



Universidad
Católica de
Valencia
San Vicente Mártir

TFG

TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
CIENCIAS DEL MAR**

Revisión bibliográfica: Estudio de las heces de misticeto como fuente de información.

Alumno: Lorena Giralt Fuixench

Tutor: María García Sanz

Curso académico: 4º Ciencias del Mar



Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Generalidades de los misticetos	3
2.2 Estudio de las heces como fuente de información	5
2.3 Caracterización de las heces de misticeto	6
2.4 Metodología de obtención de muestras fecales de misticeto	7
2.5 Metodología de análisis de muestras fecales de misticeto	8
3. OBJETIVOS	10
4. MATERIAL Y MÉTODOS	11
4.1 Búsqueda bibliográfica	11
4.1.1 Base de datos	11
4.1.2 Ecuaciones de búsqueda	11
4.2 Criterios de inclusión y exclusión	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
5.1 Selección de los artículos obtenidos mediante el análisis bibliográfico	15
5.2 Tipos de estudios a partir del análisis de heces de misticeto	19
5.2.1 Tipos de estudios a partir del análisis de heces de misticeto por año	21
5.2.2 Tipos de estudios a partir del análisis de heces de misticeto por especie	22
5.3 Metodología de análisis de heces de misticeto según el tipo de estudio	24
5.3.1 Fisiología de misticetos	24
5.3.2 Exposición a toxinas marinas	27
5.3.3 Identificación de microorganismos	29
5.3.4 Contaminación marina	32

5.3.5 Productividad primaria marina	32
5.4 Metodología de obtención de heces de misticeto	34
6. CONCLUSIONES	37
7. LÍNEAS FUTURAS	39
8. BIBLIOGRAFÍA	40

1. RESUMEN

Actualmente, muchas especies de misticeto se encuentran en peligro de extinción por causas tales como la contaminación marina, la exposición a toxinas marinas o a microbios patógenos e incluso por causas antropogénicas. Debido a ello, son múltiples los estudios existentes sobre esta superfamilia y el medio en el que habitan a partir del análisis de heces por ser su método de obtención no invasivo y, por lo tanto, no perjudicial para el animal.

En el presente Trabajo Fin de Grado se ha realizado una revisión bibliográfica de los diferentes estudios basados en el análisis de muestras de heces de misticeto publicados durante los últimos 20 años a través de una búsqueda bibliográfica llevada a cabo en la base de datos Web Of Science (WOS).

A partir de los 43 artículos publicados durante el tiempo acotado de búsqueda se ha podido observar que los estudios basados en el análisis de muestras fecales de misticeto abordan el estudio de la fisiología de dichas especies, la exposición a toxinas marinas, la identificación de microorganismos, ya sean patógenos o presas; la contaminación marina y la importancia ecológica que representan en la productividad primaria marina. Asimismo, se ha podido concluir que el método más utilizado para la obtención de muestras es la red de inmersión de nylon de 300µm de malla.

PALABRAS CLAVE: *misticeto, heces, matriz biológica, fisiología, ecología*

ABSTRACT

Currently, many species of mysticete are in danger of extinction due to causes such as marine pollution, exposure to marine toxins or pathogenic microbes, and even anthropogenic causes. Due to this, many studies are being carried out on this superfamily and the environment where they live. These studies are based on the analysis of faeces as they are a non-invasive obtaining method and, therefore, not harmful to the animal.

In this Final Degree Project, a bibliographic review of the different studies based on the analysis of faecal samples of mysticete published during the last 20 years has been done through a bibliographic search on the Web Of Science database (WOS).

From the 43 articles published during the limited search period, it has been observed that the studies based on the analysis of faecal samples of mysticete address the study of the physiology of these species, exposure to marine toxin, the identification of microorganisms, both pathogenic or prey; marine pollution and the ecological importance they represent in primary marine productivity. Likewise, it has been concluded that the most used method for obtaining faecal samples is the 300µm mesh nylon immersion network.

KEY WORDS: *mysticete, faeces, biological matrix, physiology, ecology*

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades de los misticetos

Los misticetos son un grupo de especies de mamíferos marinos pertenecientes a la superfamilia Mysticeti del infraorden de los cetáceos que se conocen comúnmente como ballenas barbadas por poseer barbas en lugar de dientes. Esta superfamilia comprende cuatro familias de organismos exclusivamente filtradores (Tabla 1) cuyas medidas pueden llegar a superar los 30 metros de longitud y las 100 toneladas de peso (Reyes, 2009).

Tabla 1. Taxonomía de las diferentes familias de especies de misticetos. Fuente: Elaboración propia.

Familia	Géneros	Nombre vulgar	Especies
Balaenidae	<i>Balaena</i> (Linnaeus, 1758)	Ballena de Groenlandia	<i>Balaena mysticetus</i> (Linnaeus, 1758)
	<i>Eubalaena</i> (Gray, 1864)	Ballena franca	<i>Eubalaena australis</i> (Desmoulins, 1822)
			<i>Eubalaena glacialis</i> (Müller, 1776)
			<i>Eubalaena japonica</i> (Lacépède, 1818)
Balaenopteridae	<i>Balaenoptera</i> (Lacépède, 1804)	Rorcual	<i>Balaenoptera acutorostrata</i> (Lacépède, 1804)
			<i>Balaenoptera bonaerensis</i> (Burmeister, 1867)
			<i>Balaenoptera borealis</i> (Lesson, 1828)
			<i>Balaenoptera edeni</i> (Anderson, 1878)
			<i>Balaenoptera musculus</i> (Linnaeus, 1758)
			<i>Balaenoptera omurai</i> (Wada, Oishi & Yamada, 2003)
	<i>Balaenoptera physalus</i> (Linnaeus, 1758)		
	<i>Megaptera</i> (Gray, 1864)	Yubarta	<i>Megaptera novaeangliae</i> (Borowski, 1781)
Eschrichtidae	<i>Eschrichtius</i> (Gray, 1864)	Ballena gris	<i>Eschrichtius robustus</i> (Lilljeborg, 1861)
Neobalaenidae	<i>Caperea</i> (Gray, 1864)	Ballena pigmea	<i>Caperea marginata</i> (Gray, 1864)

El rasgo más característico de esta superfamilia, y por lo que se diferencian de los odontocetos, son las barbas, placas triangulares de tejido oral queratinizado que cuelgan del maxilar superior (Werth *et al.*, 2018). Gracias a esta adaptación, los misticetos obtienen el alimento utilizando las barbas como filtros que retienen a las presas en el interior de la boca al ingerir grandes cantidades de agua. De esta manera, pueden alimentarse de copépodos y otros microorganismos pertenecientes al zooplancton de forma pasiva, como en el caso de las especies pertenecientes a las familias Balaenidae y Neobalaenidae (Goldbogen *et al.*, 2017); de krill y otros organismos pertenecientes al micronecton de manera activa, como en el caso de las

especies pertenecientes a la familia Balaenopteridae o de vertebrados bentónicos mediante la succión, como en el caso de la familia Eschrichtiidae (Werth, 2000).

Los misticetos son especies migratorias ya que realizan largas migraciones hacia regiones polares y subpolares para alimentarse durante el verano y hacia regiones tropicales, subtropicales y templadas durante el invierno con fines reproductivos (Reyes, 2009).

Su distribución es mundial ya que encontramos especies cosmopolitas como *Balaenoptera acutorostrata*, *Balaenoptera borealis*, *Balaenoptera musculus*, *Balaenoptera physalus*, y *Megaptera novaeangliae*, pero también especies regionales ya que *Balaena mysticetus* se encuentra únicamente en aguas árticas y subárticas, *Eubalaena australis* se distribuye por el hemisferio sur, *Eubalaena glacialis* por las aguas templadas y subpolares del norte del Atlántico, *Eubalaena japonica* por el norte del Pacífico, *Balaenoptera bonaerensis* por las aguas antárticas, *Balaenoptera edeni* vive prevalentemente en los trópicos, *Balaenoptera omurai* se distribuye por el noroeste y oeste central del Pacífico así como por el océano Índico, *Eschrichtius robustus* se extiende por el océano Pacífico y sus mares adyacentes y *Caperea marginata* por las aguas templadas y subantárticas del hemisferio sur (Jefferson, Leatherwood y Webber, 1993)

Los misticetos, así como el resto de mamíferos marinos, se ven cada vez más afectados por una variedad de impactos que incluyen desde antropogénicos, como son los enredos en aparejos de pesca o la exposición al ruido, hasta el cambio climático global (Hunt *et al.*, 2013). Estos factores, además de afectarles directamente, contribuyen tanto en la disminución de poblaciones de especies como en el impedimento de su recuperación. En particular, los misticetos se vieron afectados por la caza de ballenas, hoy en día prohibida y, actualmente, sufren los efectos que conllevan la contaminación marina, la exposición a toxinas y a agentes patógenos, el tráfico marino y la disminución de sus fuentes de alimentación, entre otros (Reyes, 2009). Es por ello que su estudio puede resultar particularmente útil para su conservación (Hunt *et al.*, 2013), así como fuente de información sobre el papel ecológico que estos mamíferos marinos desempeñan en el medio marino.

Cabe destacar que, a pesar del desafío que supone el estudio de esta superfamilia por estar designada como especie “no capturable” (Hunt *et al.*, 2013), los avances recientes en los métodos de muestreo no letales y no invasivos han conseguido que incluso las especies más grandes de ballenas sean susceptibles de estudio (Hunt, Rolland y Kraus, 2015).

El presente trabajo aborda la importancia que constituyen las muestras de heces de misticeto (método no invasivo) como fuente de información, tanto del estado de las diferentes especies de esta superfamilia como de aspectos ecológicos relacionados con el medio en el que habitan.

2.2 Estudio de las heces como fuente de información

Son diversas las matrices biológicas de los misticetos a partir de las cuáles obtener información relevante sobre diferentes aspectos fisiológicos y ecológicos de misticetos entre las cuales se destacan la sangre, heces, orina, grasa, secreción ocular, vapor respiratorio o las barbas (de Mello y de Oliveira, 2016). No obstante, cuando se requieren muestras de ejemplares vivos, son pocas las opciones válidas ya que algunas matrices únicamente pueden ser obtenidas a partir de individuos muertos. Además, actualmente son pocos los investigadores que trabajan con éxito en la captura, manipulación, muestreo y liberación de cetáceos (Martin y da Silva, 2004). Por ello, las heces constituyen una buena opción como matriz biológica de la que extraer información sin perjudicar al individuo o el medio ambiente (Rolland *et al.*, 2005).

Las técnicas disponibles para estudios de fisiología para la conservación de misticetos incluyen el análisis de heces como muestra alternativa que puede sustituir a la sangre (Rolland *et al.* 2005, 2007; Hunt *et al.* 2006). Cuando esta técnica se combina con el estudio a largo plazo de individuos identificados, es posible reconstruir una imagen de la respuesta fisiológica a diferentes perturbaciones incluso para una especie "no capturable" como son los misticetos (Rolland *et al.* 2012).

El material fecal es una matriz extremadamente útil para el monitoreo hormonal de animales salvajes ya que su recolección casi no causa estrés al animal y, por lo tanto, no provoca interferencias en los valores hormonales finales (de Mello y de Oliveira, 2016). Por esta razón, las muestras fecales constituyen una de las alternativas mejor validadas para analizar el estrés y la endocrinología reproductiva (Rolland *et al.*, 2005; Hunt *et al.*, 2006; Corkeron *et al.*, 2017).

Asimismo, las muestras fecales han sido utilizadas durante mucho tiempo para el análisis de la dieta, tradicionalmente mediante inspección visual de elementos esqueléticos y, más recientemente, utilizando métodos genéticos (Gillett, White y Rolland, 2008; Gillett *et al.*, 2010) y análisis de isótopos estables (Hunt *et al.*, 2013) permitiendo, de esta manera, evaluar la eficiencia digestiva al comparar las heces con la composición de la presa.

La exposición a toxinas también es posible detectarse a partir de muestras fecales. Debido a su transferencia y bioacumulación a través de la red trófica (D'Agostino *et al.*, 2017) estas neurotoxinas han provocado numerosos incidentes letales en mamíferos marinos durante episodios de floraciones algales tóxicas (Lefebvre *et al.*, 2002). Por ello, son múltiples los estudios sobre detección de neurotoxinas en heces de misticeto (Doucette *et al.*, 2006, 2012; Leandro *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2016; D'Agostino *et al.*, 2017).

Cabe destacar que la materia fecal también incluye ADN de una variedad de fuentes, incluido el animal huésped, la especie presa, la microflora intestinal (Valentini *et al.*, 2009) y microorganismos patógenos, lo que permite caracterizar el microbioma intestinal y asociar los cambios observados a situaciones de estrés o enfermedad (Hunt *et al.*, 2013). En este contexto, comprender el nivel de diversidad genómica en las poblaciones de misticetos y la susceptibilidad de cada individuo a patógenos, a floraciones algales nocivas y a toxinas, proporciona información relevante para comprender los impactos tanto a nivel individual como de la población (Leroy *et al.*, 2017).

Por otro lado, a partir de las heces también se puede estudiar los factores que influyen en la exposición y la bioacumulación de compuestos tóxicos, como pueden ser los bifenilos policlorados o los pesticidas, provenientes de la contaminación (Weisbrod *et al.*, 2000).

Por último y, desde otra perspectiva, las heces pueden resultar ser una fuente de información útil sobre la importancia ecológica que representan los misticetos en el ecosistema marino, ya que mejoran la productividad primaria de las áreas de alimentación mediante la defecación de altas concentraciones de nutrientes en las aguas superficiales del océano que estimulan el reciclaje de nutrientes (Roman y McCarthy, 2010; Ratnarajah, Nicol y Bowie, 2018) y, a su vez, potencian el crecimiento del fitoplancton contribuyendo a la captura y almacenamiento de carbono (Smith *et al.*, 2013).

2.3 Caracterización de las heces de misticeto

La consistencia de las heces de misticeto varía según la especie, época y alimentación, por ello, es posible encontrar desde grupos semisólidos flotantes bien formados, como en el caso de los balaénidos (familia Balaenidae) hasta penachos más fluidos y dispersos como en las ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*) (Hunt *et al.*, 2013). El motivo por el que los misticetos y, en general todas las ballenas, defequen en un estado casi líquido se debe a que, durante el buceo, se ralentizan todas las funciones

biológicas no cruciales como son la filtración glomerular y el flujo de la orina (Lavery *et al.*, 2014).

Generalmente, las heces de misticeto se pueden caracterizar por presentar un color típico de marrón a rojo anaranjado, olor fuerte, gran tamaño y presencia de pelos finos (Rolland *et al.*, 2005).

Otro aspecto importante, y por lo que se facilita su recolección, es el hecho de que las heces flotan en la superficie del agua durante un corto período de tiempo después de la defecación (Gillett, White y Rolland, 2008) aunque, una proporción sustancial se dispersa y persiste en la zona fótica alargando, mínimamente, el tiempo hábil de recolección de muestras (Lavery *et al.*, 2014).

2.4 Metodología de obtención de muestras fecales de misticeto

La obtención de heces en la naturaleza es una técnica completamente no invasiva y su metodología está bien desarrollada. No obstante, tiene sus propias limitaciones, especialmente cuando los investigadores intentan tomar las muestras de mamíferos acuáticos (Rolland *et al.*, 2005; Hunt *et al.*, 2006).

Una de estas limitaciones tiene que ver con el hecho de que las heces de misticeto suelen ser recolectadas únicamente en áreas de alimentación, ya que la probabilidad de producirse la defecación aumenta en los momentos posteriores a la alimentación (Roman y McCarthy, 2010), por lo que al ser especies migratorias solo se pueden muestrear durante la mitad del año. Por otro lado, es bastante difícil hacer coincidir las muestras con sus correspondientes individuos y clasificarlas por sexo o edad (de Mello y de Oliveira, 2016).

Normalmente, las muestras de heces se obtienen de manera oportunista durante las campañas de fotoidentificación de misticetos al observar dichas muestras fecales flotando en la superficie (Rolland *et al.*, 2005), aunque también es frecuente la utilización de perros de detección de olores entrenados para aumentar la eficiencia de muestreo (Rolland *et al.*, 2006). Este último método conlleva la desventaja de no poder asociar la muestra con su individuo, ya que cuando el perro detecta el olor de las heces, el misticeto suele encontrarse lejos (Gillett *et al.*, 2010).

Los equipos utilizados para la recolección de las muestras de la superficie del agua suelen constar de redes de inmersión de nylon unidas a anzuelos extensibles cuyas micras pueden variar entre las 300 y 63, aunque también se ha descrito la utilización de botellas como la LDPE Nalgene (Ratnarajah *et al.*, 2017) y baldes (Flores-Cascante *et al.*, 2019).

Se debe anotar la fecha, hora y localización (latitud/longitud) donde ha tenido lugar la recolección de las muestras (Burgess *et al.*, 2017) y el código del misticeto si la muestra procede de un individuo que ha sido identificado previamente (Rolland *et al.*, 2005).

Una vez recolectadas las muestras, se les realiza un filtrado para eliminar el agua salada y, rápidamente, se conservan refrigeradas a una temperatura de -20°C hasta llegar a la estación de campo donde se almacenan congeladas a -80°C hasta su análisis (Hunt, Rolland y Kraus, 2015).

Cabe destacar que también es posible la obtención de muestras fecales directamente del tracto intestinal durante la realización de necropsias de individuos varados (Doucette *et al.*, 2012).

2.5 Metodología de análisis de muestras fecales de misticeto

Una vez obtenidas las muestras de heces de misticeto, son múltiples los análisis que se les puede aplicar según el objetivo de estudio.

Se pueden analizar glucocorticoides fecales (Hunt *et al.*, 2006), hormonas sexuales y sus metabolitos fecales (Hunt, Rolland y Kraus, 2015) además de extraer y cuantificar el ADN del individuo (Gillett *et al.*, 2010) con tal de obtener información sobre la fisiología y genética de los misticetos.

Del mismo modo, se analizan neurotoxinas en muestras fecales como las saxitoxinas y sus derivados, un tipo de toxinas que causan la intoxicación paralizante por marisco (PSP) o el ácido domoico (DA), una toxina que causa la intoxicación amnésica por moluscos (ASP). Estos análisis se realizan mediante ensayos de unión a receptor por permitir detectar todas las toxinas paralizantes y amnésicas (Doucette *et al.*, 2006, 2012; Wilson *et al.*, 2016) o mediante cromatografías líquidas de alta resolución (Lefebvre *et al.*, 2002; D'Agostino *et al.*, 2017). Además, se puede determinar la exposición a toxinas mediante la identificación de frústulos de *Pseudo-nitzschia spp* con el microscopio electrónico (Lefebvre *et al.*, 2002; Fire *et al.*, 2010; D'Agostino *et al.*, 2015).

Por otro lado, existe la posibilidad de identificar microorganismos presentes en el intestino de los misticetos mediante la extracción y purificación de su ADN (Marón *et al.*, 2019), la observación al microscopio (D'Agostino, Hoffmeyer y Degradi, 2016) y la realización de ensayos inmunofluorescentes (Hughes-Hanks *et al.*, 2005) a partir de muestras fecales, además de obtener información sobre la dieta de los individuos mediante la identificación de sus presas (Nickels, Sala y Ohman, 2018).

Asimismo, se utilizan las muestras fecales para medir concentraciones de bifenilos policlorados y pesticidas para determinar el grado de exposición y bioacumulación de los contaminantes en misticetos (Weisbrod *et al.*, 2000).

Finalmente, se analizan las concentraciones de nutrientes, como el nitrógeno y el hierro, elementos traza (Wing *et al.*, 2014) y carbono para evaluar la contribución de las heces de misticeto al reciclaje de nutrientes y a la mejora de la productividad primaria del medio marino (Ratnarajah *et al.*, 2014).

Por todo lo expuesto, las muestras fecales están consideradas actualmente como matrices biológicas útiles tanto por los múltiples estudios que se pueden realizar a partir de su análisis como por su inofensivo método de obtención.

3. OBJETIVOS

Los objetivos que se pretenden alcanzar con el presente Trabajo Fin de Grado se presentan a continuación:

- Objetivo principal: Conocer la importancia del estudio de las heces de misticeto como fuente de información.
- Objetivos específicos:
 - Describir los tipos de estudio que se realizan a partir de las heces de misticeto.
 - Determinar los tipos de estudio que se han realizado a partir de las heces de misticeto desde el año 2000 hasta la actualidad.
 - Determinar los tipos de estudio que se han realizado a partir de las heces de misticeto en las diferentes especies de la superfamilia Mysticeti.
 - Describir los métodos de análisis de heces de misticeto y determinar el más utilizado según el tipo de estudio.
 - Describir los métodos de muestreo de heces de misticeto y determinar el más utilizado.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Búsqueda bibliográfica

La metodología llevada a cabo para la realización del presente Trabajo Fin de Grado fue el análisis documental clásico con el objetivo de poder realizar un estudio detallado, selectivo y crítico examinando la bibliografía publicada desde enero de 2000 hasta abril de 2020 y poder situarla en perspectiva.

La recopilación bibliográfica se centró en estudios basados en el análisis de las heces de misticeto con el objetivo de conocer la información que proporciona esta matriz, así como las diferentes metodologías de análisis y recolección de muestras.

La presente búsqueda bibliográfica se llevó a cabo durante el mes de abril de 2020.

4.1.1 Base de datos

La base de datos consultada para la realización de la búsqueda bibliográfica fue Web Of Science (WOS), una de las principales bases de datos mundiales de referencias bibliográficas y citas de publicaciones periódicas ya que incluye más de 21,000 revistas académicas de alta calidad, más de 205,000 actas de conferencias y más de 104,000 libros seleccionados.

La tecnología Web en la que está basada dicha base de datos recoge las referencias de las principales publicaciones científicas ya sean de ámbito científico, tecnológico, humanístico o sociológico desde 1945 y, además, permite evaluar y analizar el rendimiento y la calidad científica de la investigación.

La plataforma pertenece a Clarivate Analytics y su licencia está gestionada por la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT).

4.1.2 Ecuaciones de búsqueda

Para realizar la búsqueda bibliográfica se utilizaron diferentes ecuaciones de búsqueda empleando los conceptos clave de búsqueda (descriptor) y sus términos sinónimos. Para la elaboración de las ecuaciones de búsqueda se utilizaron operadores booleanos, es decir, palabras en inglés que se utilizan como nexos entre términos de búsqueda y que indican la relación entre ellos. De esta manera, se utilizó: AND para indicar que ambos términos deben aparecer en la búsqueda, OR para indicar que puede aparecer, indiferentemente, un término u otro y NOT que excluye los registros en los que aparece el término al que acompaña.

Por otro lado, también se utilizó el truncado (*) para recuperar variaciones de una palabra permitiendo, de esta manera, aumentar la exhaustividad de la búsqueda con el mismo término y, las comillas (“ ”), para recuperar palabras compuestas.

En la primera búsqueda realizada se utilizaron los términos de búsqueda “heces” y “ballenas” en inglés (*faeces* AND *whales*), ya que el idioma de búsqueda en la WOS es el anglosajón. Los documentos recuperados en esta búsqueda permitieron tener una visión general de los documentos existentes en la base de datos, así como seleccionar las palabras clave con las que realizar una búsqueda más exhaustiva. Dichos términos se recogen en la Tabla 2 ordenando los diferentes descriptores junto a sus sinónimos y respectivas traducciones al inglés.

Tabla 2. Descriptores utilizados para la creación de las ecuaciones de búsqueda con sus respectivos términos sinónimos y traducciones al inglés.

Descriptor	Términos sinónimos	Traducción
Ballenas	Ballenas y derivados	whale*
	Balaena	*balaena
	Eubalaena	
	Balaenoptera	balaenoptera
	Megaptera	megaptera
	Misticetos	
"baleen whale**"		
Heces	Heces	faeces
		feces
	Excrementos	excrement*
		scat
	Fecal	faecal
		fecal

Para obtener la ecuación de búsqueda final con la que se recuperaron todos los documentos existentes sobre el principal tema del trabajo, primero se crearon diferentes ecuaciones de búsqueda parciales, todas ellas recogidas en la Tabla 3, con el fin de asegurar que la búsqueda final contenía todos los artículos relevantes sobre el tema de estudio.

Durante la búsqueda, se utilizó tanto el campo de búsqueda por título para hacer más precisa la búsqueda, como el campo de búsqueda por tema para hacerla más exhaustiva.

De esta manera, para la primera ecuación de búsqueda se utilizaron los términos *whale*, *faeces*, y *feces* para obtener una visión global sobre la bibliografía existente sobre heces

de misticetos. En la segunda ecuación de búsqueda, se incorporaron todos los términos sinónimos de heces a la primera ecuación de búsqueda y, para finalizar con las búsquedas parciales, se realizaron múltiples búsquedas utilizando todos los términos sinónimos de heces, pero permutando el primer término de búsqueda por todos los sinónimos de ballena presentes en la Tabla 2.

Con ello, se obtuvo la ecuación de búsqueda final en la que se incorporaron operadores booleanos de exclusión con tal de refinar lo máximo posible la búsqueda ya que, en inglés, existen numerosos animales cuyos nombres comunes integran la palabra *whale* pero que no son objeto de estudio de este trabajo, tales como el cachalote (*sperm whale*), la orca, (*killer whale*), la beluga (*beluga whale*), el zifio (*beaked whale*) o el tiburón ballena (*whale shark*).

Tabla 3. Ecuaciones de búsqueda utilizadas durante el mes de abril de 2020 en la base de datos de Web Of Science para la búsqueda bibliográfica.

Ecuaciones de búsqueda	
Parciales	(whale* AND (faeces OR feces))
	(whale* AND (((((faeces OR feces) OR dregs) OR excrement) OR fecal) OR faecal))
	(*balaena AND (((((faeces OR feces) OR dregs) OR excrement) OR fecal) OR faecal))
	(balaenoptera AND (((((faeces OR feces) OR dregs) OR excrement) OR fecal) OR faecal))
	(megaptera AND (((((faeces OR feces) OR dregs) OR excrement) OR fecal) OR faecal))
	(mysticet* AND (((((faeces OR feces) OR dregs) OR excrement) OR fecal) OR faecal))
("baleen whale*" AND (((((faeces OR feces) OR dregs) OR excrement) OR fecal) OR faecal))	
Final	(((((whale* OR *balaena) OR balaenoptera) OR megaptera) OR mysticet*) OR "baleen whale*") AND (((((faeces OR feces) OR excrement) OR scat) OR fecal) OR faecal)) NOT (((sperm whale* OR killer whale*) OR beluga whale*) OR beaked whale*) OR whale shark))

Una vez finalizada la búsqueda y obtenidos todos los artículos relacionados con el tema de estudio, se confeccionaron diferentes tablas y gráficos a partir de Excel para extraer la información correspondiente con los objetivos del trabajo.

La primera tabla que se confeccionó clasifica los artículos seleccionados según la especie objeto de estudio, el tipo de estudio para el que se analizan sus muestras de heces, así como la metodología de análisis de las muestras y la de su obtención.

Por otro lado, los gráficos que se realizaron muestran el número de publicaciones por año, los diferentes tipos de estudio que se realizan a partir del análisis de heces de misticeto por año, así como por especie, las diferentes metodologías analíticas que se utilizan en cada tipo de estudio y los diferentes equipos que se emplean para la obtención de las muestras.

4.2 Criterios de inclusión y exclusión

Para la búsqueda bibliográfica se incluyeron:

- Artículos, revisiones, editoriales, libros, resúmenes y meetings.
- Todas las bases de datos de la WOS, es decir, la Colección principal de Web of Science, Current Contents Connect, Derwent Innovations Index, Korean Journal Database, MEDLINE, Russian Science Citation Index y SciELO Citation Index.
- Todos los estudios basados en el análisis heces de misticetos.
- Todas las publicaciones posteriores a enero de 2000.
- Documentos publicados en inglés.

No obstante, se excluyeron:

- Todos los documentos cuyo objeto de estudio fueran los cachalotes (*sperm whale*), orcas (*killer whale*), belugas (*beluga whale*), ballenas picudas (*beaked whale*) o tiburones ballena (*whale shark*).
- Estudios de misticetos basados en campos diferentes al análisis de sus heces.
- Documentos publicados en coreano o en ruso.
- Todas las publicaciones anteriores a enero de 2000.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Selección de los artículos obtenidos mediante el análisis bibliográfico

Los resultados obtenidos mediante la aplicación de cada ecuación de búsqueda para el análisis bibliográfico en la base de datos Web Of Science se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados obtenidos a partir de las ecuaciones de búsqueda utilizadas durante el mes de abril de 2020 en la base de datos de Web Of Science para la búsqueda bibliográfica.

Ecuaciones de búsqueda		Resultados obtenidos
Parciales	(whale* AND (faeces OR feces))	149
	(whale* AND (((((faeces OR feces) OR dregs) OR excrement) OR fecal) OR faecal))	187
	(*balaena AND (((((faeces OR feces) OR dregs) OR excrement) OR fecal) OR faecal))	44
	(balaenoptera AND (((((faeces OR feces) OR dregs) OR excrement) OR fecal) OR faecal))	34
	(megaptera AND (((((faeces OR feces) OR dregs) OR excrement) OR fecal) OR faecal))	20
	(mysticet* AND (((((faeces OR feces) OR dregs) OR excrement) OR fecal) OR faecal))	23
	("baleen whale*" AND (((((faeces OR feces) OR dregs) OR excrement) OR fecal) OR faecal))	25
Final	((((((whale* OR *balaena) OR balaenoptera) OR megaptera) OR mysticet*) OR "baleen whale*")) AND (((((faeces OR feces) OR excrement) OR scat) OR fecal) OR faecal)) NOT (((((sperm whale* OR killer whale*) OR beluga whale*) OR beaked whale*) OR whale shark))	119

Una vez realizada la ecuación de búsqueda final y aplicados los criterios de inclusión y exclusión fueron finalmente seleccionados 43 artículos de los 119 obtenidos para el desarrollo del presente Trabajo Fin de Grado.

A continuación, en las Tablas 5 y 6 se clasifican los artículos obtenidos según la especie objeto de estudio, el tipo de estudio para el que se analizan las muestras de heces, así como la metodología de análisis y obtención de dichas muestras. Cabe mencionar la repetición de referencias de algunos de los artículos obtenidos ya que, en algunos estudios, son varias las especies de misticeto de las que se analizan sus muestras fecales.

Tabla 5. Clasificación de los artículos obtenidos según la especie objeto de estudio, la aplicación de su estudio, la metodología del análisis de las muestras y su obtención, siendo NH4+, amonio; PON, nitrógeno orgánico particulado y Fe, hierro.

<u>Especie</u>	<u>Tipo de estudio</u>	<u>Metodología análisis muestras</u>	<u>Metodología obtención heces</u>	<u>Referencias</u>	
<i>Eubalaena glacialis</i>	Fisiología de misticetos	Perfil genético	Red de inmersión de nylon de 300 µm unida a anzuelo extensible	(Gillett et al., 2010) (Gillett, White y Rolland, 2008) (Corkeron et al., 2017) (Hunt et al., 2006)	
		Ensayo hormonal	Red de inmersión de nylon de 300 µm unida a anzuelo extensible	(Hunt, Rolland y Kraus, 2015) (Rolland et al., 2005) (Burgess et al., 2017) (Rolland et al., 2017)	
	Toxinas algales	Ensayo de unión a receptor	No específica		(Birnie-Gauvin, 2017)
			Red de inmersión de nylon de 300 µm unida a anzuelo extensible		(Doucette et al., 2006) (Leandro et al., 2009) (Doucette et al., 2012)
	Contaminación marina	Cromatografía de gases	Red de plancton de malla de 0.020 mm ² unida a un poste de aluminio	(Weisbrod et al., 2000)	
	Productividad primaria	Análisis de NH ₄ ⁺ y de PON	Red de inmersión de nylon de 150 µm unida a anzuelo extensible	(Roman et al., 2016)	
	<i>Eubalaena australis</i>	Fisiología de misticetos	Ensayo hormonal	No específica	(de Mello y de Oliveira, 2016)
			Extracción y purificación de ADN	Extracción intestino postmortem	(Marón et al., 2019)
		Identificación de microorganismos	Observación al microscopio	Red de inmersión de nylon de 300 µm unida a anzuelo extensible	(D'Agostino, Hoffmeyer y Degradi, 2016)
				Extracción del intestino postmortem	(Wilson et al., 2016)
Toxinas algales		Cromatografía líquida	Red de inmersión de nylon de malla de 120 µm unida a anzuelo extensible	(D'Agostino et al., 2017)	
			Red de inmersión de nylon de 300 µm unida a anzuelo extensible	(D'Agostino et al., 2015)	
Productividad primaria		Análisis de la concentración oligoelementos y carbono	Red de malla fina de 0.5mm	(Wing et al., 2014)	
Fisiología de misticetos		Ensayo hormonal	Extracción intestino postmortem		(Rolland et al., 2019)
	Ensayo inmunofluorescente		Red de inmersión de nylon de 300 µm unida a anzuelo extensible	(Hughes-Hanks et al., 2005)	
<i>Balaena mysticetus</i>	Identificación de microorganismos	Cromatografía líquida + Observación al microscopio	No específica	(Fire et al., 2010)	
		Análisis de secuenciación de 16S rRNA	Extracción del intestino postmortem	(Ogawa et al., 2010)	
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Toxinas algales	Análisis de la fotosíntesis de cultivos enriquecidos con heces	Red de malla fina de 0.5mm	(Smith et al., 2013)	
				(Ratnarajah et al., 2014)	
	Productividad primaria	Análisis de la concentración oligoelementos y de carbono	Red de malla fina de 0.2mm	(Nicol et al., 2010)	

Tabla 6. Continuación de la Tabla 5.

<u>Especie</u>	<u>Tipo de estudio</u>	<u>Metodología análisis muestras</u>	<u>Metodología obtención heces</u>	<u>Referencias</u>	
<i>Balaenoptera musculus</i>	Identificación de microorganismos	Observación al microscopio	Embudo de filtrado de plancton de malla de 183 µm unido a un anzuelo	(Nickels, Sala y Ohman, 2018)	
			Red de nylon de malla de 63 µm	(Flores-Cascante et al., 2019)	
	Fisiología de misticetos	Extracción y purificación de ADN	Mediante un balde o colador		(Jarman et al., 2002)
			Red de malla fina de 0.5mm		(de Vos et al., 2018)
			Red de inmersión de nylon de 300 µm unida a anzuelo extensible		(Guass et al., 2016)
			No específica		(McLaughlin y Kopanic, 2017)
	Toxinas algales	Cromatografía líquida + Observación al microscopio	Red de inmersión de nylon de 300 µm unida a anzuelo extensible		(Valenzuela-Molina et al., 2008)
			Red de remolque		(Bocconcelli et al., 2015)
	Productividad primaria	Análisis de la concentración de oligoelementos y de carbono	Red de piscina de malla de 1 mm		(Lefebvre et al., 2002)
			Red de malla fina de 0.2mm		(Nicol et al., 2010)
<i>Megaptera novaengliae</i>	Fisiología de misticetos	Ensayo hormonal	Red de malla fina de 0.5mm	(Ratnarajah et al., 2014)	
			Red de inmersión de nylon de 300 µm unida a anzuelo extensible		(Hunt et al., 2019)
	Toxinas algales	Cromatografía líquida + Observación al microscopio	Red de malla de 1mm		(Lefebvre et al., 2002)
			Red de inmersión de nylon de 150 µm unida a anzuelo extensible		(Roman y McCarthy, 2010)
Productividad primaria	Análisis de la concentración de oligoelementos y de carbono	Red de malla fina de 0.5mm		(Ratnarajah et al., 2014)	
		Botella Nalgene LDPE de 250 mL		(Ratnarajah et al., 2017)	
<i>Balaenoptera physalus</i>	Identificación de microorganismos	Análisis de isótopos estables de heces	Red de malla fina de 0.2mm	(Nicol et al., 2010)	
			Extracción del intestino postmortem		(Arregui et al., 2018)
	Productividad primaria	Extracción y purificación de ADN	Red de malla fina de 0.2mm		(Nicol et al., 2010)
			Red de inmersión de nylon de 150 µm unida a anzuelo extensible		(Carroll et al., 2019)
	Fisiología de misticetos	Ensayo hormonal + Perfil genético	Red de nylon de malla fina y recipiente o bolsa de plástico		(Hunt et al., 2013)

A continuación, se muestra gráficamente (Figura 1) el número de artículos publicados anualmente dentro del periodo acotado para la búsqueda bibliográfica, es decir entre 2000 y 2020. Se puede observar como los estudios a partir de heces de misticeto ganaron importancia a partir del año 2015 aunque con un leve receso en el 2018, ya que de media se publicaron, aproximadamente, 5 documentos al año. Por otro lado, el año 2010 destaca por sus múltiples estudios publicados a partir de dichas matrices biológicas en comparación con los años que le preceden y le siguen hasta el 2015, siendo considerado el segundo año más fructífero después de 2017.

Cabe destacar que, en los años 2001, 2003, 2004, 2007 y 2011 no se publicó ningún artículo referente a los estudios basados en heces de misticeto, tal y como se observa en la Figura 1. De esta manera, más de la mitad de los artículos publicados durante el tiempo acotado de búsqueda pertenecen a los años 2010, 2016, 2017 y 2019.



Figura 1. Representación gráfica de los artículos publicados basados en estudios a partir de heces de misticeto por año (n=43 artículos)

5.2 Tipos de estudios a partir del análisis de heces de misticeto

Los artículos seleccionados para el presente trabajo mostraron que las investigaciones a partir de heces de misticeto tratan sobre temas muy diversos, pudiendo distinguir 5 grandes tipos de estudio: estudios sobre fisiología, identificación de microorganismos, exposición a toxinas, contaminación marina y productividad primaria marina (Figura 2). De estos estudios, los que trataban aspectos sobre fisiología de misticetos y sobre identificación de microorganismos destacaron por ser los más frecuentes en la literatura científica, representando el 63% de los artículos publicados, usando dichas matrices biológicas, durante el tiempo acotado para el análisis bibliográfico. Los estudios sobre exposición a toxinas marinas y sobre la influencia de las heces en los procesos de productividad primaria marina también resultaron abundantes, representando el 19% y el 16% de los artículos publicados respectivamente. Sin embargo, cabe destacar la escasez de artículos publicados sobre contaminación marina a partir de muestras fecales de misticeto ya que, incluso extendiendo el periodo temporal de búsqueda bibliográfica 100 años, únicamente se obtuvo un estudio, lo que representa el 2% de los artículos obtenidos.

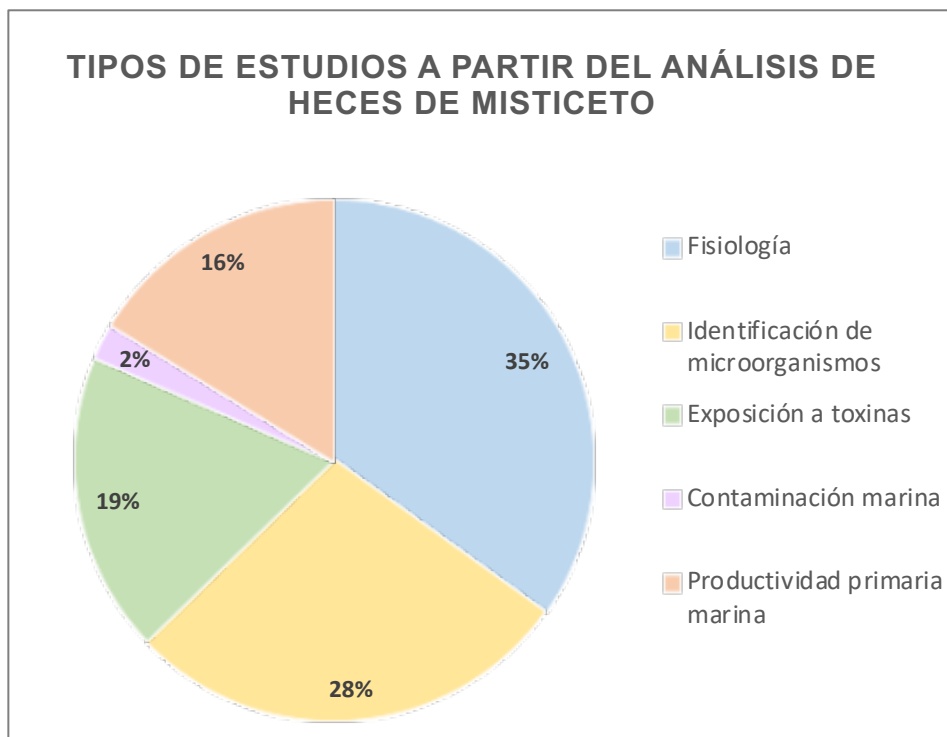


Figura 2. Representación gráfica de los diferentes tipos de estudio basados en el análisis de heces de misticeto (n=43 artículos)

Respecto a los estudios sobre fisiología, se ha podido observar que las heces constituyen una fuente de información fiable de la que extraer datos sobre el estado reproductivo (Corkeron *et al.*, 2017), la respuesta al estrés (Burgess *et al.*, 2017; Rolland

et al., 2017) la respuesta inmune o la edad de madurez sexual (Rolland *et al.*, 2005). Por lo tanto, es lógico pensar que la fisiología constituye el tipo de estudio a partir de heces más relevante del momento por constituir una fuente de información crucial del estado poblacional de los misticetos (de Mello y de Oliveira, 2016).

Por otra parte, la identificación de microorganismos a partir de muestras fecales también resulta relevante ya que, mediante la identificación de las presas que se hayan en el interior de los misticetos se obtiene información nutricional e, indirectamente, información relevante sobre su salud. (D'Agostino, Hoffmeyer y Degradi, 2016; de Vos *et al.*, 2018; Nickels, Sala y Ohman, 2018). Asimismo, a partir de la caracterización del microbioma intestinal (Guass *et al.*, 2016) como de la identificación de organismos patógenos, como es el caso de la identificación de *Clostridium perfringens* (Marón *et al.*, 2019), *Enterococcus faecalis* (Ogawa *et al.*, 2010; McLaughlin y Kopanic, 2017), *Giardia spp* y *Cryptosporidium spp* (Hughes-Hanks *et al.*, 2005), entre otros, se obtiene información relevante sobre enfermedades e incluso sobre posibles causas mortales debidas a agentes biológicos.

La falta documental sobre estudios de contaminación marina basados en heces de misticeto se debe a que los resultados del artículo publicado sobre este tema demostraron que las heces no son matrices biológicas válidas para utilizarse en este tipo de estudios, ya que la comparativa entre los resultados obtenidos a partir de biopsias de piel y grasa de misticetos y los resultados obtenidos a partir de heces diferían en grandes magnitudes, siendo estos últimos de dos a tres órdenes de magnitud inferiores (Weisbrod *et al.*, 2000), lo que significa que la bioacumulación de contaminantes no puede ser estudiada a partir de muestras fecales.

Por último, cabe destacar que el 84% de los artículos obtenidos aplican sus estudios a partir de heces de misticeto al conocimiento de estas especies de mamíferos marinos y, únicamente un 16%, lo aplican a la investigación de la importancia ecológica que suponen dichas matrices biológicas para el ecosistema marino. Esta brecha constituida por el objetivo último de estudio ya sea el misticeto o el ecosistema marino, es relevante ya que refleja la preocupación existente sobre el estado de las poblaciones de misticetos al encontrarse, muchas de ellas, en peligro.

5.2.1 Tipos de estudios a partir del análisis de heces de misticeto por año

La publicación de estudios basados en el análisis de heces de misticeto en los últimos 20 años ha sido continua, aumentando el número de publicaciones en los últimos 5 años (Figura 3). Los temas tratados en estas publicaciones a lo largo de estas últimas dos décadas son diversos y varían a lo largo del tiempo. Por una parte, podemos observar como el único estudio que se ha obtenido en la búsqueda bibliográfica sobre contaminación marina fue publicado en el año 2000. Por otra parte, los artículos sobre identificación de microorganismos representan el 75% de los artículos publicados en los últimos años (18-19), por lo que podemos inferir que es el tema que despierta más interés en la comunidad científica en la actualidad. Por último, cabe destacar que los artículos sobre productividad primaria comienzan a aparecer en la literatura científica hace 10 años (años 2010, 2013, 2014, 2016 y 2017), describiendo la importancia ecológica que suponen dichas matrices biológicas por influir en los ciclos de nutrientes y en la productividad primaria marina.

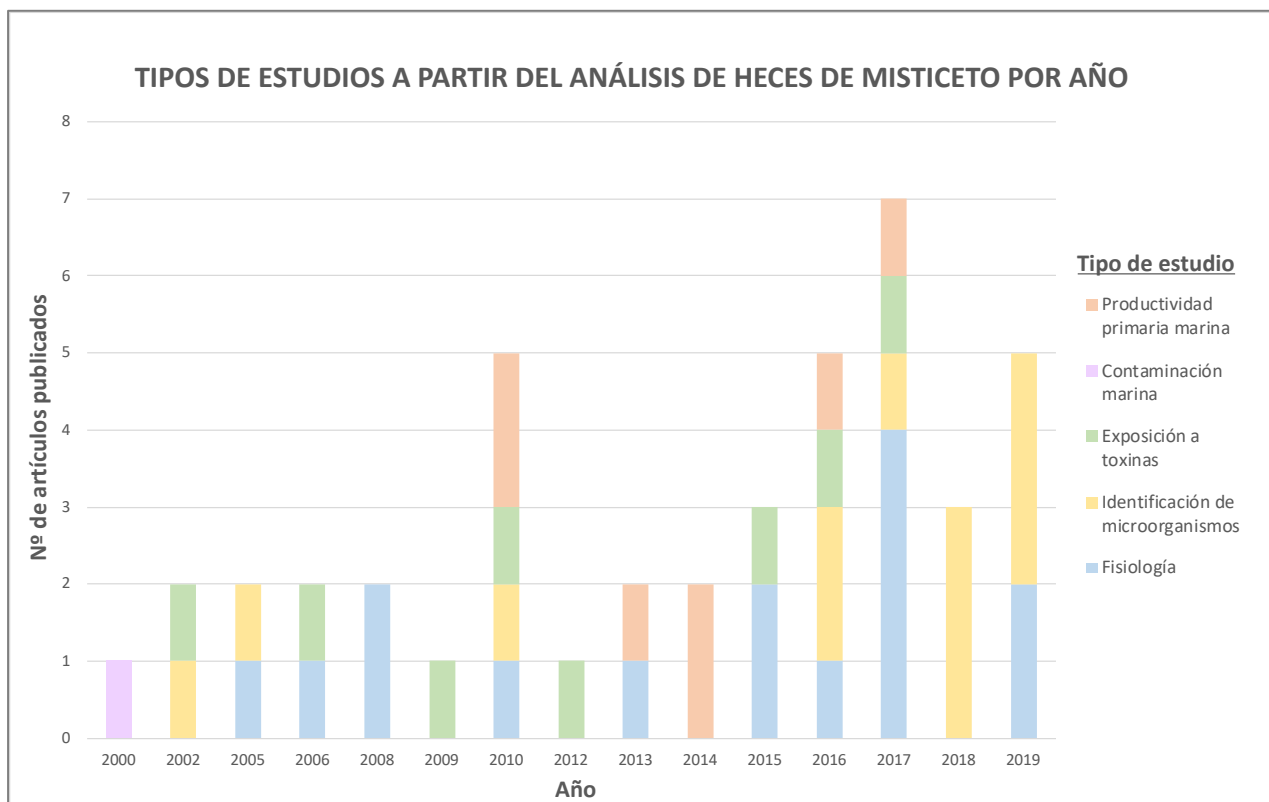


Figura 3. Representación gráfica de los artículos publicados según el tipo de estudio basado en el análisis de heces de misticeto por año (n=43 artículos).

5.2.2 Tipos de estudios a partir del análisis de heces de misticeto por especie

especie

Las publicaciones basadas en el análisis de heces de misticeto a lo largo de los últimos 20 años variaron en número según la especie de misticeto estudiada, tal y como se puede apreciar en la Figura 4. Dichas investigaciones se realizaron sobre 9 de las 14 especies de misticeto conocidas, siendo *Eubalaena glacialis* la especie de misticeto más estudiada utilizando las heces como matriz biológica (14 de los artículos publicados), seguida de *Balaenoptera musculus* (11 artículos), de *Eubalaena australis* (7 artículos) y de *Megaptera novaengliae* (6 artículos). Las demás especies de misticeto (*Balaenoptera musculus brevicauda*, *Balaena mysticetus*, *Balaenoptera acutorostrata*, *Balaenoptera physalus* y *Balaenoptera edeni brydei*) aparecen en un menor número de estudios (entre 3 y 1 artículos).

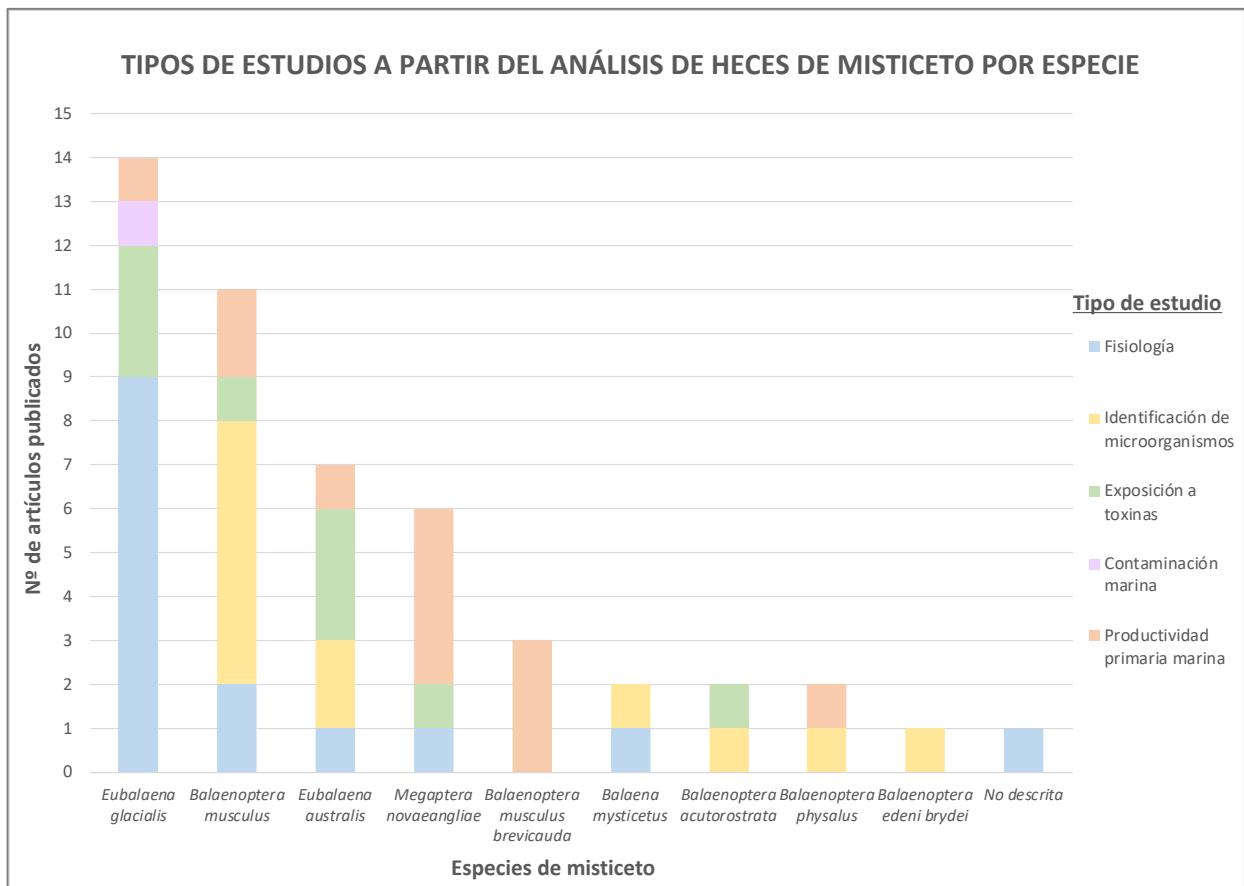


Figura 4. Representación gráfica de los artículos publicados según el tipo de estudio basado en el análisis de heces de misticeto por especie (n=43 artículos)

El hecho de que *Eubalaena glacialis* represente la especie de misticeto cuyas muestras fecales han sido las más estudiadas se debe a que se trata de una de las especies de cetáceo más amenazadas (categoría IUCN (2017): en peligro). Durante la década de 1990, los individuos de esta especie disminuyeron significativamente su reproducción y

mostraron signos de una salud comprometida (Gillett, White y Rolland, 2008), hecho que provocó el inicio de los estudios no invasivos basados en muestras fecales (Gillett *et al.*, 2010). El alto grado de amenaza de esta especie explica también que el mayor número de artículos encontrados traten sobre fisiología, ya que es una de las líneas más importantes de estudio para la conservación de especies. Por último, esta especie constituye un buen modelo de estudio, ya que la mayoría de sus individuos han sido fotoidentificados y se posee información histórica abundante que permite realizar exhaustivos estudios sobre su fisiología (Hunt *et al.*, 2006; Corkeron *et al.*, 2017)

Por otro lado, *Balaenoptera musculus* es otra especie en peligro de extinción (categoría IUCN (2018): en peligro), por ello, sus muestras fecales se han visto ampliamente analizadas en diversos tipos de estudio, siendo la identificación de microorganismos el más común de ellos por representar el análisis del microbioma intestinal, así como el comportamiento alimenticio a partir de muestras fecales, una importante fuente de información sobre la salud y aptitud de esta especie (Guass *et al.*, 2016; de Vos *et al.*, 2018; Nickels, Sala y Ohman, 2018). Asimismo, los estudios en los que se reveló la presencia de endoparásitos destacan la necesidad de potenciar este tipo de estudio basado en el análisis de muestras fecales para llevar a cabo un monitoreo de la salud de esta especie de cetáceo y procurar su conservación (Marón *et al.*, 2019), ya que se ha evidenciado que, en el Golfo de California, *Balaenoptera musculus* se encuentra permanentemente parasitada de helmintos (Flores-Cascante *et al.*, 2019) además de encontrar, en dos ejemplares de esta especie, bacterias del género *Clostridium* y hongos del filo Ascomycota (Guass *et al.*, 2016), así como una cepa de la bacteria *Enterococcus faecalis* (McLaughlin y Kopanic, 2017).

Cabe destacar que, aunque no se considere una especie en peligro de extinción, (categoría IUCN (2017): preocupación menor), *Eubalaena australis* fue cazada hasta casi su extinción a mediados del siglo XX. Este hecho, sumado a las 706 muertes que sufrió la población del Atlántico Sur en las áreas de parto de la Península Valdés (Argentina) entre 2003 y 2017, seguramente explica que sea la tercera especie en número de estudios que utiliza heces como matriz biológica. Una de las causas que ha sido investigada para entender el alto número de muertes en estos últimos años es la exposición a toxinas marinas derivada de floraciones algales nocivas (D'Agostino *et al.*, 2015, 2017; Wilson *et al.*, 2016), lo que se ve reflejado en el número de publicaciones sobre este tema (3 de los 7 artículos publicados). Por otra parte, los varamientos sufridos en esta especie podrían deberse a la presencia de microbios patógenos, por los que los estudios basados en la identificación de microorganismos a partir de muestras fecales tratan esta problemática (Marón *et al.*, 2019).

La cuarta especie de misticeto en número de estudios basados en el análisis de sus heces, *Megaptera novaeangliae*, es otra especie que tampoco se encuentra amenazada (categoría IUCN (2018): preocupación menor) y que está ampliamente distribuida. Es por ello que, los estudios recuperados en este trabajo no tratan tanto de aspectos relacionados con la conservación de esta especie, sino de la importancia ecológica que suponen las heces de estos misticetos para el ecosistema marino. Esta especie, junto con la especie *Balaenoptera musculus brevicauda*, fueron utilizadas en los mismos estudios para análisis de concentración de hierro (Nicol *et al.*, 2010), así como de otros elementos traza (Ratnarajah *et al.*, 2014).

Por último, los estudios publicados sobre las especies *Balaena mysticetus*, *Balaenoptera acutorostrata*, *Balaenoptera physalus* y *Balaenoptera edeni brydei* fueron escasos (uno o dos artículos por especie) aunque, cabe destacar que uno de los artículos publicados de cada especie, trató sobre la identificación de organismos basado en el análisis de heces de misticeto, siendo los cuatro estudios muy recientes (Hughes-Hanks *et al.*, 2005; Ogawa *et al.*, 2010; Arregui *et al.*, 2018; Carroll *et al.*, 2019), lo que afianza la hipótesis que este tema despierta curiosidad en la comunidad científica en la actualidad.

5.3 Metodología de análisis de heces de misticeto según el tipo de estudio

Según el tipo de estudio para el que fueron analizadas las heces de misticeto se han podido diferenciar las técnicas de análisis utilizadas, así como los ámbitos de estudio o los elementos analizados.

5.3.1 Fisiología de misticetos

Los diferentes estudios sobre fisiología de misticetos realizados a partir del análisis de muestras fecales se recogen en la Figura 5. Como se puede observar, el 53% de los artículos publicados sobre fisiología de misticetos a partir del análisis de heces trataron sobre el estado reproductivo de estos mamíferos marinos. Esto se debe a que el estudio de las tasas reproductivas representa una fuente crucial de información para el manejo y conservación de las poblaciones de esta superfamilia (de Mello y de Oliveira, 2016), ya que este ámbito de estudio se incluye dentro del monitoreo a largo plazo de la salud de misticetos (Valenzuela-Molina *et al.*, 2018).

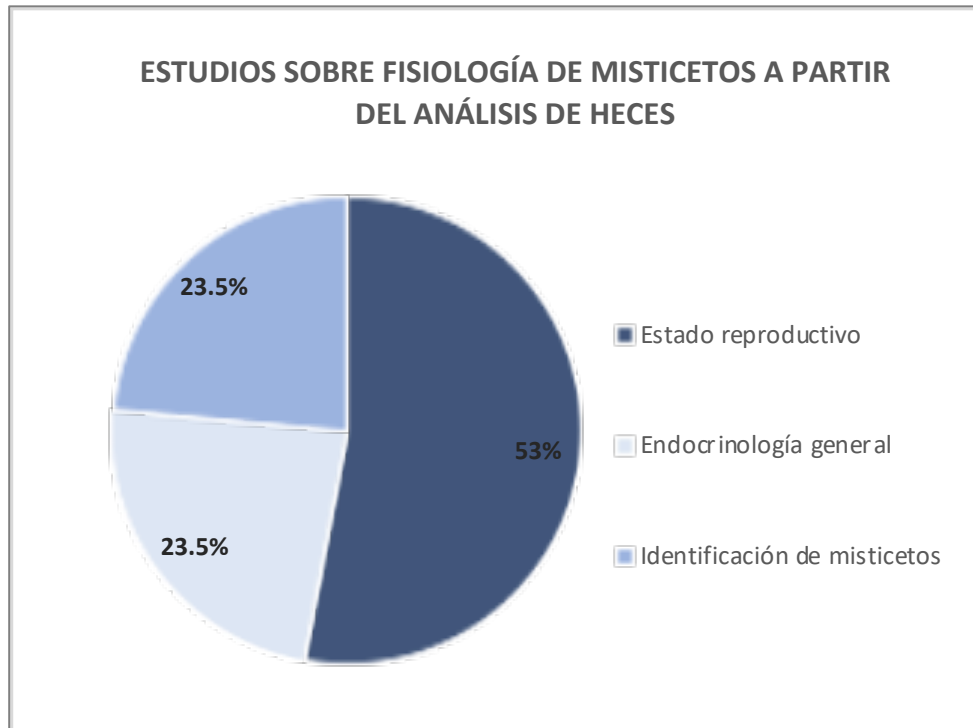


Figura 5. Representación gráfica de los estudios sobre fisiología de misticetos a partir del análisis de heces (n=15 artículos).

Por otro lado, tanto los estudios sobre endocrinología como los estudios basados en la identificación de misticetos supusieron el 23.5% de los artículos obtenidos sobre fisiología. La abundancia de estudios endocrinos basados en el análisis de heces se debe a que estos mamíferos marinos poseen características inusuales como la larga vida útil, la larga duración del periodo de gestación, reproducción fuertemente estacional, ciclos interparto de varios años, migraciones anuales, ayuno estacional en muchas especies, etc, que resultan en aspectos únicos de liberación de hormonas, tales como las catecolaminas y alteraciones en la actividad suprarrenal y en el sistema renina-angiotensina-aldosterona (Hunt *et al.*, 2019). Además, se ha demostrado que el análisis de glucocorticoides fecales puede ser utilizado para la evaluación del estrés fisiológico (Burgess *et al.*, 2017; Rolland *et al.*, 2017). Por otra parte, los estudios basados en la identificación de misticetos destacan por ser estudios de suma importancia ya que, gracias a los perfiles genéticos realizados a partir de muestras fecales, se facilita la relación entre la información obtenida sobre parámetros reproductivos y/o estado de salud y el sujeto de la muestra (Gillett, White y Rolland, 2008).

Las diferentes técnicas de análisis utilizadas para estudios de fisiología de misticetos a partir de muestras fecales se presentan en la Figura 6. Tal y como se puede observar en el gráfico, el ensayo hormonal aparece como técnica de análisis más empleada para

el estudio de la fisiología de los misticetos a partir de muestras fecales, empleándose en el 75% de los artículos analizados. La otra técnica de análisis aplicada a muestras fecales para la obtención de información referente a la fisiología fue el perfil genético, ya que se empleó en el 25% de los artículos analizados restantes.

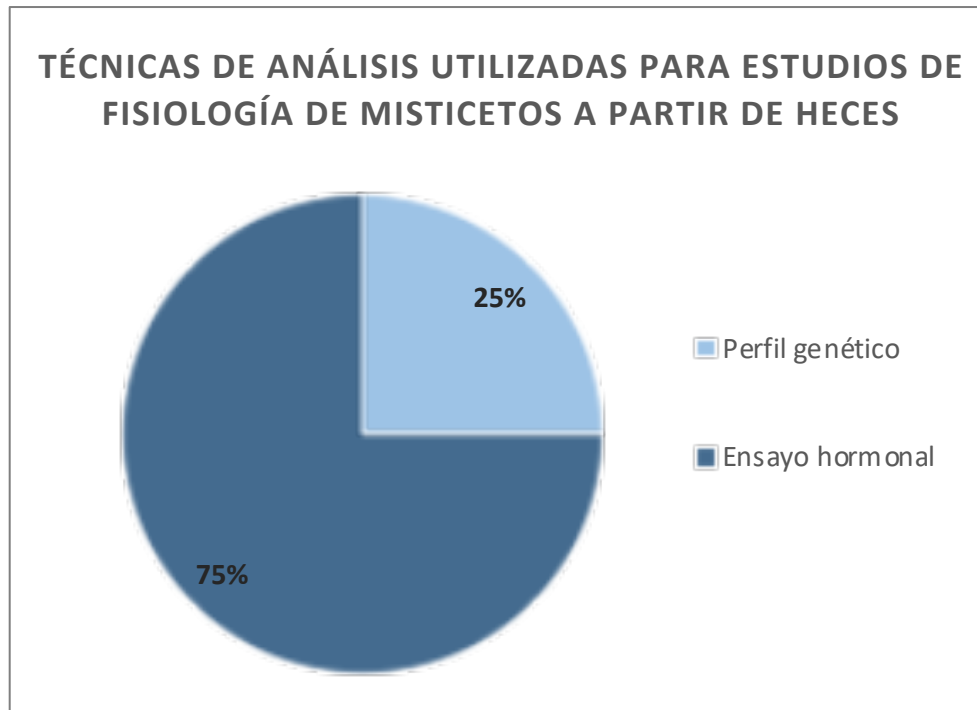


Figura 6. Representación gráfica de las diferentes técnicas de análisis utilizadas en los documentos obtenidos para el estudio de la fisiología de misticetos a partir de heces (n=15 artículos)

El hecho de que sea el ensayo hormonal la técnica más utilizada para el análisis de heces aplicado al estudio de la fisiología de misticetos se debe a que las técnicas tradicionales basadas en análisis de sangre no se pueden efectuar en grandes ballenas (Hunt, Rolland y Kraus, 2015; Rolland *et al.*, 2017). Por ello, son múltiples los estudios basados en análisis de glucocorticoides fecales (Hunt *et al.*, 2006; Hunt, Rolland y Kraus, 2015; Burgess *et al.*, 2017; Rolland *et al.*, 2017), cortisol (Corkeron *et al.*, 2017), estrógenos, progestinas, andrógenos y metabolitos fecales (Rolland *et al.*, 2005; Corkeron *et al.*, 2017) para extraer información sobre respuestas al estrés causado por factores antropogénicos (Corkeron *et al.*, 2017; Rolland *et al.*, 2017), así como del estado reproductivo y poblacional de cada especie de misticeto (Rolland *et al.*, 2005) (Birnie-Gauvin, 2017).

5.3.2 Exposición a toxinas marinas

Los estudios sobre exposición de los misticetos a toxinas marinas mediante muestras fecales analizaron, principalmente, dos elementos: las neurotoxinas y los frústulos de *Pseudo-nitzschia spp* (Figura 7). Tal y como se puede comprobar en el gráfico, los estudios basados en el análisis de neurotoxinas fueron más numerosos (7 de 8 artículos) que los que analizaron frústulos de *Pseudo-nitzschia spp* (3 de 8 artículos)

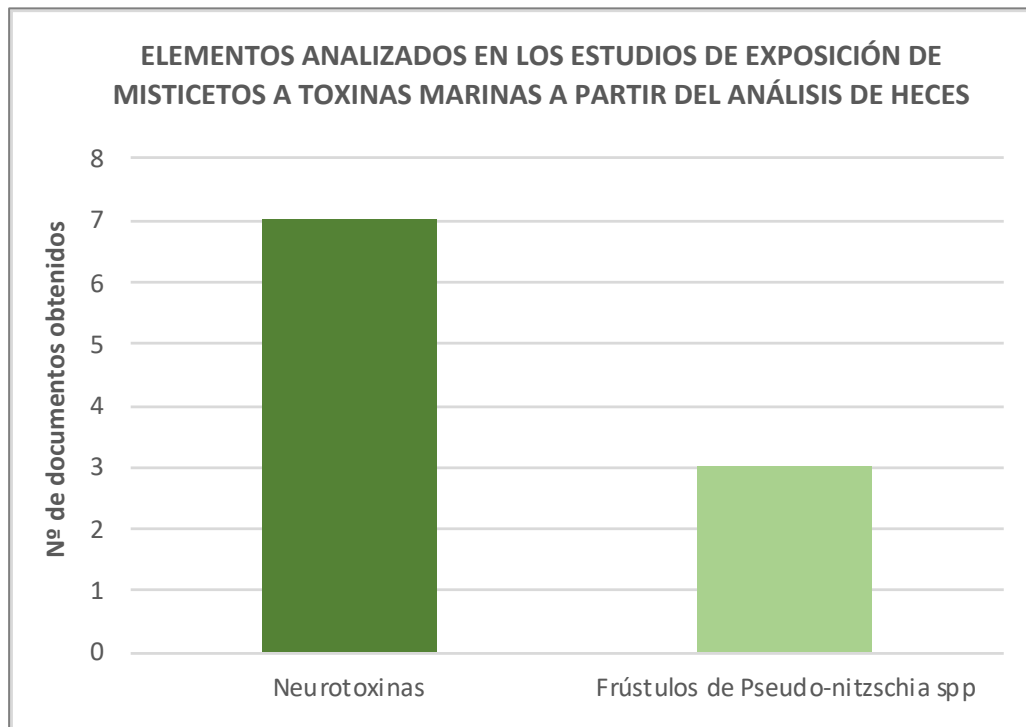


Figura 7. Representación gráfica de los elementos analizados en los estudios de exposición de misticetos a toxinas marinas a partir del análisis de heces (n=8 artículos)

Dentro de las neurotoxinas analizadas en los artículos publicados, destaca el ácido domoico por ser una toxina amnésica, soluble en agua y posible causante de múltiples muertes en mamíferos marinos por su transferencia y acumulación a través de la cadena trófica mediante vectores planctívoros (D'Agostino *et al.*, 2017). Por otro lado, las saxitoxinas y sus derivados comprenden un conjunto de más de 20 compuestos de tetrahidropurina, solubles en agua y de bajo peso molecular que, según algunos investigadores, pueden provocar efectos subletales en la fisiología respiratoria de cetáceos llegando a causar un comportamiento anormal de buceo y alimentación que, finalmente, afecte a la fecundidad (Doucette *et al.*, 2006).

Por otra parte, algunas diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* resultan ser productoras naturales del ácido domoico (Lefebvre *et al.*, 2002; Fire *et al.*, 2010), por lo que el análisis de frústulos de este grupo en muestras fecales de misticetos aporta información indirecta sobre el grado de exposición de los misticetos a esta neurotoxina. De hecho,

este género resultó ser un importante componente de las comunidades de fitoplancton durante los años 2004, 2005 y 2010 (D'Agostino *et al.*, 2015).

Los trabajos publicados sobre exposición a toxinas marinas asociadas a floraciones algales nocivas se fundamenta en que pueden causar anomalías reproductivas y de salud en misticetos (Doucette *et al.*, 2006; Leandro *et al.*, 2009). A nivel mundial, la incidencia de estos eventos ha aumentado dramáticamente en las últimas décadas y se espera que continúe constituyendo una situación problemática en escenarios de cambio climático (Doucette *et al.*, 2012), por lo que el estudio de los blooms algales tóxicos se presenta como necesario para la conservación de estas especies.

Para llevar a cabo el análisis de neurotoxinas, así como la identificación de frústulos a partir de muestras fecales de misticetos fueron diversas las técnicas utilizadas, tal y como se puede observar en la Figura 8.

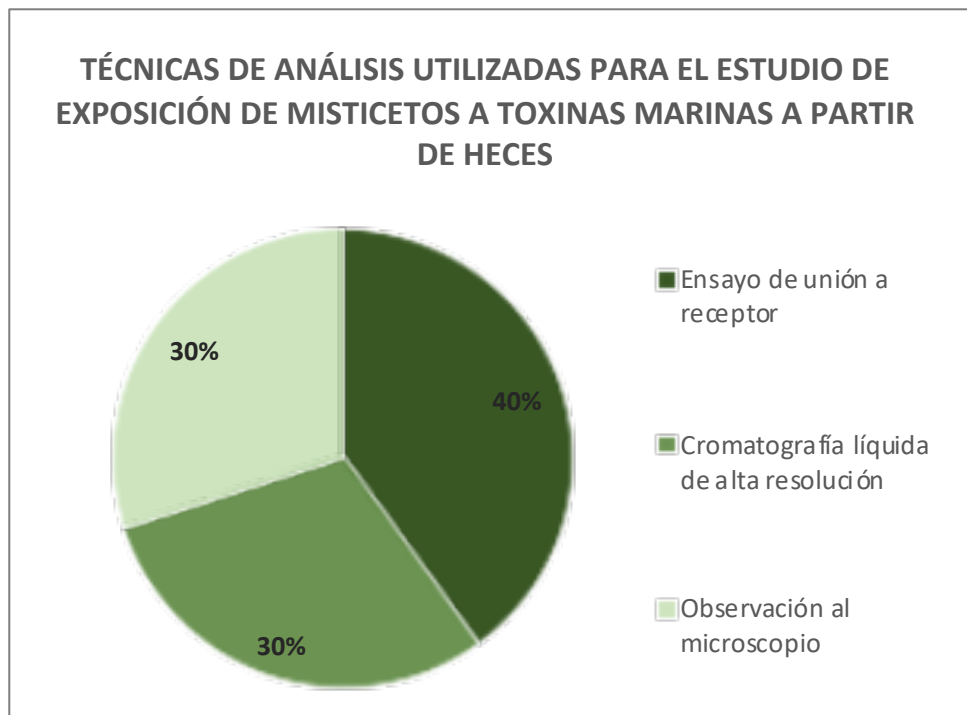


Figura 8. Representación gráfica de las diferentes técnicas de análisis utilizadas para el estudio de la exposición de misticetos a toxinas marinas a partir de heces (n= 8 artículos)

La técnica de análisis más utilizada consistió en el ensayo de unión a receptor, ya que apareció descrita como técnica de análisis en el 40% de los artículos en los que se analizaban las saxitoxinas y el ácido domoico (neurotoxinas) para evaluar la exposición de los misticetos a toxinas marinas. Otra técnica utilizada para el análisis de dichas neurotoxinas resultó ser la cromatografía líquida de alta resolución, ya que apareció descrita en el 30% de los artículos obtenidos como técnica de análisis para este tipo de

estudio basado en muestras fecales. Por último, para la identificación de frústulos de *Pseudo-nitzschia spp*, la técnica utilizada fue la observación al microscopio que coincide con el 30% restante de los artículos obtenidos para el estudio de la exposición de misticetos a toxinas marinas.

La gran utilización del ensayo de unión a receptor como técnica de análisis se debe a que permite detectar todas las toxinas paralizantes, entre las que se incluyen las saxitoxinas y sus derivados, así como las toxinas amnésicas, como el ácido domoico, en proporción a su afinidad de unión por los canales de sodio dependientes de voltaje (Doucette *et al.*, 2006, 2012; Leandro *et al.*, 2009).

Por otro lado, la utilización de la cromatografía líquida de alta resolución únicamente se ha visto utilizada para el análisis de ácido domoico, por lo que para realizar los análisis de neurotoxinas se prefiere el ensayo de unión a receptor como técnica de análisis. De igual modo ocurre con la identificación de frústulos de *Pseudo-nitzschia spp*, ya que únicamente se ha visto descrita la observación al microscopio electrónico como técnica de análisis.

5.3.3 Identificación de microorganismos

Los microorganismos identificados a partir del análisis de las heces de misticetos se muestran en la Figura 9.

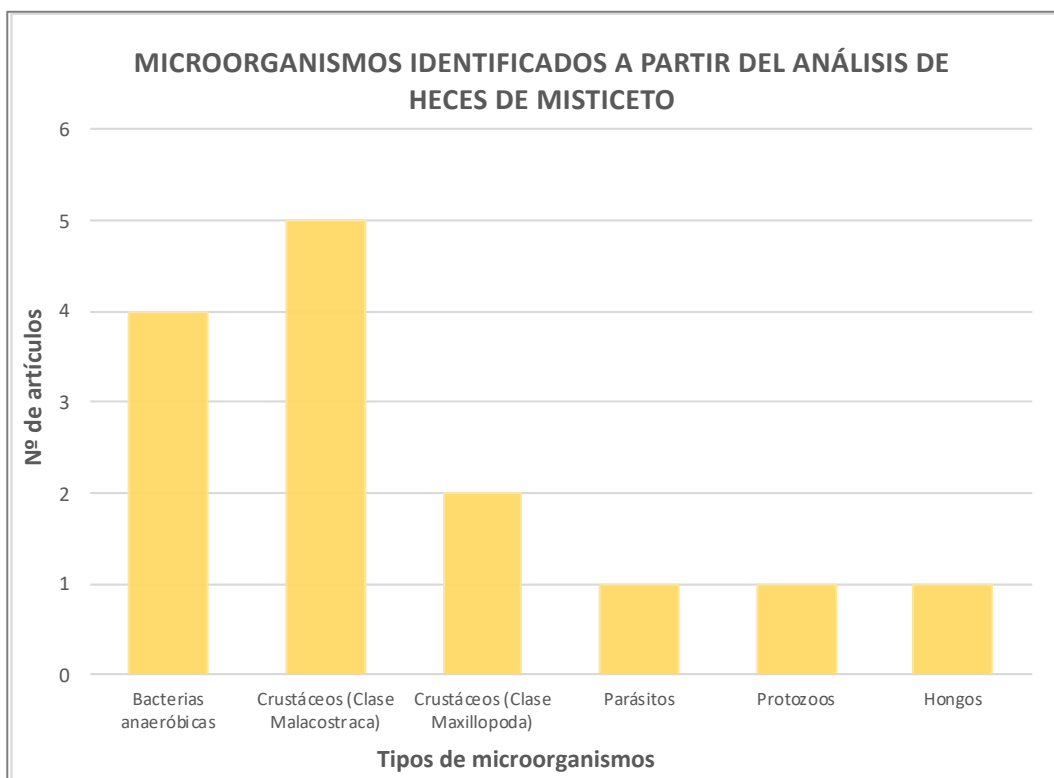


Figura 9. Representación gráfica de los diferentes microorganismos hallados en los estudios sobre la identificación de microorganismos a partir de heces de misticeto (n=12 artículos)

Las investigaciones que analizan crustáceos de la clase Malacostraca en heces de misticeto fueron las más publicadas ya que en dicha clase de crustáceos se incluye el krill, organismos marinos pelágicos abundantes en todos los ecosistemas oceánicos que constituyen la principal fuente de alimento de depredadores vertebrados como son los misticetos (Carroll *et al.*, 2019). Los copépodos, crustáceos de la clase Maxillopoda, también constituyen parte de la alimentación de algunas especies de misticeto (D'Agostino, Hoffmeyer y Degradi, 2016) y, por ello, también fueron objeto de estudio, aunque en menor medida. Cabe destacar que la identificación del krill en la dieta de depredadores marinos es vital para el conocimiento de los ecosistemas marinos por representar un papel central en las redes tróficas marinas y relacionar a los depredadores megafaunales con la producción primaria (Jarman *et al.*, 2002).

Por otro lado, también fueron múltiples los estudios sobre bacterias anaeróbicas en muestras fecales de misticetos en los que se identificaron *Enterococcus faecalis* (Ogawa *et al.*, 2010; McLaughlin y Kopanic, 2017), *Enterococcus sp.*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Edwardsiella ictaluri* y *Clostridium sp* (Ogawa *et al.*, 2010; Guass *et al.*, 2016).

Por último, un estudio llevado a cabo a partir del análisis de muestras fecales de *Balaenoptera musculus* cuantificó e identificó huevos de helmintos (parásitos) (Flores-Cascante *et al.*, 2019) y determinó la prevalencia de dos protozoos (*Cryptosporidium spp* y *Giardia spp*) en cinco mamíferos marinos en los que se incluyó la especie de misticeto *Balaena mysticetus* (Hughes-Hanks *et al.*, 2005). Y, para concluir, un estudio basado en la microbiota del material fecal de dos misticetos de la especie *Balaenoptera musculus*, identificó el hongo *Metschnikowia spp* del filo Ascomycota (Guass *et al.*, 2016).

Las diferentes técnicas de análisis utilizadas para la identificación de microorganismos a partir de heces de misticeto se muestran en la Figura 10. Tal y como se puede observar, en la mitad de los documentos obtenidos sobre identificación de microorganismos se utilizó la extracción y purificación de ADN como técnica de análisis y, en un 25% de los artículos publicados, se utilizó la técnica tradicional de observación al microscopio, ya fuera mediante tinción o sin ella. Por último, los ensayos inmunofluorescentes, los análisis de secuenciación de 16S rRNA y los de isótopos estables de heces aparecieron descritos, cada uno, en el 8.33% de los artículos analizados.

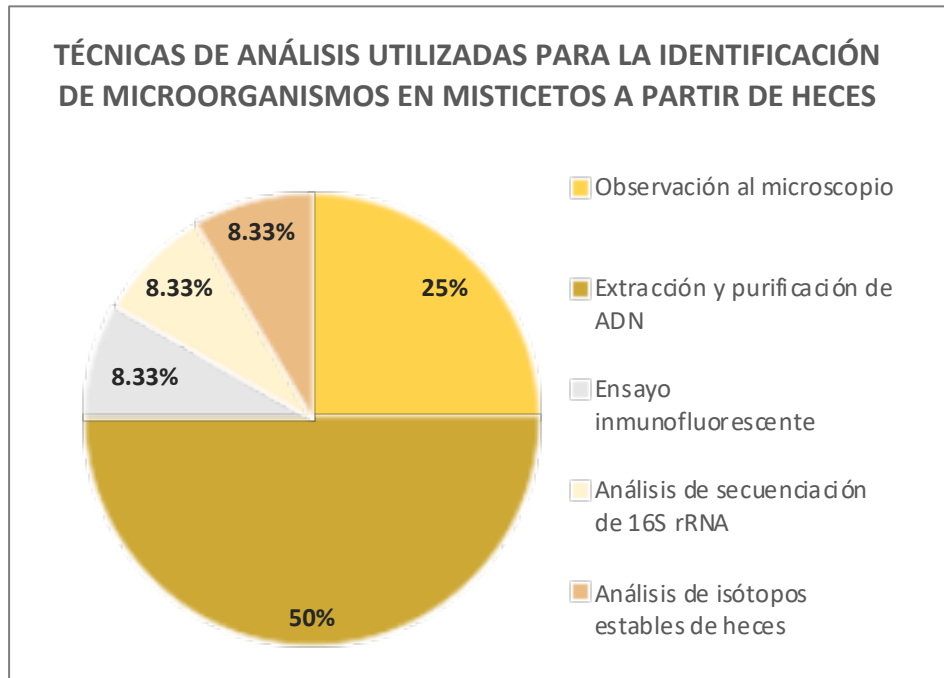


Figura 10. Representación gráfica de las diferentes técnicas de análisis utilizadas para la identificación de microorganismos en misticetos a partir de heces (n=12 artículos).

La importancia que representa el método analítico basado en la extracción y purificación de ADN se debe a que a partir de los métodos de secuenciación de ADN se pueden caracterizar comunidades bacterianas y detectar posibles patógenos permitiendo, a su vez, estudiar otra posible causa de las muertes sucedidas en Península Valdés ya que, como se ha mencionado anteriormente, los microbios patógenos pueden ser causantes de varamientos en cetáceos (Marón *et al.*, 2019). Por otro lado, para estudiar el comportamiento alimenticio de los misticetos a través de la caracterización de la dieta, se puede realizar mediante la extracción del ADN de las presas presentes en muestras fecales (Jarman *et al.*, 2002; Carroll *et al.*, 2019), o bien, mediante la observación al microscopio, otra técnica ampliamente utilizada por permitir la obtención de conocimientos básicos sobre la ecología trófica y el grado de aprovechamiento del alimento (D'Agostino, Hoffmeyer y Degradi, 2016).

Cabe destacar que las demás técnicas aparecen poco utilizadas en los artículos obtenidos sobre identificación de microorganismos en heces de misticeto, ya que se usan con los mismos objetivos que las dos técnicas empleadas en el 75% de las publicaciones, siendo el ensayo inmunofluorescente utilizado para detectar parásitos en heces (Hughes-Hanks *et al.*, 2005), el análisis de secuenciación de 16S rRNA para identificar colonias bacterianas previamente aisladas (Ogawa *et al.*, 2010) y el análisis de isótopos estables como técnica alternativa para el estudio de la dieta de misticetos a corto plazo (Arregui *et al.*, 2018).

5.3.4 Contaminación marina

Para el estudio sobre la exposición de los misticetos a la contaminación marina a partir de muestras fecales únicamente se obtuvo un artículo y, en este, se utilizaba la cromatografía de gases como técnica analítica.

La utilización de esta técnica de análisis se debe a que permite analizar la concentración de organoclorados y pesticidas en muestras fecales de sujetos que previamente han sido contaminados mediante la ingestión de presas contaminadas. De esta manera, se pueden identificar los factores que influyen en la exposición y la bioacumulación de tóxicos, ya que pueden llegar a ser perjudiciales por sus propiedades de biomagnificación (Weisbrod *et al.*, 2000) aunque, como ya se ha mencionado anteriormente, para este tipo de estudio no se recomienda el análisis de heces como metodología analítica.

5.3.5 Productividad primaria marina

Por último, como se puede observar en la Figura 11, también son múltiples las técnicas analíticas que se pueden aplicar a las muestras fecales de misticeto para el estudio de la productividad primaria marina.

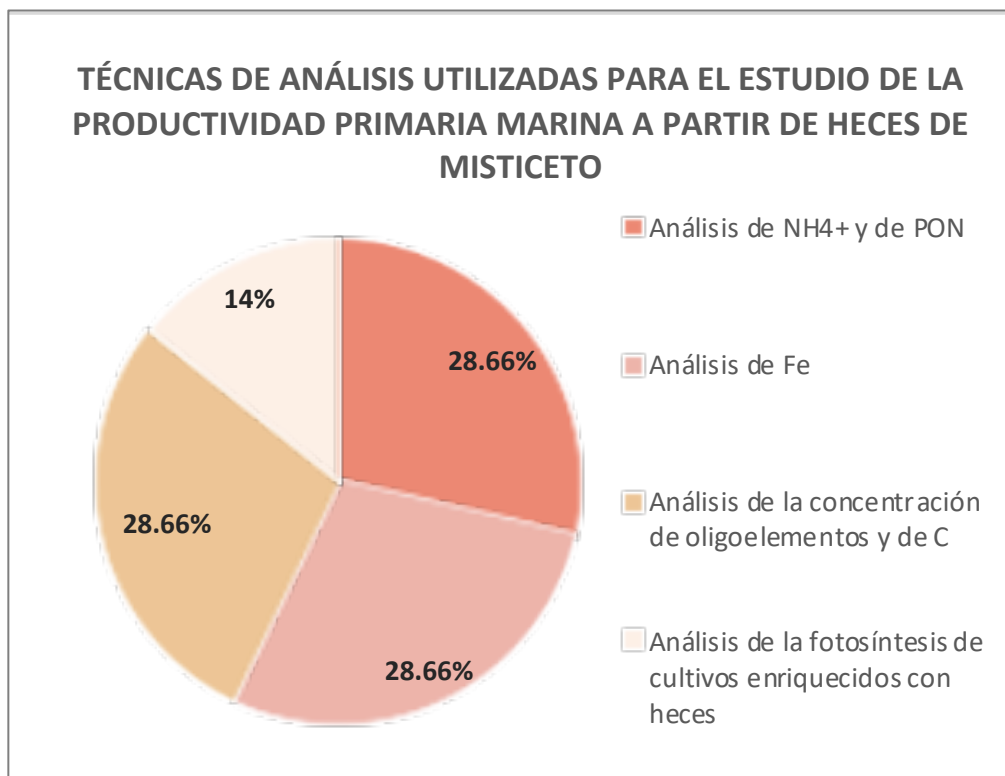


Figura 11. Representación gráfica de las diferentes técnicas de análisis utilizadas para el estudio de la productividad primaria marina a partir del análisis de heces de misticeto (n= 7 artículos).

Tal y como se observa en la Figura 11, las técnicas de análisis de NH_4^+ (amonio) junto con PON (nitrógeno orgánico particulado), análisis de Fe (hierro) y análisis de la concentración de múltiples oligoelementos y C (carbono) fueron utilizadas en la misma proporción de estudios sobre productividad primaria marina basados en el análisis de heces de misticeto, ya que se vieron descritas, cada una, en el 28.66% de los artículos obtenidos.

No obstante, en un 14% de los artículos, se describió el análisis de la fotosíntesis de cultivos enriquecidos con heces de misticeto como método analítico para evaluar la influencia de las heces en la productividad primaria marina.

Los análisis de NH_4^+ y PON en muestras fecales de misticeto son usuales en el estudio de la productividad primaria marina, ya que se utilizan para evaluar como el proceso de defecación de misticetos interviene en el reciclaje rápido y eficiente de nutrientes (Roman y McCarthy, 2010; Roman *et al.*, 2016). Asimismo, los análisis específicos de hierro en muestras fecales de misticeto también son frecuentes en estudios de reciclaje de nutrientes del ecosistema marino por ser este un nutriente limitante en el océano e influir, por ello, en la productividad primaria marina (Nicol *et al.*, 2010; Ratnarajah *et al.*, 2017). Por otro lado, los análisis de varios oligoelementos y carbono a partir de muestras fecales son, de igual modo, utilizados para el estudio del papel de los misticetos en la redistribución de micronutrientes en el medio marino, así como en la captura y almacenamiento de carbono (Ratnarajah *et al.*, 2014; Wing *et al.*, 2014).

Cabe destacar la importancia del único estudio en qué se demuestra que las heces de una especie de misticeto, *Balaenoptera musculus brevicauda*, estimulan el rendimiento fotosintético y el crecimiento de tres especies de fitoplancton marino analizando la fotosíntesis de cultivos enriquecidos con heces porque, a pesar de considerarse estos hallazgos como preliminares, demuestran que los misticetos son un medio potencialmente importante de reciclaje de nutrientes en el medio marino (Smith *et al.*, 2013).

5.4 Metodología de obtención de heces de misticeto

La obtención de heces de misticeto se puede llevar a cabo mediante la utilización de diferentes equipos, tal y como se recoge en la Figura 12.

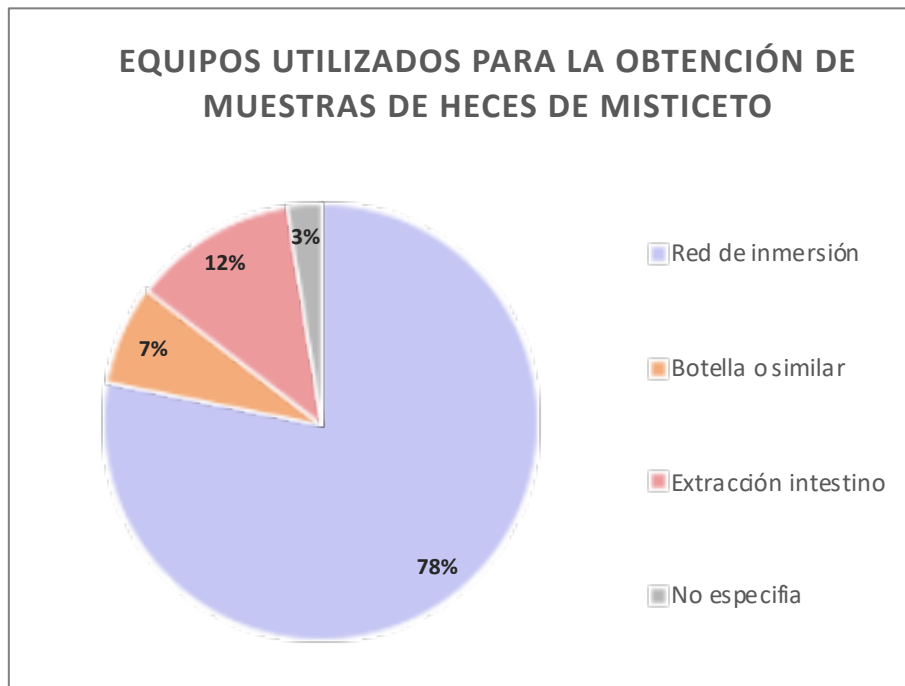


Figura 12. Representación gráfica de los distintos equipos utilizados para la obtención de heces de misticeto (n=43 artículos)

El equipo más utilizado para la recolección de las muestras fecales de misticeto fue la red de inmersión, como se puede observar en la Figura 12, ya que se utilizó en el 78% de los artículos sobre estudios basados en el análisis de heces de misticeto. Cabe destacar que son múltiples las micras de malla que se vieron utilizadas en las redes de inmersión, como se mostrará en adelante.

El hecho de que sea la red de inmersión el método más utilizado para la recolección de muestras fecales se debe a que, mediante su unión al anzuelo telescópico, permite la recolección de la mayor cantidad posible de material fecal y constituye el método de recolección más inocuo para las muestras (Rolland *et al.*, 2005).

Por otro lado, la extracción directa del intestino llevada a cabo durante las necropsias postmortem de individuos varados fue la segunda metodología de obtención de heces más utilizada, aunque únicamente fuera descrita en el 12% de los artículos publicados.

El empleo de este método se debe, por desgracia, a las múltiples muertes que tuvieron lugar en Península de Valdés que trajeron consigo la obtención de ejemplares de misticetos de los que obtener diversas muestras, entre las que se encuentran las muestras del contenido intestinal (Wilson *et al.*, 2016; Marón *et al.*, 2019).

Por último, cabe destacar la poca utilización de metodologías de obtención de heces de misticeto alternativas ya que, entre todas ellas, únicamente aparecen empleadas en el 7% de los artículos publicados. El escaso empleo de botellas o similares para la recolección de muestras fecales se debe a que las muestras que se obtienen contienen una proporción más alta de agua que de heces y esto puede ser contraproducente si las muestras fecales van a ser utilizadas para ensayos hormonales, ya que cabe la posibilidad de que los metabolitos polares de la hormona fecal migren al agua de mar (Hunt *et al.*, 2013).

Por otro lado, y como se ha mencionado anteriormente, fueron diversas las micras de las mallas de red de inmersión utilizadas durante los muestreos de heces de misticeto, tal y como se recogen en la Figura 13.

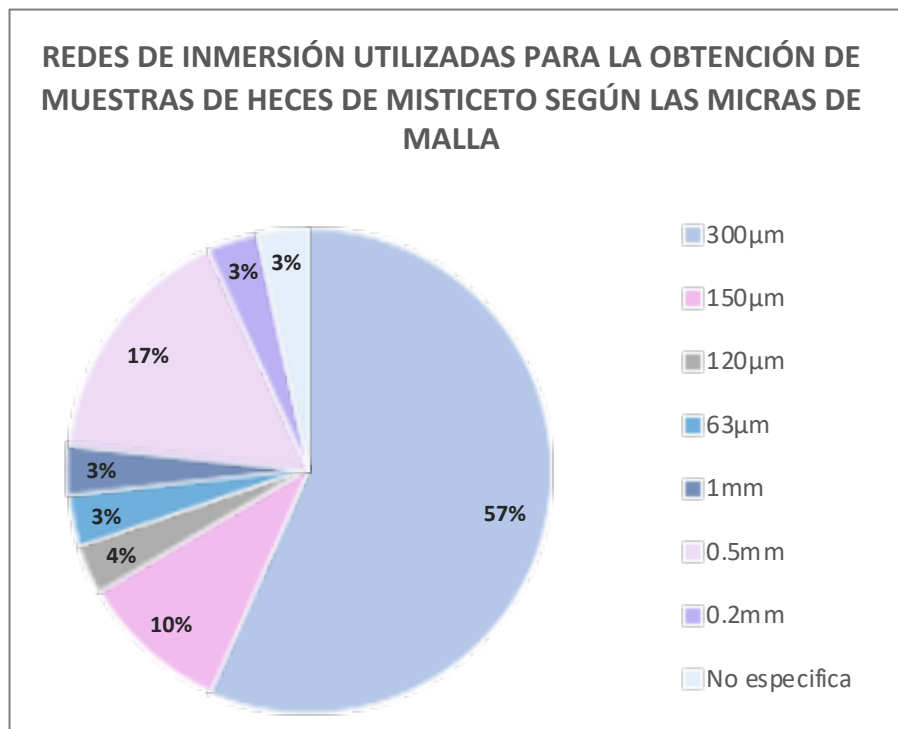


Figura 13. Representación gráfica de las redes de inmersión utilizadas para la obtención de muestras de heces de misticeto según las micras de malla.

La red de inmersión más utilizada para la obtención de heces de misticeto fue la de 300µm de malla, ya que se describió como equipo de muestreo en el 57% de los artículos publicados. Por otro lado, la red de inmersión de 0.5mm de malla supuso el segundo equipo más utilizado para la obtención de muestras fecales de misticeto por describirse en el 17% de los artículos publicados y, el tercero, la malla de 150µm por emplearse en el 10% de los artículos. Las demás redes de inmersión utilizadas en los diferentes artículos no supusieron más del 4% de los instrumentos escogidos para

realizar el muestreo de heces de misticeto tal y como se puede observar en la Figura 13.

El hecho de que exista tanta diversidad en cuánto a las micras de malla utilizadas en las redes de inmersión se debe a que muchas de dichas redes fueron confeccionadas por los investigadores que llevaron a cabo el muestreo (Hunt *et al.*, 2013) y, por lo tanto, cada investigador siguió sus propios criterios para la confección. Otro motivo que explica la diversidad de redes es el hecho de que, durante la realización de algunos estudios basados en el análisis de muestras de heces de misticeto también se analizaron muestras de zooplancton y, por lo tanto, se utilizó la misma red para recolectar tanto muestras fecales como muestras de dichos organismos (Weisbrod *et al.*, 2000; Doucette *et al.*, 2006; Leandro *et al.*, 2009; Carroll *et al.*, 2019).

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos de la revisión bibliográfica llevada a cabo para la realización del presente Trabajo Fin de Grado, se puede concluir:

- Las heces de misticeto representan una importante fuente de información por su método de obtención no invasivo y por los múltiples estudios basados en su análisis.
- Los trabajos analizados basados en el análisis de heces de misticeto incluyen estudios sobre: fisiología, exposición a toxinas marinas, identificación de microorganismos (patógenos y presas), contaminación marina y productividad primaria marina.
- Los trabajos sobre fisiología de misticetos y sobre identificación de microorganismos son los que más utilizan heces como matriz biológica (63% de los artículos publicados analizados)
- Para el estudio sobre la exposición y la bioacumulación de compuestos tóxicos provenientes de la contaminación marina no se recomienda la utilización de las heces como matriz biológica.
- Los estudios realizados con el objetivo de conocer el estado poblacional de los misticetos a partir del análisis de muestras fecales se han publicado a lo largo de los últimos 20 años. Sin embargo, los estudios sobre la importancia ecológica que representan las heces de estos mamíferos marinos para la productividad primaria marina son más recientes y comenzaron a publicarse hace 10 años.
- Los artículos sobre identificación de especies representan un 75% de los artículos publicados en los últimos dos años (18-19), por lo que podemos inferir que es el tema que despierta más interés en la comunidad científica en la actualidad.
- Las especies *Eubalaena glacialis* y *Balaenoptera musculus*, ambas en peligro de extinción, han sido las especies más estudiadas en los últimos 20 años utilizando muestras fecales como matriz biológica (25 de los 43 artículos publicados).
- Las metodologías de análisis más utilizadas en los estudios basados en el análisis de heces de misticeto son:

El ensayo hormonal para los estudios de fisiología de misticetos.

El ensayo de unión a receptor para los estudios sobre la exposición de misticetos a toxinas marinas.

La extracción y purificación de ADN para los estudios sobre identificación de microorganismos en misticetos.

Revisión bibliográfica: Estudio de las heces de misticeto como fuente de información.

Y, los análisis de NH_4^+ (amonio) y PON (nitrógeno orgánico particulado), de Fe (hierro), así como de la concentración de diferentes oligoelementos y carbono para los estudios sobre el papel ecológico de los misticetos en la productividad primaria marina.

- Por último, el método de obtención de heces de misticeto más utilizado según la presente revisión bibliográfica es la red de inmersión de $300\mu\text{m}$ de malla.

7. LÍNEAS FUTURAS

A partir de la revisión bibliográfica llevada a cabo para la realización del presente Trabajo Fin de Grado, se pueden plantear las siguientes líneas de investigación:

- Estudio de microplásticos y nanoplásticos en heces de misticeto
- Estudio de poblaciones de zooplancton a través del análisis de heces de misticeto
- Estudio poblacional de las especies de misticeto en peligro de extinción a través de la identificación de individuos mediante perfiles genéticos a partir de muestras fecales

8. BIBLIOGRAFÍA

Arregui, M. *et al.* (2018) «Stable isotope analysis of fecal material provides insight into the diet of fin whales», *Marine Mammal Science*, 34(4), pp. 1059-1069. doi: 10.1111/mms.12504.

Birnie-Gauvin, K. (2017) «Right whale poo: the key to conserving an endangered species?», *Conservation Physiology*, 5(1), p. 8600. doi: 10.1093/conphys/cox063.

Burgess, E. A. *et al.* (2017) «Adrenal responses of large whales: Integrating fecal aldosterone as a complementary biomarker to glucocorticoids», *General and Comparative Endocrinology*. Elsevier Inc., 252, pp. 103-110. doi: 10.1016/j.ygcen.2017.07.026.

Carroll, E. L. *et al.* (2019) «Multi-locus DNA metabarcoding of zooplankton communities and scat reveal trophic interactions of a generalist predator», *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1-14. doi: 10.1038/s41598-018-36478-x.

Cooke, J. G. (2018a) *Balaenoptera musculus* (errata version published in 2019). *The IUCN Red List of Threatened Species* 2018: e.T2477A156923585. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T2477A156923585.en>.

Cooke, J. G. & Zerbini, A. N. (2018) *Eubalaena australis*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2018: e.T8153A50354147. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-1.RLTS.T8153A50354147.en>.

Cooke, J. G. (2018b) *Eubalaena glacialis*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2018: e.T41712A50380891. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-1.RLTS.T41712A50380891.en>.

Cooke, J. G. (2018c) *Megaptera novaeangliae*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2018: e.T13006A50362794. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T13006A50362794.en>.

Corkeron, P. *et al.* (2017) «A right whale pootree: Classification trees of faecal hormones identify reproductive states in north atlantic right whales (*eubalaena glacialis*)», *Conservation Physiology*, 5(1), pp. 1-9. doi: 10.1093/conphys/cox006.

D'Agostino, V. C. *et al.* (2017) «Domoic acid in a marine pelagic food web: Exposure of southern right whales *Eubalaena australis* to domoic acid on the Península Valdés calving ground, Argentina», *Harmful Algae*. Elsevier B.V., 68, pp. 248-257. doi: 10.1016/j.hal.2017.09.001.

D'Agostino, V. C., Hoffmeyer, M. S. y Degradi, M. (2016) «Faecal analysis of southern right whales (*Eubalaena australis*) in Península Valdés calving ground, Argentina: *Calanus australis*, a key prey species», *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(4), pp. 859-868. doi: 10.1017/S0025315415001897.

D'Agostino, V. C. *et al.* (2015) «Potentially toxic Pseudo-nitzschia species in plankton and fecal samples of *Eubalaena australis* from Península Valdés calving ground, Argentina», *Journal of Sea Research*. Elsevier B.V., 106, pp. 39-43. doi: 10.1016/j.seares.2015.09.004.

Doucette, G. J. *et al.* (2012) «Endangered North Atlantic right whales (*Eubalaena glacialis*) experience repeated, concurrent exposure to multiple environmental neurotoxins produced by marine algae», *Environmental Research*. Elsevier, 112, pp. 67-76. doi: 10.1016/j.envres.2011.09.010.

Doucette, G. J. *et al.* (2006) «Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in North Atlantic right whales *Eubalaena glacialis* and their zooplankton prey in the Bay of Fundy, Canada», *Marine Ecology Progress Series*, 306, pp. 303-313. doi: 10.3354/meps306303.

Fire, S. E. *et al.* (2010) «Trophic transfer of the harmful algal toxin domoic acid as a cause of death in a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) stranding in southern California», *Aquatic Mammals*, 36(4), pp. 342-350. doi: 10.1578/AM.36.4.2010.342.

Flores-Cascante, L. *et al.* (2019) «Helminth Load in Feces of Free-Ranging Blue and Fin Whales from the Gulf of California», *Acta Parasitologica*. Springer International Publishing, 64(3), pp. 625-637. doi: 10.2478/s11686-019-00069-1.

Gillett, R. M. *et al.* (2010) «Molecular identification of individual North Atlantic right whales (*Eubalaena glacialis*) using free-floating feces», *Marine Mammal Science*, 26(4), pp. 917-936. doi: 10.1111/j.1748-7692.2010.00380.x.

Gillett, R. M., White, B. N. y Rolland, R. M. (2008) «Quantification and genetic profiling of DNA isolated from free-floating feces of the North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*)», *Marine Mammal Science*, 24(2), pp. 341-355. doi: 10.1111/j.1748-7692.2008.00192.x.

Goldbogen, J. A., Cade, D. E., Calambokidis, J., Friedlaender, A. S., Potvin, J., Segre, P. S y Werth, A. J., (2017) «How Baleen Whales Feed: The Biomechanics of Engulfment and Filtration», *Annual Review of Marine Science* 9, 367-386. doi: 10.1146/annurev-marine-122414-033905.

Guass, O. *et al.* (2016) «Analysis of the microbial diversity in faecal material of the endangered blue whale, *Balaenoptera musculus*», *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 109(7), pp. 1063-1069. doi: 10.1007/s10482-016-0698-1.

Hughes-Hanks, J. M. *et al.* (2005) «Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Five Marine Mammal Species», *Journal of Parasitology*, 91(5), pp. 1225-1228. doi: 10.1645/ge-545r.1.

Hunt, K. E. *et al.* (2019) «Evaluation of fecal hormones for noninvasive research on reproduction and stress in humpback whales (*Megaptera novaeangliae*)», *General and Comparative Endocrinology*. Elsevier, 280(March), pp. 24-34. doi: 10.1016/j.ygcen.2019.04.004.

Hunt, K. E., Rolland, R. M. y Kraus, S. D. (2015) «Conservation physiology of an uncatchable animal: The North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*)», *Integrative and Comparative Biology*, 55(4), pp. 577-586. doi: 10.1093/icb/icv071.

Hunt, K. E. *et al.* (2013) «Overcoming the challenges of studying conservation physiology in large whales: a review of available methods», *Conservation Physiology*, 1(1), pp. cot006-cot006. doi: 10.1093/conphys/cot006.

Hunt, K. E. *et al.* (2006) «Analysis of fecal glucocorticoids in the North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*)», *General and Comparative Endocrinology*, 148(2), pp. 260-272. doi: 10.1016/j.ygcen.2006.03.012.

Jarman, S. N. *et al.* (2002) «A DNA-based method for identification of krill species and its application to analysing the diet of marine vertebrate predators», *Molecular Ecology*, 11(12), pp. 2679-2690. doi: 10.1046/j.1365-294X.2002.01641.x.

Jefferson, T. A., Leatherwood, S y Webber, M.A., (1993) *FAO Species Identification Guide. Marine mammals of the World*. Roma, FAO.

Lavery, T. J. *et al.* (2014) «Whales sustain fisheries: Blue whales stimulate primary production in the Southern Ocean», *Marine Mammal Science*, 30(3), pp. 888-904. doi: 10.1111/mms.12108.

Leandro, L. F. *et al.* (2009) «Exposure of the North Atlantic right whale *Eubalaena glacialis* to the marine algal biotoxin, domoic acid», *Marine Ecology Progress Series*, 398, pp. 287-303. doi: 10.3354/meps08321.

Lefebvre, K. A. *et al.* (2002) «From sanddabs to blue whales: The pervasiveness of domoic acid», *Toxicon*, 40(7), pp. 971-977. doi: 10.1016/S0041-0101(02)00093-4.

Leroy, G., Carroll, E. L., Bruford, M. W., DeWoody, J. A., Strand, A., Waits, L. y Wang, J., (2017) «Next-generation metrics for monitoring genetic erosion within populations of conservation concern». *Evolutionary Applications* 11(7), 1066–1083. doi: 10.1111/eva.12564

Marón, C. F. *et al.* (2019) «Symbiotic microbes and potential pathogens in the intestine of dead southern right whale (*Eubalaena australis*) calves», *Anaerobe*, 57, pp. 107-114. doi: 10.1016/j.anaerobe.2019.04.003.

Martin AR, da Silva VMF (2004) «Number, seasonal movements, and residency characteristics of river dolphins in an Amazonian floodplain lake system». *Canadian Journal of Zoology* 82, 1307–1315.

de Mello, D. M. D. y de Oliveira, C. A. (2016) «Biological matrices for sampling free-ranging cetaceans and the implications of their use for reproductive endocrine monitoring», *Mammal Review*, 46(2), pp. 77-91. doi: 10.1111/mam.12055.

Nickels, C. F., Sala, L. M. y Ohman, M. D. (2018) «The morphology of euphausiid mandibles used to assess selective predation by blue whales in the southern sector of the California Current System», *Journal of Crustacean Biology*, 38(5), pp. 563-573. doi: 10.1093/jcbiol/ruy062.

Nicol, S. *et al.* (2010) «Southern Ocean iron fertilization by baleen whales and Antarctic krill», *Fish and Fisheries*, 11(2), pp. 203-209. doi: 10.1111/j.1467-2979.2010.00356.x.

Ogawa, G. *et al.* (2010) «Identification of facultative anaerobic bacteria isolated from the intestine of the minke whale *Balaenoptera acutorostrata* by 16S rRNA sequencing analysis», *Fisheries Science*, 76(2), pp. 177-181. doi: 10.1007/s12562-009-0211-0.

Ratnarajah, L., Nicol, S. y Bowie, A. R. (2018) «Pelagic iron recycling in the Southern Ocean: Exploring the contribution of marine animals», *Frontiers in Marine Science*, 5(MAR), pp. 1-9. doi: 10.3389/fmars.2018.00109.

Ratnarajah, L. *et al.* (2017) «Physical speciation and solubility of iron from baleen whale faecal material», *Marine Chemistry*. Elsevier B.V, 194, pp. 79-88. doi: 10.1016/j.marchem.2017.05.004.

Ratnarajah, L. *et al.* (2014) «The biogeochemical role of baleen whales and krill in

Southern Ocean nutrient cycling», *PLoS ONE*, 9(12), pp. 1-18. doi: 10.1371/journal.pone.0114067.

Reyes, J., (2009). *Ballenas, Delfines y Otros Cetáceos del Perú. Una fuente de información*. Perú: Squema Ediciones, 23, pp. 25-29.

Rolland, R. M. *et al.* (2017) «Fecal glucocorticoids and anthropogenic injury and mortality in North Atlantic right whales *Eubalaena glacialis*», *Endangered Species Research*, 34, pp. 417-429. doi: 10.3354/esr00866.

Rolland, R. M., Parks, S. E., Hunt, K. E., Castellote, M., Corkeron, P. J., Nowacek, D. P., Wasser, S. K. y Kraus, S. D., (2012) «Evidence that ship noise increases stress in right whales», *Proceedings. Biological sciences/The Royal Society* 279, 2363–2368.

Rolland, R. M., Hunt, K. E., Doucette, G. J., Rickard, L. G. y Wasser, S. K., (2007) «The inner whale: Hormones, biotoxins and parasites», In: Kraus, S. D. y Rolland, R. M., editors. *The urban whale: North Atlantic right whales at the crossroads*. Cambridge (MA): Harvard University Press, 232–272.

Rolland, R.M., Hamilton, P. K., Kraus, S. D., Davenport, B., Bower, R. M. y Wasser, S. K., (2006) «Faecal sampling using detection dogs to study reproduction and health in North Atlantic right whales (*Eubalaena glacialis*)». *J. Cetacean Res. Manag., Special Issue* 8, 121–125.

Rolland, R. M. *et al.* (2005) «Assessing reproductive status of right whales (*Eubalaena glacialis*) using fecal hormone metabolites», *General and Comparative Endocrinology*, 142(3), pp. 308-317. doi: 10.1016/j.ygcen.2005.02.002.

Roman, J. *et al.* (2016) «Endangered right whales enhance primary productivity in the bay of fundy», *PLoS ONE*, 11(6), pp. 1-14. doi: 10.1371/journal.pone.0156553.

Roman, J. y McCarthy, J. J. (2010) «The whale pump: Marine mammals enhance primary productivity in a coastal basin», *PLoS ONE*, 5(10). doi: 10.1371/journal.pone.0013255.

Smith, L. V. *et al.* (2013) «Preliminary investigation into the stimulation of phytoplankton photophysiology and growth by whale faeces», *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Elsevier B.V., 446, pp. 1-9. doi: 10.1016/j.jembe.2013.04.010.

Valentini, A., Pompanon, F., Taberlet, P., (2009) «DNA barcoding for ecologists». *Trends in Ecology & Evolution* 24 (2), 110–117. doi: 10.1016/j.tree.2008.09.011.

Valenzuela-Molina, M. *et al.* (2018) «Fecal steroid hormones reveal reproductive state in female blue whales sampled in the Gulf of California, Mexico», *General and Comparative Endocrinology*, 261, pp. 127-135. doi: 10.1016/j.ygcen.2018.02.015.

de Vos, A. *et al.* (2018) «New determination of prey and parasite species for Northern Indian Ocean blue whales», *Frontiers in Marine Science*, 5(APR). doi: 10.3389/fmars.2018.00104.

WoRMS Editorial Board (2020): *World Register of Marine Species*. Disponible en: <http://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2020-06-11. doi:10.14284/170

WoS (2020): *Web Of Science*. Disponible en: https://apps.webofknowledge.com/WOS_GeneralSearch_input.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&SID=C3wM5vZtYFISl6xOBhh&preferencesSaved=

Weisbrod, A. V. *et al.* (2000) «Organochlorine Exposure and Bioaccumulation in the Endangered Northwest Atlantic Right Whale (*Eubalaena Glacialis*) Population», *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(3), p. 654. doi: 10.1897/1551-5028(2000)019<0654:oeabit>2.3.co;2.

Werth, A. J. *et al.* (2018) «Filtration area scaling and evolution in mysticetes: Trophic niche partitioning and the curious cases of sei and pygmy right whales», *Biological Journal of the Linnean Society*, 125(2), pp. 264-279. doi: 10.1093/BIOLINNEAN/BLY121.

Werth, A. J., (2000) *Feeding in Marine Mammals, Feeding*. doi: 10.1016/b978-012632590-4/50017-4.

Wilson, C. *et al.* (2016) «Southern right whale (*Eubalaena australis*) calf mortality at Península Valdés, Argentina: Are harmful algal blooms to blame?», *Marine Mammal Science*, 32(2), pp. 423-451. doi: 10.1111/mms.12263.

Wing, S. R. *et al.* (2014) «Seabirds and marine mammals redistribute bioavailable iron in the Southern Ocean», *Marine Ecology Progress Series*, 510, pp. 1-13. doi: 10.3354/meps10923.