géneros encontrados (figura 3).

Figura 3. Tinción Gram, para identificación de colonias bacterianas pertenecientes a familia *Enterobacteriaceae*, Gram negativos; géneros A) *Klebsiella spp.*, B) *Escherichia coli* C) *Enterobacter spp.*



Se realizaron pruebas bioquímicas correspondientes a la identificación de miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. En la figura 4 se muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos en cada género estudiado. A su vez, en la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en estas pruebas que nos permitieron identificar de manera precisa lo observado previamente.

Figura 4. Datos obtenidos a partir de la respuesta a crecimiento bacteriano en pruebas bioquímicas: A) prueba Rojo de Metilo, B) Prueba Vogues Proskauer, C) Citrato de Simmons, D) Prueba SIM: producción de sulfito y E) Prueba SIM: Motilidad

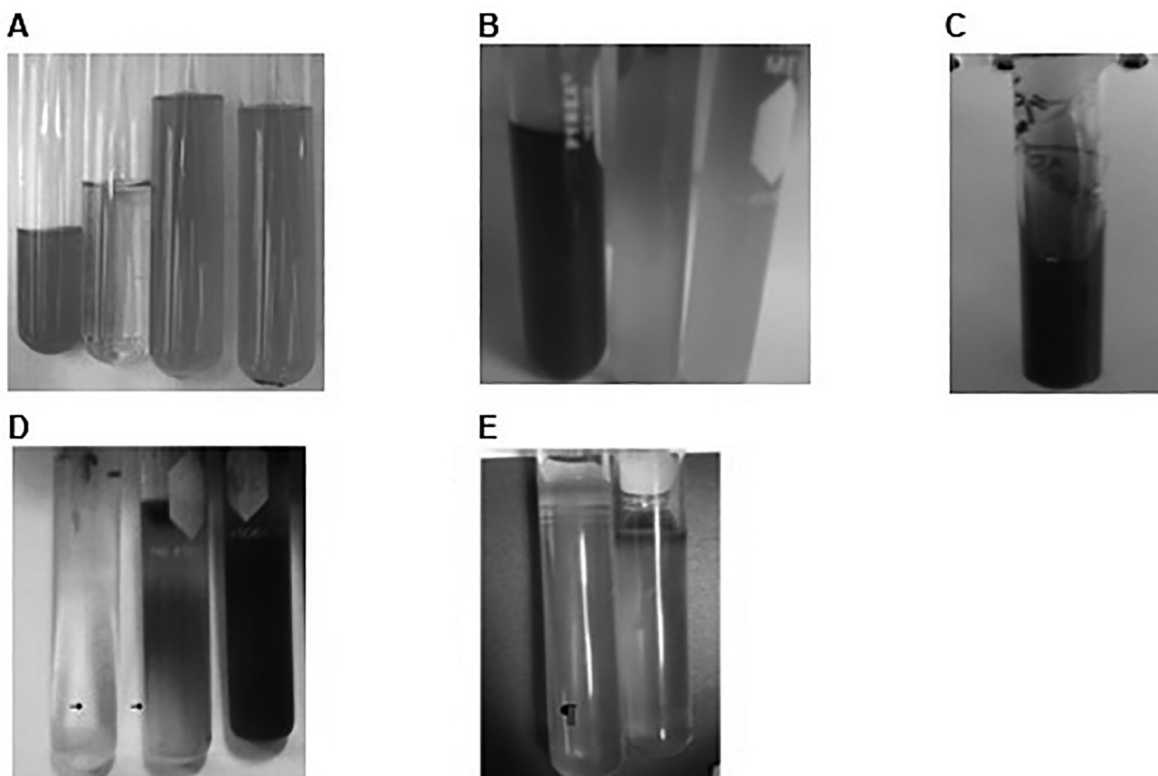
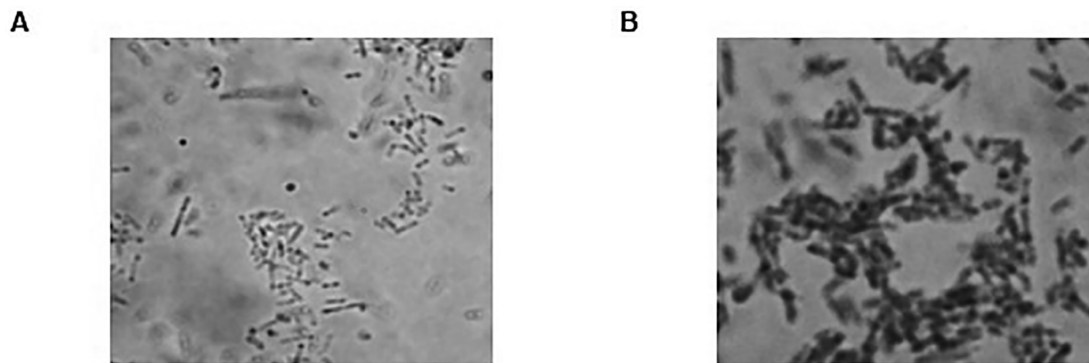


Tabla 1. Resultados obtenidos en pruebas bioquímicas para los diferentes géneros de Enterobacterias presentes en muestras fecales de coyotes en vida libre

Prueba bioquímica/ Enterobacteria	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter</i>
Citrato de Simmons	+	-	+
Rojo de Metilo	-	+	-
Prueba Sulfitos (SIM)	-	-	-
Prueba Indol (SIM)	-	+	-
Prueba motilidad (SIM)	-	+	+
Vogues Proskauer	-	-	+

Adicional a las bacterias que pudimos identificar, notamos la presencia de levaduras en los cultivos. Se cultivaron en Agar Maíz para su aislamiento. Para su identificación se realizaron dos tinciones específicas de levaduras: tinción con yodo y tinción con azul algodón. La figura 5 nos muestra la morfología propia del grupo de los Schizosaccharomycetales.

Figura 5. Observación de microorganismos con forma levaduriforme perteneciente a Schizosaccharomycetales, (A) tinción con yodo 100X. (B) tinción Azul de algodón 100X, a partir del crecimiento en Medio EMB



De manera contrastante, en las muestras obtenidas de coyotes de vida en cautiverio solo pudimos identificar al género *Klebsiella* (figura 6A, 7A), y además notamos la presencia de una bacteria Gram negativa con morfología de cocos. Se realizaron pruebas bioquímicas para su caracterización (figura 6B-C; 7B).

Figura 6. Cepa pura obtenida de crecimiento en EMB de *Klebsiella* sp. (A). Morfología de la colonia en medio EMB (B) y Mac Conkey (C) del coco

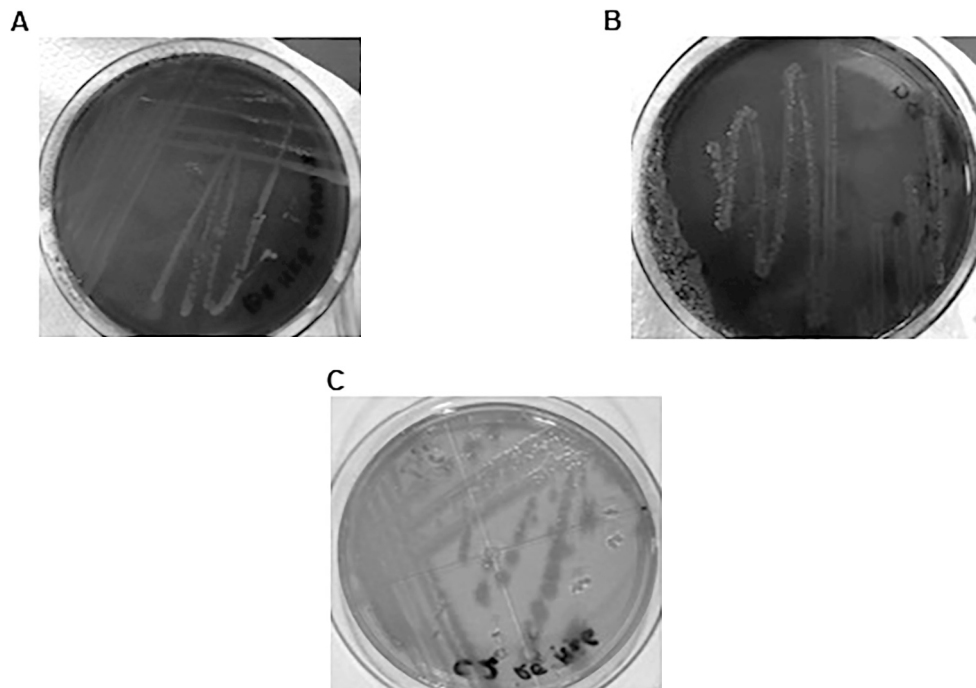
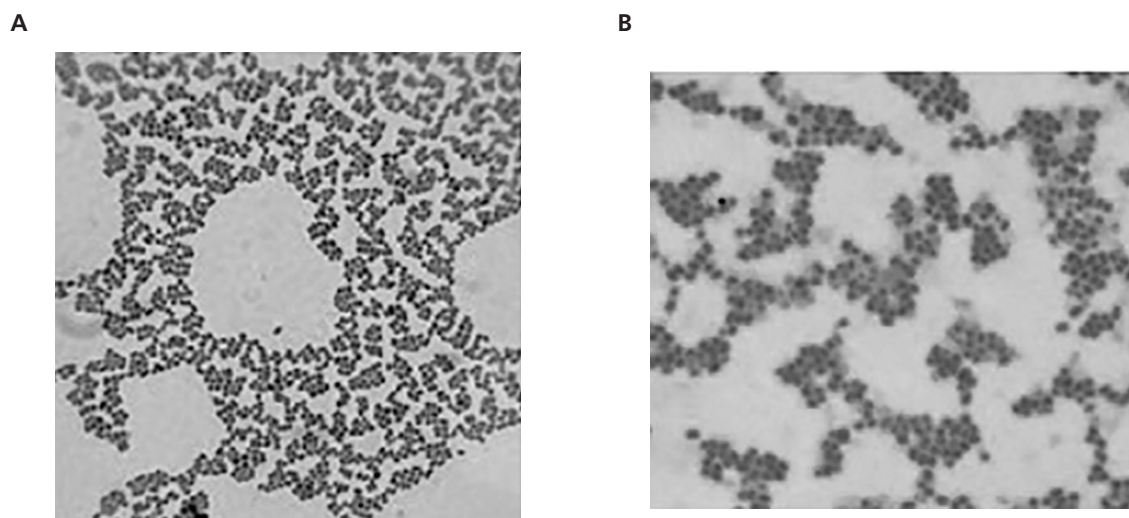


Figura 7. Tinción Gram de cepas aisladas de muestras de heces de *Canis latrans* en cautiverio (A) *Klebsiella sp.* (B) cocos gram negativos



Al analizar los resultados obtenidos en las diferentes pruebas bioquímicas, se pudo mostrar la elevada sobrevivencia y respuestas de *Klebsiella spp* a las diferentes condiciones empleadas en los medios específicos como Rojo de Metilo, SIM (prueba Sulfito e Indol), Vogues Proskauer. Los resultados en propagación y respuesta en Agar Mac Conkey y Agar EMB el crecimiento colonial de *Klebsiella spp* fue característicos en la mayoría de los medios de cultivo.

Tabla 2. Resultados obtenidos en pruebas bioquímicas para los diferentes géneros de Enterobacterias presentes en muestras fecales de coyotes en vida en cautiverio

Prueba bioquímica/ Enterobacteria	<i>Klebsiella sp.</i>	Coco gram negativo.
Citrato de Simmons	-	-
Rojo de Metilo	+	+
Prueba Sulfitos (SIM)	-	-
Prueba Indol (SIM)	-	+
Prueba motilidad (SIM)	-	-
Vogues Proskauer	-	-

Discusión

Diversos estudios han sido enfocados a los hábitos alimenticios del coyote. Es de esperarse que los estudios que hablan sobre la microbiota del animal, sean mínimos de acuerdo con este enfoque. Esta investigación arrojó un primer reporte de algunos miembros de la microbiota intestinal del coyote. Adicionalmente, se comparó

entre la microbiota existente entre animales de vida silvestre y ejemplares de cautiverio, para estimar si existe una relación importante y significativa entre el tipo de alimentación y la forma de vida del animal con respecto a su microbiota normal.

En el estudio realizado en las excretas de coyote, fue posible la identificación de Enterobacterias por medio de la obtención de cepas puras y la aplicación de pruebas bioquímicas (MacFaddin, 2000). El proceso se llevó a cabo por medios de cultivo EMB (Eosin Metil Blue) que permitió la purificación de las cepas, ya que es un medio específico para bacterias Gram-negativas y de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Además es un medio diferencial que permite analizar la capacidad de las bacterias de fermentar o no la lactosa o sacarosa. Este medio permitió realizar una identificación preliminar de dos de las cepas obtenidas en el análisis de las excretas, las cuales fueron *Escherichia coli* y *Enterobacter*. En el caso de *E.coli* se presentó el crecimiento de una colonia mucosa y cóncava que presentaba un brillo metálico, que es una característica de crecimiento en el medio EMB de la cepa. *Enterobacter* se caracterizó por presentar colonias mucosas de color morado con un centro oscuro, lo cual indicaba que se trataba de una bacteria fermentadora de lactosa. La tercer cepa que se identificó fue *Klebsiella sp.*, la cual se aisló en el medio Mac Conkey, el cual también es específico de Enterobacterias fermentadoras positivas de lactosa. Se dedujo el género por el aspecto mucoso, rosado y de borde redondo, considerando también el cambio de coloración de rojo a rosa que presentó el medio de cultivo, al promover su crecimiento en medio Mac Conkey (Ausina. V y Moreno S, 2006; MacFaddin, 2000).

Al tener las cepas puras y la identificación preliminar de dichos géneros, se prosiguió a realizar las pruebas bioquímicas de cada cepa en medio Citrato Simmons, medio SIM y medio RM-VG, que se divide en rojo de metilo y Vogues-Proskauer. En el análisis de resultados, todas las cepas analizadas presentaron un resultado negativo a la utilización del citrato como única fuente de carbono y a la capacidad de fermentar el carbono absorbiendo el nitrógeno del amonio y convertirlo en amoniaco, por lo que el medio no presentó un cambio en la coloración de verde a azul. El medio SIM, es un medio que evalúa tres pruebas, producción de sulfitos, movilidad y producción de indol. En cuanto a motilidad *E.coli* y *Enterobacter* fueron positivos debido al enturbiamiento del medio a la presencia de flagelos

en las bacterias, los cuales no presenta *Klebsiella* por lo que su resultado fue negativo, presentaron resultados positivos *Klebsiella* y *Enterobacter* en la producción de sulfitos ya que son capaces de utilizar el hierro, el azufre y la peptona para producir sulfuro ferroso que es lo que lleva a que se forme el precipitado negro en el medio. Por último la prueba indol sólo dio positivo para *Klebsiella*, en donde se esperaba un resultado negativo, al igual que en el caso de *Enterobacter*. La única prueba positiva debió de ser para *E.coli*, debido a que es una bacteria que presenta la enzima triptofanasa que metaboliza el aminoácido triptófano a indol, dándose una coloración roja debido a la reacción y al reactivo de Kovac (Ausina y Moreno, 2006; García-del Valle y Zamudio, 1998).

En la prueba de rojo de metilo, la cual es una prueba cuantitativa de la producción de ácidos fuertes por medio de la fermentación de la glucosa, se presentó un resultado positivo para *E.coli* y *Klebsiella*. En cambio en Vogues-Porskauer sólo fue positivo *Enterobacter*, indicando con esto que *Enterobacter* es capaz de fermentar la glucosa presente en el medio y generar butanodiol, debido a que es una bacteria generadora de este compuesto por naturaleza. En el resto de las cepas observamos un resultado negativo porque fermentan ácidos mixtos, pero no antes mencionados. La presencia de las bacterias identificadas en este trabajo; en vida silvestre; tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, y *Enterobacter sp.*; es debido a que son bacterias que se encuentran normalmente en el tracto digestivo, en específico en el intestino grueso y finales del delgado, tanto de humanos como en animales homeotérmicos, esto se debe a que la importancia de dichas bacterias se centra en la capacidad de sintetizar vitamina K y reducir los problemas gastrointestinales en la absorción de grasas y nutrientes en el organismo (Ausina y Moreno, 2006; Madigan *et. al.*, 1999).

Un hallazgo que sorprendió al elaborar las tinciones de las cepas, fue encontrar levaduras creciendo junto con bacterias sobre todo en medio LB. De acuerdo a la literatura, esto se debe a que lagomorfos y roedores presentan en su microbiota regular la presencia de levaduras como *Cyniclomyces guttulatus* (anteriormente conocida como *Saccharomycopsis guttulata*) después del destete, y estos animales al ser las principales presas del coyote, funcionan como vectores para la transmisión de las levaduras al coyote. Dicho esto, se puede considerar a la levadura como un microorganismo común dentro

de la microbiota intestinal del coyote. La levadura observada se inoculó en Agar Maíz que permite la diferenciación morfológica de muchos organismos levaduriformes, suprime el crecimiento vegetativo y facilita la esporulación (Guilliermond 1920). En el medio se presentó poco crecimiento, pero se logró obtener la cepa pura. Para identificar la levadura se realizó la tinción con lactofenol azul de algodón para observar la pared del hongo, de acuerdo con la bipartición que presentaban y a su forma ovalada se identificó la levadura como del grupo de los Schizosaccharomycetales. Este resultado es preliminar, pues es necesaria una guía más específica para la identificación específica de la levadura.

De manera interesante, al trabajar con las muestras obtenidas de coyotes residentes en cautiverio, notamos que la única cepa bacteriana que coincidió con la de vida silvestre fue *Klebsiella*, sin embargo presentó una morfología colonial diferente a la obtenida en la muestra de vida silvestre. Y de manera interesante, observamos la presencia de un coco gram negativo en los cultivos. Basándonos en los resultados obtenidos por pruebas bioquímicas sugerimos que pudiera ser una bacteria perteneciente a la familia *Neisseriaceae*, posiblemente del género *Moraxella* sp. (Madigan et al., 1999). Este tipo de bacteria sólo se obtuvo su crecimiento a partir de las muestras proporcionadas por el Zoológico de los Coyotes, en el Distrito Federal. Este tipo de bacterias reside en la microbiota oral de perros y se ha aislado en tres infecciones humanas relacionadas con mordedura de estos animales (Vanechoutte et al., 2000). La posible forma de transmisión de esta bacteria es mediante el contacto directo con las mucosas o saliva de caninos infectados, por ello al encontrar la presencia de *Moraxella* en la muestra fecal de *Canis latrans* nos indica que posiblemente podría adquirirse por la dieta, al ingerir carne contaminada de bovinos u ovinos. Esto a su vez explicaría la diferencia entre la consistencia y olor de las muestras fecales de los animales, y sugerir un estado de salud distinto de los coyotes en cautiverio (Winn et al., 2006).

No obstante, de las especies reportadas de importancia veterinaria, *M. canis*, se caracteriza por formar agrupaciones denominadas diplococos y tener crecimiento negativo en Agar Mac Conkey (Gilardi, 1968). Por ello abrimos la posibilidad que sea otro género. Es posible también que el coco gram negativo que encontramos sea miembro de la familia *Veillonellaceae*, específicamente del género *Veillonella*. Con anterioridad esta familia fue clasificada

como parte de la familia *Neisseriaceae*, de ahí que compartan algunas similitudes bioquímicas. Estas bacterias se han reportado presentes en saliva de diversos mamíferos, incluidos los cánidos. De manera importante, estos organismos no producen indol y tampoco están asociados a olores fétidos (Rogosa, 1964; Madigan et al., 1999). Debido a ello, creemos que se requieren mayores experimentos para conocer el metabolismo y la secuencia de esta bacteria para poder definir el género al que pertenece.


Es necesario resaltar que para el caso de la investigación realizada con excretas de lobo, se observó la presencia mayoritaria de bacterias del grupo de los Clostridiales (53.8% de las unidades operacionales de taxon). De acuerdo con las técnicas empleadas para este primer acercamiento, no podemos inferir otro tipo de grupos más allá de las Enterobacterias. Sin embargo, es importante señalar que este estudio preliminar no descarta la posibilidad de utilizar técnicas de biología molecular tales como análisis de ARN ribosomal 16s (Greetham et al., 2000; Fu et al., 2006), o hibridación *in situ* (Inness et al., 2007) para confirmar la presencia de estos géneros, así como la identificación de otros taxon que por los métodos empleados no hayan sido determinados, como son las bacterias lácticas (O'Mahoney et al., 2009; Rinkinen et al., 2004).

Conclusión

Los bacilos y levaduras pueden formar parte de la microbiota fisiológica de los coyotes en vida libre, debido a que los géneros *Escherichia* y *Klebsiella* se encuentran normalmente en el intestino grueso, así como en el tracto digestivo de sus presas principales. Con respecto a muestras de cautiverio, se puede plantear que la presencia de cocos en las heces nos indica que el animal posiblemente no presenta una microbiota intestinal fisiológica, posiblemente relacionado con sus hábitos alimenticios. Se requieren más estudios y pruebas enfocadas a la identificación más precisa sobre la microbiota de *Canis latrans*.

La investigación realizada en muestras de materia fecal de *Canis latrans* permitirá obtener un conocimiento más profundo de la ecología de la especie, entender la mecánica de sistemas ecológicos y contar con elementos objetivos para la toma de decisiones en materia de manejo y conservación de la especie.

Agradecimientos

Gracias a la Dra. Azucena Herróz Zamorano por el apoyo brindado a esta investigación. Al profesor Alfonso Montañez por su asesoría en la identificación y manejo de levaduras. A la USB por suministrar el material de trabajo y los laboratorios. A la Dirección Técnica y de Investigación y a la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre por brindarnos las muestras de materia fecal de coyotes en cautiverio. 

Referencias

- Aranda, M., López-Rivera, N. y López de Buen, L. (1995). "Hábitos alimentarios del Coyote (*Canis latrans*) en la sierra del Ajusco, México". En: *Acta Zoológica Mexicana*. Xalapa, Veracruz, México: Instituto de Ecología, 65:89-99.
- Ausina, V. y Moreno, S. (2006). *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Chang, C., Kasten, R., Chomel, B., Simpson, D., Hew, C. y Kordick, D. (2001). "Coyote (*Canis latrans*) as the reservoir for a human pathogenic *Bartonella* sp.: Molecular Epidemiology of *Bartonella visonii* subsp. *Berkhoffii* Infection in Coyotes from Central Costa California". En: *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (11):4193-4200.
- Fu, C. J., Carter, J.N., Li, Y., Porter, J. H. y Kerley, M.S. (2006). "Comparison of Agar Plate and real-time PCR on enumeration of *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* and total anaerobic bacteria in dog faeces". En: *Letters in Applied Microbiology*, 42:490-494.
- García-del Valle, A. y Zamudio, M. (1998). *Manual de Microbiología Médica*. México, UNAM: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Gese, E., Schultz, R., Johnson, M., Williams, E., Crabtree, R., y Ruff R. (1997). "Serological survey for diseases in free-ranging coyotes (*Canis latrans*) in yellowstone national park, Wyoming". En: *Journal of Wildlife Disease*. U.S.A.: University of Wisconsin, Department of Wildlife Ecology, 33(1): 47-56.
- Gilardi, G. (1961). "Morphological and Biochemical Differentiation of *Achromobacter* and *Moraxella* (Debord's Tribe Mimeae)". En: *Appl Microbiol.*, 16(1):33-38.
- González- Fuentes, M., Fadua, L., Fernández, F., Villanueva, M., Ulloa, J. y Fernández, H. (2010). "Especies de la familia *Enterobacteriaceae* en heces de lobo marino común, *Otaria flavescens* establecido en río Valdivia". En: *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45(2):331-334.
- Grajales, K., Rodríguez, R. y Cancino, J. (2003). "Dieta estacional del Coyote *Canis latrans* durante el periodo 1996-1997 en el desierto de Vizcaíno, Baja California Sur, México". En: *Acta Zoológica Mexicana*. Xalapa, Veracruz, México: Instituto de Ecología, 89:17 - 28.
- Greetham, H. L., Giffard, C., Hutson, R. A., Collins, M. D. y Gibson, G. R. (2002). "Bacteriology of the Labrador dog gut: a cultural and genotypic approach". En: *Journal of Applied Microbiology*, 93:640-646.
- Guilliermond, A. (1920). *Yeast: culture, identification and microbiology* Stanhope press.
- Hernández, N., López, C. y Guerrero, M. J. (2010). *Seroprevalencia de Leptospira interrogans, hematología y perfil bioquímico en cánidos silvestres del Parque Nacional El Cimatario*. Querétaro. México, 1(2): 121-128.
- Icaza-Chávez, M. E. (2012). "Microbiota intestinal en salud y enfermedad". En: *Rev Gastroenterol Mex.*, 77(1):23-25
- Inness, V. L., McCartney, A. L., Khoo, C., Gross, K. L. y Gibson, G. R. (2007). "Molecular characterisation of the gut microflora of healthy and inflammatory bowel disease cats using fluorescence *in situ* hybridisation with special reference to *Desulfovibrio* spp.". En: *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 91(1-2):48-53.
- Luna, M., Moles, L. P., Torres, J. I. y Gual, F. (1996). "Investigación serológica de leptospirosis en fauna silvestre mantenida en cautiverio en el zoológico de Chapultepec de la Ciudad de México." En: *Vet. Méx.*, 27(3): 229-234.
- MacFaddin, J. (2000). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Montevideo, Uruguay: Ed. Médica Panamericana.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. (1999). *Brock: Biología de los microorganismos*. Madrid, España: Pearson/Prentice Hall.
- O'Mahony, D., Murphy, K. B., MacSharry, J., Boileau, T., Sunvold, G., Reinhart, G., Kiely, B., Shanahan, F. y O'Mahony, L. (2009). "Portrait of a canine probiotic *Bifidobacterium*. From gut to gut", 139 (1-2): 106-112.
- Rinkinen, M. L., Koort, J. M. K., Ouwehand, A. C., Westermarck, E. y Björkroth, K. J. "Streptococcus alactolyticus is the dominating culturable lactic acid bacterium species in canine jejunum and feces of four fistulated dogs". En: *FEMS Microbiology Letters*, 230:35-39.
- Rogosa, M. (1964). "The genus *Veillonella* I: General Cultural, Ecological, and Biochemical Considerations". En: *J. Bacteriol.*, 87(1):162.
- Simpson, J. M., Martineau, B., Jones, W. E., Ballam, J. M. y Mackie, R. I. (2002). "Characterization of fecal bacteria populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber". En: *Microb. Ecol.*, 44:186-197.

- Swanson, K S., Dowd, S. E., Suchodolski, J. S., Middelbos, I. S., Vester, B. M., Barry, K. A., Nelson, K. E., Torralba, M., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Cann, I. K., White, B. A. y Fahey, J. C. (2011). "Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice". En: *The ISME Journal*, 5:639–649.
- Thomson, M. A., Greer, R., Cleghorn, G. J. y Storey, P. (1994). "Canine-human transmission of *Gastrospirillum hominis*". En: *The Lancet*, 343 (8913).
- Vaneechoutte, M., Claeys, G., Steyaert, S., De Baere, T., Peleman, R. y Verschraegen, G. (2000). "Isolation of *Moraxella Canis* from an Ulcerated Metastatic Lymph Node". En: *Journal of clinical microbiology*, 38 (10): 3870–3871.
- Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. y Woods, G. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Ambler, P.A.: Lippincott Williams and Wilkins.
- Zhang, H. y Chen, L. (2010). "Phylogenetic analysis of 16s rRNA genes sequences reveals distal gut bacterial diversity in wild wolves (*Canis lupus*)". En: *Mol. Biol. Rep.*, 37:4013-4022.