

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Zoología y Antropología Física



TESIS DOCTORAL

Interacciones ecológico-evolutivas entre aves y bacterias: implicaciones en
huevos y plumas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

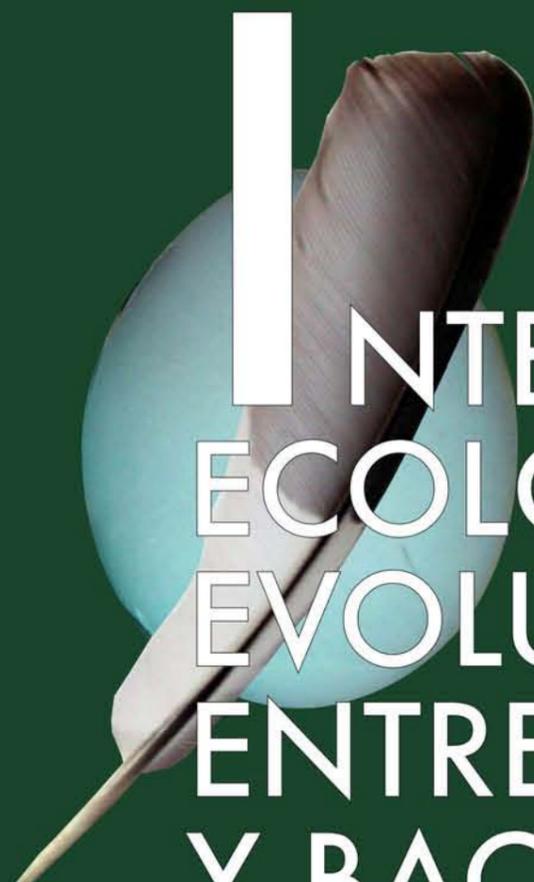
PRESENTADA POR

Rafael Ruiz de Castañeda Blum

Director

Juan Moreno Klemming
Ana Isabel Vela Alonso
Víctor Briones Dieste

Madrid, 2012



INTERACCIONES ECOLÓGICO EVOLUTIVAS ENTRE AVES Y BACTERIAS: IMPLICACIONES SOBRE HUEVOS Y PLUMAS

Rafael Ruiz de Castañeda Blum



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID



CSIC



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

INTERACCIONES ECOLÓGICO-EVOLUTIVAS ENTRE AVES Y BACTERIAS: IMPLICACIONES SOBRE HUEVOS Y PLUMAS

Departamento de Zoología y Antropología Física
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid

Memoria presentada por el Licenciado Rafael Ruiz de Castañeda Blum para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, dirigida por el Dr. Juan Moreno Klemming del Departamento de Ecología Evolutiva del Museo Nacional de Ciencias Naturales-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y la Dra. Ana Isabel Vela Alonso y el Dr. Víctor Briones Dieste del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

El Doctorando
Rafael Ruiz de Castañeda

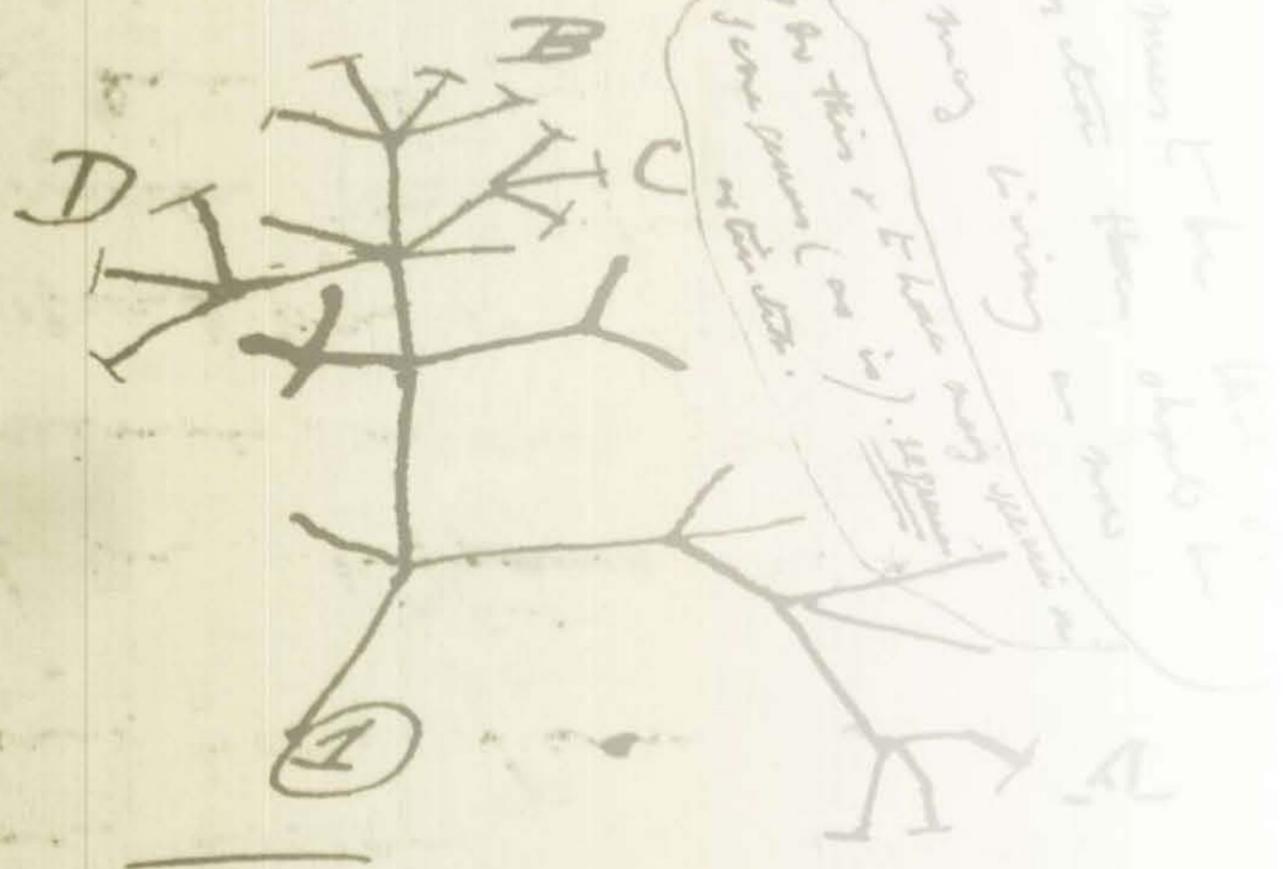
Vº Bº del Director
Juan Moreno

Vº Bº del Director
Ana Isabel Vela

Vº Bº del Director
Víctor Briones

Vº Bº del Tutor
Mª Ángeles
Vázquez

I think



A mis padres, Luis y Petra,
a mi hermana, Ana,
y como no, a Rosina

There between A & B. various
sort of relation. C & B. The
first gradation, B & D
rather greater distance
then genus would be
formed. - bearing relation

INDICE

Agradecimientos	6
Introducción	10
Objetivos	24
Resultados y Discusión	26
Discusión integradora	46
Conclusiones	57
Bibliografía	58
Capítulo 1	70
Carga bacteriana sobre huevos en el papamoscas cerrojillo: Factores ambientales y maternos	
Capítulo 2	82
Prevalencia de bacterias cultivables potencialmente patógenas sobre huevos y en cloacas de hembras de papamoscas cerrojillo en un hábitat templado del centro de España	
Capítulo 3	94
Prevalencia de <i>Salmonella</i> y <i>Yersinia</i> en el papamoscas cerrojillo (<i>Ficedula hypoleuca</i>) en el centro de España	
Capítulo 4	104
Inicio temprano de la incubación y carga bacteriana sobre huevos en un paseriforme troglodita en un hábitat templado	
Capítulo 5	120
Secar los huevos para inhibir a las bacterias: La incubación durante la puesta en un paseriforme troglodita	
Capítulo 6	132
Degradabilidad bacteriana de un ornamento no melanizado a nivel intra-pluma: ¿Un rol para las bacterias degradadoras de plumas en la selección sexual?	
Capítulo 7	150
Degradabilidad bacteriana de una señal blanca del plumaje: Asociaciones con el esfuerzo parental y fecha de reproducción en un paseriforme migrador	

1

2

3

A GRADECIMIENTOS

A bordo de “Gloria”, en algún punto del océano Atlántico entre Cabo Verde y las Antillas Occidentales, me fue concedida una beca predoctoral JAE del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Una tesis doctoral ha sido, en mi opinión, un intenso proceso de aprendizaje, y aprender del ejemplo, Juan Moreno, es lo que la ha hecho posible. Juan Moreno es ciencia en estado puro, brillantez y dedicación a la máxima potencia. Me siento enormemente afortunado por haber contado con él como director de tesis. Le estoy y estaré siempre profundamente agradecido por todo.

Si Juan Moreno es la ecología y la evolución de esta tesis, Ana Isabel Vela y Víctor Briones son la microbiología. Ana Isabel Vela y Víctor Briones han hecho posible que disfrute de uno de los mejores laboratorios de microbiología de Europa. Las buenas costumbres en las prácticas microbiológicas las he aprendido de Ana Isabel Vela. Además, me contentaría con haber adquirido tan sólo una pequeña parte de su finísimo “ojo microbiológico”. Víctor Briones, siempre resolutivo en sus razonamientos. A ambos les estoy enormemente agradecido por todo. Debido a la necesidad de simultanear el trabajo de campo con el de laboratorio, esto es “ponerme la bata sin quitarme las botas”, me he visto en muchas ocasiones forzado a llevar fechas y horarios de trabajo de laboratorio complicados y difícilmente compatibles con el resto del mundo. Además, mi casa durante estos cuatro años ha sido inevitablemente el Museo Nacional de Ciencias Naturales. Por todo ello, Ana Isabel Vela, Víctor Briones y yo hemos compartido menos tiempo del que realmente nos hubiera gustado.

Con Judith Morales escribí mi primer artículo científico, con Elisa Lobato capturé a mi primer papamoscas y con Josué Martínez de la Puente asistí a mi primer congreso. Ellos ya han pasado por aquí y lo han hecho dejando su sello. Son personas y científicos por los que siento muchísimo cariño y admiración. Reflejan además el tradicional hermanamiento de los grupos de investigación de Juan Moreno y Santiago Merino. Santiago Merino ha sido para mí casi un segundo padre en este mundo de la investigación y nosotros, Judith Morales, Elisa Lobato, Josué Martínez de la Puente, Juan Rivero, Sara del Cerro, Sonia González-Braojos y Rodrigo Mejía, hermanos. Álex Cantarero es ya también parte de este equipo. Unos con los herrerillos y otros los papamoscas, unos antes y otros después, hemos compartido no sólo las tormentas y heladas de las primaveras de Valsaín sino todo el huracán que supone la temporada de trabajo de campo y más ampliamente una tesis doctoral. Todos ellos son partícipes de este trabajo.

Durante la primavera de 2008, el trabajo de laboratorio adquirió unas dimensiones colosales y Elisa Lobato quedó a merced de las lluvias y de los papamoscas mientras yo de las bacterias. Elisa Lobato afrontó estoicamente sin mi colaboración varias semanas de capturas de papamoscas. Quisiera darle especialmente las gracias por ello. También a Santiago Merino, Josué Martínez de la Puente, Juan Rivero y Sara del Cerro por la gran ayuda prestada durante aquellos días.

Es difícil explicar lo intenso que puede llegar a ser el hecho de simultanear trabajo de campo y de laboratorio, especialmente cuando consideramos la gran sincronía de los papamoscas en Valsaín y cuando nos enfrentamos a las bacterias. Hay que vivirlo. En este sentido Sonia González-Braojos me entiende perfectamente. Quisiera agradecerle especialmente por tanto campo y tanto laboratorio juntos. Sin su participación esta tesis no hubiera sido posible.

Quisiera agradecer además a otros investigadores del Departamento de Ecología Evolutiva del Museo o que han pasado por él. Entre otros, Óscar Gordo, Diego Gil, Juan José Sanz, José Martín, Pilar López, Juanto Fargallo o Andrés Barbosa. De una manera o de otra, en mayor o

menor medida, mi interacción con ellos me ha servido de ayuda. Óscar Gordo y Diego Gil merecen especial mención.

Mis muchas conversaciones con Óscar Gordo, trabajador infatigable y diligente hasta los extremos, me han enriquecido y me han dado siempre un plus de motivación para seguir leyendo, escribiendo o analizando datos. Me ha resuelto muchísimas dudas y me ha dado una enorme tranquilidad poder contar con su ayuda en cualquier momento.

Diego Gil me permitió desarrollar una primera estancia internacional en la University of St Andrews (Escocia) incluso antes de comenzar la tesis, poco después de licenciarme. Fue una experiencia fantástica y muy valiosa en muchos sentidos. Aprendí a hacer una PCR, descubrí Escocia y ratifiqué mi pasión por el mar y lo marino, y lo que es más importante conocí a investigadores como Jeff Graves, Peter Slater, Miguel Barbosa, Valentina Islas y Patricia Cellis, entre otros.

Ya durante la tesis, desarrollé dos estancias internacionales. La primera en Francia en la Université Paris-Sud con Anders P. Møller. Haber podido trabajar con Anders P. Møller durante casi dos meses ha sido un auténtico lujo y le estoy muy agradecido por haberme dado esta posibilidad. La segunda en EE.UU. en la Ohio Wesleyan University con Edward Burtt. Edward Burtt es coautor de los dos capítulos de esta tesis que conforman el tercer bloque referido a plumas y bacterias. Edward Burtt es sinceramente una de las personas más entrañables que he conocido. Sus numerosos estudiantes me fueron de gran ayuda, tanto en lo personal como lo profesional, durante mi estancia en Delaware (OH). Agradezco también a todos los investigadores del Department of Botany/Microbiology y Genetics/Molecular Biology que me han ayudado directa o indirectamente a alcanzar mis objetivos de trabajo. Mi estancia en Delaware fue muy agradable debido a la constante atención de todo el equipo de relaciones internacionales de la Universidad.

Quiero agradecer a Juan José Soler y Juan Manuel Peralta-Sánchez, de la Estación Experimental de Zonas Áridas (EEZA), y a Manuel Martín-Vivaldi, de la Universidad de Granada (UGR), por haberse interesado siempre por el desarrollo de esta tesis y haberme dado buenos consejos y sugerencias para nuestras investigaciones en el campo de la ecología microbiana en aves silvestres. Ellos abrieron el camino que nosotros luego hemos seguido. A todos los investigadores y becarios de la EEZA y del Departamento de Zoología de la UGR que se fusionan en un gran equipo de trabajo en la cueva de Guadix, quiero darles las gracias por haberme recibido siempre como a uno más.

Respecto a los microbiólogos, veterinarios y técnicos de laboratorio, agradezco muchísimo toda la atención y ayuda que me han prestado Almudena Casamayor, Verónica Sánchez del Rey, Leydis Zamora, Lucía, Noelia y Alberto en mi labores en VISAVET. Ellos han hecho mucho más agradables mis largas sesiones de trabajo en la banca y frente al mechero. Por todo ello y mucho más les considero una parte importante de esta tesis.

Añado un agradecimiento general a todo el personal de VISAVET, del Museo y del Ventorrillo. Paloma Cadahía, Clara Cardeñosa y Chelo Díez me han sacado de más de un lío administrativo, Antonio Teijón de más de uno informático.

Los amigos han sabido muchos de ellos darle la nota de humor a mi exigente situación profesional y entender que en estos cuatro años sólo he podido ser amigo a ratos. Han sabido reírse de mí y hacer que me ría de mí mismo. He hecho muy buenos amigos en Madrid, entre otros muchos, destaco al charrúa Pato y a su mujer Vanesa. También en Madrid he profundizado en algunas amistades que ya tenía, la guapísima Alejandra y “los tarifeños por Madrid”, Andrés, Luisa, Christian y Vanesa. Doy gracias a todos ellos.

Doy gracias a mis amigos del Sur, a los de casa, por haber disfrutado tanto de Tarifa, del mar y del viento, por mí durante todo este tiempo. Manolo y Alejandro son sólo algunos de esos locos. Esta tesis es también de mi amigo Mateo por que ambos somos de Tarifa, ambos somos biólogos y a ambos nos han unido siempre las mismas inquietudes intelectuales. A todos nos une un enorme amor por Tarifa. Podría seguir con Bruna, Patri, Angela, Ani y familia.

Por supuesto, a Ludo. Ludo es simplemente una parte de casa, uno más de la familia. Gracias por tantos kilómetros en África juntos, gracias por tantas cosas por mis padres.

A la familia Rosario Linares, desde el desierto de Tabernas en Almería hasta las costas de Málaga pasando por la Alpujarra de Granada, les estoy a todos sin excepción profundamente agradecido por haberse interesado siempre por mí y por mis progresos, y haberme acogido como un primo, un hermano o un hijo más. No hay para mí mejor cocina española que la que se cuece en los incansables fogones de Rosa. Gracias por reservarme el sitio de la ventana. Eduardo culturiza con cada palabra. Las hermanas, Natalia, Elena y Mar son para mí nada menos que una extensión de Rosina, cada una a su manera. Con Natalia tengo un *feeling* singular. Samba, genial. Gracias a todos.

A juzgar por mi acento sureño es difícil pensar que tengo sangre de lo más profundo de los Alpes, de Nidwalden. Gracias a mi padrino Dietmar Blum y a Daniela por tantas buenas cosas durante estos últimos años. Obviamente, Madelaine, Tom, Chris, Helenka, Milagritos y Darío. Gracias por esos buenos ratos juntos.

Esta tesis doctoral es “culpa” de mis padres, Luis y Petra. No tuve elección. Cuando uno crece en Tarifa y África, recogiendo setas en Los Alcornocales, presenciando el paso del Estrecho de las aves migradoras, tallando fósiles en el Sáhara u observando a las limícolas en Banque D’Arguin en Mauritania, a los elefantes en el Delta del Okavango en Botswana y a las orcas en las costas de Namibia, apasionarse por la naturaleza es una consecuencia inevitable. Mis padres me enseñaron a ser curioso y a disfrutar observando la naturaleza, cualidades que, en mi opinión, han sido muy valiosas para afrontar esta tesis doctoral. Mis padres han sido pilares de todas las etapas de mi vida, aunque desde la lejanía también de ésta. Por esta tesis he sacrificado poder estar con ellos literalmente en más de medio mundo durante estos últimos años. Cuando el aliento y las palabras de motivación de una madre llegan desde la Isla de Pascua o desde Las Galápagos adquieren un valor emocional añadido. Gracias por todo.

A mi hermana Ana, no he podido dedicarle todo el tiempo que se merecía en ausencia de mis padres. Mis visitas a Tarifa y a Ginebra, en Suiza, han sido inevitablemente demasiado escasas. Vivimos una curiosa relación de hermanos. En Delaware (OH) hemos pasado momentos que quedarán sólo para el recuerdo de los dos. Gracias por todo a tí también.

Estas últimas palabras y todas las que siguen a continuación te las dedico de corazón a tí, Rosina. Nadie como tú ha sabido reír las penas y llorar las alegrías de esta tesis. Has sido lo mejor de cada uno de los días de estos cuatro años. He hecho una tesis contigo, ahora quiero hacer una sobre tí!

INTRODUCCIÓN GENERAL

Marco teórico general

Tal y como expresara Haeckel en 1869 “la ecología es el estudio de todas las complejas interrelaciones que Darwin consideraba condiciones de la lucha por la existencia”. La principal lección que nos ofrecen los estudios ecológicos es que todos los organismos están implicados en una complejísima trama de interacciones con otros y con su medio, lo que determina una actuación continua, aunque de intensidad variable, de los procesos asociados a la selección natural (Moreno 2008). La manifestación más íntima o estrecha de la interacción entre dos organismos es aquella en la que estos evolucionan juntos, lo que se conoce genéricamente como simbiosis (Moyá y Peretó 2011). Un caso claro de simbiosis es la que existe entre un microorganismo y un macroorganismo sobre o en el que se desarrolla el primero, pudiendo tratarse más específicamente de parasitismo, mutualismo o comensalismo según los efectos de la interacción sobre la eficacia biológica de cada uno de los participantes.

Esta tesis doctoral se centra en la ecología evolutiva de la interacción parásito-hospedador, usando como modelo parásito a las bacterias y como modelo hospedador a las aves, en concreto al papamoscas cerrojillo *Ficedula hypoleuca*, un passeriforme troglodita tradicionalmente estudiado en ecología evolutiva (Lundberg y Alatalo 1992). Las bacterias son consideradas aquí como patógenos potenciales capaces de ejercer presiones de selección sobre diferentes componentes de la eficacia biológica de las aves (ej., éxito de eclosión, expresión de ornamentos del plumaje etc.). Estas presiones de selección ejercidas por las bacterias pueden variar de acuerdo con las fluctuaciones de las condiciones ambientales y, por otra parte, las defensas mostradas por las aves frente a estas bacterias pueden a su vez depender de sus estrategias vitales (Møller 1997). El estudio de la influencia bacteriana y de las defensas frente a bacterias patógenas en el marco de la evolución de las estrategias vitales de las aves (Stearns 1992) es una cuestión casi inexplorada pero con importantes implicaciones ecológicas y evolutivas, y por ende en la biología de la conservación. Así, por ejemplo, el estudio de la influencia de los protozoos parásitos en la expresión de caracteres sexuales secundarios en aves tiene un bagaje de casi tres décadas desde la publicación del trabajo seminal de Hamilton y Zuk (1982), mientras que las bacterias patógenas (Nolan et al. 1998, Brawner et al. 2000, Hill et al. 2004), pero más concretamente las bacterias degradadoras de plumas (FDB), posiblemente aquéllas que afectan de manera más directa a los ornamentos del plumaje, tan sólo han sido consideradas recientemente (Shawkey et al. 2007, Burt et al. 2010).

Esta carencia general de conocimientos se debe, en parte, a que el estudio de la interacción bacterias-aves ha estado tradicionalmente acotado al campo de la veterinaria y de la producción avícola, centrándose por tanto en las implicaciones zoonóticas y económicas derivadas de infecciones de aves de corral con cepas bacterianas patógenas (Humphrey 1994). Además, los escasos estudios desarrollados en condiciones silvestres están sesgados hacia especies de aves silvestres estrechamente ligadas a las actividades humanas. Estos estudios carecen asimismo de un enfoque poblacional y generalmente desatienden los posibles efectos subletales de las bacterias sobre la eficacia biológica (ej., efectos sobre éxito reproductor, expresión de caracteres sexuales secundarios etc.) (Benskin et al. 2009).

La microbiología aviar como una ciencia propiamente ecológica y evolutiva es por tanto una disciplina emergente que hermana a ecólogos evolutivos y microbiólogos. Esta tesis doctoral pretende ser una modesta contribución a este prometedor campo multidisciplinar de investigación.

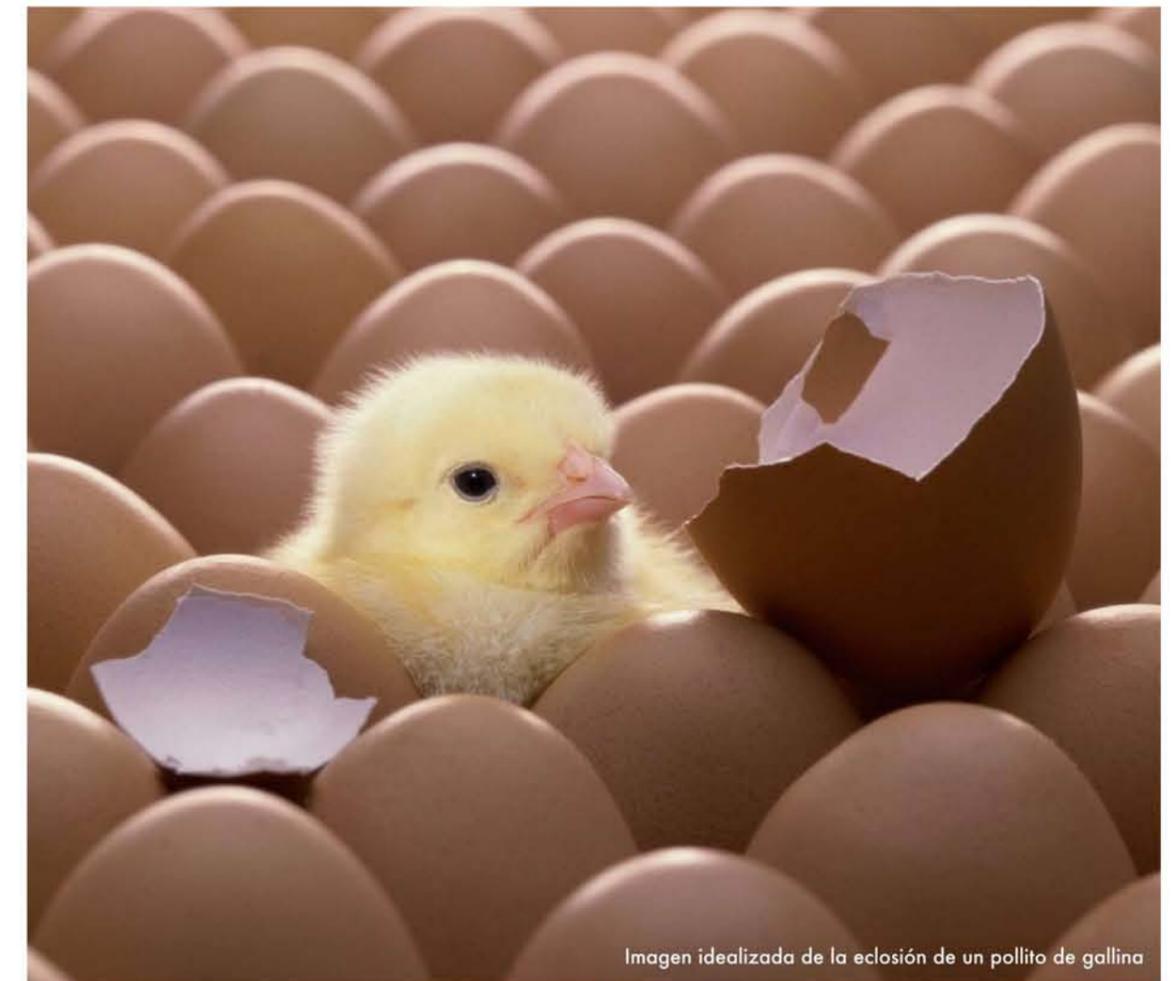


Imagen idealizada de la eclosión de un pollito de gallina

El huevo de las aves como micro-hábitat bacteriano

Desde una perspectiva ecológica, las bacterias se caracterizan principalmente por su ubicuidad, plasticidad y diversidad (Whitman et al. 1998, Rossello-Mora y Amman 2001, Mlot et al. 2004, Horner-Devine et al. 2004). Es por ello que la superficie y el contenido de los huevos de las aves, tanto las de corral como las silvestres, pueden ser colonizados por las bacterias.

Tras el proceso de formación de la cáscara del huevo en la llamada glándula de la cáscara en la porción terminal del oviducto (Board et al. 1994, Scott 2010), las bacterias maternas presentes en el propio oviducto y fundamentalmente en la cloaca, pueden colonizar la superficie del huevo (Humphrey 1994). La cloaca es una estructura propia de aves y reptiles que presenta la singularidad anatómica de que es el punto de confluencia del tracto digestivo y genital-urinario. Así, en su paso por la cloaca, el huevo procedente del oviducto se impregna directamente con material fecal y fluidos o exudados de origen genital y/o urinario potencialmente ricos en bacterias (Barrow 1994, Kobayashi et al. 1997, Lombardo et al. 1996). En los capítulos 1 y 2 de esta tesis se analiza la posible transmisión vertical de bacterias desde la cloaca a la superficie de los huevos.

La composición bacteriana cloacal en aves silvestres varía en función de factores ambientales como el tipo de alimentación y/o hábitat (Lucas y Heeb 2005, Klomp et al. 2008) y/o factores filogenéticos (Ruiz-Rodríguez et al. 2009a). Además, las hembras podrían recibir bacterias en su cloaca por transmisión horizontal durante la cópula con el macho (Lombardo et al. 1999, Steward y Rambo 2000, Hupton et al. 2003). Las propias interacciones ecológicas (ej., competencia) entre las bacterias (Soler et al. 2010) y la acción del sistema inmunitario podrían modular activamente la composición bacteriana indígena del tracto intestinal-cloacal (Berg 1996, Soler et al. 2011). Tras la oviposición, son las bacterias ambientales presentes en el aire (Northcut et al. 2004), en el material vegetal del nido (Singleton y Harper 1998, Goodenough et al. 2010) o en sus materiales accesorios como plumas (Peralta-Sánchez et al. 2010, 2011), junto con otras bacterias maternas presentes en las plumas o piel de la placa incubatriz (Burt e Ichida 1999, Lucas et al. 2005, Gunderson et al. 2009), las que se suman para conformar la comunidad bacteriana de la superficie del huevo.

Si bien una parte importante de esta comunidad está representada por bacterias saprófitas o comensales, algunas de éstas son patógenas oportunistas (Cook et al. 2005a). Además, ciertos grupos de bacterias como los géneros *Pseudomonas*, *Salmonella* o *Yersinia* (genéricamente conocidas como pseudomonas, salmonelas o yersinias), entre otras, incluyen cepas bacterianas patógenas para el embrión y con importantes implicaciones zoonóticas. Estudios realizados en aves de corral han descrito a las pseudomonas como máximos responsables de la contaminación interna del huevo debido a su capacidad de degradar la cutícula de la cáscara y consecuentemente de penetrar a través de los poros de la misma (Dockstater 1952, Florian y Trussell 1957). Las salmonelas son posiblemente el grupo de bacterias más conocidas debido a los riesgos que implican para la salud pública (Humphrey 1994). Los estudios de la prevalencia de estas bacterias en aves silvestres son escasos y generalmente carecen de un correcto enfoque ecológico (Benskin et al. 2009). Los capítulos 2 y 3 de esta tesis pretenden ser una contribución a este vacío en la literatura.

La temperatura y la humedad del aire en contacto con los huevos en el nido son factores críticos para la proliferación y supervivencia bacterianas (Maier et al. 2000). Ambos factores están relacionados y podrían explicar parte de la variación de la carga y composición bacteriana de la superficie de los huevos (cuestión abordada en el capítulo 1) así como la probabilidad de contaminación de su contenido por penetración a través de la cáscara (Bruce y Drysdale 1994, Cook et al. 2003, 2005a). Poco después de la oviposición, cuando la temperatura del huevo es superior a la del ambiente, se produce una presión negativa hacia el interior del huevo de modo que, en presencia de humedad sobre la superficie, cabe la posibilidad de que las bacterias sean arrastradas a través de los poros hacia el interior pudiendo infectar potencialmente al embrión en desarrollo (Board et al. 1979, Bruce y Drysdale 1994, Kobayashi et al. 1997). Este proceso puede ser contrarrestado por la presencia de una batería de adaptaciones defensivas del huevo de tipo físico (ej., cutícula lipo-proteica de la cáscara, Jacob et al. 1979, Sparks 1994) y químico (ej., proteínas antimicrobianas del albumen, Saíno et al. 2002, Well-Labadie et al. 2007). Además, las defensas comportamentales como la incubación actúan “secando” los huevos (D’Alba et al. 2010) (ver detalles en la sección siguiente).

Si bien no existen comprobaciones experimentales concluyentes, numerosos estudios en aves de corral sugieren una correlación positiva entre la contaminación bacteriana y los fallos de eclosión de huevos (McCabe 1964, Board y Tranter 1986, Bruce y Drysdale 1994). En aves silvestres, Kozłowski et al. (1989), Pinowski et al. (1994) y Steward y Rambo (2000) sugirieron que las bacterias son la principal causa de los fallos de eclosión. Los trabajos experimentales de Cook et al. (2003, 2005a) demuestran que huevos con mayor carga bacteriana sobre la cáscara tienen menor éxito de eclosión en un hábitat tropical húmedo pero no en un hábitat tropical seco. Asimismo, en hábitats templados, donde las condiciones ambientales son marcadamente más secas que en hábitats tropicales, las bacterias no parecen ejercer presiones importantes sobre la supervivencia de los embriones (Peralta-Sánchez et al. 2010, D’Alba et al. 2010). Conjuntamente, estos resultados sugieren que la influencia de las bacterias sobre el éxito de eclosión depende en gran medida del tipo de clima, en particular de las condiciones de humedad, puesto que el agua actúa como vehículo para la penetración a través de la cáscara (Bruce y Drysdale 1994, Cook et al. 2003, 2005a).

Otra cuestión importante es poder confirmar que la contaminación bacteriana del huevo es realmente la causa y no la consecuencia de la muerte del embrión. Ciertos autores sugieren que



las bacterias halladas en el interior del huevo pueden haber llegado tras la muerte del embrión o haber entrado en huevos infértiles tras la descomposición de las sustancias defensivas (Houston et al. 1997, Steward y Rambo 2000). Estudios experimentales futuros son necesarios para esclarecer estas cuestiones. La relación de la carga bacteriana y la prevalencia de patógenos sobre la superficie de la puesta con el éxito de eclosión son abordadas en los capítulos 1 y 2 de esta tesis.

La incubación temprana durante la puesta como defensa comportamental de las aves frente a las bacterias



Hembra de papamoscas cerrojillo de nuestra población incubando

Con varias décadas de esfuerzo investigador y con más de 20 hipótesis distintas propuestas al respecto, el estudio de la evolución de los patrones de eclosión en relación a los patrones de inicio de la incubación se han convertido en un tema candente en la ecología evolutiva de las aves (Magrath 1990, Stoleson y Beissinger 1995, Stenning 1996, Wang y Beissinger 2011). A pesar de ello, existen escasos estudios que relacionen los patrones de inicio de la incubación con la supervivencia de los embriones y no con la de los pollos

(Cook et al. 2003, 2005a, Massaro et al. 2007, Wang y Bessinger 2009). Con este interesante cambio de perspectiva, Cook et al. (2003, 2005a) sugirieron que el inicio temprano de la incubación durante el periodo de puesta es, en parte, una estrategia defensiva de las aves para inhibir la proliferación de las bacterias que colonizan la superficie de los huevos en el nido y en última instancia reducir la probabilidad de infección bacteriana del embrión en desarrollo. Así, el inicio de la incubación podría en parte estar determinado por el tiempo máximo durante el que los primeros huevos de la puesta pueden estar expuestos al ambiente, y por tanto a las bacterias, sin que exista infección del embrión (Cook et al. 2003, 2005a, b). Esto podría variar a nivel intra e interespecífico y según las condiciones ambientales (Cook et al. 2003, 2005a, b, Wang y Beissinger 2009).

Cook et al. (2005b) y Shawkey et al. (2009a), usando métodos dependientes e independientes de cultivo bacteriano respectivamente, demostraron experimentalmente que la incubación parcial durante la puesta en un paseriforme tropical inhibía la proliferación y diversificación bacteriana sobre los huevos. Esto es, los huevos, retirados de su caja-nido original en el momento de la puesta y expuestos al ambiente en una caja-nido contigua en ausencia de la hembra, albergaban una carga bacteriana mayor y más diversa que los huevos control naturalmente incubados por la hembra. Si bien en estos trabajos se especula acerca de los posibles mecanismos de inhibición de las bacterias asociados a la incubación (ej. desplazamiento del óptimo térmico de crecimiento bacteriano, efecto “secado”, etc.), el reciente trabajo de D’Alba et al. (2010) aporta la primera demostración experimental de que la incubación inhibe a la proliferación bacteriana sobre los huevos por medio de la reducción de la humedad en su entorno inmediato. D’Alba et al. (2010) comprobaron que los huevos experimentalmente humedecidos tenían mayor carga de bacterias que los controles tan sólo cuando estos huevos eran privados experimentalmente de la incubación. Por tanto, la incubación de la hembra contrarresta el efecto de humedecer experimentalmente los huevos, esto es, seca los huevos y el ambiente inmediatamente circundante.

No podemos descartar la operación de otros mecanismos antibacterianos durante la incubación. Por ejemplo, las secreciones antibacterianas de la glándula uropigial (Shawkey et al. 2003, Soler et al. 2008, Martín-Vivaldi et al. 2010) o de la propia placa incubatriz (Menon y Menon 2000) podrían ser transferidas directa o indirectamente a los huevos durante la incubación. Además, la inclusión de plantas biológicamente activas en el nido podría liberar compuestos volátiles antibacterianos como resultado de los incrementos térmicos asociados a la incubación (Clark y Mason 1985, Mennerat et al. 2009). Algunos de estos mecanismos parecen altamente especializados y por tanto restringidos a un reducido número de especies. Por el contrario, el efecto más general de la incubación es una modificación de las condiciones microclimáticas dentro del nido, en especial en aves con cría en cavidades (D’Alba et al. 2010). El efecto “secado” de la incubación podría por tanto estar altamente extendido en la naturaleza.

En el segundo bloque temático de esta tesis, que incluye los capítulos 4 y 5, se estudia la actividad de incubación parcial durante la puesta de las hembras de papamoscas cerrojillo, la asociación de esta actividad de incubación con la carga bacteriana sobre la puesta y el mecanismo antibacteriano de “secado” de los huevos.

Las bacterias degradadoras de plumas en el contexto de la selección sexual en aves

Las bacterias también colonizan el plumaje de las aves, algunas incluso usándolo directamente como sustrato nutricional (Burt et al. 1999). Estas últimas son genéricamente denominadas bacterias degradadoras de plumas (FDB, del término inglés *feather-degrading bacteria*), un grupo polifilético de bacterias principalmente representadas por *Bacillus licheniformis*, cuya capacidad de hidrolizar la queratina (Gupta y Ramnani 2006), uno de los materiales biológicos más duros y principal componente de las plumas (Brush 1996), ha sugerido la posibilidad de que pudieran jugar un rol importante en la evolución de la expresión de caracteres sexuales secundarios y de las estrategias vitales de las aves (Gunderson 2008, Burt 2009).

A pesar de que no existen estudios experimentales, por ejemplo, de “desinfección” del plumaje, que demuestren las lesiones reales producidas por las FDB sobre las plumas en condiciones silvestres ni los efectos de estas lesiones sobre la eficacia biológica (Burt 2009), recientes estudios correlativos desarrollados en el campo sugieren que las FDB afectan negativamente a ciertas propiedades del plumaje (Gunderson et al. 2009, Shawkey et al. 2009b) así como a la condición física del individuo (Gunderson et al. 2009). La evolución de defensas antimicrobianas como el aceite de la glándula uropigial impregnado sobre el plumaje (Shawkey et al. 2003, Reneerkens et al. 2008, Soler et al. 2008, Ruiz-Rodríguez et al. 2009b) o la coloración de las plumas con determinados pigmentos “defensivos” como la melanina (Goldstein et al. 2004, Gunderson et al. 2008) o las psittacofulvinas (Grande et al. 2004, Burt et al. 2010) también parece apuntar a que las FDB son una amenaza real para las aves en la naturaleza.

Estas cuestiones cobran especial interés en el contexto de la comunicación visual en aves. De acuerdo con la teoría de la selección sexual, Shawkey et al. (2009b) mostró para machos de pinzón mejicano (*Carpodacus mexicanus*), cuya coloración sexual depende de carotenoides, que aquellos que eran más rojos tenían una menor carga de FDB. Las FDB también

alteran la coloración y brillo estructural azul de las plumas del azulejo oriental (*Sialia sialis*) en condiciones silvestres (Shawkey et al. 2007, Gunderson et al. 2009) y estos efectos parecen variar entre sexos (Gunderson et al., 2009). A pesar de cierto debate inicial debido a la publicación del trabajo de Grande et al. (2004) en contraposición al de Goldstein et al. (2004), nuevas evidencias confirman los resultados de Goldstein et al. (2004) de que plumas melanizadas (negro-pardo) son más resistentes a la degradación por *Bacillus licheniformis* que las plumas blancas no melanizadas tanto en aves domésticas (Gunderson et al. 2008) como en aves silvestres (Burt et al. 2010).

Respecto a este último caso, los mecanismos moleculares o celulares próximos asociados al rol defensivo de la melanina frente a las bacterias están aún por determinar, aunque estos podrían estar relacionados con los que también confieren a las barbas melanizadas mayor resistencia a la abrasión. Así, se ha sugerido que la acumulación de gránulos melanoprotéicos produce un engrosamiento estructural de la capa cortical externa de queratina de las barbas que favorece una mayor resistencia mecánica a la abrasión (Burt 1986). Goldstein et al. (2004) sugieren que la melanina favorece la formación de puentes disulfuro en y entre moléculas de queratina que podrían dificultar la acomodación de la enzima queratinolítica de las bacterias. La melanina también podría actuar directamente como molécula inhibidora de la proliferación bacteriana aunque esto aún no se ha demostrado en aves (Burkhardt-Holm et al. 1997).

Independientemente del mecanismo asociado al papel protector de la melanina, lo cierto es las FDB podrían actuar como presiones de selección que aseguren la expresión honesta de señales blancas no melanizadas. Sólo los individuos de mejor calidad podrían afrontar los costes de producir barbas blancas resistentes a la abrasión física (Barrowclough y Sibley 1980, Burt 1986, Bonser 1995) y a la degradación biótica por ácaros (Kose y Møller 1999) o, en este caso particular, por los bacilos degradadores de plumas (Goldstein et al. 2004, Gunderson et al. 2008, Burt et al. 2010) incluso en ausencia de melanización. Estudios recientes parecen sin embargo no haber tenido en cuenta esta cuestión (Jawor y Breitwisch 2003, Moreno y Møller 2006, McGraw et al. 2008). Además, tanto Goldstein et al. (2004) y Gunderson et al. (2008), compararon la degradabilidad bacteriana de plumas negras frente a plumas blancas sin tener en cuenta la frecuente ocurrencia en la naturaleza de patrones de coloración blancos y negros dentro de la misma pluma. La combinación de blancos y negros dentro de la misma pluma genera señales altamente conspicuas con un potente valor comunicativo y han sido por tanto seleccionadas en multitud de especies de aves como potenciales indicadoras de calidad individual (Jones 1990, Price y Pavelka 1996, Brooke 1998, Kose y Møller 1999, Moreno-Rueda 2005, McGlothlin et al. 2007, Morales et al. 2007a, Hegyi et al. 2008a, b, Hanssen et al. 2009). La degradación de segmentos no melanizados en plumas de vuelo conlleva la aparición de muescas en dichas plumas que deben afectar negativamente a la capacidad de vuelo de las aves (Vágási et al. 2011).

Una cuestión clave, aunque inexplorada hasta la fecha, es comprobar que la diferencia en degradabilidad bacteriana entre plumas blancas y negras también existe y en el sentido esperado, entre áreas blancas y negras a nivel intra-pluma. Además, es de esperar que las diferencias sexuales en la intensidad de señalización puedan afectar a esta degradabilidad intra-pluma. Estas cuestiones son abordadas en el capítulo 6 de esta tesis para el caso concreto de la banda blanca de las plumas alares primarias del papamoscas cerrojillo.

Degradabilidad bacteriana de plumas y fenología reproductiva

En el contexto de la migración y reproducción está ampliamente aceptado que los individuos con fechas de llegada y reproducción tardías son de inferior calidad (Møller et al. 1994, Kokko 1999, Lobato et al. 2010). Esta cuestión podría resultar particularmente relevante en relación con la calidad de las plumas en migrantes de larga distancia, siendo esperable que los individuos tardíos tengan plumas más degradadas que los tempranos. Un plumaje en mal estado, en especial cuando las lesiones afectan a las plumas alares o las de la cola, puede afectar negativamente a la eficiencia de vuelo y por tanto a la llegada a las zonas de cría y al inicio de la actividad reproductiva (Kose y Møller 1999, Møller et al. 2004, Pap et al. 2005). Si bien el desgaste de las plumas aumenta con el tiempo (Vágási et al. 2011), existen evidencias de que la fecha de cría es repetible interanualmente (Lundberg y Alatalo 1992, Svensson 1997, Van der Heugd y McCleery 2002), lo cual sugiere que el tiempo que transcurre entre mudas en individuos tempranos y tardíos es equivalente. A nivel inter-sexual, puesto que son los machos los que sufren presiones de selección más intensas para llegar antes y ocupar los mejores territorios para la cría (Ruiz-de-Castañeda et al. 2009, Lobato et al. 2010), la asociación entre el desgaste de las plumas y la fecha debería ser más acusado en machos que en hembras, sobre todo cuando consideramos marcas del plumaje o de las plumas sexualmente seleccionadas (ej., banda blanca de las plumas alares primarias del papamoscas cerrojillo).

La degradabilidad bacteriana de las plumas es un posible indicador de su calidad y podría por tanto relacionarse con la fenología reproductiva de las aves, un buen indicador la calidad individual. En el capítulo 7 desarrollamos un estudio descriptivo exploratorio para analizar la asociación entre estas variables, fenología reproductiva y degradabilidad bacteriana de la banda blanca de las plumas alares primarias en machos y hembras de papamoscas cerrojillo. Usamos un enfoque correlacional puesto que resulta complejo “aislar” experimentalmente la relación entre la fenología reproductiva y la degradabilidad de las plumas. La manipulación de la fecha de puesta por ejemplo podría influir sobre otros parámetros fisiológicos de las aves que podrían confundir una posible relación con la degradabilidad bacteriana de las plumas en sí misma.



Banda blanca del ala extendida de un macho de papamoscas cerrojillo de nuestra población

Degradabilidad bacteriana de plumas y esfuerzo parental

Las plumas son apéndices tegumentarios inertes de las aves expuestas a un conjunto de agentes degradadores abióticos y bióticos que comprometen su estado físico y por tanto su función. Como agente abiótico destaca la abrasión (Barrowclough y Sibley 1980, Burt 1986, Bonser 1995) y como agentes bióticos los ectoparásitos (Kose y Møller 1999, Pap et al. 2005, Vas et al. 2008) y las bacterias, éstas tan sólo recientemente estudiadas en condiciones silvestres (Shawkey et al. 2009b, Gunderson et al. 2009, Saag et al. 2011). Si bien, se ha tendido a independizar el estudio y los efectos de estos agentes sobre las plumas, es muy probable que la abrasión, los ectoparásitos y las bacterias operen de manera simultánea sobre el plumaje en condiciones silvestres. De hecho es de esperar que exista un proceso de facilitación, de modo que los daños producidos sobre las plumas por un agente degradador favorezcan la actuación posterior de otro. Los daños podrían por tanto ser complementarios y aditivos. La evolución de las plumas hacia la producción estructuras resistentes, por ejemplo, por medio de la melanización (Bonser 1995, Goldstein et al. 2004) o por aplicación de protectores químicos externos como los aceites uropigiales (Shawkey et al. 2003, Reneerkens et al. 2008, Ruiz-Rodríguez et al. 2009b, Moreno-Rueda 2011), podría en parte explicarse por los costes sobre las plumas asociados a la abrasión, los ectoparásitos y las bacterias.

El proceso de desgaste y degradación de las plumas se intensifica notablemente durante la reproducción, cuando las aves tienen menos tiempo, energía y recursos para el cuidado de su plumaje y están además expuestas en mayor medida a la abrasión y a posibles focos infecciosos (Lucas et al. 2005, Vágási et al. 2011). En concreto, durante la fase crítica del cuidado y ceba de los pollos existe un conflicto para los adultos que enfrenta el cuidado del plumaje y la inversión parental (Whittingham 1993, Merilä y Hemborg 2000). Además, las aves realizan cientos de vuelos diarios para buscar alimento para los pollos, lo cual por una parte intensifica la abrasión de las plumas y por otra aumenta el riesgo de colonización del plumaje por parte de ectoparásitos y bacterias presentes en diferentes elementos del medio. Lucas et al. (2005), en el único estudio experimental desarrollado hasta la fecha que relaciona esfuerzo parental y carga bacteriana del plumaje, mostraron que padres de estornino europeo *Sturnus vulgaris* a cargo de nidadas aumentadas tenían una mayor carga de bacterias libres en su plumaje pectoral (término usado por Lucas et al. (2005) para referirse a bacterias con una unión física al plumaje poco intensa).

En el capítulo 7 de esta tesis exploramos la asociación entre la degradabilidad bacteriana *in vitro* (en este caso cuantificada bioquímicamente, a diferencia de Lucas et al. (2005)) de la banda blanca de la cuarta pluma alar primaria en machos y hembras de papamoscas cerrojillo con el esfuerzo reproductor (tamaño o peso de nidada). Predecimos que un mayor esfuerzo reproductor reduce la condición de las plumas lo cual las hace más vulnerables a la posterior degradación bacteriana *in vitro*. Esta asociación podría diferir entre sexos de acuerdo con diferencias en las propiedades de las plumas, en especial si consideramos señales sexualmente seleccionadas (capítulo 6).

No se han planteado experimentos de manipulación del esfuerzo en este caso al haberse abordado este objetivo en el marco de un estudio descriptivo de los efectos de la fenología (ver apartado anterior).

Métodos

La descripción pormenorizada de cada una de las actividades de muestreo de campo, análisis microbiológico de laboratorio y análisis estadístico de datos asociadas a esta tesis se aporta específicamente en cada uno de los capítulos que la conforman.

En los capítulos 1-5 se describe el método de muestreo de campo de las bacterias que proliferan sobre las puestas y en la cloaca de las hembras de papamoscas cerrojillo. Además, se describen los métodos microbiológicos de laboratorio para el recuento de bacterias viables así como su identificación bioquímica.

En los capítulos 4 y 5, se detalla el procedimiento de medición de las condiciones microclimáticas (temperatura y humedad) en el nido asociadas a la actividad de incubación de la hembra durante el periodo de puesta. Cabe destacar que la colocación del sensor de temperatura en íntimo contacto con los huevos dentro del cuenco del nido supuso una valiosa innovación metodológica y permitió por tanto obtener precisos registros de temperatura de incubación.

En los capítulos 6 y 7 se describe el método de obtención de plumas alares primarias de adultos de papamoscas cerrojillo desarrollado en el campo. Se describe también el protocolo de laboratorio que permitió determinar la degradabilidad de las plumas por medio de la estima de la concentración de oligopéptidos resultantes de la degradación bacteriana de la queratina *in vitro*. Este método se basa en el uso de la espectrofotometría para medir la absorbancia de las muestras y resulta notablemente más preciso que otros métodos puramente visuales, sujetos a posibles errores del observador.

A continuación, se describen las características generales de la especie y la zona de estudio y se explican las razones por las que el papamoscas cerrojillo es un buen modelo para estudiar interacciones ecológicas entre aves y bacterias.



Especie de estudio

El papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*) es un pequeño (12-13 g) paseriforme migrador trans-sahariano e insectívoro forestal. En España y Portugal, la subespecie presente es *Ficedula hypoleuca iberiae* (Curio 1960). Se trata de un ave troglodita que cría tanto en cavidades naturales como en niales artificiales en bosques templados de la región Paleártica, mostrando preferencia por bosques caducifolios, generalmente de quercinias. Su gran adaptabilidad para criar en niales artificiales ante la escasez de cavidades naturales en nuestros bosques y su tolerancia a la manipulación, le convierten en un modelo de estudio idóneo. Así, se trata de una de las especies más estudiadas en biología reproductiva de aves (Lundberg y Alatalo 1992).

Su llegada a las áreas de cría en el centro de España procedente del cinturón subsahariano occidental tiene lugar a partir de mediados del mes de abril, llegando los machos en torno a una semana antes que las hembras. Los machos tempranos suelen ser individuos de mejor calidad y ocupan los mejores territorios (Potti y Montalvo 1991, Lobato et al. 2009).

El nido es construido por la hembra y su componente principal en nuestra zona de estudio es la jara estepa (*Cistus laurifolius*). Existen variaciones geográficas en la composición vegetal del nido, siendo herbáceas secas las que sustituyen a las jaras cuando éstas no están presentes en el hábitat (Moreno et al. 2009). El nido presenta característicamente un cuenco esférico bien definido con posición variable.

La puesta del primer huevo tiene lugar a finales del mes de mayo y las hembras inician la actividad de incubación antes de completar la puesta, aunque no antes de la puesta del tercer huevo. Tanto la incubación parcial durante el periodo de puesta como la incubación plena tras completar la puesta son desarrolladas exclusivamente por la hembra. El periodo de incubación plena dura unos 13 días, durante el cual la hembra recibe cebas por parte del macho (Moreno et al. 2011). El papamoscas cerrojillo es por tanto una especie muy interesante para estudiar el comportamiento de incubación parcial durante el periodo de puesta. El hecho de que los huevos queden perfectamente reunidos en una pequeña superficie en el fondo del cuenco del nido, permite que las mediciones de las condiciones microclimáticas en torno ellos puedan ser precisas.

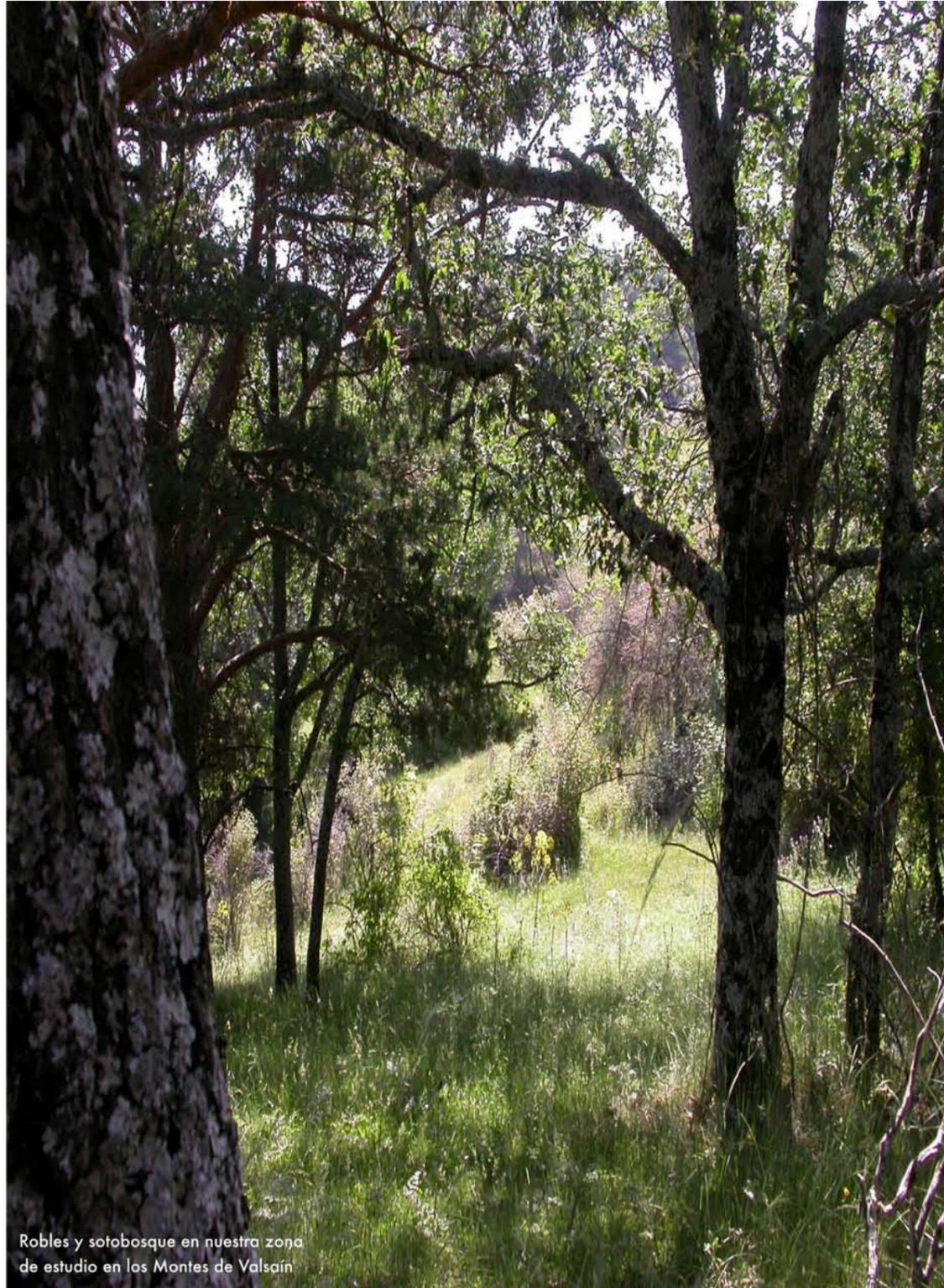
El tamaño de la puesta oscila entre 4 y 6 huevos, siendo el tamaño modal de puesta en la población de 6 (Sanz 1997). La eclosión tiene lugar de manera asincrónica en un intervalo variable de tiempo de aproximadamente 24-48 horas. La hembra empolla hasta 7 días tras la eclosión (Sanz y Moreno 1995). Ambos adultos ceban a los pollos, que echan a volar hacia los 14-16 días de edad (Moreno et al. 1995). Esto ocurre hacia la segunda semana de Junio en la población de estudio y no hay segundas puestas.

El patrón de muda es el típico de paseriformes europeos (Svensson 1984). Los adultos realizan una muda parcial en invierno, justo antes de la migración de primavera, tras la cual se aprecia un acusado dimorfismo sexual, pues los machos adquieren el conspicuo plumaje nupcial. El plumaje del macho se caracteriza por tener amplias áreas negras melanizadas en el dorso y plumas sobre las que contrastan áreas blancas no melanizadas que funcionan como señales de calidad individual (Lundberg y Alatalo 1992). En particular destacan la ampliamente estudiada mancha blanca de la frente (Dale et al. 1999, Osorno et al. 2006, Morales et al. 2007,

Galván y Moreno 2009) y las menos estudiadas bandas blancas en la base de las plumas alares primarias. Curio (1960) ya destacó que las bandas blancas de las primarias son más conspicuas en poblaciones ibéricas que en poblaciones centro-norte europeas. Puesto que los machos están generalmente expuestos a mayores presiones de selección para señalar (Andersson 1994), estos tienen bandas blancas notablemente más conspicuas, de mayor tamaño y visiblemente más blancas, que las hembras (Lundberg y Alatalo, 1992). El tamaño de la banda está asociado a una mayor calidad individual en papamoscas pertenecientes al género *Ficedula* y parece jugar un papel relevante en el contexto de la selección sexual y social tanto en machos (Sheldon y Ellegren 1999, Garamszegi et al. 2006, Sirkiä y Laaksonen 2009) como en hembras (Morales et al. 2007, Hegyi et al. 2007, 2008b). El papamoscas cerrojillo es por tanto un excelente modelo de estudio para testar los posibles efectos de las FDB en la expresión de señales blancas no melanizadas en plumas melanizadas. Puesto que la expresión de estas señales varía entre machos y hembras, esta cuestión cobra especial interés en el contexto de la selección sexual. Finalmente, realizan una segunda muda completa en verano, antes de la migración de otoño, tras la que el plumaje de los machos se vuelve prácticamente idéntico al de las hembras (Svensson 1984).

Cabe destacar que el papamoscas cerrojillo es una especie altamente filopátrica en relación a las áreas de cría (Lundberg y Alatalo 1992), especialmente en las poblaciones del sur de Europa (Potti y Montalvo 1991, Sanz y Moreno 2000, Sanz 2001) y con alta supervivencia interanual (Sanz y Moreno 2000). Estos factores son idóneos para el desarrollo de estudios poblacionales a medio-largo plazo.





Robles y sotobosque en nuestra zona de estudio en los Montes de Valsain

Zona de estudio

La zona de estudio se encuentra en “Los Montes de Valsain” en el término municipal de La Granja, en la provincia de Segovia. Se trata de un melojar (*Quercus pyrenaica*) montano situado a 1200 m sobre el nivel de mar (Mata de Navalparaíso, 40°bc 54’N, 4°bc 01’O) ubicado en la vertiente norte de la Sierra de Guadarrama (Sistema Central). El bosque se encuentra en el piso supramediterráneo y presenta un ombroclima subhúmedo (Izco 1984). En cualquier caso existe una considerable variación interanual en las condiciones meteorológicas durante la primavera, produciéndose con relativa frecuencia episodios meteorológicos extremos como nevadas tardías a mediados de mayo. El bosque se compone de un estrato arbóreo continuo dominado por robles jóvenes, debido a la intensa explotación para la obtención de leñas y carbones a que estuvo sometido durante el siglo pasado (Vidal et al. 2004), y un estrato arbustivo dominado por jaras estepas *Cistus laurifolius*.

En 1991, se colocaron un total de 300 cajas nido de madera de pino a una altura aproximada de 4 m y separadas por unos 25 m. Las características de estas cajas nido se describen en Lambrechts et al. (2010). Debido a la escasa disponibilidad de oquedades naturales en la zona, las cajas nido ofrecen oquedades artificiales para la cría de paseriformes insectívoros forestales como el papamoscas cerrojillo *Ficedula hypoleuca*, herrerillo común *Cyanistes caeruleus*, carbonero común *Parus major* y trepador azul *Sitta europaea*. El papamoscas cerrojillo representa la especie más abundante junto con el herrerillo común, oscilando el número de parejas por año entre 60 y 125. Se viene haciendo un seguimiento de la población desde 1991, para determinar las fechas y tamaños de puesta y el número de pollos.

Objetivos

Capítulo 1:

- Identificación de factores ambientales (temperatura y humedad) y maternos (transmisión vertical de bacterias) que podrían explicar la variación de la carga de bacterias heterótrofas viables cultivables presentes sobre la superficie de la puesta en fases tempranas y tardías de incubación.
- Estudio de la posible variación en la carga de bacterias heterótrofas viables cultivables sobre la puesta a lo largo del periodo de incubación plena.
- Estudio de la asociación entre la carga de bacterias heterótrofas viables cultivables sobre la puesta y el éxito de eclosión.

Capítulo 2:

- Descripción del espectro o composición de bacterias viables cultivables en términos de morfología celular microscópica (coco o bacilos, Gram positivo o Gram negativo) y taxones (familia, género y especie) más prevalentes y potencialmente patógenos para el embrión presentes sobre la superficie de la puesta en fases tempranas y tardías de incubación, y en la cloaca de las hembras de papamoscas cerrojillo.
- Estudio de la posible transmisión vertical (cloaca materna-superficie de la puesta) de los grupos de bacterias más prevalentes.
- Estudio de la posible variación de la prevalencia de los grupos de bacterias más abundantes sobre la puesta a lo largo del periodo de incubación plena.
- Estudio de la asociación entre la prevalencia de los grupos de bacterias potencialmente patógenas más representativas sobre la puesta y el éxito de eclosión.

Capítulo 3:

- Estudio de la prevalencia de *Salmonella* y *Yersinia*, dos de los grupos de bacterias potencialmente patógenas más importantes para el embrión, sobre la superficie de la puesta en fases tempranas y tardías de incubación, en el interior de huevos no eclosionados y en la cloaca de las hembras de papamoscas cerrojillo.

Capítulo 4:

- Determinación del inicio de la incubación y descripción del patrón de incubación parcial durante el periodo de puesta en hembras de papamoscas cerrojillo en base al registro de temperatura alrededor de los huevos en el nido.
- Estudio de la posible asociación entre la intensidad de incubación parcial y carga cultivable de bacterias heterótrofas sobre la puesta.

Capítulo 5:

- Estudio de los cambios micro-climáticos de la humedad relativa dentro del nido asociados a la actividad de incubación parcial de la hembra durante el periodo de puesta.
- Estudio de la posible asociación entre la intensidad de incubación parcial y la humedad relativa y la carga de grupos de bacterias viables cultivables prevalentes sobre la puesta.

Capítulo 6:

- Estudio de posibles diferencias en la degradabilidad bacteriana *in vitro* entre áreas no melanizadas (blancas) y melanizadas (negro-pardas) dentro de la misma pluma, en concreto entre las bandas blancas de las plumas alares primarias y las áreas melanizadas adyacentes en machos y hembras de papamoscas cerrojillo.
- Estudio de posibles diferencias entre sexos en la degradabilidad bacteriana *in vitro* de la banda blanca de las plumas alares primarias y de las posibles implicaciones de estas diferencias en el contexto de la selección sexual.
- Estudio de las posibles diferencias en dimensiones micro-estructurales de las barbas no melanizadas y melanizadas así como de la densidad de barbas en la banda blanca y su área melanizada adyacente, y de las implicaciones de estas diferencias para explicar posibles diferencias de degradabilidad.

Capítulo 7:

- Estudio de posibles diferencias de degradabilidad bacteriana entre la banda blanca de las plumas alares primarias y el área melanizada adyacente dentro de la misma pluma en machos y hembras de papamoscas cerrojillo en relación a la fenología reproductiva (fecha de puesta) y esfuerzo reproductor (tamaño o masa total de nidada).

Resultados principales y discusión

Bloque 1

El bloque 1 lo conforman los capítulos 1-3 y está dedicado a la microbiología del huevo del papamoscas cerrojillo. En términos generales, en el capítulo 1 se estudian los factores climáticos (temperatura y precipitación) y maternos (transmisión vertical de bacterias) que pueden influir en la carga de bacterias sobre la puesta. En los capítulos 2 y 3 se aporta un catálogo de las bacterias cultivables prevalentes potencialmente patógenas sobre la puesta y en cloacas maternas de papamoscas cerrojillo. Las muestras y datos considerados aquí fueron obtenidos durante la temporada reproductiva 2008.

Capítulo 1

La temperatura ambiental y la precipitación como predictores de la carga de bacterias heterótrofas viables cultivables sobre la puesta

En el capítulo 1 de esta tesis estudiamos si la variación de las condiciones meteorológicas de temperatura y precipitación en nuestro hábitat montano en el centro de España durante el periodo de puesta e incubación de la temporada reproductiva 2008, podría explicar la variación de la carga de bacterias heterótrofas viables cultivables sobre la puesta de los papamoscas cerrojillos en nuestra población.

De acuerdo con el principio general de microbiología de que la temperatura favorece la actividad metabólica bacteriana y por tanto su proliferación (Zwietering et al. 1991, Schaechter et al. 2006), nuestros modelos ambientales sugieren que la temperatura, y no la precipitación, fue la variable ambiental más explicativa de la variación de la carga bacteriana sobre la puesta y que mayores valores de temperatura se asociaban significativamente con mayores valores de carga bacteriana. En concreto, esto fue así para la carga bacteriana sobre la puesta en fases tempranas de incubación y la temperatura media ambiental durante el periodo de puesta. La temperatura media ambiental durante el periodo de puesta estaba incluida como predictor en el mejor modelo (menor AICc y mayor peso). En cualquier caso, la temperatura media ambiental durante el periodo de puesta tan sólo explicaba un 7% de la variación de la carga bacteriana sobre la puesta en fases tempranas de incubación (GLM, $F_{1,79} = 5.64$, $P = 0.02$, Figura 1). Estudios previos realizados con aves de corral ya habían señalado la importancia de la temperatura ambiental para controlar la proliferación de bacterias sobre los huevos (Clay y Board 1991, Theron et al. 2003). Es posible que los leves incrementos de temperatura observados durante el periodo de puesta dentro de un rango de valores frescos propios de este tipo de hábitats

montanos durante las fases tempranas de la primavera (Figura 1), hayan favorecido especialmente la proliferación de bacterias psicrófilas y/o mesófilas (con temperaturas óptimas de crecimiento bajas y medias, respectivamente) presentes sobre la puesta, y en menor medida a las termófilas (con temperaturas óptimas de crecimiento altas) las cuales podrían haber perdido viabilidad o entrar temporalmente en un estado de quiescencia (Balaban et al. 2004).

Si bien la humedad ambiental es uno de los factores más importantes para la proliferación bacteriana sobre los huevos (Cook et al. 2003, 2005a), nuestros modelos indican que la precipitación fue un predictor poco relevante. La precipitación ambiental parece no ser un buen correlato de la humedad microambiental en torno a los huevos dentro del nido. La precipitación ambiental podría mostrar efectos demasiado indirectos sobre la carga bacteriana de la puesta, especialmente si tenemos en cuenta que los huevos en estudio, y por tanto sus bacterias, se encuentran en el interior de una caja-nido resguardados de la incidencia directa de las gotas de agua.

Los modelos ambientales para el periodo de incubación carecieron de valor explicativo para la variación de la carga bacteriana a finales de la incubación. Ninguno de los modelos con $\Delta AICc < 2$ fue significativo y ni la temperatura media ni la media de la precipitación diaria estuvieron incluidas en el mejor modelo. Es posible que en fases tardías de incubación, los marcados cambios ambientales que produce la incubación plena de la hembra sobre el microambiente que rodea a la puesta dentro del nido, hayan podido disipar los efectos puramente meteorológicos sobre la proliferación bacteriana sobre la puesta. Este hecho puede haber sido menos acusado poco después de completar la puesta cuando se hizo el primer muestreo bacteriano.

En general nuestros resultados suponen un primer paso para comprender las fluctuaciones en la carga de bacterias sobre los huevos en condiciones silvestres y apuntan a que la temperatura podría ser una variable ambiental importante. Para comprender de manera más precisa los efectos puramente ambientales sobre la proliferación de las bacterias sobre la puesta, es preciso que estudios futuros midan la temperatura y humedad a nivel micro-ambiental dentro de la caja-nido en ausencia de incubación de la hembra.

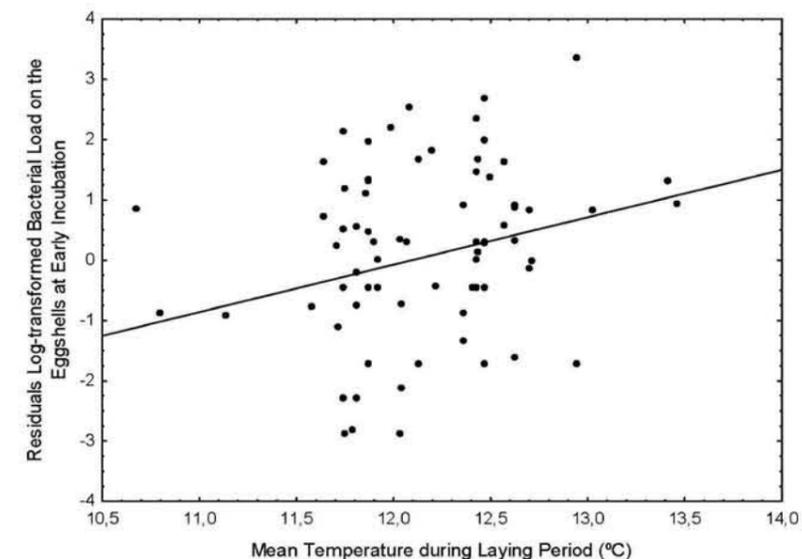


Figura 1: Asociación entre la temperatura media durante el periodo de puesta y la carga bacteriana (bacterias heterótrofas viables cultivables, medio de cultivo TSA) sobre las puestas en fases tempranas de incubación. La carga bacteriana se corrigió estadísticamente por los efectos del plazo de procesamiento de las muestras usando los residuos de la regresión entre carga bacteriana y plazo de procesamiento de las muestras.

Verticalidad cloaca-puesta en la transmisión de bacterias: Asociación entre la carga de bacterias heterótrofas viables cultivables de la cloaca y la de la puesta

Las bacterias que colonizan la superficie de los huevos podrían tener principalmente dos orígenes: ambiental y materno. Tras la oviposición, las bacterias ambientales presentes en el aire (Northcut et al. 2004), en el material vegetal del nido (Singleton y Harper 1998, Goodenough y Stallwood 2010) o en sus materiales accesorios como plumas (Peralta-Sánchez et al. 2010), pueden colonizar la superficie del huevo. Las bacterias maternas son bacterias de origen cloacal, tanto fecales como urogenitales, que son transferidas a la superficie del huevo desde que se forma su cáscara en la porción final de oviducto y en su paso por la cloaca durante la oviposición (Barrow 1994, Kobayashi et al. 1997, Lombardo et al. 1996, Soler et al. 2011). Este segundo grupo de bacterias puede albergar cepas potencialmente patógenas para el embrión en desarrollo en el huevo (Barrow 1994, Humphrey 1994, Soler et al. 2011), mientras que las bacterias ambientales son en su mayoría saprófitas o comensales que pueden ser patógenas solo de forma facultativa y oportunista (Cook et al. 2003, 2005a).

En la segunda parte del capítulo 1, estudiamos la posible verticalidad en la transmisión de bacterias desde la cloaca materna a la superficie de la puesta. Para ello estudiamos la posible asociación entre la carga de bacterias heterótrofas viables cultivables de la cloaca materna y de la superficie de sus puestas tanto en fases tempranas como tardías de incubación.

Nuestros resultados sugieren en parte que la carga bacteriana cloacal materna podría ser una buena variable predictora de la variación de la carga bacteriana sobre la puesta. Nuestros resultados no son homogéneos y varían según consideremos la carga bacteriana sobre la puesta en fases tempranas y tardías de incubación. Llamativamente, la carga bacteriana cloacal estuvo incluida en el mejor modelo predictivo de la carga bacteriana sobre la puesta para fases tardías de incubación, pero no para fases tempranas donde apareció en el segundo mejor modelo. En este último caso, la carga bacteriana cloacal y la de la puesta en fases tempranas de incubación no estaban asociadas significativamente cuando se controlaba por los efectos del plazo de procesado de las muestras (GLM, $F_{1,26} = 0.94$, $P = 0.34$). Por el contrario, la carga bacteriana cloacal materna y la de la puesta en fases tardías de incubación sí estaban asociadas positivamente (GLM, $F_{1,20} = 11.19$, $P = 0.004$, Figura 2).

La interpretación de estos resultados no es obvia puesto que *a priori* es más esperable encontrar una asociación entre la carga bacteriana cloacal y la de la puesta en fases tempranas de incubación, cuando el tiempo desde que se pusieron los huevos, y por tanto la hembra les transfirió las bacterias cloacales, hasta que se muestreó su superficie es menor. Evidentemente, esto supondría que la carga bacteriana de la cloaca materna durante el periodo de puesta es equivalente a la carga que tendría la hembra en fases intermedias de incubación, cuando realmente se muestreó. Lo cierto es que para que exista verticalidad en la transmisión de bacterias, la hembra necesariamente habría tenido que transferir bacterias desde su cloaca a los huevos en el momento de la oviposición (Barrow 1994). Es posible que el fuerte contraste entre las condiciones micro-ambientales dentro de la cloaca, donde las bacterias habitan en medios fluidos o semisólidos con temperaturas de 38-42°C propias del ambiente interno del ave (Prinzinger et al. 1991), y las hostiles condiciones ambientales externas sobre la cáscara de los huevos, haya producido una pérdida de viabilidad o reducción de la actividad metabólica, entrando en estado de quiescencia (Balaban et al. 2004). Así, la carga bacteriana cuantificada sobre la puesta en fases

tempranas de incubación podría estar en parte subestimada, determinando la ausencia de asociación observada con la carga de la cloaca de la hembra. Ciertas bacterias podrían haber requerido de un periodo de aclimatación y haber recuperado la actividad metabólica de manera gradual hasta el momento del segundo muestreo bacteriano, a finales de la incubación. Esta posibilidad podría estar confrontada con el demostrado efecto inhibitorio de la incubación (Cook et al. 2005b, Shawkey et al. 2009a) así como con otro de nuestros resultados en el capítulo 1 que sugiere que la carga bacteriana no varía significativamente entre las puestas desde fases tempranas a tardías de incubación (GLM, $F_{1,60} = 0.02$, $P = 0.90$). A pesar de esto, no podemos descartar que ciertas bacterias podrían ver potenciado su crecimiento durante la incubación, tal y como observaron Cook et al. (2005b). Es preciso notar que nuestro método de cuantificación de bacterias es general y nos permite únicamente determinar el número de bacterias heterótrofas viables cultivables pero no grupos específicos de éstas.

Esta interpretación es especulativa siendo por tanto necesario estudios futuros para confirmar la verticalidad cloaca-puesta en la transmisión de bacterias en aves silvestres. El diseño óptimo para confirmar la verticalidad en la transmisión de bacterias exigiría muestrear la superficie de un único huevo y la cloaca de la hembra inmediatamente después de su puesta. Sin embargo, este diseño resulta impracticable en el papamoscas cerrojillo puesto que la captura y manipulación de las hembras durante el periodo de puesta entraña un alto riesgo de abandono.

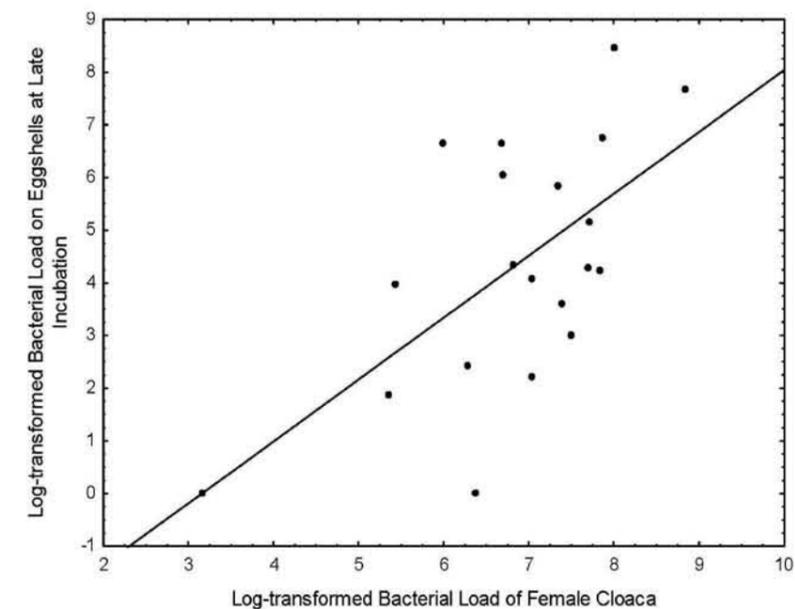


Figura 2: Asociación entre la carga bacteriana (bacterias heterótrofas viables cultivables, medio de cultivo TSA) en la cloaca de las hembras y sobre las puestas en fases finales de incubación.

Capítulo 2

Prevalencia de bacterias viables cultivables potencialmente patogénicas sobre la puesta y en la cloaca de hembras de papamoscas cerrojillo

El capítulo 2 de esta tesis es un complemento necesario al capítulo 1 y añade el aspecto cualitativo al estudio descriptivo de las bacterias sobre la puesta. Usando métodos fenotípicos, tanto morfológicos (basados en la observación macro como microscópica de las bacterias) y bioquímicos se realizó por primera vez un catálogo detallado de los grupos y taxones bacterianos potencialmente patógenos más prevalentes sobre las puestas y en las cloacas maternas del papamoscas cerrojillo.

Respecto a la morfología celular microscópica, las bacterias aisladas se encuadraban en tres grupos: cocos Gram-positivos, bacilos Gram-positivos y Gram-negativos. En ningún caso se aisló un coco Gram-negativo. Los bacilos Gram-negativos eran el grupo de bacterias más prevalente, tanto sobre las puestas como en las cloacas.

Se identificaron un total 24 familias, 30 géneros, 40 especies de bacterias en puestas y cloacas maternas a nivel poblacional, sin embargo tan sólo un escaso número de estas bacterias estaba representado en cada una de las puestas o cloacas. En concreto, identificamos 40 bacterias ($n = 28$, media por muestra \pm SE = 1.43 ± 0.13) y 30 ($n = 22$, media por puesta = 1.36 ± 0.12) sobre las puestas en fases tempranas y tardías de incubación, respectivamente. En muestras cloacales, identificamos 51 bacterias ($n = 26$, media por muestra = 1.96 ± 0.18). Además, la mayoría de las bacterias mostraban una prevalencia relativamente baja o incluso una representación puntual en ciertas puestas o cloacas (Tabla 1).

Este patrón de diversidad podría estar relacionado con la diversidad de orígenes de las bacterias de la puesta (ambiental y materno) y de la cloaca (intestinal y urogenital), y con los cambios ambientales que podrían modular activamente la composición de la comunidad bacteriana. Por una parte, las bacterias maternas de la cloaca, que pueden colonizar la superficie del huevo (Barrow 1994), dependen de factores como la dieta y el hábitat (Blanco et al. 2006, Klomp et al. 2008) y de procesos de transmisión horizontal durante la cópula (Lombardo et al. 1999, Stewart y Rambo 2000, Hupton et al. 2003). Las bacterias transmitidas a la superficie del huevo después de la formación de la cáscara en el oviducto y posteriormente en el paso por la cloaca, sufren un drástico choque ambiental en términos de temperatura, humedad y disponibilidad de nutrientes cuando pasan al medio externo en el nido. Muchas de estas bacterias podrían perecer o entrar en estado de quiescencia (Balaban et al. 2004), y las que se mantienen activas podrían competir con bacterias ambientales (Peralta-Sánchez et al. 2009). Por otra parte, tanto las bacterias ambientales como las bacterias maternas sobre la puesta también sufren un importante choque ambiental a medida que se intensifica la actividad de incubación desde la puesta hasta la eclosión (Cook et al., 2005b, Shawkey et al. 2009a, D'Alba et al. 2010). Estas fluctuaciones ambientales podrían además tener diferente magnitud entre individuos. Resulta por tanto complejo el establecimiento de una composición bacteriana estable y homogénea a nivel poblacional existiendo un activo relevo de bacterias poco prevalentes y sólo una minoría dominante.

La familia *Pseudomonadaceae* y más concretamente la especie *Pseudomonas luteola*

(reclasificada actualmente como *Chryseomonas luteola*), genéricamente llamadas pseudomonas, fueron las bacterias más prevalentes tanto sobre puestas como en las cloacas. Esto concuerda con el hecho de que las pseudomonas son posiblemente el grupo de bacterias ecológicamente más plástico y diverso del planeta (Stanier et al. 1966, Spiers et al. 2000).

Species	Family	Number of detections		
		Early incubation (N = 28)	Late incubation (N = 22)	Female cloacae (N = 26)
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Moraxellaceae	0	1	0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Moraxellaceae	3	1	2
<i>Aeromonas hydrophila / caviae</i>	Aeromonadaceae	1	1	0
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Aeromonadaceae	0	1	0
<i>Aerococcus viridans</i>	Aerococcaceae	2	1	1
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Rhizobiaceae	0	1	0
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	Alcaligenes	0	1	0
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Bacillaceae	0	1	0
<i>Brevibacterium spp.</i>	Brevibacteriaceae	0	2	0
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	Caulobacteraceae	0	1	0
<i>Burkholderia cepacia</i>	Burkholderiaceae	0	0	5
<i>Corynebacterium Group F1</i>	Corynebacteriaceae	0	1	0
<i>Corynebacterium striatum</i>	Corynebacteriaceae	0	1	0
<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	0	0	2
<i>Enterobacter amnigenus</i>	Enterobacteriaceae	1	0	1
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Enterococcaceae	0	1	0
<i>Enterococcus durans</i>	Enterococcaceae	0	0	1
<i>Enterococcus faecium</i>	Enterococcaceae	3	0	2
<i>Enterococcus gallinarum</i>	Enterococcaceae	0	0	1
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Bifidobacteriaceae	0	1	1
<i>Gemella haemolysans</i>	Staphylococcaceae	1	1	0
<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	Streptococcaceae	1	0	0
<i>Leuconostoc spp.</i>	Leuconostocaceae	1	1	1
<i>Listeria gravi</i>	Listeriaceae	0	0	1
<i>Micrococcus liale</i>	Micrococcaceae	1	0	0
<i>Moraxella spp.</i>	Moraxellaceae	1	1	0
<i>Ochrobacter anthropi</i>	Brucellaceae	3	1	0
<i>Pasteurella spp.</i>	Pasteurellaceae	3	0	0
<i>Propionibacterium avidum</i>	Propionibacteriaceae	0	0	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pseudomonadaceae	2	0	1
<i>Pseudomonas luteola</i>	Pseudomonadaceae	6	6	19
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	Pseudomonadaceae	2	2	0
<i>Rahnella aquatilis</i>	Enterobacteriaceae	1	0	0
<i>Ralstonia picketti</i>	Burkholderiaceae	0	0	1
<i>Serratia liquefaciens</i>	Enterobacteriaceae	0	0	2
<i>Serratia fonticola</i>	Enterobacteriaceae	0	0	2
<i>Serratia plymuthica</i>	Enterobacteriaceae	0	0	1
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Sphingomonadaceae	1	2	0
<i>Staphylococcus cohnii cohnii</i>	Staphylococcaceae	1	0	0
<i>Vibrio metschnikovii</i>	Vibrionaceae	2	0	0
40	24	19	21	18

Tabla 1: Número de identificaciones de especies de bacterias cultivables sobre las puestas en fases tempranas y tardías de incubación y en la cloaca de hembras de papamoscas cerrojillo. Los valores al final de cada columna indican el número total de especies y familias, y el número total de especies detectada en cada tipo de muestra.

Capítulo 3

Prevalencia de *Salmonella* y *Yersinia* en huevos y cloacas de papamoscas cerrojillos

En el capítulo 3 se usaron protocolos microbiológicos específicos para el aislamiento e identificación sobre puestas y en huevos no eclosionados, y cloacas de hembras de papamoscas cerrojillo, de dos de los grupos de bacterias patógenas más relevantes en microbiología aviar: salmonellas y yersinias. Estas bacterias han sido intensamente estudiadas en veterinaria debido a su impacto sobre la supervivencia de adultos y embriones de aves de corral y debido a sus consecuentes riesgos para la salud pública (Humphrey 1994, Havelaar et al. 2007). Además, estas bacterias también han recibido especial atención en los escasos estudios de microbiología aviar desarrollados en condiciones silvestres puesto que se ha sugerido que las aves silvestres podrían actuar como reservorios y transmisores de estos patógenos (Benskin et al. 2009).

Detectamos tan sólo un caso positivo de *Salmonella arizonae* (ver foto), pero ninguno de *Yersinia*, de entre 26 muestras cloacales analizadas. Esto indica una prevalencia del 3,8% en hembras de nuestra población de papamoscas cerrojillo.

Por otra parte, en huevos no detectamos ningún caso positivo de *Salmonella* ni *Yersinia* en un total de 82 y 62 muestras de superficie de puestas en fases tempranas y tardías de incubación, respectivamente, ni en 24 muestras de contenidos de huevos no eclosionados.

La interpretación de estos valores de prevalencia no es sencilla puesto que existe una escasa literatura comparable para paseriformes silvestres (Benskin et al. 2009). La mayoría de los estudios se han centrado en grupos de aves como palomas y gaviotas cuya ecología está ligada a las actividades humanas por lo que su importancia como reservorios o dispersores de infecciones es relevante para la salud pública (Benskin et al. 2009). Por otra parte, ciertos estudios desarrollados en paseriformes silvestres aportan valores de prevalencia elevados respecto a los observados aquí debido a que analizaron individuos hallados muertos o moribundos en el campo (Cornelius et al. 1969, Pennycott 1998). En nuestro estudio, las hembras capturadas conforman una submuestra aleatoria de individuos de la población de los que nos se tenía ninguna información de su estado de salud previo a la captura. Además, no se observó ningún tipo de síntoma o anomalía comportamental de las hembras durante su manipulación que pudieran estar relacionados con infecciones bacterianas. Así pues, nuestros valores de prevalencia son difícilmente comparables con este tipo de estudios y sugieren que las hembras de papamoscas cerrojillo de nuestra población no son reservorios y/o dispersores relevantes de *Salmonella* ni de *Yersinia*. Otros autores como Morishita et al. (1999), Kobayashi et al. (2007) y Ortiz-Catedral et al. (2009) ya habían sugerido esta posibilidad para otras poblaciones de aves silvestres. Curiosamente, Plant (1978)



sugirió que las aves paseriformes podrían tener adaptaciones intestinales para prevenir la colonización por salmonellas patógenas.

Nuestros resultados no permiten sacar ninguna conclusión relevante acerca de la posible verticalidad en la transmisión de estos patógenos desde la cloaca a la superficie de la puesta y finalmente al interior del huevo a través de la cáscara (Humphrey 1994). La hembra infectada con *Salmonella arizonae* no estaba transfiriendo esta bacteria a la superficie de sus huevos, posiblemente por que la intensidad de infección fecal-cloacal no era lo suficientemente intensa (Prevost et al. 2006).

No asociación entre carga y prevalencia de bacterias sobre la puesta con el éxito de eclosión

El éxito de eclosión en nuestra población durante la temporada 2008 fue elevado (éxito de eclosión medio (%) \pm SE = 94 ± 0.02) con un total de 57 nidos donde eclosionó el 100% de los huevos y 19 donde eclosionó el 80%. El éxito de eclosión ofrece por tanto poca variabilidad y fue considerado como variable categórica binomial.

En el capítulo 1, desarrollamos un modelo predictivo del éxito de eclosión, incluyendo simultáneamente la carga de bacterias heterótrofas viables cultivables sobre la puesta a inicios y finales de incubación, y la fecha de puesta como variables predictoras. Ninguno de los 15 modelos obtenidos fue significativo. La carga bacteriana a inicios de la incubación fue incluida en el mejor modelo predictivo, aunque cuando testamos específicamente su asociación con el éxito de eclosión, los resultados no fueron significativos (GLZ binomial, Wald = 0.78, P = 0.38, n = 72). Este resultado podría deberse a que nuestra cuantificación de bacterias haya sido demasiado grosera, incluyendo bacterias patógenas pero también un importante número de bacterias saprófitas o comensales no directamente implicadas en una posible infección del embrión. Sin embargo, en el capítulo 2, la prevalencia de *Pseudomonadaceae* y de *Pseudomonas luteola* sobre la puesta a inicios (ambos Fishers exact test, P > 0.14, n = 21) y finales de incubación (ambos Fishers exact test, P > 0.57, n = 25) tampoco se asociaba con el éxito de eclosión. Este hecho es llamativo teniendo en cuenta que las pseudomonas han sido descritas como el principal grupo de bacterias contaminantes del contenido de huevos en aves de corral (Dockstater 1952, Florian y Trussell 1957) debido a su capacidad para degradar la cutícula del huevo (Baggott y Graeme-Cook 2002). Finalmente, en el capítulo 3 no detectamos ningún caso positivo de *Salmonella* o *Yersinia* en el interior de los huevos no eclosionados.

Debido a la reutilización de cavidades y por tanto a la exposición potencial de los huevos a ambientes contaminados (Singleton y Harper 1998, Tomás et al. 2007), estos podrían haber desarrollado estrategias defensivas de tipo físico que reduzcan la probabilidad de penetración de bacterias a través de la cáscara (Sparks 1994) o bien de tipo químico para proteger al embrión de las bacterias que consiguen penetrar al interior (Playfair y Bancroft 2004). Otra línea de defensa se relaciona con el comportamiento de la hembra. Si bien, ciertas especies de aves incluyen plantas con propiedades antimicrobianas en el nido (Clark y Mason 1985) o plumas cuyas bacterias podrían excluir competitivamente a las bacterias de la puesta (Peralta-Sánchez et al. 2010), ninguna de estas posibilidades ha sido comprobada para el papamoscas cerrojillo. Por el contrario, resulta probable que la incubación parcial durante el periodo de puesta (Wang y Beissinger 2011) o la incubación plena después de completar la puesta podrían funcionar como

mecanismos defensivos para reducir la carga bacteriana o la prevalencia de patógenos sobre la puesta (Cook et al. 2005b, Shawkey et al. 2009a, D'Alba et al. 2010). Además, podemos asumir que en general, debido a la diferencias de temperatura y humedad ambiental, entre hábitats templados y tropicales, la probabilidad de contaminación del interior del huevo es más probable en los últimos (Cook et al. 2003, 2005a vs Peralta-Sánchez et al. 2010, D'Alba et al. 2010).

Si bien *Salmonella* y *Yersinia* no fueron detectadas en el interior de los huevos no eclosionados, sabemos que otras bacterias sí lo colonizaron (Ruiz-de-Castañeda en preparación). Sin embargo, a pesar de que se ha sugerido que las bacterias son la principal causa de la muerte del embrión (Pinowski et al. 1994, Steward y Rambo 2000), aún no ha sido posible determinar con exactitud si las bacterias que aparecen dentro del huevo son la causa o la consecuencia de la muerte del embrión. Se ha sugerido que las bacterias entran al interior del huevo tras la muerte del embrión con la descomposición de las sustancias defensivas (Houston et al. 1997, Steward y Rambo 2000).

Bloque 2

El bloque 2 lo conforman los capítulos 4 y 5 y está dedicado al estudio del comportamiento de incubación parcial de la hembra de papamoscas cerrojillo durante la puesta y su asociación con la carga bacteriana sobre la puesta. En términos generales, en el capítulo 4 aportamos una descripción detallada de la actividad de incubación parcial de la hembra durante los días y las noches del periodo de puesta de la temporada 2008 e identificamos el momento en que se inicia la incubación durante la puesta en nuestra población. Analizamos la asociación entre la intensidad de incubación en el día de inicio de ésta durante la puesta y la carga bacteriana sobre la puesta. Por otra parte en el capítulo 5, estudiamos los efectos microclimáticos, en términos de humedad relativa, inducidos por la incubación parcial sobre el microambiente dentro del nido que pudieran afectar al la proliferación bacteriana sobre la puesta. En este caso nos basamos en datos obtenidos en 2009. A continuación aportamos los resultados principales obtenidos en los capítulos 4 y 5.

Capítulo 4

Inicio temprano de la incubación y carga bacteriana sobre la puesta

En el capítulo 4 estudiamos la actividad de incubación parcial de las hembras de papamoscas cerrojillo de nuestra población en base a un análisis detallado del registro continuo de temperatura diurna y nocturna del aire inmediatamente circundante a los huevos durante la fase crítica del periodo de puesta para el inicio de la incubación (días 3-5) (Figura 3). Nuestros resultados muestran que la actividad de incubación parcial en nuestra población durante la temporada reproductiva 2008 fue esencialmente diurna, existiendo valores nulos de incubación nocturna para la mayoría de las hembras de la población en estudio. Además, el día de puesta del 4º huevo (día 4) fue el momento de inicio de la incubación para la mayoría de las hembras. En concreto, 37 de 67 (55.2%) de las hembras iniciaron su incubación parcial en el día de puesta del 4º huevo, mientras que tan sólo 7 y 11 hembras iniciaron la incubación en el día de puesta del 3er y 5º huevo (día 3 y 5), respectivamente (Figura 4). El día de puesta del 4º huevo concentra

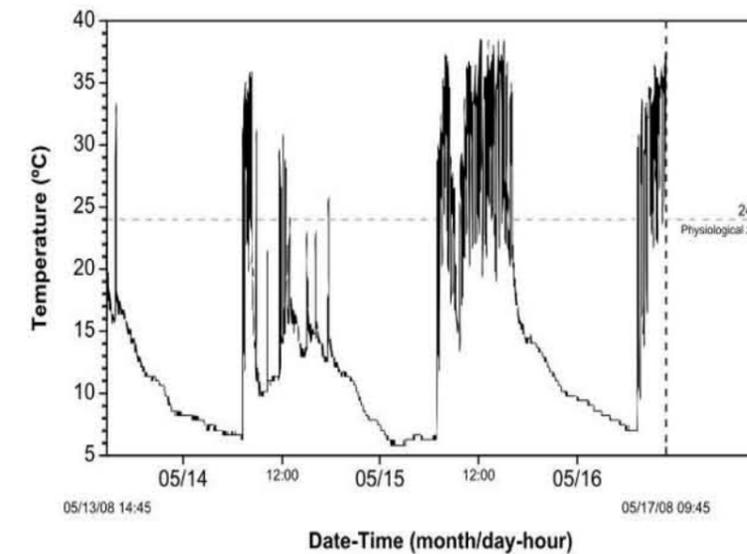


Figura 3: Ejemplo representativo de un registro continuo de la temperatura del aire en contacto con los huevos desde 14:45 h en el día de puesta del tercer huevo hasta las 09:45 h del día en que se completa la puesta (6 huevos). La línea horizontal discontinua indica el zero fisiológico (24°C), mientras que la línea vertical discontinua indica el final del registro.

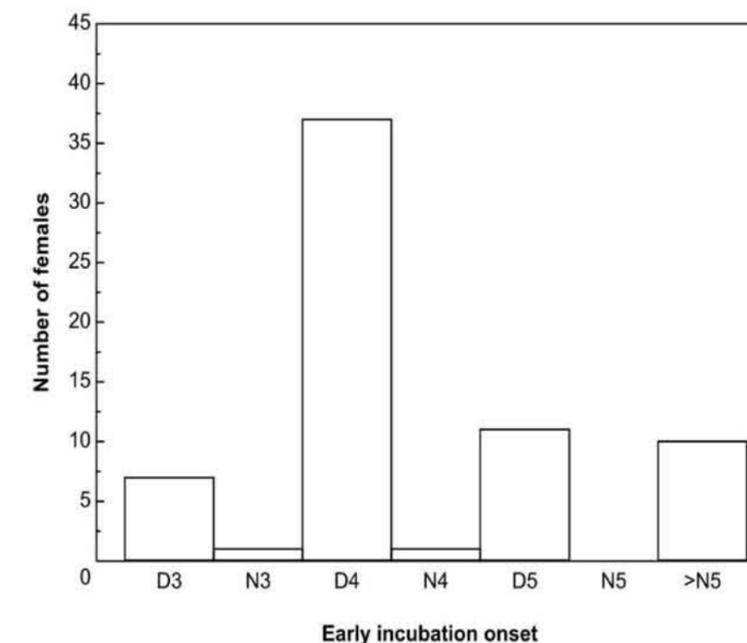


Figura 4: Inicio de la incubación de 67 hembras de papamoscas cerrojillo durante los días (D) o las noches (N) de distintos días (días de puesta del huevo 3, 4 y 5) durante el periodo de puesta.

por tanto la mayor actividad de inicio de incubación y la variación en la intensidad de incubación durante este día resulta particularmente interesante para explorar las implicaciones de la incubación temprana en relación a la carga bacteriana sobre la puesta.

Cuando incluimos simultáneamente en el mismo modelo, la intensidad de incubación y la temperatura media para los días 3, 4 y 5 como variables predictoras de la carga de bacterias heterótrofas viables cultivables sobre la puesta, resulta que la intensidad de incubación en el día 4, y no en los días 3 o 5, fue la variable más explicativa. El mejor modelo predictivo, incluía la intensidad de incubación en el día 4 y el plazo de procesado de las muestras, explicando un 44% de la varianza de la carga bacteriana sobre la puesta. En concreto, la intensidad de incubación de la hembra durante el día 4 se asoció de manera significativa y negativa con la carga bacteriana de la puesta cuando se controlaba por el plazo de procesado de las muestras (GLM, $F_{1,61} = 6.74$, $P = 0.01$, Figura 5). Por otra parte, cuando analizamos el periodo total de días 3-5, la intensidad de incubación total y la temperatura media fueron predictores poco relevantes para la carga bacteriana de la puesta. Ninguno de estas variables predictoras fue incluida en el mejor modelo.

Respecto a la actividad de incubación parcial nocturna, encontramos que el mejor modelo posible cuando considerábamos intensidad de incubación y temperatura media para los días 3, 4 y 5 como predictores de la carga de bacterias heterótrofas sobre la puesta, incluía la intensidad de incubación durante la noche 5 y el plazo de procesado de las muestras. Sin embargo, la intensidad de incubación durante la noche 5 no se asoció significativamente con la carga bacteriana de la puesta cuando se controlaba por el plazo de procesado de las muestras (GLM, $F_{1,61} = 3.32$, $P = 0.07$).

Por otra parte, cuando analizamos el periodo total de noches 3-5, tenemos que el mejor modelo predictivo incluía la intensidad total de incubación 3-5 y el plazo de procesado de las muestras, explicando un 42% de la variación de la carga bacteriana sobre la puesta. En concreto, la intensidad de incubación total estaba asociada de manera significativa y negativa con la carga bacteriana de la puesta cuando se controlaba por el plazo de procesado de las muestras (GLM, $F_{1,61} = 4.50$, $P = 0.04$).

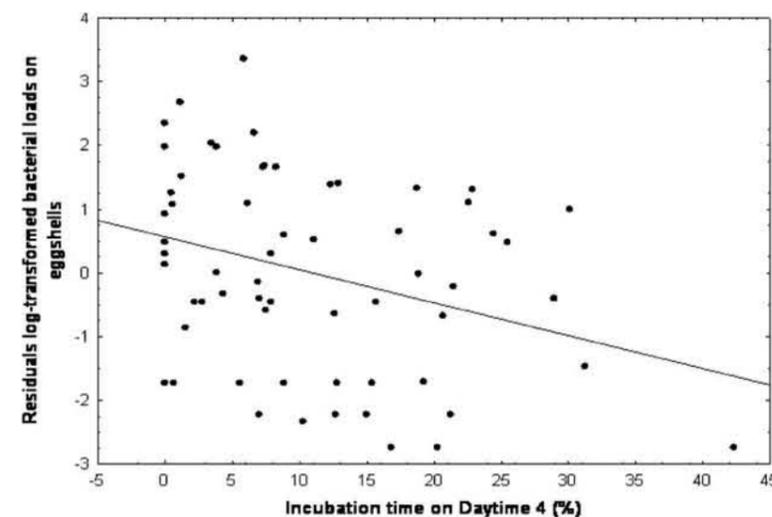


Figura 5: Asociación entre la intensidad de incubación (% tiempo) durante el día de puesta del cuarto huevo y la carga de bacterias (bacterias heterótrofas viables cultivables, medio de cultivo TSA) sobre la puesta, presentadas como los residuos de la correlación entre la carga de bacterias (transformada logarítmicamente) y el plazo de procesado de las muestras ($n = 61$, $r = -0.32$, $p = 0.01$, $y = 0.57 - 0.05x$).

En primer lugar, el hecho de que la actividad de incubación sea esencialmente diurna y no nocturna podría relacionarse con que durante el día las bacterias ven potenciado su metabolismo y por tanto su proliferación ante los incrementos térmicos moderados en un rango de temperaturas frescas propios del periodo de puesta en este tipo de hábitats montanos (ver capítulo 1). Esto es, la inversión en defensa antibacteriana se intensifica cuando las bacterias ejercen una presión mayor sobre los huevos. Por el contrario, la proliferación bacteriana durante la noche estaría limitada por las bajas temperaturas ambientales y por tanto la inversión de la hembra sería aparentemente menos relevante. Sin embargo, a la vista de nuestros resultados no podemos excluir que al menos cierta actividad de incubación nocturna podría ser importante para prevenir la proliferación de ciertas bacterias (posiblemente psicrófilas). La ausencia de incubación nocturna antes de la finalización de la puesta contradice los resultados de otros estudios y muestra que existe una diversidad inexplicada en cuanto a patrones de incubación temprana en las aves. También sugiere que la incubación durante el periodo de puesta no tiene como función regular la temperatura del embrión ya que la noche es cuando esta temperatura sufre un mayor cambio.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de Cook et al. (2003, 2005a) de que un inicio temprano de la incubación durante el periodo de puesta es una adaptación para prevenir la proliferación bacteriana sobre los huevos. Asimismo apoyan los trabajos de Cook et al. (2005b) y Shawkey et al. (2009), y D'Alba et al. (2010) en un paseriforme de hábitat tropical y templado respectivamente, que demostraron que la carga y riqueza de taxones bacterianos era menor en huevos naturalmente incubados por la hembra durante el periodo de puesta que en huevos privados experimentalmente de la incubación y por tanto expuestos directamente al ambiente. Sin embargo, nuestro estudio relaciona por primera vez una medida directa de la actividad de incubación de la hembra de un paseriforme durante el periodo de puesta con la carga bacteriana de la puesta y muestra que una mayor intensidad de incubación en el día de inicio de ésta se asocia con una menor carga bacteriana sobre la puesta.

Hemos comprobado que la proporción de tiempo en que la temperatura supera un cierto umbral crítico (24°C) (intensidad de incubación) parece más importante que la temperatura de incubación en sí misma. Esto resta peso a la posibilidad sugerida por Cook et al. (2003, 2005a, b) de que los incrementos térmicos de la incubación desplazan a las bacterias de su óptimo de crecimiento. El reciente trabajo experimental de D'Alba et al. (2010) ha demostrado que un mecanismo antibacteriano de la incubación consiste en la reducción de la humedad en torno a los huevos. Abordamos esta cuestión en la siguiente sección referida al capítulo 5.

Capítulo 5

Secar los huevos para inhibir a las bacterias: La incubación durante la puesta en el papamoscas cerrojillo

En el capítulo 5, comprobamos que una mayor intensidad de incubación durante el periodo crítico de la puesta para el inicio de la incubación (días 3-5), se asociaba significativamente con menores valores de humedad relativa (Spearman correlation, $r = -0.41$, $P = 0.02$, $n = 34$) (Figura 6).

Por otra parte, la intensidad de incubación y la humedad relativa en torno a los huevos se asociaban negativamente y positivamente (respectivamente) con la carga bacteriana sobre la puesta, aunque la significación de estas asociaciones variaba según los grupos de bacterias viables cultivables: bacterias heterótrofas generales, bacterias entéricas Gram-negativas y pseudomonas (nótese que estos dos últimos grupos de bacterias también son heterótrofas). Las bacterias heterótrofas generales y las pseudomonas resultaron más sensibles a las reducciones en humedad relativa que las entéricas Gram-negativas, las cuales no se asociaron con significativamente con la humedad (Tabla 2). La fecha de puesta se asociaba positivamente con todos los grupos de bacterias cuantificados sobre la puesta (Tabla 2).

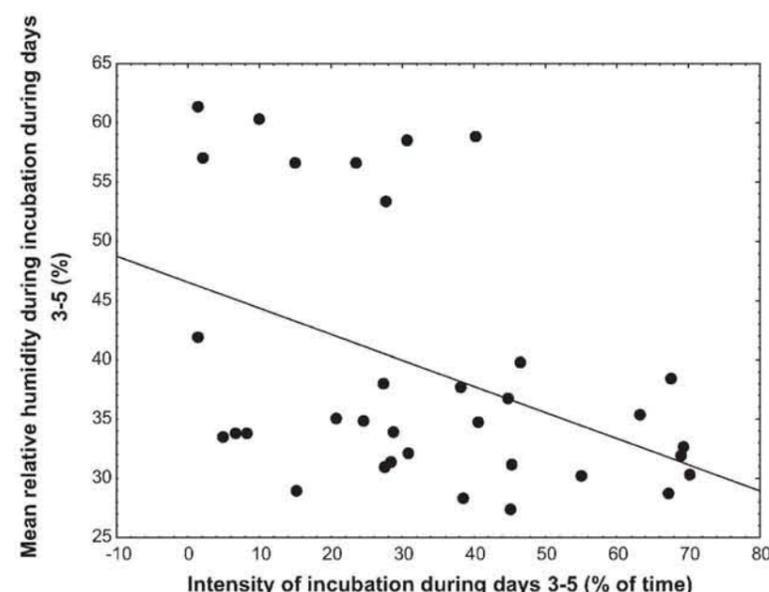


Figura 6: Asociación entre la intensidad de incubación (% tiempo) y la humedad relativa media (%) dentro de la caja nido durante el periodo crítico para el inicio de la actividad de incubación (días de puesta 3-5) en nuestra población de papamoscas cerrojillo en el centro de España ($r = -0.43$; $y = 46.56 - 0.22x$).

Model	Days 3-5			
	F	P	Sign	n
Heterotrophic bacteria				
Incubation intensity	11.35	<0.01	-	26
Laying date	24.21	<0.001	+	26
Relative humidity (%)	5.24	0.03	+	26
Laying date	9.10	<0.01	+	26
Gram negative enterics				
Incubation intensity	5.19	0.03	-	27
Laying date	8.60	<0.01	+	27
Relative humidity (%)	1.82	0.19	+	27
Laying date	2.96	0.10	+	27
Pseudomonads				
Incubation intensity	6.78	0.02	-	29
Laying date	9.55	<0.01	+	29
Relative humidity (%)	30.12	<0.001	+	29
Laying date	2.49	0.13	+	29

Tabla 2: Resultados de los modelos GLM de los efectos de la intensidad de incubación (% de tiempo) durante los días 3-5 o la humedad relativa media (%) durante esta actividad de incubación sobre la carga de bacterias viables cultivables heterótrofas (TSA), entéricas Gram-negativas (Mck) o pseudomonas (Agar pseudomonas). La fecha de puesta del primer huevo también se incluyó en los modelos como covariable. Los valores significativos ($P < 0.05$) se resaltan en negrita.

Nuestros resultados apuntan a que los efectos antibacterianos de la actividad de incubación durante la puesta están mediados por los cambios en humedad relativa que esta actividad impone en el microambiente que rodea a los huevos y apoyan por tanto el reciente trabajo de D'Alba et al. (2010). En un experimento desarrollado con golondrinas (*Tachycineta bicolor*), D'Alba et al. (2010) expusieron huevos naturalmente incubados y huevos privados experimentalmente de la incubación a condiciones de humedad aumentadas o control (ambiental) y observaron que, bajo ambas condiciones de humedad, los huevos no incubados tenían mayor carga bacteriana sobre su superficie que los huevos naturalmente incubados por la hembra, y que sólo en ausencia de incubación, los huevos humedecidos albergaban más bacterias que los no humedecidos. Igualmente, en el campo observamos que al final del periodo de puesta, cuando la mayoría de las hembras ya han comenzado a incubar, la superficie de los huevos está seca y brillante. Por una parte, esto podría deberse a los aceites hidrofóbicos transferidos desde las plumas (Reneerkens et al. 2008), placa incubatriz (Menon y Menon 2000) o glándula uropigial (Soler et al. 2008), pero de manera más general a los marcados incrementos térmicos en torno a los huevos asociados a la incubación que favorecen la evaporación y previenen la condensación de agua sobre la puesta (Cook et al. 2003, 2005a,b, D'Alba et al. 2010).

El efecto antibacteriano de la incubación fue general para todos los tipos de bacterias cuantificados sobre la puesta. Si bien la humedad es uno de los factores abióticos más relevantes para la proliferación bacteriana, las bacterias heterótrofas generales y las pseudomonas fueron más sensibles a la reducción de humedad que las entéricas Gram-negativas. Este resultado parece lógico para el caso de las bacterias heterótrofas generales puesto que representan a un grupo amplio de bacterias. Asimismo, las pseudomonas son en general un grupo de bacterias reconocidas por tener una ecología estrechamente ligada a ambientes terrestres húmedos o dulceacuícolas y marinos (Stanier et al. 1966, Spiers et al. 2000) o incluso ambientes artificiales como piscinas (Guida et al. 2009) y sistemas de ventilación (Chan et al. 2008). Finalmente, en el caso de las bacterias entéricas Gram-negativas nuestros resultados sugieren que los efectos inhibitorios de la incubación también observados para estas bacterias, podrían estar mediados por mecanismos diferentes a la reducción de humedad. Alternativamente, a pesar de que el crecimiento de bacterias entéricas Gram-negativas está potenciado en el medio de cultivo Mck, no podemos descartar que hayamos cuantificado también ciertas bacterias resistentes a la desecación como los enterococos que pudieran haber afectado a este resultado.

La asociación positiva de la fecha con la carga de bacterias sobre la puesta podría estar relacionada con el ya observado efecto promotor de la temperatura ambiental sobre la proliferación bacteriana sobre la puesta (capítulo 1).

Bloque 3

El bloque 3 lo conforman los capítulos 6 y 7 y, en términos generales, está dedicado al estudio de la degradabilidad *in vitro* de plumas por la acción de *Bacillus licheniformis* y su relación con la expresión de señales blancas no melanizadas del plumaje (capítulo 6) y con parámetros reproductivos centrales en las estrategias vitales de las aves (fecha de puesta y tamaño de nidada) (capítulo 7). Usamos plumas recogidas durante las temporadas 2009 y 2010 y datos reproductivos obtenidos durante 2009.

Capítulo 6

Diferencias en la degradabilidad bacteriana *in vitro* entre áreas oscuras melanizadas y blancas no melanizadas dentro de la misma pluma: el caso de la banda blanca de las plumas alares primarias del papamoscas cerrojillo

Una de las cuestiones más importantes en el contexto de la comunicación visual en aves es que la actividad queratinolítica de *Bacillus licheniformis*, la FDB más estudiada, está relacionada con la coloración de las plumas. Estudios previos realizados en aves silvestres han mostrado que las FDB pueden afectar a la expresión de colores del plumaje diversos, tanto los dependientes de carotenoides (Shawkey et al. 2009b) y melanina (Goldstein et al. 2004, Gunderson et al. 2008) como colores estructurales no dependientes de pigmentos (Shawkey et al. 2007, Gunderson et al. 2009). Además, parece existir cierta gradación en la degradabilidad bacteriana de las plumas en relación a su color siendo los dependientes de psitacofulvinas los más resistentes, y los dependientes de melanina más resistentes que los blancos sin melanina (Burt et al. 2010). Esta última comparación resulta particularmente interesante y ha sido demostrada reiteradamente en estudios *in vitro* (Goldstein et al. 2004, Gunderson et al. 2008). Nuestros resultados del capítulo 6 apoyan estos trabajos pero añaden además la novedad de que este patrón de degradabilidad diferencial también se cumple para áreas oscuras melanizadas y áreas blancas no melanizadas dentro de la misma pluma y no sólo para plumas independientes, tal y como se había sugerido en estos estudios previos (Goldstein et al. 2004, Gunderson et al. 2008). En concreto, en el capítulo 6 comprobamos para la 4ª pluma primaria de machos y hembras de papamoscas cerrojillo, que la degradabilidad bacteriana *in vitro* de la banda blanca no melanizada era significativamente mayor que la del área oscura melanizada contigua dentro de la misma pluma y que además esta banda blanca era significativamente más degradable en machos que en hembras (Tabla 3 y Figura 7).

Tanto para machos como para hembras nuestros resultados confirman el papel defensivo de la melanina (Goldstein et al. 2004). Además, basándonos en mediciones de barbas realizadas con microscopio electrónico observamos que la anchura parcial y total de la sección transversal de barbas negras era significativamente mayor que la de barbas blancas ($F_{1,12} = 24.83, P = 0.01$; $F_{1,12} = 29.98, P = 0.01$, respectivamente). Voitkevich (1966) ya sugirió que el grosor

Predictors	Effect	df	F	P
Colour	Fixed factor	1, 119	59,02	< 0,001
Sex	Fixed factor	1, 114	3,31	0,07
Colour*Sex	Fixed factor	1, 101	31,95	< 0,001
Length of fragment	Fixed covariate	1, 120	10,75	< 0,01
Individual	Random factor	120, 101	1,74	< 0,01

Tabla 3: Análisis de "variance components" para la degradabilidad bacteriana de fragmentos de plumas melanizados y no melanizados de 58 machos y 69 hembras de una población española de papamoscas cerrojillo incluyendo individuo como factor aleatorio. La interacciones se indican con *.

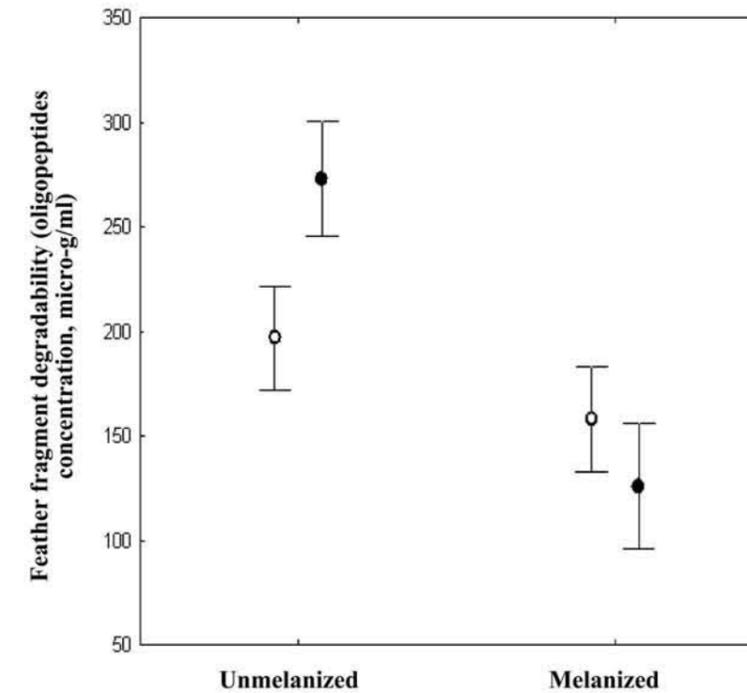


Figura 7: Degradabilidad bacteriana (mínimos cuadrados controlando por la longitud de el tamaño del fragmento con intervalo de confianza del 95%) de los fragmentos de plumas en relación al color (oscuro melanizado vs blanco no melanizado) y sexo (machos, símbolo relleno vs hembras símbolo vacío) para 127 papamoscas cerrojillo de una población del centro de España.

del córtex era mayor en barbas melanizadas. Los mecanismos moleculares o celulares próximos asociados al rol defensivo de la melanina frente a las bacterias están aún por determinar, aunque estos podrían estar relacionados con los que también confieren a las barbas melanizadas mayor resistencia a la abrasión. Se ha sugerido que la acumulación de gránulos melanoprotéicos produce un engrosamiento estructural de la capa cortical externa de queratina de las barbas que favorece una mayor resistencia mecánica (Burt 1986). Goldstein et al. (2004) sugieren que la melanina favorece la formación de puentes disulfuro en y entre moléculas de queratina que podrían dificultar la acomodación de la enzima queratinolítica de las bacterias. La melanina también podría actuar directamente como molécula inhibidora de la proliferación bacteriana aunque esto aún no se ha demostrado en aves (Burkhardt-Holm et al. 1997). Es preciso realizar estudios futuros que esclarezcan las causas próximas que explican el papel defensivo de la melanina frente a las FDB. Además, nuestros resultados en relación a la densidad de barbas sugieren que ésta era significativamente mayor en la banda blanca de la pluma que en la parte melanizada tanto en machos como en hembras (Wilcoxon matched pairs-test, $Z = 3.82, P < 0.001, n = 20$; $Z = 3.92, P < 0.001, n = 20$, respectivamente). Es posible que exista una compensación de la mayor degradabilidad de las barbas blancas por medio de la producción de barbas de repuesto.

La cuestión más interesante de nuestros resultados se refiere al hecho de que los machos tengan una banda blanca más vulnerable a las FDB que las hembras. Este resultado sugiere que las FDB podrían jugar un importante papel en la expresión de señales de plumas en el contexto de la selección sexual y social, por una parte en el en el papamoscas cerrojillo, pero más ampliamente,

en las aves en general debido a que el uso de señales blancas sobre plumas o plumaje negro está altamente extendido en la naturaleza (Jones 1990, Price y Pavelka 1996, Brooke 1998, Fitzpatrick 1998, Kose y Møller 1999, Moreno-Rueda 2005, McGlothlin et al. 2007, Morales et al. 2007, Galván 2008, Hegyi et al. 2008a, b, Hanssen et al. 2009). En el caso de los papamoscas de género *Ficedula* se sabe además que machos con mayores bandas blancas en sus plumas primarias tienen mayor éxito en la obtención de pareja (Sheldon y Ellegren 1999, Sirkiä y Laaksonen 2009), éxito reproductor (Sirkiä et al. 2010) y supervivencia (Török et al. 2003). La literatura es más escasa y menos concluyente para las hembras puesto que éstas tienen menor necesidad de señalar en un contexto sexual que los machos (pero véase Hegyi et al. 2007, Morales et al. 2007, Hegyi et al. 2008b). Los machos producen por tanto bandas más conspicuas que las hembras, más grandes y posiblemente más blancas (Lundberg y Alatalo 1992), lo cual podría repercutir positivamente en su degradabilidad. Así, los machos señalizan la calidad de sus plumas por medio de la depigmentación de parches de plumas alares, mientras que estos parches en el caso de las hembras podrían ser mera consecuencia de una correlación genética con los parches de los machos (Lande 1980) y su mantenimiento resultado de la selección social (West-Eberhard 1983).

Si bien es posible que las defensas antimicrobianas ofrecidas por el aceite uropigial (Shawkey et al. 2003, Reenerkens et al. 2008, Soler et al. 2008) podrían diferir entre machos y hembras, produciendo éstas un aceite físicamente o químicamente más protector o simplemente invirtiendo más tiempo en la aplicación del aceite sobre el plumaje que los machos (Reenerkens et al. 2008, Martín-Vivaldi et al. 2009), esta posibilidad resulta improbable en nuestro estudio puesto que el aceite presente en las plumas de machos y hembras podría haber perdido sus propiedades tras el autoclavado de las plumas y por tanto no ser funcional frente a los bacilos inoculados *in vitro*.

De acuerdo con la teoría de la señalización honesta (Zahavi 1997), sólo los machos de mejor calidad podrían afrontar los costes de producir bandas blancas mayores con barbas capaces de resistir la abrasión física (Barrowclough y Sibley 1980, Burt 1986, Bonser 1995), la acción de los ácaros (Kose y Møller 1999) y/o, en este caso, la degradación de los bacilos degradadores de plumas (Goldstein et al. 2004, Gunderson et al. 2008, Burt et al. 2010). Las bandas blancas de las plumas alares primarias funcionan por tanto como ventanas a la resistencia del plumaje, indicando la capacidad de un individuo de producir plumas de alta resistencia sobre una superficie alar mayor que no cuenta con la protección de melanina. Los machos de calidad inferior que intentaran exhibir bandas tan anchas como los de mejor calidad fenotípica mostrarían bandas blancas con muchas barbas degradadas lo que se expresaría como muescas en las primarias, algo fácil de detectar por otros individuos incluidas potenciales parejas (Fitzpatrick 1998).

Puesto que posibles lesiones en las barbas de plumas alares podrían limitar la eficiencia de vuelo y por tanto la capacidad de escapar de predadores (Dale y Slagsvold 1996, Møller et al. 2010), la capacidad de forrajeo en vuelo (Swaddle et al. 1996) y/o aumentar los costes de migración (Møller et al. 2004), las bandas blancas sobre las plumas primarias son señales honestas que ofrecen un buen índice de calidad del plumaje.

Capítulo 7

Asociación entre la degradabilidad bacteriana *in vitro* de la blanca de las plumas alares primarias con el esfuerzo y fenología reproductivos en machos y hembras de papamoscas cerrojillo

En el caso de los machos, el mejor modelo predictivo de la degradabilidad bacteriana de la banda blanca de las plumas alares primarias incluía la fecha de puesta y el tamaño de nidada, y estas variables estaban positivamente asociadas a la degradabilidad de la banda blanca cuando se controlaba por el tamaño de la misma (GLM, $F_{1,46} = 12.92$, $P = 0.001$; $F_{1,46} = 13.25$, $P = 0.001$, respectivamente, Figura 8 y Figura 9). Estos es, los machos que se reproducían más tarde y estaban a cargo de nidadas mayores tenían plumas más degradables por la acción bacteriana *in vitro*. Para la porción melanizada de la pluma sólo la longitud de este fragmento estaba incluida en el modelo final, mostrando una asociación positiva con su degradabilidad bacteriana (GLM, $F_{1,41} = 5.00$, $P = 0.03$).

En el caso de las hembras, la fecha de puesta pero no el tamaño de nidada resultó ser la variable predictora más importante de la degradabilidad bacteriana de la banda blanca. En concreto, la degradabilidad y la fecha de puesta estaban asociadas de manera positiva (GLM, $F_{1,51} = 5.78$, $P = 0.02$, $r^2 = 17.2$, Figura 9). Esto es, las hembras tardías tenían plumas más degradables que las hembras tempranas. La degradabilidad de la porción melanizada no estaba asociada significativamente a ninguno de los predictores testados (todos $P > 0.11$).

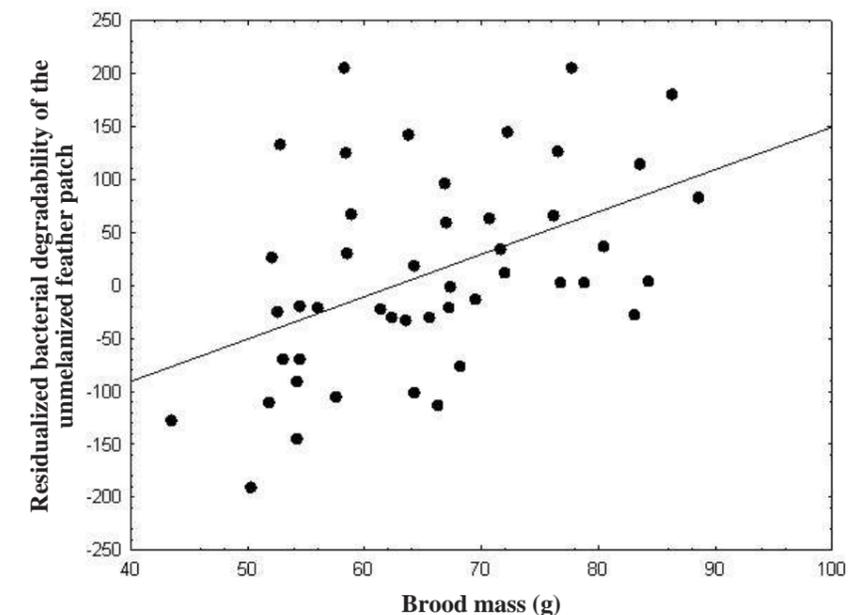


Figure 8: Degradabilidad bacteriana de la banda blanca de la 4ª pluma primaria en machos en relación al peso de la nidada controlando por la fecha de puesta del primer huevo y la longitud de dicha banda blanca. Presentamos la degradabilidad residualizada por la fecha de puesta y el tamaño de la banda ($r = 0.47$, $P = 0.001$, $n = 46$).

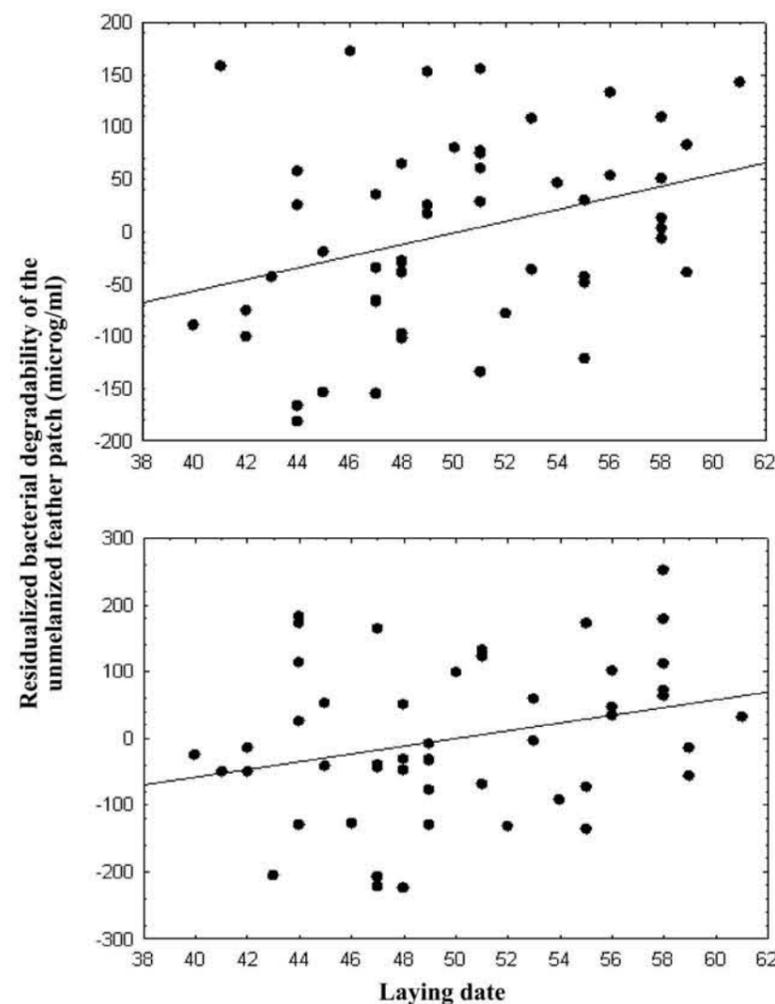


Figura 9: Degradabilidad bacteriana de la banda blanca de la 4ª pluma primaria en hembras y machos en relación a la fecha de puesta del primer huevo (1 = 1 de Abril) controlando por el la longitud de dicha banda blanca. Presentamos la degradabilidad residualizada por el tamaño de la banda (Hembras: $r = 0.32$, $P = 0.02$, $N = 51$ y machos: $r = 0.28$, $P = 0.05$, $N = 51$).

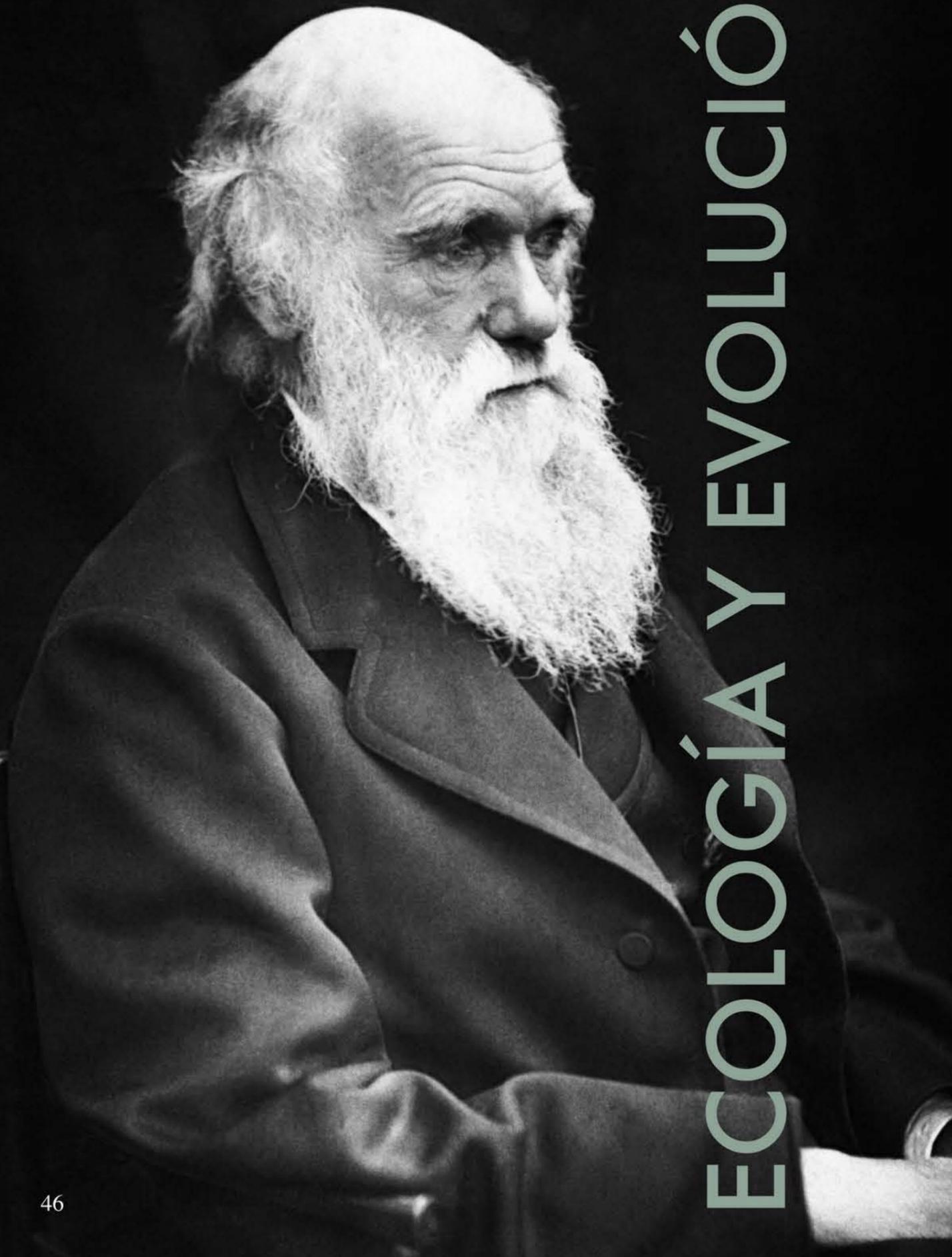
En el capítulo 6 habíamos demostrado que la banda blanca de las primarias en machos es más degradable por las bacterias que en hembras puesto que éstas tienen menor presión para señalar y por tanto producen bandas menos conspicuas. Los resultados obtenidos en el capítulo 7 concuerdan con este hecho ya que es en los machos y no en las hembras donde observamos una asociación positiva entre el esfuerzo reproductor y la degradabilidad de la banda blanca. Los machos a cargo de nidadas mayores tendrían plumas primarias más desgastadas y degradadas en el momento en que las muestreamos en el campo, siendo por tanto estas plumas en peor condición más degradables por las bacterias en los tests *in vitro* que desarrollamos posteriormente en el laboratorio. Una posibilidad adicional sería que los machos hayan invertido más que las hembras en la ceba de los pollos, y por tanto descuidado en mayor medida el estado de sus plumas. Existen trabajos que apoyan esta posibilidad aunque sólo para las fases tempranas del periodo de cebas, cuando realmente los costes de cebar son muy inferiores a los de fases tardías, cuando machos y hembras invierten por igual (Moreno et al. 1995, 2006, Stodola et al. 2010).

Si bien las hembras ceban en menor medida que los machos en fases tempranas, éstas podrían igualar estos costes de los machos por estar más expuestas a las bacterias de los nidos durante el *brooding* (Goodenough y Stallwood 2010). Así, la explicación más plausible es posiblemente la basada en las diferencias entre sexos de las propiedades de la banda blanca de las primarias.

El argumento previo se refiere a la comparación entre sexos. Por otra parte, cuando consideramos diferencias en la degradabilidad de la banda blanca de las primarias dentro de los machos en relación al tamaño de nidada, la interpretación más obvia es que los machos a cargo de nidadas mayores hayan pagado mayores costes en términos de una mayor exposición a los agentes abióticos y bióticos degradadores del plumaje y que además hayan tenido menos tiempo, materia y energía para proteger sus plumas (Whittingham 1993, Merilä y Hemborg 2000, Lucas et al. 2005, Vágási et al. 2011). Las plumas de estos machos serían más degradables a las bacterias *in vitro* debido a su peor condición en el momento de muestreo en el campo. Esta posibilidad fue sugerida por Lucas et al. (2005), aunque no demostrada. Si bien comprobaron que los individuos con tamaños de nidada experimentalmente aumentada tenían una mayor carga de bacterias libres (término usado por los autores para referirse a bacterias con una unión laxa a las plumas) en su plumaje pectoral, no detectaron efectos del experimento sobre la degradación de las plumas *in vitro*, posiblemente debido a escasa potencia estadística, tal y como sugieren los propios autores. A diferencia de Lucas et al. (2005), nosotros nos centramos específicamente en la degradabilidad bacteriana *in vitro* de una señal sexual de las plumas (Sheldon y Ellegren 1999, Morales et al. 2007, Sirkiä y Laaksonen 2009, Sirkiä et al. 2010) y socialmente (Garamszegi et al. 2006, Hegyi et al. 2008b) seleccionada, además de usar métodos moleculares frente a visuales para cuantificar la degradación bacteriana *in vitro*. Estas cuestiones podrían en parte explicar las diferencias de resultados.

La asociación positiva entre la degradabilidad bacteriana de la banda blanca de las primarias y la fecha de puesta fue detectada tanto en machos como en hembras y podría estar relacionada con la idea general de que los individuos tardíos son generalmente de calidad inferior (Kokko 1999, Møller 1994), lo cual también incluiría una calidad inferior de sus plumas así como la eficacia de sus defensas (Kose y Møller 1999, Møller et al. 2004, Pap et al. 2005). En nuestra población, sólo los machos de mejor calidad son capaces de afrontar los costes de una llegada y cría tempranas (Ruiz-de-Castañeda et al. 2009, Lobato et al. 2010). Además, es posible que las presiones impuestas por agentes degradadores del plumaje como las bacterias, se vean intensificadas por mayores valores de temperatura ambiental (Lucas et al. 2005), tal y como se ha mostrado en nuestra población para la comunidad bacteriana heterótrofa de las puestas (Capítulo 1). Este efecto estacional podría también potenciar que los individuos tardíos tengan plumas de peor condición en el momento de muestreo en el campo. La ausencia de efectos de la protandria sobre la pendiente de la correlación entre degradabilidad y fecha de puesta sugiere que las hembras también pagan costes por criar pronto (Nilsson 1994).

Finalmente, ni el tamaño de nidada ni la fecha de cría explicaban significativamente la variación de la degradabilidad del área melanizada de la cuarta primaria en machos o hembras de nuestra población. Ello concuerda con lo mostrado en capítulo 6, que el área melanizada es más resistente a la degradación bacteriana que la banda blanca de las primarias, y que machos y hembras tienen áreas melanizadas igualmente resistentes a las bacterias. La sensibilidad de las áreas melanizadas a los costos reproductivos podría haberse minimizado evolutivamente en el contexto de la optimización del vuelo, pues estas áreas componen la mayor parte de la pluma.



DISCUSIÓN INTEGRADORA

Contexto Ecológico-Evolutivo

Las bacterias son fósiles vivientes que han presenciado la historia de la vida desde sus inicios (Madigan et al. 2011). Por ello, todos los organismos que han constituido y constituyen hoy la diversidad biológica del planeta han convivido con bacterias más o menos estrechamente desde su aparición. La evolución de nuevos organismos y de sus novedades estructurales y/o comportamentales ha ofrecido desde el principio una nueva gama de hábitats potencialmente colonizables y recursos explotables para las ubicuas y ecológicamente plásticas bacterias (Mlot 2004). El origen de las aves hace 150 millones de años a partir de los terópodos, un subgrupo de dinosaurios (Paul 2002), es un claro ejemplo de ello. Por una parte, el huevo de las aves supuso una diferenciación estructural respecto al huevo de los reptiles con la producción de una cáscara rígida, pero sobre todo, en el contexto de la reproducción, las aves innovaron desde un punto de vista comportamental con el origen de la llamada unidad ave-nido y de la incubación por contacto, y con ello de la regulación de las condiciones microclimáticas en que tiene lugar el desarrollo embrionario (Deeming 2002). Puesto que la unidad ave-nido dio lugar a la creación de un nuevo tipo de hábitat para bacterias y hongos diversos (Singleton y Harper 1998, Baggott y Graeme-Cook 2002, Goodenough y Stallwood 2010), tanto la cáscara rígida como la incubación por contacto evolucionaron probablemente en un contexto de riesgo de infección bacteriana de embriones. La sensibilidad de las bacterias a las condiciones microclimáticas puede haber sido una de las causas originarias de la evolución de la incubación en aves, un factor no muy tenido en cuenta hasta ahora (D'Alba et al. 2010).

La argumentación tradicional en ornitología, aunque no así en la industria avícola (Board y Fuller 1994), es que pocos embriones mueren por infección bacteriana por lo que las bacterias no serían importantes como determinantes del éxito reproductor ni explicarían los rasgos reproductivos de las aves. Este argumento es como defender que el atropello de viandantes en las ciudades es infrecuente por lo que no explicaría la presencia de semáforos. Son las adaptaciones de las aves, físicas, químicas y comportamentales, desde sus orígenes evolutivos, al importante riesgo de infección bacteriana las que explican su baja incidencia actualmente (Peralta-Sánchez et al. 2010).

Por otra parte, el origen de las aves no se concibe sin el origen de las plumas, una de las novedades estructurales más cruciales en la evolución de los vertebrados terrestres (Hanson 2011). Las plumas pueden haber surgido en los dinosaurios como ornamentos capaces de expresar resistencia de estructuras complejas a la degradación física, química y bacteriana más que como facilitadoras del vuelo o elementos asociados a la termorregulación (Vinther et al. 2008, 2010, Quanguo Li et al. 2010).

Independientemente de su origen evolutivo, las plumas han ofrecido nuevos recursos a las bacterias y han implicado la evolución en las aves de morfologías, procesos fisiológicos y comportamientos tendentes a reducir la degradación bacteriana del plumaje (Burt 2009). Un plumaje en mal estado podría tener costes directos sobre la eficacia de vuelo y por tanto, sobre la migración (Møller et al. 2004), la capacidad de captura de presas (Swaddle et al. 1996) o de escapar del ataque de depredadores (Møller et al. 2010), y sobre la interacción social y/o sexual a nivel intraespecífico (Gunderson et al. 2009, Griggio et al. 2010). La capacidad de resistir dicha degradación puede haberse convertido en un factor importante sustentador de eficacia biológica y capaz por tanto de convertirse en ornamento sexualmente seleccionado (Gunderson et al. 2009).

Tanto los huevos de las aves como las plumas sustentan hoy una comunidad bacteriana compleja reflejo de millones de años de coevolución entre aves y bacterias. El impacto de estas bacterias sobre la eficacia biológica de las aves dependerá de la evolución de defensas capaces de controlar la proliferación bacteriana sobre huevos y/o plumas en cada contexto ecológico. Esta tesis se centra en el estudio de estas simbiosis aves-bacterias, y en concreto en la influencia de la colonización y explotación bacteriana de los huevos y de las plumas sobre correlatos de la eficacia biológica de las aves así como de algunas de las adaptaciones defensivas comportamentales desarrolladas por éstas.

Huevos y bacterias

Las bacterias colonizan la superficie de los huevos y más ampliamente de las puestas en condiciones silvestres y el origen de estas bacterias puede ser tanto materno como ambiental. Las bacterias pioneras en la colonización del huevo tienen origen materno de modo que cuando los huevos contactan por primera vez con el medio externo después de la oviposición ya pueden albergar bacterias transmitidas verticalmente (Barrow 1994, Soler et al. 2011). El proceso de colonización de la superficie del huevo tiene lugar inmediatamente tras el proceso de formación de la cáscara en la porción final del oviducto pero sobre todo en su paso a través de la cloaca durante la oviposición. La cloaca es una cavidad anatómica propia de reptiles y aves donde convergen la porción final de los tractos intestinal y urogenital. La cloaca recoge las heces y otros fluidos o exudados urogenitales antes de su expulsión al exterior, convirtiéndose por tanto su contenido en un verdadero caldo o sustrato para bacterias (Lombardo et al. 1996, Steward y Rambo 2000, Hupton et al. 2003). Este sustrato bacteriano puede impregnar la superficie del huevo a su paso por la cloaca, de manera que la transmisión vertical de bacterias es consecuencia de la propia anatomía de reptiles y aves. Los mamíferos han resuelto en parte este coste anatómico con la pérdida de la cloaca y la canalización al exterior de forma independiente de los tractos intestinal y urogenital, evitando que las heces, principal fuente de bacterias internas, contacten con las crías. Puesto que bacterias patógenas para el embrión como ciertas pseudomonas o salmonellas pueden proliferar en la cloaca materna, el estado de salud de la madre y su capacidad para controlar las poblaciones de este tipo de patógenos en el intestino, es determinante de la probabilidad de colonización de la superficie del huevo y por tanto de la infección del embrión (Barrow 1994, Humphrey 1994, Soler et al. 2011). Los efectos maternos en el huevo han sido tradicionalmente considerados desde su papel positivo para el embrión (p. ej. lisozimas)

(Saino et al. 2002), pero la transmisión vertical de bacterias al huevo sugiere reconsiderar esta cuestión y ampliar la perspectiva asumiendo que existen efectos maternos que pueden comprometer la supervivencia del embrión (Soler et al. 2011). En el bloque temático 1 de esta tesis, que incluye los capítulos 1-3, aportamos por primera vez una descripción detallada de la comunidad de bacterias cultivables potencialmente patógenas que proliferan sobre la superficie de las puestas de papamoscas cerrojillo y su relación con las bacterias cloacales de las hembras. Esto establece una base descriptiva indispensable en este inexplorado campo de la ecología reproductiva de aves silvestres. En base a ello, es preciso desarrollar futuros estudios experimentales de manipulación de la carga intestinal-cloacal materna por medio de la administración de antibióticos vía oral o cloacal y evaluar la magnitud de la transmisión vertical de bacterias sobre la cáscara y sus efectos sobre el éxito reproductor.

El oviparismo, característico de la mayoría de grupos de vertebrados (aunque es minoritario en los mamíferos), tiene asociado una exposición directa del huevo y por tanto del embrión a bacterias ambientales. Estas bacterias proceden del agua o del aire según consideremos vertebrados acuáticos o terrestres y de la superficie sobre las que son depositados los huevos. El nido de las aves supuso una innovación estructural y funcional respecto al de los reptiles y fue crítico para el origen de la unidad de incubación ave-nido (Deeming 2002). Paralelamente, el nido de las aves delimitó un conjunto de nuevos micro-ambientes que pasarían a albergar una diversa comunidad de insectos, bacterias y hongos (Singleton y Harper 1998, Baggott y Graeme-Cook 2002, Goodenough y Stallwood 2010).



La mayoría de estas bacterias son saprófitas o comensales presentes en el material vegetal aunque pueden adquirir carácter patogénico y afectar a ciertas propiedades del huevo o incluso infectar al embrión (Cook et al. 2003, 2005a). La estructura y composición del nido, así como los comportamientos de higienización del mismo pueden haber sido seleccionados en relación al riesgo de contaminación bacteriana de los huevos (Clark y Mason 1985). Existen sin embargo excepciones como el caso de la abubilla *Upupa epops*. Esta especie presenta nidos poco estructurados en cavidades donde se acumula una importante cantidad de excrementos u otros materiales en descomposición desde el inicio de la incubación con el primer huevo de la puesta. En este tipo de ambientes con alto microbismo, la abubillas protegen sus huevos impregnándolos con un aceite uropigial antibacteriano (Soler et al. 2008, Martín-Vivaldi et al. 2010).

La proliferación de las bacterias que colonizan la superficie de la puesta en condiciones silvestres y su penetración al interior del huevo a través de la cáscara puede estar influenciada por las condiciones ambientales, principalmente de temperatura y humedad. Estas variables suelen estar relacionadas y forman parte del grupo de factores más limitantes para la supervivencia y proliferación de las bacterias tanto en condiciones de laboratorio como silvestres (Madigan et al. 2011). Por una parte, se sabe que la actividad enzimática, y por tanto el metabolismo bacteriano, es potenciado térmicamente de modo que mayores valores de temperatura dentro de un rango óptimo se asocian a una mayor multiplicación bacteriana (capítulo 1). Por otra parte, las bacterias dependen de microambientes húmedos para desarrollar su metabolismo de intercambio de materia con su entorno. Sobre los huevos de las aves, el agua actúa además como vehículo de las bacterias para su penetración a través de los poros hacia el interior (Cook et al. 2003, 2005a). De esta manera, las presiones de selección ejercidas por las bacterias sobre los huevos y los embriones de las aves dependerán del tipo de hábitat, en particular de sus condiciones de temperatura y humedad. De acuerdo con ello, los efectos de las bacterias sobre el éxito de eclosión son menos claros en hábitats templados (Peralta-Sánchez et al. 2010, D'Alba et al. 2010) (capítulos 1-3) que en hábitats tropicales (Cook et al. 2003, 2005a), donde las condiciones de temperatura y humedad son homogéneamente elevadas durante todo el año. Las fluctuaciones interanuales de las condiciones climáticas, frecuentes en hábitats templados, podrían influir en los efectos de las bacterias sobre el éxito de eclosión en distintas temporadas reproductivas. Estas cuestiones ofrecen una línea de investigación adicional en el contexto de la ecología reproductiva de las aves y el cambio climático (Møller et al. 2011).

La evolución de comportamientos para la defensa antibacteriana de las puestas ha estado por tanto encaminada a controlar las condiciones micro-ambientales en torno a los huevos para inhibir la proliferación bacteriana sobre estos (D'Alba et al. 2010). Así, la mayor innovación evolutiva de las aves en el contexto de la reproducción es posiblemente la unidad de incubación ave-nido (Deeming 2002). Al poner los huevos en un nido perfectamente definido sobre el que el ave entra en contacto directo con ellos, se consigue crear un microambiente cuyas condiciones de temperatura y humedad pueden ser marcadamente diferentes de las del ambiente inmediatamente circundante fuera del nido (Ar y Sidis 2002). Estas condiciones resultantes de la actividad de incubación pueden atenuar o anular los efectos potenciadores de la proliferación bacteriana de las condiciones puramente climáticas (capítulos 1 y 2) (D'Alba et al. 2010). El tipo de nido y su ubicación, y el comportamiento de incubación (ej., ritmos diarios, intensidad, rango de temperaturas) varían en función de las estrategias vitales de las aves y pueden ser factores importantes para controlar la proliferación bacteriana sobre los huevos en diferentes contextos

ecológicos (Wang y Beissinger 2011). Estudios experimentales y correlativos tanto en especies tanto de hábitats templados (D'Alba et al. 2010) como tropicales (Cook et al. 2003, 2005a,b, Shawkey et al. 2009a), muestran que la incubación inhibe la proliferación bacteriana sobre los huevos y que un posible mecanismo para ello consiste en el secado de los huevos (D'Alba et al. 2010), en parte consecuencia de los incrementos de temperatura y/o del contacto directo de las plumas hidrófobas de la hembra con la superficie de los huevos. Todo ello apunta a que la incubación puede ser una adaptación antibacteriana ampliamente extendida en la naturaleza.

Como las hembras de las aves sólo pueden poner un huevo al día durante el periodo de puesta, existe una relación negativa entre el orden de puesta y el número de días en que un huevo está expuesto al ambiente antes del inicio de la incubación plena. Existe además una relación positiva entre el número de días que un huevo está expuesto al ambiente y por tanto a la colonización bacteriana, y su fallo de eclosión (Cook et al. 2003, 2005a). Según ello, se ha propuesto que el inicio temprano de la actividad de incubación durante el periodo de puesta es una adaptación defensiva frente a la proliferación bacteriana sobre los huevos (Cook et al. 2003, 2005a,b). Nuestros resultados de los capítulos 4 y 5 muestran una asociación negativa entre la intensidad de incubación durante el periodo de puesta y la carga bacteriana sobre la puesta y apoyan por tanto esta hipótesis. Esta posibilidad contrasta con la idea tradicional de Lack (1954) de la reducción adaptativa de nidada, según la cual un inicio temprano de la incubación es una adaptación para producir asimetría en los pollos, consecuencia de la asincronía de eclosión, y optimizar así el tamaño de nidada según las condiciones ambientales de cada temporada reproductiva. Ante condiciones ambientales desfavorables, el último pollo en eclosionar y por tanto el menos desarrollado respecto a sus hermanos, moriría en favor de la condición de sus hermanos y padres.

El estudio de los patrones de inicio de la actividad de incubación y su relación con la asincronía de eclosión y asimetría de pollos ha sido un tema central en la ecología reproductiva de las aves durante las últimas décadas (Stoleson y Beissinger 1995). Sin embargo, la mayor parte de las hipótesis generadas al respecto se han centrado en las consecuencias del inicio temprano de la incubación sobre la supervivencia de pollos y no sobre la de los embriones. Respecto a este último caso, Arnold et al. (1987) sugirió que la viabilidad de los embriones de los primeros huevos de la puesta podría reducirse por una exposición continuada a bajas temperaturas ambientales. La incubación temprana durante la puesta y los incrementos de temperatura asociados podría por tanto haber surgido para mantener la viabilidad de los embriones. Nuestras evidencias de que las hembras de papamoscas cerrojillo incuban mínimamente durante las noches del periodo de puesta (capítulo 4), cuando las bajas temperaturas ambientales podrían ser supuestamente más letales para embrión, niegan la posibilidad sugerida por Arnold et al. (1987). Además, la tolerancia de los embriones a bajas temperaturas debe ser mayor de lo generalmente asumido. Durante las frecuentes nevadas tardías en nuestros hábitats montanos, individuos de diversas especies de paseriformes se ven forzados a interrumpir su actividad de incubación abandonando temporalmente el nido durante períodos que van desde varias horas a más de un día. Esta interrupción de la incubación no parece tener efectos sobre el éxito de eclosión y supervivencia de los pollos.

Nuestros resultados junto con otros de estudios recientes (Shawkey et al. 2009a, D'Alba et al. 2010) apoyan la hipótesis de Cook et al. (2003, 2005a) y sugieren que la asincronía de eclosión es la consecuencia inevitable y no necesariamente adaptativa de la necesidad de las

aves de defender a sus embriones de las bacterias durante el período de puesta y no una adaptación para facilitar la reducción de nidada. Por tanto el inicio temprano de la incubación constituiría según estos resultados una adaptación antibacteriana, y la reducción de nidada, en los casos en que es eficiente, una ventaja añadida, que es contrarrestada en muchos casos por una reducción de nidada ineficaz o innecesaria. La incubación de las aves durante la puesta puede ser una potente defensa comportamental basada en un mecanismo antibacteriano sencillo (D'Alba et al. 2010). Así, a pesar de que estudios recientes realizados en aves silvestres ofrecen una importante heterogeneidad de resultados y por tanto un escenario aparentemente poco concluyente en lo referente a los efectos de las bacterias sobre el éxito de eclosión, es posible que lo que observamos hoy en la naturaleza sea el reflejo de un proceso coevolutivo de millones de años entre aves y bacterias (Peralta-Sánchez et al. 2010). Las aves podrían estar controlando el resultado de la carrera armamentística con las bacterias gracias a adaptaciones costosas. Es necesario en futuras investigaciones desarrollar un enfoque experimental para por un lado eliminar temporalmente las barreras antibacterianas para así evaluar el potencial infeccioso de las bacterias, y por otro lado eliminar el riesgo de contaminación de los huevos para resaltar así los costes que implican las adaptaciones antibacterianas de las aves.

Plumas y bacterias

Impresa en caliza, una solitaria pluma de hace 150 millones de años descubierta en una cantera alemana en 1861, dos años después de la publicación del *Origen de las Especies*, abrió un debate evolutivo que aún no se ha zanjado sobre uno de los elementos más elegantes de la naturaleza: las plumas (Hanson 2011). Las aves evolucionaron a partir de los terópodos, un subgrupo de dinosaurios, pero es posible que el origen de sus plumas se remonte aún más en el tiempo, hasta el antepasado común de los dinosaurios y pterosaurios (Paul 2002). La idea tradicional de que las plumas hayan evolucionado a partir de las escamas de los reptiles ha perdido fuerza y se sugiere ahora que tanto las escamas de los reptiles como las plumas primitivas tienen su origen en unos discos de células cutáneas llamados placodas (Sawyer et al. 2005). Diferencias en la activación y expresión genética de estas células a lo largo del desarrollo embrionario en reptiles y aves dio lugar a que la proliferación celular ocurriera de forma plana produciendo escamas, o bien de forma vertical y cilíndrica produciendo cerdas primitivas. Estas cerdas primitivas eran tubos huecos cuya complejidad estructural aumentó de forma gradual durante millones de años en forma de ramificaciones interconectadas (barbas, bárbulas y barbicelos) para formar las plumas actuales. Desde un punto de vista químico, las escamas y las plumas se componen de queratina. La queratina es posiblemente la proteína más resistente de la naturaleza aunque ello no evita que exista un reducido grupo polifilético de bacterias adaptadas a usar esta proteína como fuente de carbono, esto es, especializadas en degradar y consumir queratina (Burt et al. 1999). Las escamas y en especial las plumas, cuya estructura ramificada ofrece una superficie notablemente mayor, representan por tanto un nuevo hábitat potencialmente colonizable y explotable por estas bacterias.



En el contexto de la ornitología este grupo de bacterias, principalmente representado por *Bacillus licheniformis* aunque genéricamente denominado *feather degrading bacteria* (FDB), fue aislado por primera vez en aves silvestres por Burt et al. (1999). Si bien los ectoparásitos han sido considerablemente estudiados en relación a sus efectos sobre el plumaje y más ampliamente sobre la eficacia biológica de las aves, las FDB han recibido una inmerecidamente escasa atención.

Estudios recientes desarrollados en condiciones silvestres sugieren sin embargo que las FDB afectan negativamente a ciertas propiedades del plumaje y pueden por tanto haber jugado un papel importante en la evolución de las plumas de las aves (Burt 2009). Además, las aves han desarrollado diversas adaptaciones defensivas para prevenir la proliferación de las bacterias sobre el plumaje y minimizar las lesiones que éstas producen. Entre otras adaptaciones destacan, el aceite de la glándula uropigial (Shawkey et al. 2003, Ruiz-Rodríguez et al. 2009b) impregnado sobre el plumaje o la coloración de las plumas con determinados pigmentos “defensivos” como la melanina (Goldstein et al. 2004) o las psittacofulvinas (Burt et al. 2010). Estas cuestiones cobran especial interés en el contexto de la comunicación visual en aves. Se sabe que la eficacia queratinolítica de las FDB depende de la coloración de las plumas, por una parte del tipo de pigmentación pero también de la intensidad de cierta pigmentación. Las plumas pigmentadas con psittacofulvinas, hecho extendido en aves tropicales, son las más resistentes a la degradación bacteriana, posiblemente por que las presiones ejercidas por las bacterias en este tipo de hábitats cálidos y húmedos han sido y son elevadas (Burt et al. 2010). Por otra parte, las plumas negras o pardas pigmentadas con melanina son menos degradables que las plumas blancas no melanizadas.

(Goldstein et al. 2004, Gunderson et al. 2008). La melanina es el tipo de pigmento más común y más ampliamente distribuido en el reino animal (Liu y Simon 2003, Liu et al. 2005) y, en particular, en las plumas de las aves (McGraw et al. 2005, McGraw 2006). En el capítulo 6 demostramos por primera vez que este patrón diferencial de degradación también se cumple a nivel intra-pluma en machos y hembras de papamoscas cerrojillo. Además, de acuerdo con la teoría de la selección sexual, se ha comprobado que una mayor intensidad en la coloración roja dependiente de carotenoides en machos de pinzón mejicano (*Carpodacus mexicanus*) se asocia a una menor carga de FDB (Shawkey et al. 2009b).

Si bien las plumas son herramientas indispensables para el vuelo en las aves, recientes evidencias genéticas sugieren que las plumas podrían ser un carácter simplesiomórfico presente en un ancestro común de los pterosaurios y dinosaurios (Paul 2002). Ello indica por tanto que las plumas no surgieron para volar. Algunos paleontólogos las han asociado con cuestiones de aislamiento térmico aunque la hipótesis que actualmente cobra mayor interés es la relacionada con la selección sexual. Las plumas podrían por tanto haber surgido para ser exhibidas a la vista de con-específicos como ornamentos indicadores de calidad (Vinther et al. 2008, 2010, Quanguo Li et al. 2010). Existen notables evidencias fósiles que parecen apoyar esta posibilidad en ambas ramas del clado de los dinosaurios, ornitiscuios y sauriscuios.

Por ejemplo, *Tianyulong*, un ornitiscuio, mostraba cerdas curvas similares a plumas a lo largo del dorso de la cola. *Epidexipteryx*, un sauriscuio, mostraba una extravagante cola compuesta por cuatro largas plumas en forma de cinta, con barbas dispuestas en un plano. Sin embargo, los mayores avances en este contexto están relacionados con el estudio de la microestructura de las barbas de plumas fósiles por medio de microscopía electrónica. La reciente confirmación de la existencia de melanosomas (Vinther et al. 2008, 2010), que habían sido inicialmente confundidos con bacterias, en fósiles de plumas, ha abierto la posibilidad de determinar el color de éstas, una cuestión de máxima importancia para comprender los procesos de señalización y comunicación visual en fases tempranas de la evolución de las plumas y posteriormente de las aves.

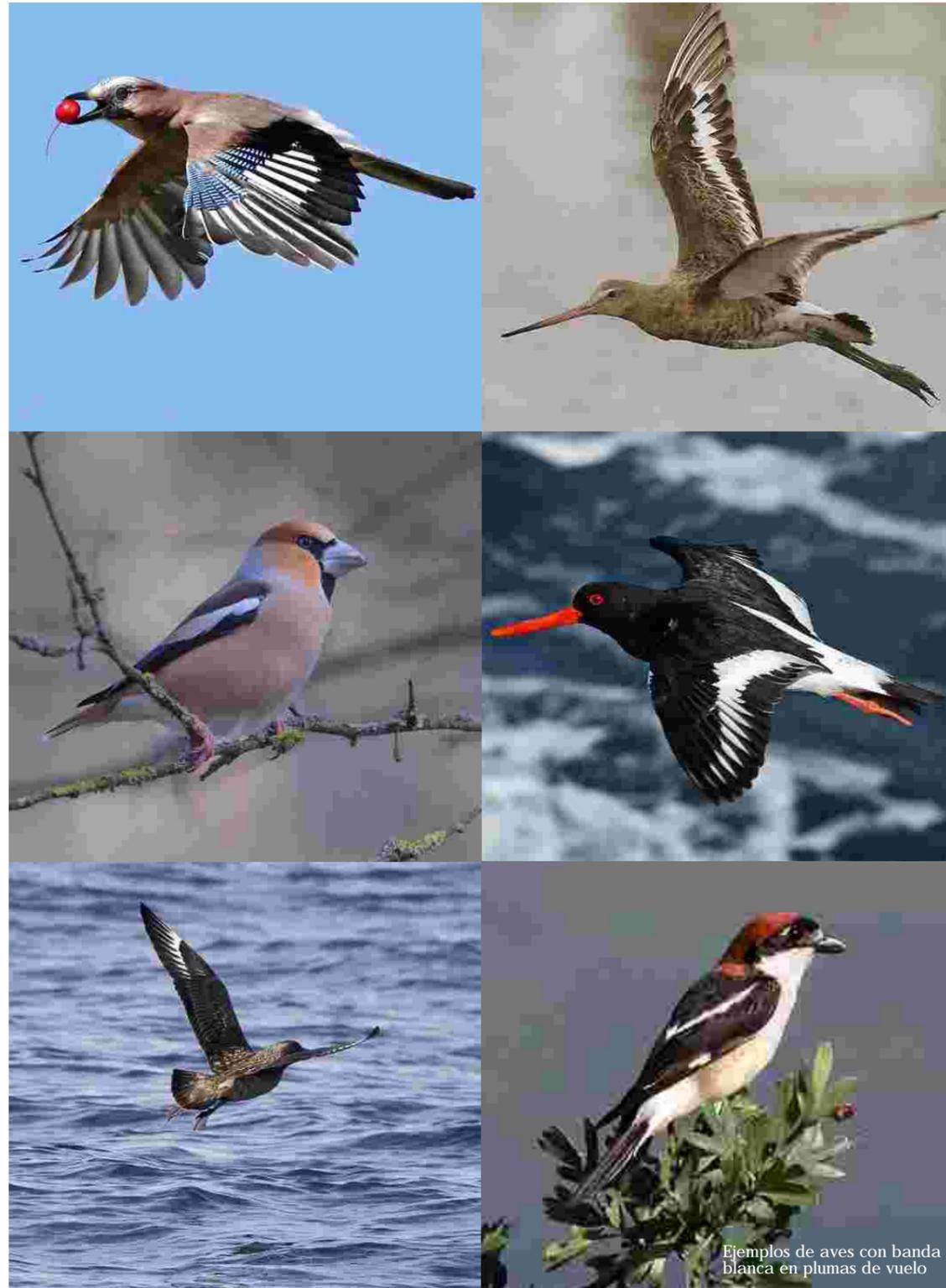
La melanina es el pigmento más frecuente en plumas (McGraw et al. 2005, McGraw 2006) y la combinación de áreas oscuras melanizadas y áreas blancas no melanizadas en el plumaje o en las plumas para señalar calidad individual está ampliamente extendido en la naturaleza (Jones 1990, Price y Pavelka 1996, Brooke 1998, Fitzpatrick 1998, Kose y Møller 1999, Moreno-Rueda 2005, McGlothlin et al. 2007, Morales et al. 2007, Galván 2008, Hegyi et al. 2008a,b, Hanssen et al. 2009). Basta con revisar monografías ornitológicas con representación gráfica de especies (p.ej. Cramp 1994) para observar que numerosas especies presentan combinaciones de negro, blanco y pardo, colores todos ellos dependientes de melanina o su ausencia. Curiosamente, estos patrones de coloración parecen estar ya presentes en las primeras plumas. *Anchiornis*, un pariente cercano a las aves con más de 150 millones de años de antigüedad, ya mostraba una cantidad importante de plumas que combinaban áreas blancas y negras. Además, las plumas de *Anchiornis* eran simétricas y por tanto no válidas para el vuelo. Es posible que este tipo de plumaje extravagante sea por tanto resultado de un proceso de selección sexual (Quanguo Li et al. 2010).

Con el origen del vuelo, las presiones de las FDB sobre la calidad de las plumas podrían haberse intensificado de modo que además de la operación de la selección sexual sobre la coloración, la selección natural actuaría negativamente sobre los individuos con plumas lesionadas.

La degradación bacteriana del plumaje podría producir lesiones en las plumas con costes sobre la eficiencia aerodinámica de la pluma y por tanto en la capacidad de vuelo, una cuestión inexplorada hasta la fecha pero con importantes implicaciones ecológico-evolutivas en las aves (Møller et al. 2010). Las bandas blancas alares formadas por plumas remeras con bandas blancas rodeadas de zonas oscuras están presentes en numerosas especies de aves, especialmente de paseriformes, y son exhibidas mediante el movimiento vertical de las alas plegadas en interacciones sexuales y sociales. El sustrato indicador de estas bandas alares no ha sido apenas estudiado hasta la fecha, habiendo recibido mucho menos atención que las señales basadas en plumaje corporal y en pigmentos carotenoides. Cuando se ha tratado el carácter señalizador de la melanina ha sido en relación con plumaje corporal y con amplias zonas de plumas totalmente melanizadas o desmelanizadas. Puesto que a nivel intra-pluma las áreas blancas no melanizadas son más degradables por las FDB que las oscuras melanizadas (capítulos 6 y 7), las FDB podrían haber controlado la expresión de este patrón de coloración desde sus primeras manifestaciones en la evolución. Sólo los machos de mayor calidad serían capaces de afrontar los costes de producir bandas más blancas y de mayor tamaño resistentes al ataque bacteriano sin mostrar degradación de bandas blancas visibles como muescas y que tendrían importantes consecuencias aerodinámicas.

La exhibición de resistencia a la degradación en plumas de vuelo mediante bandas blancas de distinta amplitud podría haber experimentado selección sexual y social en muchas especies, como ocurre en machos y en menor medida en hembras de nuestra población de papamoscas cerrojillo (capítulo 6). Una evidencia de los costes posibles de las bandas blancas en plumas remeras es que dichas bandas se encuentran normalmente en la base y no en el extremo de las plumas, como es también el caso en el papamoscas cerrojillo (capítulos 6 y 7), dado que los extremos de las plumas de vuelo están más expuestas a la abrasión durante el vuelo (Burt 1986). La selección sexual no habría sido capaz de favorecer puntas blancas en las plumas de vuelo debido a la presión contraria de la selección natural. Aunque mostrar bandas blancas en los extremos de las plumas sería la evidencia máxima de la calidad del plumaje, ya que denotaría la capacidad de resistir simultáneamente a la abrasión y a las bacterias, los costes de mostrar bandas blancas en el extremo de las plumas alares son demasiado elevados. La interacción entre la selección natural y sexual habría así determinado la expresión óptima de la señal (Olsen et al. 2010).

La gran diversidad de patrones de coloración de plumajes que observamos hoy en la naturaleza podría ser en parte el resultado de millones de años de coevolución con las bacterias. Las FDB podrían haber jugado un rol en la selección sexual desde el origen de la primera pluma. Además, con el origen del vuelo, las bacterias habrían operado en la selección de plumas de mayor calidad estructural capaces de resistir la degradación.



Conclusiones

- 1 Las bacterias heterótrofas cultivables colonizan la superficie de las puestas de papamoscas cerrojillo de nuestra población en condiciones silvestres y su carga sobre éstas se asocia positivamente con las temperaturas ambientales y con la carga bacteriana de la cloaca materna.
- 2 En términos de morfología celular microscópica, los bacilos gram-negativos, y en términos de taxones bacterianos, la Familia *Pseudomonadaceae* y la especie *Pseudomonas luteola* fueron las más prevalentes sobre la puesta y cloacas maternas de papamoscas cerrojillo de nuestra población.
- 3 La prevalencia de *Salmonella* y *Yersinia* en puestas y cloacas maternas de papamoscas cerrojillo de nuestra población es baja y nula respectivamente.
- 4 La carga de bacterias heterótrofas viables cultivables y la prevalencia de *Pseudomonadaceae* y *Pseudomonas luteola* sobre la puesta no se asocia al éxito de eclosión en papamoscas cerrojillo de nuestra población.
- 5 Las hembras de papamoscas cerrojillo de nuestra población inician la actividad de incubación durante el periodo de puesta, mayoritariamente en el día de puesta del cuarto huevo. La actividad de incubación durante el periodo de puesta es principalmente diurna siendo rara la nocturna. La intensidad de incubación en el día de puesta del cuarto huevo se asocia negativamente con la carga de bacterias heterótrofas sobre la puesta.
- 6 La intensidad de incubación de las hembras de papamoscas cerrojillo de nuestra población durante el periodo crítico para el inicio de la incubación durante el periodo de puesta se asocia negativamente con la humedad relativa en torno a la puesta. La intensidad de incubación y la humedad relativa se asocian negativamente y positivamente con la carga bacteriana sobre la puesta respectivamente. La significación de estas asociaciones depende del tipo de bacteriano: heterótrofas generales, entéricas Gram-negativas y pseudomonas.
- 7 La degradabilidad bacteriana de la banda blanca de las plumas alares primarias del papamoscas cerrojillo en nuestra población es mayor que la parte melanizada contigua dentro de la misma pluma. Además, la banda blanca es más degradable en machos que en hembras mientras que no existen diferencias entre sexos en la degradabilidad de la porción melanizada.
- 8 La degradabilidad de la banda blanca de las plumas alares primarias se asocia positivamente con la fecha de cría en machos y hembras de papamoscas cerrojillo de nuestra población, y con el número de pollos aunque sólo en machos. La degradabilidad de la porción melanizada de la pluma primaria no se asocia significativamente ni con la fecha de cría ni con el número de pollos.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersson M. 1994. *Sexual Selection*. Princeton University Press, Princeton.
- Ar, A. and Sidis, Y. 2002. Nest microclimate during incubation, p. 143-160. In: D.C. Deeming (ed.), *Avian incubation behaviour, environment and evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Arnold, T.W., Rohwer, F.C. and Armstrong, T. 1987. Egg viability, nest predation, and the adaptive significance of clutch size in prairie ducks. *American Naturalist* 130: 643-653.
- Baggott, G.K. and Graeme-Cook, K. 2002. Microbiology of natural incubation, p. 179-189. In: D.C. Deeming (ed.), *Avian incubation behaviour, environment and evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. and Leibler, S. 2004. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305:1622–1625.
- Barrow, P.A. 1994. The microflora of the alimentary tract and avian pathogens: translocation and vertical transmission, p. 117-136. In: R.G. Board and R. Fuller (eds.), *Microbiology of avian eggs*. Chapman & Hall, London, UK.
- Barrowclough, G.F. and Sibley, F.C. 1980. Feather colour and abrasion: Test of a hypothesis. *Auk* 97: 881-883.
- Benskin, C.McW.H., Wilson, K., Jones, K. and Hartley, I.R.. 2009. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biological Reviews* 84: 349–373.
- Berg, R.D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology* 4: 430–435.
- Blanco, G., Lemus, J.A. and Grande, J. 2006. Faecal bacteria associated with different diets of wintering red kites: influence of livestock carcass dumps in microflora alteration and pathogen acquisition. *Journal of Applied Ecology* 43: 990-998.
- Board, R.G., Loseby, S. and Miles, V.R. 1979. Microbial growth on hen eggshells. *British Poultry Science* 20: 413-420.
- Board, R.G. and Tranter, H.S. 1986. The microbiology of eggs, p. 75–96. In: W.J. Stadelman and O. J. Cotterill (eds.), *Egg science and technology*, 3rd ed. AVI Publishing, Westport, CT.
- Board, R.G., Clay, C., Lock, J. and Dolman, J. 1994. The egg: a compartmentalized, aseptically packaged food, p. 43–62. In: R.G. Board and R. Fuller (eds.), *Microbiology of the avian egg*. Chapman & Hall, London.
- Board, R.G. and Fuller, R. 1994. *Microbiology of the avian egg*. Chapman Hall London UK.
- Bonser, H. 1995. Melanin and the abrasion resistance of feathers. *Condor* 97: 590-591.
- Brawner, W.R., Hill, G.E. and Sundermann, C.A. 2000. Effects of coccidial and mycoplasmal infections on carotenoid-based plumage colour in male house finches. *Auk* 117: 952–963.
- Brooke, M. de L. 1998. Ecological factors influencing the occurrence of 'flash marks' in wading birds. *Functional Ecology* 12: 339–346.
- Bruce, J. and Drysdale, E.M.. 1994. Trans-shell transmission, p. 63–91. In: R. G. Board and R. Fuller (eds.), *Microbiology of the avian egg*. Chapman & Hall, London.
- Brush, A.H. 1996. On the origin of feathers. *Journal of Evolutionary Biology* 9: 131-142.
- Burkhardt-Holm, P., Escher, M. and Meier, W. 1997. Waste-water management plant effluents cause cellular alterations in the skin of the brown trout . *Journal of Fish Biology* 50: 744-758.
- Burt, E.H Jr. 1986. An analysis of physical, physiological, and optical aspects of avian coloration with emphasis on wood warblers. *Ornithological Monographs* 38: 1-122.
- Burt, E.H. Jr and Ichida, J.M. 1999. Occurrence of feather degrading bacilli in the plumage of birds. *Auk* 116: 364–372.
- Burt, E.H. Jr. 2009. A future with feather-degrading bacteria. *Journal of Avian Biology* 40: 349–351.
- Burt, E.H. Jr, Schroeder, M.R., Smith, L.A., Sroka, J.E. and McGraw, K.J. 2010. Colourful parrot feathers resist bacterial degradation. *Biology Letters* 7: 214-216.
- Chan, D.W.T., Leung, P.H.M., Tam, C.S.Y. and Jones, A.P. 2008. Survey of airborne bacterial genus at a university campus. *Indoor and Built Environments* 17: 460–466.
- Clark, L. and Mason, J.R. 1985. Use of nest material as insecticidal and anti-pathogenic agents by the european starling. *Oecologia* 67: 169–176.
- Clay, C.E. and Board, R.G. 1991. Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated hens' shell eggs. *Epidemiology and Infection* 106: 271–281.
- Cook, M.I., Beissinger, S.R., Toranzos, G.A., Rodriguez, R.A. and Arendt, W.J. 2003. Trans-shell infection by pathogenic micro-organisms reduces the shelf life of non-incubated bird's eggs: a constraint on the onset of incubation? *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: 2233–2240.
- Cook, M.I., Beissinger, S.R., Toranzos, G.A., Rodriguez, R.A. and Arendt, W.J. 2005a. Microbial infection affects egg viability and incubation behavior in a tropical passerine. *Behavioral Ecology* 16: 30–36.
- Cook, M.I., Beissinger, S.R., Toranzos, G.A. and Arendt, W.J. 2005b. Incubation reduces microbial growth on eggshells and the opportunity for trans-shell infection. *Ecology Letters* 8: 532–537.
- Cornelius, L.W. 1969. Field notes on *Salmonella* infection in green finches and house sparrows. *Bulletin of Wildlife and Disease Association* 5: 142–143.
- Cramp, S. 1994. *The birds of Western Palearctic*. Oxford University Press.
- Curio, E. 1960. Die systematische stellung des spanischen trauerschnäppers. *Vogelwelt* 81: 113-121.
- D'Alba, L., Oborn, A., Shawkey, M.D. 2010. Experimental evidence that keeping eggs dry is a mechanisms for antimicrobial effects of incubation. *Naturwissenschaften* 97: 1089–1095.
- Dale, S. and Slagsvold, T. 1996. Plumage coloration and conspicuousness in birds: Experiments with the pied flycatchers. *Auk* 113: 849-857.
- Dale, S., Slagsvold, T., Lampe, H.M. and Saetre, G.P. 1999. Population divergence in sexual ornaments: The white forehead patch of Norwegian pied flycatchers is small and unsexy. *Evolution* 53: 1235-1246.
- Deeming, D.C. 2002. Importance and evolution of incubation in avian reproduction, p. 1-6. In: D.C. Deeming (eds.), *Avian incubation behaviour, environment and evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Dockstater, W.B. 1952. Aerobic microorganisms found to be predominant in spoiled eggs. Ph.D Dissertation, Washington State University, Pullman, WA.
- Fitzpatrick, S. 1998. Intraspecific variation in wing length and male plumage coloration with migratory behaviour in continental and island populations. *Journal of Avian Biology* 29: 248-256.
- Florian, M.L.E. and Trussell, P.C. 1957. Bacterial spoilage of shell eggs. Identification of spoilage organisms. *Food Technology* 11: 56–60.

- Galván, I. 2008. The importance of black on white: unmelanized plumage proportions predicts display complexity in birds. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63: 303-311.
- Galván, I. and Moreno, J. 2009. Variation in effects of male plumage ornaments: the case of Iberian pied flycatchers. *Ibis* 151: 541-546.
- Garamszegi, L.Z., Rosivall, B., Hegyi, G., Szollosi, E., Torok, J. and Eens M. 2006. Determinants of male territorial behaviour in Hungarian collared flycatcher population: plumage traits of residents and challengers. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60: 663-671.
- Goldstein, G., Flory, K.R., Browne, B.A., Majid, S., Ichida, J.M. and Burt, E.H. Jr. 2004. Bacterial degradation of black and white feathers. *Auk* 121: 656-659.
- Goodenough, A.E. and Stallwood, B. 2010. Intraspecific variation and interspecific differences in the bacterial and fungal assemblages of blue tit (*Cyanistes caeruleus*) and great tit (*Parus major*) nests. *Microbial Ecology* 59: 221-232.
- Grande, J.M., Negro, J.J. and Torres, M.J. 2004. The evolution of bird plumage colouration: a role for feather-degrading bacteria? *Ardeola* 51: 375-383.
- Griggio, M., Hoi, H. and Pilastro, A. 2010. Plumage maintenance affects ultraviolet colour and female preference in the budgerigar. *Behavioural Processes* 84: 739-744.
- Guida, M., Galle, F., Mattei, M.L., Anastasi, D. and Liguori, G. 2009. Microbiological quality of the water of recreational and rehabilitation pools: A 2 year survey in Naples, Italy. *Public Health* 123:448-451.
- Gunderson, A.R. 2008. Feather-degrading bacteria: a new frontier in avian host-parasite research? *Auk* 125: 972-979.
- Gunderson, A.R., Frame, A.H., Forsythe, M.H. and Swaddle, J.P. 2008. Resistance of melanized feathers to bacterial degradation: is it really so black and white? *Journal of Avian Biology* 39: 539-545.
- Gunderson, A.R., Forsythe, M.H. and Swaddle, J.P. 2009. Evidence that plumage bacteria influence feather coloration and body condition in a passerine. *Journal of Avian Biology* 40: 440-447.
- Gupta, R. and Ramnani, P. 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbial Biotechnology* 70: 21-33.
- Haeckel, E. 1869. *Über entwicklungsgang und ausgabe der zoologie*. *Jenaische Zeitschrift* 5: 353-370.
- Hamilton, W.D. and Zuk, M. 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* 218: 384-387.
- Hanson, T. 2011. *Feathers: the evolution of a natural miracle*. Basic Books, Perseus Book Group. New York, USA.
- Hanssen, S.A., Bustnes, J.O., Tveraa, T., Hasselquist, D., Varpe, O. and Henden, J.A. 2009. Individual quality and reproductive effort mirrored in white wing plumage in both sexes of south polar skuas. *Behavioral Ecology* 20: 961-966.
- Havelaar, A.H., Brauning, J., Christiansen, K., Cornu, M., Haid, T., Mangen, M.J.J., Molbak, M., Pielaat, A., Snary, E., Van Pelt, W., Velthuis, A. and Wahlstrom, H. 2007. Towards an integrated approach in supporting microbiological food safety decisions. *Zoonoses Public Health* 54: 103-107.
- Hegyi, G., Rosivall, B., Szöllösi, E., Hargitai, R., Eens, M. and Török, J. 2007. A role for female ornamentation in the facultatively polygynous mating system of collared flycatchers. *Behavioral Ecology* 18: 1116-1122.
- Hegyi, G., Garamszegi, L.Z. and Eens, M. 2008a. The roles of ecological factors and sexual selection in the evolution of white wing patches in ducks. *Behavioral Ecology* 19: 1208-1216.
- Hegyi, G., Garamszegi, L.Z., Eens, M. and Török, J. 2008b. Female ornamentation and territorial conflicts in collared flycatchers (*Ficedula albicollis*). *Naturwissenschaften* 95: 993-996.
- Hill, G.E., Farmer, K.L. and Beck, M.L. 2004. The effect of mycoplasmosis on carotenoid plumage coloration in male house finches. *Journal of Experimental Biology* 207: 2095-2099.
- Horner-Devine, M.C., Carney, K.M. and Bohannon, B.J.M. 2004. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271: 113-122.
- Houston, C.S., Saunders, J.R. and Crawford, R.D. 1997. Aerobic bacterial flora of addled raptor eggs in Saskatchewan. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 328-331.
- Humphrey, T.J. 1994. Contamination of eggs with potential human pathogens, p.117-136. In: G. Board and R. Fuller (eds.), *Microbiology of avian eggs*. Chapman & Hall, London, UK.
- Hupton, G., Portocarrero, S., Newman, M. and Westneat D.F. 2003. Bacteria in the reproductive tracts of red-winged blackbirds. *Condor* 105: 453-464.
- Izco, J. 1984. *Madrid Verde*. Instituto de Estudios Agrarios, Pesqueros y Alimentarios. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Comunidad de Madrid.
- Jacob, J., Balthazart, J. and Schoffeniels, E. 1979. Sex differences in the chemical composition of uropygial gland waxes in domestic ducks. *Biochemical systematics and ecology* 7: 149-153.
- Jawor, J.M. and Breitwisch, R. 2003. Melanin ornaments, honesty and sexual selection. *Auk* 120: 249-265.
- Jones, I.L. 1990. Plumage variability functions for status signalling in least auklets. *Animal Behaviour* 39: 967-975.
- Klomp, J.E., Murphy, M.T., Smith, S.B., McKay, J.E., Ferrera, I and Reysenback, A.L. 2008. Cloacal microbial communities of females spotted towhees *Pipilo maculatus*: microgeographic variations and individual sources of variability. *Journal of Avian Biology* 39: 530-538.
- Kobayashi, M., Gutiérrez, M.A. and Hatta, H. 1997. Microbiology of eggs, p.179-193. In: T. Yamamoto, T.J. Juneja, H. Hatta and M. Kim (eds.) *Hen eggs: their basic and applied science*. CRC Press.
- Kobayashi, H., Kanazaki, M., Shimizu, Y., Nakajima, H., Khatun, M., Hata, E. and Kubo, M. 2007. Salmonella isolates from cloacal swabs and footpads of wild birds in the immediate environment of Tokyo Bay. *Journal of Veterinary Medical Science* 69: 309-311.
- Kokko, H. 1999. Competition for early arrival in migratory birds. *Journal of Animal Ecology* 68: 940-950.
- Kose, M. and Møller, A.P. 1999. Sexual selection, feather breakage and parasites: The importance of white spots in the tail of the barn swallow (*Hirundo rustica*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 45: 430-436.
- Kozłowski, S., Malysko, E., Pinowski, J. and Kruszewicz, A. 1989. The effect of microorganisms on the mortality of house sparrow (*Passer domesticus*) and tree sparrow (*Passer montanus*) embryos, p. 121-128. In: J. Pinowski, B.P. Kavanagh and W. Gorski (eds.) *Proceedings of the International Symposium Working Group on Granivorous Birds*. Intecol, Słupsk, Poland.
- Lack, D. 1954. *The natural regulation of animal numbers*. Oxford University Press, London.
- Lande, R. 1980. Sexual dimorphism, sexual selection, and adaptation in polygenic characters. *Evolution* 34: 292-305.
- Lambrechts, M.M., Adriaensen, F., Ardia, D.R., Artemyev, A.V., Atiénzar, F., Ba•bura, J., Barba, E., Bouvier, J.C., Camprodon, J., Cooper, C.B., Dawson, R.D., Eens, M., Eeva, T., Faivre, B., Garamszegi, L.Z., Goodenough, A.E., Gosler, A.G., Grégoire, A., Griffith, S.C., Gustafsson, L., Johnson, L.S., Kania, W., Kei•s, O., Llambias, P.E., Mainwaring, M.C., Mänd, R., Massa, B., Mazgajski, T.D., Møller, A.P., Moreno, J., Naef-Daenzer, B., Nilsson, J-A., Norte, A., Orell, M., Otter, K.A., Park, C.R., Perrins, C.M., Pinowski, P., Porkert, J., Potti, J., Remes, V., Richner, H., Rytönen, S., Shiao, M-T., Silverin, B., Slagsvold, T., Smith, H.G., Sorace, A., Stenning, M.J., Stewart, I., Thompson, C.F., Tryjanowski, P., Török, J., van Noordwijk, A.R., Winkler, D.W. and Ziane, N. 2010. The design

- of artificial nestboxes for the study of secondary hole-nesting birds: A review of methodological inconsistencies and potential biases. *Acta Ornithologica* 45: 1-26.
- Liu, Y. and Simon, J.D. 2003. Isolation and biophysical studies of natural eumelanins: Applications of imaging technologies and ultrafast spectroscopy. *Pigment Cell Research* 16: 606-618.
- Liu, Y., Hong, L., Wakamatsu, K., Ito, S., Adhyaru, B., Cheng, C-Y., Bowers, C.R. and Simon, J.D. 2005. Comparison of structural and chemical properties of black and red human hair melanosomes. *Photochemistry and Photobiology* 81: 135-144.
- Lobato, E., Moreno, J., Merino, S., Morales, J., Tomás, G., Martínez, J., Vásquez, R. A., Kuchar, A., Möstl, E. and Osorno, J.L. 2010. Arrival date and territorial behavior are associated with corticosterone metabolite levels in a migratory bird. *Journal of Ornithology* 151: 587-597.
- Lombardo, M.P., Thorpe, P.A., Cichewicz, R., Henshaw, M., Millard, C., Steen, C. and Zeller, T.K. 1996. Communities of cloacal bacteria in tree swallow families. *Condor* 98: 167-172.
- Lombardo, M.P., Thorpe, P.A. and Power, H.W. 1999. The beneficial sexually transmitted microbe hypothesis of avian copulation. *Behavioral Ecology* 10: 333-337.
- Lucas, F.S. and Heeb, P. 2005. Environmental factors shape cloacal bacterial assemblages in great tit *Parus major* and blue tit *Parus caeruleus* nestlings. *Journal of Avian Biology* 36: 510-516.
- Lucas, F.S., Moureau, B., Jourdie, V. and Heeb, P. 2005. Brood size modifications affect plumage bacterial assemblages of European starlings. *Molecular Ecology* 14: 639-646.
- Lundberg, A. and Alatalo, R. 1992. *The Pied Flycatcher*. Poyser, London.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D. and Clark, D.P. 2011. *Brock Biology of Microorganisms*. 13th edition Pearson Education. San Francisco, USA.
- Magrath, R.D. 1990. Hatching asynchrony in altricial birds. *Biological Reviews* 65: 587-622.
- Maier, R.M., Pepper, I.L. and Gerba, C.P. 2000. *Environmental Microbiology*, 2nd edition Academic Press, San Diego, CA.
- Martín-Vivaldi, M., Soler, J.J., Peralta-Sánchez, J.M., Mendez, M., Valdivia, E., Martín-Platero, A.M. and Martínez-Bueno, M. 2009. Seasonal, sexual and developmental differences in hoopoe *Upupa epops* preen gland morphology and secretions: evidence for a role of bacteria. *Journal of Avian Biology* 40: 42-48.
- Martín-Vivaldi, M., Pena, A., Peralta-Sánchez, J.M., Sánchez, L., Ananou, S., Ruiz-Rodríguez, M. and Soler, J.J. 2010. Antimicrobial chemicals in hoopoe preen secretions are produced by symbiotic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B* 277: 123-130.
- Massaro, M., Setiawan, A.N. and Davis, L.S. 2007. Effects of artificial eggs on prolactin secretion, steroid levels, brood patch development, incubation onset and clutch size in the yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*). *General and Comparative Endocrinology* 151: 220-229.
- McCabe, W.R. 1964. Studies of staphylococcal infections. I. Virulence of staphylococci and characteristics of infections in embryonated eggs. *Journal of Clinical Investigations* 43: 2146-2157.
- McGlothlin, J.W., Duffy, D.L., Henry-Freeman, J.L. and Ketterson, E.D. 2007. Diet quality affects an attractive white plumage pattern in dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*) *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61: 1391-1399.
- McGraw, K.J., Safran, R.J. and Wakamatsu, K. 2005. How feather colour reflects its melanin content. *Functional Ecology* 19: 816-821.
- McGraw, K.J. 2006. Mechanics of melanin-based coloration, p. 243-294. In: G.E. Hill and K.J. McGraw (eds.), *Bird coloration*, vol 1. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- McGraw, K.J. 2008. An update on the honesty of melanin-based color signals in birds. *Pigment Cell Melanoma Research* 21: 133-138.
- Mennerat, A., Mirleau, P., Blondel, J., Perret, P., Lambrechts, M.M. and Heeb, P. 2009. Aromatic plants in nests of the blue tit *Cyanistes caeruleus* protect chicks from bacteria. *Oecologia* 161: 849-855.
- Menon, C.K. and Menon, J. 2000. Avian epidermal lipids: functional considerations and relationship to feathering. *American Zoologist* 40: 540-552.
- Merilä, J. and Hemborg, C. 2000. Fitness and feather wear in the collared flycatcher *Ficedula albicollis*. *Journal of Avian Biology* 31: 504-510.
- Mlot, C. 2004. Microbial diversity unbound. *BioScience* 54: 1064-1068.
- Møller, A.P. 1994. *Sexual Selection and the barn swallow*. Oxford University Press.
- Møller, A.P. 1997. Parasitism and evolution of host life-history, p. 105-127. In: D.H. Clayton and J. Moore (eds.), *Host parasite evolution: General principles in avian models*. Oxford University Press, Oxford.
- Møller, A.P., De Lope, F. and Saino, N. 2004. Parasitism, immunity, and arrival date in a migratory bird, the barn swallow. *Ecology* 85: 206-219.
- Møller, A.P., Erritzoe, J. and Nielsen, J.T. 2010. Predators and microorganisms of prey: Goshawks prefer prey with small uropygial gland. *Functional Ecology* 24: 608-613.
- Møller, A.P., Fiedler, W. and Berthold, P. 2011. *Effects of climate change on birds*. Oxford University Press.
- Morales, J., Moreno, J., Merino, S., Sanz J.J., Tomás, G., Arriero, E., Lobato, E. and Martínez-de la Puente, J. 2007. Female ornaments in the pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*: associations with age, health and reproductive success. *Ibis* 149: 245-254.
- Moreno, J., Cowie, R.J., Sanz, J.J. and Williams, R.S.R. 1995. Differential response by males and females to brood manipulation in the pied flycatcher: Energy expenditure and nestling diet. *Journal of Animal Ecology* 64: 721-732.
- Moreno, J. and Møller, A.P. 2006. Are melanin ornaments signals of antioxidant and immune capacity in birds? *Acta Zoologica Sinica* 52: 202-208.
- Moreno, J. 2008. *Los restos actuales del Darwinismo: ¿Una teoría en crisis?* Editorial Síntesis, Madrid, España.
- Moreno, J., Merino, S., Lobato, E., Ruiz-de-Castañeda, R., Martínez de la Puente, J., del Cerro, S. and Rivero-de Aguilar, J. 2009. Nest-dwelling ectoparasites of two sympatric hole-nesting passerines in relation to nest composition: An experimental study. *Écoscience* 16: 418-427.
- Moreno, J., Velando, A., Ruiz-de-Castañeda, R., Cantarero, A., González-Braojos, S., Redondo, A. 2011. Plasma antioxidant capacity and oxidative damage in relation to male plumage ornamental traits in a montane Iberian pied flycatcher *Ficedula hypoleuca* population. *Acta Ornithologica* 46: 65-70.
- Moreno-Rueda, G. 2005. Is the white wing-stripe of male house sparrows *Passer domesticus* an indicator of the load of mallophaga? *Ardea* 93: 109-114.
- Moreno-Rueda, G. 2011. House sparrows *Passer domesticus* with larger uropygial glands show reduced feather wear. *Ibis* 153: 195-198.
- Morishita, T.Y., Aye, P.P., Ley, E.C. and Harr, B.S. 1999. Survey of pathogens and blood parasites in free-living passerines. *Avian Diseases* 43: 549-552.
- Moya, A. y Peretó, J. 2011. *Simbiosis. Seres que evolucionan juntos*. Editorial Síntesis, Madrid, España.
- Nilsson, J. 1994. Energetic bottle-necks during breeding and the reproductive cost of being to early. *Journal of Animal Ecology* 63: 200-208.
- Nolan, P.M., Hill, G.E. and Stoehr, A.M. 1998. Sex, size, and plumage redness predict house finch survival in an epidemic. *Proceedings of the Royal Society of London B* 265: 961-965.

- Northcutt, J.K., Jones, D.R., Ingram, K.D., Hinton, A.Jr. and Musgrove, M.T. 2004. Airborne microorganisms in commercial shell egg processing facilities international. *Journal of Poultry Science* 3: 195-200.
- Olsen, B.J., Greenberg, R., Liu, I.A., Felch, J.M. and Walters, J.R. 2010. Interactions between sexual and natural selection on the evolution of a plumage badge. *Evolutionary Ecology* 24: 731-748.
- Ortiz-Catedral, L., Ismar, S.M.H., Baird, K., Ewen, J.G., Hauber, M.E. and Brunton, D.H. 2009. No evidence of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Yersinia* in free-living populations of the red-crowned parakeet (*Cyanoramphus novaezelandiae*). *New Zealand Journal of Zoology* 36: 379–383.
- Osorno, J.L., Morales, J., Moreno, J., Merino, S., Tomás, G. and Vásquez, R. 2006. Evidence for differential allocation to eggs in relation to manipulated male attractiveness in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Journal of Ornithology* 147: 605-611.
- Pap, P.L., Tökölyi, J. and Szep, T. 2005. Frequency and consequences of feather holes in barn swallows *Hirundo rustica*. *Ibis* 147: 169-175.
- Paul, G.S. 2002. *Dinosaurs of the air: The evolution and loss of flight in dinosaurs and birds*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Pennycott, T.W. 1998. Population density and infectious disease at bird tables. *Veterinary Record* 142: 523.
- Peralta-Sánchez, J.M., Møller, A.P., Martín-Platero, A.M. and Soler, J.J. 2010. Number and colour composition of nest lining feathers predict eggshell bacterial community in barn swallow nests: An experimental study. *Functional Ecology* 24: 426–433.
- Peralta-Sánchez, J.M., Møller, A.P. and Soler, J.J. 2011. Colour composition of nest lining feathers affects hatching success of barn swallows, *Hirundo rustica* (Passeriformes: Hirundinidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 102: 67-74.
- Pinowski, J., Barkowska, M., Kruszewicz, A.H. and Kruszewicz, A.G. 1994. The causes of the mortality of eggs and nestlings of *Passer* spp. *Journal of Biosciences* 19: 441–451.
- Plant, C.W. 1978. Salmonellosis in wild birds feeding at sewage treatment works. *Journal of Hygiene* 81: 43–48.
- Playfair, J. and Bancroft, G. 2004. *Infection and immunity*, 2nd edition. Oxford University Press, Oxford.
- Potti, J. and Montalvo, S. 1991. Male arrival and female mate choice in pied flycatcher *Ficedula hypoleuca* in central Spain. *Ornis Scandinavica* 22: 45-54.
- Prevost, K., Magal, P. and Beaumont, C. 2006. A model of *Salmonella* infection within industrial house hens. *Journal of Theoretical Biology* 242: 755–763.
- Price, T. and Pavelka, M. 1996. Evolution of a colour pattern: history, development, and selection. *Journal of Evolutionary Biology* 9: 451–470.
- Prinzinger, R., Pressmar, A. and Schleucher, E. 1991. Body temperature in birds. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 99: 499–506.
- Quanguo Li, Q-G., Gao, K-Q., Vinther, J., Shawkey, M.D., Clarke, J.A., D'Alba, L., Meng, Q., Briggs, D.E.G. and Prum, R.O. 2010. Plumage color patterns of an extinct non-avian dinosaur. *Science* 327: 1369-1372.
- Reneerkens, J., Versteegh, M.A., Schneider, A.M., Piersma, T. and Burt, E.H. 2008. Seasonally changing preen-wax composition: Red knots' (*Calidris canutus*) flexible defense against feather-degrading bacteria? *Auk* 125: 285-290.
- Rossello-Mora, R. and Amann, R.I. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 39-67.
- Ruiz-de-Castañeda, R., Morales, J., Moreno, J., Lobato, E., Merino, S., Martínez-de la Puente and Tomás, G. 2009. Costs and benefits of early reproduction: *Haemoproteus* prevalence and reproductive success of infected male pied flycatchers in a montane habitat in Central Spain. *Ardeola* 56: 271-280.
- Ruiz-Rodríguez, M., Lucas, F.S., Heeb, P. and Soler, J.J. 2009a. Differences in intestinal microbiota between avian brood parasites and their hosts. *Biological Journal of the Linnean Society* 96: 406-414.
- Ruiz-Rodríguez, M., Valdivia, E., Soler, J.J., Martín-Vivaldi, M., Martín-Platero, A.M. and Martínez Bueno, M. 2009b. Symbiotic bacteria living in the hoopoe's uropygial gland prevent feather degradation. *Journal of Experimental Biology* 212: 3621-3626.
- Saag, P., Tilgar, V., Maend, R., Kilgas, P. and Maegi, M. 2011. Plumage bacterial assemblages in a breeding wild passerine: relationships with ecological factors and body condition. *Microbial Ecology* 61: 740-749.
- Saino, N., Dallara, P., Martinelli, R. and Møller A.P. 2002. Early maternal effects and antibacterial immune factors in the eggs, nestlings and adults of the barn swallow. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 735-743.
- Sanz, J.J. and Moreno, M. 1995. Experimentally-induced clutch size enlargements affect reproductive success in the pied-flycatcher. *Oecologia* 103: 358-364.
- Sanz, J.J. 1997. Geographic variation in breeding parameters of the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Ibis* 139: 107–114.
- Sanz, J.J. and Moreno, J. 2000. Delayed senescence in a southern population of the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Ecoscience* 7: 25-31.
- Sanz, J.J. 2001. Latitudinal variation in female local return rate in the philopatric pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Auk* 118: 539-543.
- Sawyer, R.H., Rogers, L., Washington, L., Glenn, T.C. and Knapp, L.W. 2005. Evolutionary origin of the feather epidermis. *Developmental Dynamics* 232: 256-267.
- Schaechter, M., Ingraham, J.L. and Neidhardt, F.D. 2006. *Microbe*. ASM Press Washington, D.C.
- Scott, G. 2010. *Essential Ornithology*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Shawkey, M.D., Pillai, S.R. and Hill, G.E. 2003. Chemical warfare? Effects of uropygial oil on feather-degrading bacteria. *Journal of Avian Biology* 34: 345–349.
- Shawkey, M.D., Pillai, S.R., Hill, G.E., Siefferman, L.M. and Roberts, S.R. 2007. Bacteria as an agent for change in structural plumage color: Correlational and experimental evidence. *American Naturalist* 169: S112–S117.
- Shawkey, M.D., Firestone, M.K., Brodie, E.L. and Beissinger, S.R. 2009a. Avian incubation inhibits growth and diversification of bacterial assemblages on eggs. *PLoS One* 4: e4522
- Shawkey, M.D., Pillai, S.R. and Hill, G.E. 2009b. Do feather-degrading bacteria affect sexually selected plumage color? *Naturwissenschaften* 96: 123-128.
- Sheldon, B.C. and Ellegren, H. 1999. Sexual selection resulting from extrapair paternity in collared pied flycatchers. *Animal Behaviour* 57: 285-298.
- Singleton, D.R. and Harper, R.G. 1998. Bacteria in old house wren nest. *Journal of Field Ornithology* 69: 71–74.
- Sirkiä, P.M. and Laaksonen, T. 2009. Distinguishing between male and territory quality: females choose multiple traits in the pied flycatcher. *Animal Behaviour* 78: 1051-1060.
- Sirkiä, P.M., Virolainen, M. and Laaksonen, T. 2010. Melanin colouration has temperature-dependent effects on breeding performance that may maintain phenotypic variation in a passerine bird. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 2385-2396.
- Soler, J.J., Martín-Vivaldi, M., Ruiz-Rodríguez, M., Valdivia, E., Martín-Platero, A.M., Martínez-Bueno, M., Peralta-Sánchez, J.M. and Méndez, M. 2008. Symbiotic association between hoopoes and

- antibiotic-producing bacteria that live in their uropygial gland. *Functional Ecology* 22: 864–871.
- Soler, J.J., Martín-Vivaldi, M., Peralta-Sánchez, J.M. and Ruiz-Rodríguez, M. 2010. Antibiotic-producing bacteria as a possible defence of birds against pathogenic microorganisms. *Open Ornithology Journal* 3: 93–100.
- Soler, J.J., Peralta-Sánchez, J.M., Flensted-Jensen, E., Martín-Platero, A.M., Møller, A.P. 2011. Innate humoral immunity is related to eggshell bacterial load of European birds: a comparative analysis. *Naturwissenschaften* 98: 807-813.
- Sparks, N.H.C. 1994. Shell accessory materials: structure and function, p. 25-42. In: Board R.G. and Fuller R (eds), *Microbiology of the avian egg*. Chapman & Hall, London.
- Spiers, A.J., Buckling, A. and Rainey, P.B. 2000. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* 146: 2345–2350.
- Stanier, R.Y., Palleron, N.J. and Doudorof, M. 1966. The aerobic *Pseudomonads*: a taxonomic study. *Journal of Genetical Microbiology* 43: 159–271.
- Stearns, S. 1992. *The evolution of life-histories*. Oxford University Press, Oxford.
- Stenning, M.J. 1996. Hatching asynchrony, brood reduction and other rapidly reproducing hypotheses. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 243-246.
- Steward, R. and Rambo, T.B. 2000. Cloacal microbes in house sparrows. *Condor* 102: 679–684.
- Stodola, K.W., Linder, T.L., Buehler, D.A., Franzreb, K.E., Kim, D.H. and Cooper, R. J. 2010. Relative influence of male and female care in determining nestling mass in a migratory songbird. *Journal of Avian Biology* 41: 515-522.
- Stoleson, S.H. and Beissinger, S.R. 1995. Hatching asynchrony and the onset of incubation in birds, revisited: when is the critical period?, p. 191-254. In: D.N. Power (ed.), *Current Ornithology*, vol 12. New York, Plenum Press.
- Svensson, L. 1984. *Identification guide to European passerines*. Uggå.
- Svensson, E. 1997. Natural selection on avian breeding time: causality, fecundity-dependent, and fecundity-independent selection. *Evolution* 51: 1276-1283.
- Swaddle, J.P., Witter, M.S., Cuthill, I.C., Budden, A. and McCowen, P. 1996. Plumage condition affects flight performance in common starlings: Implication for developmental homeostasis, abrasion and moult. *Journal of Avian Biology* 27: 103-111.
- Theron, H., Venter, P. and Lues, F.R. 2003. Bacterial growth on chicken eggs in various storage environments. *Food Research International* 36: 969–075.
- Tomás, G., Merino, S., Moreno, J. and Morales, J. 2007. Consequences of nest reuse for parasite burden and female health and condition in blue tits, *Cyanistes caeruleus*. *Animal Behavior* 73:805–814.
- Török, J., Hegyi, G. and Garamszegi, L.Z. 2003. Depigmented wing patch size is condition dependent indicator of viability in male collared flycatchers. *Behavioral Ecology* 14: 382-388.
- Vágási, C.I., Pap, P.L., Tökölyi, J., Székely, E. and Barta, Z. 2011. Correlates of variation in flight feather quality in great tit *Parus major*. *Ardea* 99: 53-60.
- Van der Jeugd, H.P. and McCleery, R. 2002. Effects of spatial autocorrelation, natal philopatry and phenotypic plasticity on the heritability of laying date. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 380-387.
- Vas, Z., Csörgő, T., Møller, A.P. and Rózsa, L. 2008. The feather holes on the barn swallow *Hirundo rustica* and other small passerines are probably caused by *Brueelia* spp. lice. *Journal of Parasitology* 94: 1438–1440.
- Vidal, J.F., Heras, F. y Donés, J. 2004. *Los Montes y el Valle de Valsaín*. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.
- Vinther, J., Briggs, D.E.G., Prum, R.O. and Saranathan, V. 2008. The colour of fossil feathers. *Biology Letters* 4: 522-525.
- Vinther, J., Briggs, D.E.G., Clarke, J., Mayr, G. and Prum, R.O. 2010. Structural coloration in a fossil feather. *Biology Letters* 6: 128-131.
- Voitkevich AA. 1966. *The feathers and plumage of birds*. October House, New York.
- Wand, J.M. and Beissinger, S.R. 2009. Variation in the onset of incubation and its influence on avian hatching success and asynchrony. *Animal Behaviour* 78: 601-613.
- Wang, J.M. and Bessinger, S.R. 2011. Partial incubation in birds: Its occurrence, function and quantification. *Auk* 128: 454-466.
- Wellman-Labadie, O., Picman, J. and Hincke, M.T. 2007. Avian antimicrobial proteins: structure, distribution and activity. *World's Poultry Science Journal* 63: 421-438.
- West-Eberhard, M.J. 1983. Sexual selection, social competition and speciation. *The Quarterly Review of Biology* 58: 155-183.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C. and Wiebe, W.J. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 6578-6583.
- Whittingham, L.A. 1993. Effects of nestling provisioning on the time-activity budgets of male red-winged blackbirds. *Condor* 95: 730-73.
- Zahavi, A. and Zahavi, A. 1997. *The Handicap Principle: A missing piece in Darwin's puzzle*. Oxford University Press. Oxford.
- Zwietering, M.H., De Koos, J.T., Hasenack, B.E., De Wit, J.C. and Van't Riet, K. 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and environmental microbiology* 57: 1094-1101.



SHEDDING SLOWLY

CARGA BACTERIANA SOBRE HUEVOS EN EL PAPAMOSCAS CERROJILLO: FACTORES AMBIENTALES Y MATERNOS

Estudiamos los factores ambientales y maternos que podrían explicar la carga bacteriana de la cáscara de los huevos en una población de papamoscas cerrojillo *Ficedula hypoleuca* y examinamos los efectos de esta carga sobre el éxito de eclosión. Se muestrearon las bacterias de las cáscaras de los huevos de las puestas en fases iniciales y finales de incubación, así como de las heces maternas como un correlato de las bacterias cloacales en fases intermedias de la incubación. Mayores valores de temperatura media ambiental durante el período de puesta promovieron la carga bacteriana sobre la cáscara de los huevos a inicios de incubación, apoyando la idea de que las bacterias proliferan ante aumentos de temperatura. La carga bacteriana sobre la cáscara de los huevos en fases finales de incubación se correlacionó significativamente con la carga bacteriana cloacal materna, lo que sugiere una posible verticalidad en la transmisión de bacterias. No se detectaron diferencias significativas entre las cargas bacterianas sobre las cáscaras de los huevos desde inicios y finales de la incubación. Posibles efectos bacteriostáticos de la incubación u otros mecanismos alternativos independientes de la incubación aún no descritos podrían explicar este patrón. La carga bacteriana no pareció afectar al éxito de eclosión, destacando la necesidad de evaluar los posibles efectos de la composición bacteriana sobre la supervivencia de los embriones en estudios futuros.

Rafael Ruiz-de-Castañeda,
Ana Isabel Vela, Elisa Lobato, Víctor Briones y Juan Moreno

S
O
V
E
D
H

Bacterial Loads on Eggshells of the Pied Flycatcher: Environmental and Maternal Factors

Author(s): R. Ruiz-De-Castañeda, A. I. Vela, E. Lobato, V. Briones and J. Moreno

Source: The Condor, 113(1):200–208. 2011.

Published By: Cooper Ornithological Society

URL: <http://www.bioone.org/doi/full/10.1525/cond.2011.100035>

BioOne (www.bioone.org) is a nonprofit, online aggregation of core research in the biological, ecological, and environmental sciences. BioOne provides a sustainable online platform for over 170 journals and books published by nonprofit societies, associations, museums, institutions, and presses.

Your use of this PDF, the BioOne Web site, and all posted and associated content indicates your acceptance of BioOne's Terms of Use, available at www.bioone.org/page/terms_of_use.

Usage of BioOne content is strictly limited to personal, educational, and non-commercial use. Commercial inquiries or rights and permissions requests should be directed to the individual publisher as copyright holder.

BioOne sees sustainable scholarly publishing as an inherently collaborative enterprise connecting authors, nonprofit publishers, academic institutions, research libraries, and research funders in the common goal of maximizing access to critical research.

BACTERIAL LOADS ON EGGSHELLS OF THE PIED FLYCATCHER: ENVIRONMENTAL AND MATERNAL FACTORS

R. RUIZ-DE-CASTAÑEDA^{1,4}, A. I. VELA^{2,3}, E. LOBATO^{1,5}, V. BRIONES^{2,3}, AND J. MORENO¹

¹Departamento de Ecología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales–Consejo Superior de Investigaciones Científicas, José Abascal 2, 28006 Madrid, Spain

²Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense, Avenida Puerta del Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

³Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Avenida Puerta del Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

Abstract. We studied environmental and maternal factors explaining bacterial loads on eggshells in a population of a hole-nesting passerine, the Pied Flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) and the possible effects of bacteria on hatching success. We collected bacteria from eggshells at early and late stages of incubation and from females' feces, as a surrogate for cloacal samples, at intermediate stages of incubation. Higher environmental temperatures during laying promoted bacterial loads on the eggshells during early incubation, supporting the fact that bacterial growth is generally favored by increasing ambient temperature. Bacterial loads on the eggshells at late stages of incubation were correlated positively with bacterial loads in the female's cloaca, suggesting possible vertical transmission of bacteria. We detected no significant differences between bacterial loads of the eggshells at early and late stages of incubation. Possible bacteriostatic effects of incubation and/or other alternative mechanisms not associated with incubation may be responsible for this pattern. Bacterial loads seemed not to affect hatching success, raising the question whether bacterial species composition rather than bacterial load affects embryo survival.

Key words: eggshell bacterial loads, *Ficedula hypoleuca*, hatching success, incubation, Pied Flycatcher, temperature, vertical transmission.

Carga Bacteriana en la Cáscara de los Huevos de *Ficedula hypoleuca*: Factores Ambientales y Maternos

Resumen. Estudiamos los factores ambientales y maternos que podrían explicar la carga bacteriana de la cáscara de los huevos en una población de *Ficedula hypoleuca* y examinamos los efectos de esta carga sobre el éxito de eclosión. Se muestrearon las bacterias de las cáscaras de los huevos de las puestas en fases iniciales y finales de incubación, así como de las heces maternas como un correlato de las bacterias cloacales en fases intermedias de la incubación. Mayores valores de temperatura media ambiental durante el período de puesta promovieron la carga bacteriana sobre la cáscara de los huevos a inicios de incubación, apoyando la idea de que las bacterias proliferan ante aumentos de temperatura. La carga bacteriana sobre la cáscara de los huevos en fases finales de incubación se correlacionó significativamente con la carga bacteriana cloacal materna, lo que sugiere una posible verticalidad en la transmisión de bacterias. No se detectaron diferencias significativas entre las cargas bacterianas sobre las cáscaras de los huevos desde inicios y finales de la incubación. Posibles efectos bacteriostáticos de la incubación u otros mecanismos alternativos independientes de la incubación aún no descritos podrían explicar este patrón. La carga bacteriana no pareció afectar al éxito de eclosión, destacando la necesidad de evaluar los posibles efectos de la composición bacteriana sobre la supervivencia de los embriones en estudios futuros.

INTRODUCTION

Parasites play a major role in the evolution of host life histories (Møller 1997) and may affect the expression of sexually selected characters in birds (Hamilton and Zuk 1982). However, the most diverse group of potential parasites, the bacteria (Mlot 2004), has only received scant attention in field ornithology (but see Hubálek 1994, 2004, Cook et al. 2003, 2005a,b, Benskin et al. 2009, Burt 2009).

Bacterial growth on the eggshell surface is rapid under suitable environmental conditions and can lead to a high probability of trans-shell infection (Cook et al. 2003). Cook et al. (2003, 2005a) observed that in tropical areas microbial growth was more rapid on eggs exposed to cool humid conditions than on those experiencing warmer and drier conditions. Therefore, water may be crucial for survival and growth of bacteria on the eggshells (Cook et al. 2003). Bacteria generally maximize their metabolic activity and growth within

Manuscript received 22 February 2010; accepted 22 September 2010.

⁴E-mail: rrdcb@mncn.csic.es

⁵Current address: Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE), UMR 5175, 1919 Route de Mende, F-34293 Montpellier cedex 5, France.

The Condor, Vol. 113, Number 1, pages 200–208. ISSN 0010-5422, electronic ISSN 1938-5422. © 2011 by The Cooper Ornithological Society. All rights reserved. Please direct all requests for permission to photocopy or reproduce article content through the University of California Press's Rights and Permissions website, <http://www.ucpressjournals.com/reprintInfo.asp>. DOI: 10.1525/cond.2011.100035

PREVALENCIA DE BACTERIAS CULTIVABLES POTENCIALMENTE PATÓGENAS SOBRE HUEVOS Y EN CLOACAS DE HEMBRAS DE PAPAMOSCAS CERROJILLO EN UN HÁBITAT TEMPLADO DEL CENTRO DE ESPAÑA

Rafael Ruiz-de-Castañeda,
Ana Isabel Vela, Elisa Lobato, Víctor Briones y Juan Moreno

Las bacterias crecen sobre las cáscaras de huevos de las aves, y por tanto podrían causar enfermedades en los embriones en desarrollo. Poco se conoce acerca de la colonización de bacterias cultivables en las cáscaras de huevo de aves silvestres, y la mayoría de los estudios están restringidos a las aves de corral. Nuestro objetivo fue examinar las bacterias cultivables que crecen en la cáscara de huevos durante la incubación que podrían afectar negativamente el éxito de eclosión del papamoscas cerrojillo *Ficedula hypoleuca* en un hábitat templado de montaña en el centro de España. Las bacterias cultivables de la cloaca de las hembras también se analizaron ya que las bacterias pueden ser transmitidas verticalmente de las hembras a los huevos. Utilizamos muestras de materia fecal como sustitutos a las muestras cloacales debido al pequeño tamaño de las aves muestreadas. Encontramos que la cloaca y las cáscaras de huevo de *F. hypoleuca* tenían 24 y 40 familias y especies de bacterias, respectivamente, pero sólo unos pocos en cada puesta de huevos y en cada cloaca. Bacterias Gram-negativas en forma de bacilo y las bacterias de la familia *Pseudomonadaceae* fueron las bacterias más comunes sobre las cáscaras de huevo durante las etapas tempranas y tardías de la incubación, y en las cloacas de las hembras. Aunque se basa en pequeños tamaños de muestra, encontramos que las hembras con bacterias Gram-negativas en forma de bacilo en sus cloacas pusieron huevos que también tenían estas bacterias, proporcionando posible evidencia de una transmisión vertical. No encontramos pruebas de transmisión vertical de *Pseudomonadaceae*, lo que sugiere un posible origen ambiental para estas bacterias. La prevalencia de tipos morfológicos y de las principales categorías taxonómicas de bacterias sobre las cáscaras de huevo no variaron desde el principio hasta las finales de la incubación, apoyando la hipótesis de que la incubación puede tener efectos bacteriostáticos sobre la proliferación de las bacterias en la cáscara del huevo. A pesar de ser invasores primarios de huevos en las aves de corral, no detectamos efectos de *Pseudomonadaceae* o de *Pseudomonas luteola* cultivables sobre el éxito de eclosión. Nuestro estudio representa el primero en examinar las bacterias cultivables que crecen en las cáscaras de huevo de un ave silvestre en un hábitat templado, sin embargo otros estudios basados en técnicas independientes del cultivo son necesarios para confirmar nuestros resultados.



Prevalence of potentially pathogenic culturable bacteria on eggshells and in cloacae of female Pied Flycatchers in a temperate habitat in central Spain

Rafael Ruiz-de-Castañeda,^{1,5} Ana Isabel Vela,^{2,3} Elisa Lobato,⁴ Víctor Briones,^{2,3} and Juan Moreno¹

¹Departamento de Ecología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales-Consejo Superior de Investigaciones Científicas. José Abascal 2, 28006, Madrid, Spain

²Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense. Avenida Puerta del Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

³Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense. Avenida Puerta del Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

⁴Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE), UMR 5175 Route de Mende, F-34293 Montpellier Cedex 5, France

Received 26 July 2010; accepted 7 December 2010

ABSTRACT. Bacteria grow on avian eggshells and thus can potentially cause diseases in developing embryos. Little is known about culturable bacteria colonizing avian eggshells in free-living birds, with most studies restricted to poultry. Our objective was to examine the culturable bacterial array growing on eggshells during incubation that could negatively affect hatching success of Pied Flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) in a temperate montane habitat in central Spain. Cloacal culturable bacteria of females were also analyzed because bacteria can be vertically transmitted from females to eggs. We used fecal samples as surrogates of cloacal samples due to the small size of sampled birds. We found that eggshells and female cloacae of Pied Flycatchers harbored 24 and 40 bacterial families and species, respectively, but only a few in each clutch and each cloaca. Rod-shaped gram-negative bacteria and bacteria in the family *Pseudomonadaceae* were the most common bacteria on eggshells during early and late incubation and in female cloacae. Although based on small sample sizes, we found that females with rod-shaped gram-negative bacteria in their cloacae laid eggs that also had these bacteria, providing possible evidence for vertical transmission. We found no evidence for vertical transmission of *Pseudomonadaceae*, suggesting a possible environmental source for these bacteria. The prevalence of bacterial morphological types and major taxonomical categories on eggshells did not vary from early to late stages of incubation, providing support for the hypothesis that incubation may have bacteriostatic effects on bacterial proliferation on eggshells. Despite being primary egg invaders in poultry, we detected no effects of culturable *Pseudomonadaceae* or *Pseudomonas luteola* on hatching success. Our study represents the first to examine the culturable bacteria growing on the eggshells of a wild bird in a temperate habitat and additional studies based on culture-independent techniques are required to confirm our results.

RESUMEN. El prevalencia de bacterias cultivables potencialmente patogénicas en la cáscara de huevos y en la cloaca de hembras de *Ficedula hypoleuca* en un hábitat templado en el centro de España

Las bacterias crecen sobre las cáscaras de huevos de las aves, y por tanto podrían causar enfermedades en los embriones en desarrollo. Poco se conoce acerca de la colonización de bacterias cultivables en las cáscaras de huevo de aves silvestres, y la mayoría de los estudios están restringidos a las aves de corral. Nuestro objetivo fue examinar las bacterias cultivables que crecen en la cáscara de huevos durante la incubación que podrían afectar negativamente el éxito de eclosión de *Ficedula hypoleuca* en un hábitat templado de montaña en el centro de España. Las bacterias cultivables de la cloaca de las hembras también se analizaron ya que las bacterias pueden ser transmitidas verticalmente de las hembras a los huevos. Utilizamos muestras de materia fecal como sustitutos a las muestras cloacales debido al pequeño tamaño de las aves muestreadas. Encontramos que la cloaca y las cáscaras de huevo de *F. hypoleuca* tenían 24 y 40 familias y especies de bacterias, respectivamente, pero sólo unos pocos en cada puesta de huevos y en cada cloaca. Bacterias gram-negativas en forma de bacilo y las bacterias de la familia *Pseudomonadaceae* fueron las bacterias más comunes sobre las cáscaras de huevo durante las etapas tempranas y tardías de la incubación, y en las cloacas de las hembras. Aunque se basa en pequeños tamaños de muestra, encontramos que las hembras con bacterias gram-negativas en forma de bacilo en sus cloacas pusieron huevos que también tenían estas bacterias,

⁵Corresponding author. Email: rrdcb@mncn.csic.es

proporcionando posible evidencia de una transmisión vertical. No encontramos pruebas de transmisión vertical de *Pseudomonadaceae*, lo que sugiere un posible origen ambiental para estas bacterias. La prevalencia de tipos morfológicos y de las principales categorías taxonómicas de bacterias sobre las cáscaras de huevo no variaron desde el principio hasta las finales de la incubación, apoyando la hipótesis de que la incubación puede tener efectos bacteriostáticos sobre la proliferación de las bacterias en la cáscara del huevo. A pesar de ser invasores primarios de huevos en las aves de corral, no detectamos efectos de *Pseudomonadaceae* o de *Pseudomonas luteola* cultivables sobre el éxito de eclosión. Nuestro estudio representa el primero en examinar las bacterias cultivables que crecen en las cáscaras de huevo de un ave silvestre en un hábitat templado, sin embargo otros estudios basados en técnicas independientes del cultivo son necesarios para confirmar nuestros resultados.

Key words: cloacae, culturable bacteria, *Ficedula hypoleuca*, incubation, *Pseudomonadaceae*, vertical transmission

Information regarding culturable and non-culturable potentially pathogenic bacteria present on the eggshells of wild birds is scarce, with most available information restricted to poultry and focusing on the economical and medical implications of these pathogens (Humphrey 1994, Tauxe 1997, Rasekh et al. 2009). Two recent studies, both focusing on Pearly-eyed Thrashers (*Magarops fuscatus*), provided information about bacteria growing on eggshells in the wild (Cook et al. 2005, Shawkey et al. 2009). Based on traditional culture-dependent (Cook et al. 2005) and culture-independent (Shawkey et al. 2009) methods, both studies revealed that incubation may inhibit bacterial growth and diversification on eggshells. Cook et al. (2005, but see Shawkey et al. 2009) also found that incubation may selectively enhance the proliferation of certain types of beneficial bacteria (rod-shaped gram-positive) capable of out-competing pathogenic bacteria also growing on eggshells. In general, Cook et al. (2005) identified culturable bacteria to major group level, with rod-shaped gram-positive, enterics gram-negative, fermenters gram-negative, cocci gram-positive, and enterics gram-negative being the most common bacteria on eggshells at laying. Shawkey et al. (2009) produced a broader taxonomical description at the level of family, genus, and species. Despite the importance of these two studies for understanding the microbiology of avian eggs, their descriptive and functional outcomes may be limited to tropical habitats where temperature and moisture levels are uniformly high throughout the year, a fact of key relevance for bacterial proliferation.

To our knowledge, no information is available from temperate areas regarding the prevalence of culturable bacteria colonizing eggshells at different stages of incubation and their association to

those present in female cloacae. One objective of our study was to provide a description of the bacteria growing on eggshells and in female cloacae by focusing specifically on a portion of the culturable bacteria, enumerating bacteria that could potentially impact directly or indirectly hatchability in a population of Pied Flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) breeding in a temperate montane habitat in central Spain. Additional objectives were to identify a possible association between culturable bacteria on eggshells and in female cloacae due to possible vertical transmission, detect possible changes in the prevalence of culturable bacteria growing on eggshells from early to late stages of incubation, and evaluate the possible effects of the most prevalent bacteria on hatching success.

METHODS

Study species and study area. Pied Flycatchers are small (12–13 g), migratory, cavity-nesting passerines of European woodlands that readily nest in nest-boxes. Our study was conducted during spring 2008 in a deciduous forest of Pyrenean oak (*Quercus pyrenaica*) at 1200 m asl near Valsaín, central Spain (40° 54'N, 04° 01'W). The structure of the habitat was homogeneous, with most oaks being of similar age. Egg laying by Pied Flycatchers typically begins in late May, and clutch sizes range from 2 to 8 (Sanz 1997). Females normally lay one egg per day during the laying period, and start incubating before clutch completion (generally the day the fourth egg is laid). The incubation period lasts about 12 to 15 days and only females incubate.

Field sampling. Nest boxes were visited daily beginning early in the breeding season and dates of clutch initiation (laying date) were recorded. We sampled 82 and 62 clutches during early (mean number of days after clutch completion = 0.56 ± 0.09 [SE]) and late (mean

PREVALENCIA DE *Salmonella* y *Yersinia* EN EL PAPAMOSCAS CERROJILLO (*Ficedula hypoleuca*) EN EL CENTRO DE ESPAÑA

Salmonella y *Yersinia* son potenciales enteropatógenos en aves de corral pudiendo afectarles en distintas etapas de su vida, incluyendo la embrionaria. Estos enteropatógenos tienen notables implicaciones económicas y médicas a nivel mundial y son por tanto ampliamente estudiados en el contexto de la producción avícola. La información referente a la prevalencia de estas bacterias en aves silvestres es escasa y está generalmente sesgada hacia especies ecológicamente ligadas al hombre, habiendo sido por tanto catalogadas como reservorios y dispersores de estos enteropatógenos. Evaluamos la prevalencia de *Salmonella* y *Yersinia* en heces y huevos de hembras de una población de papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*) que criaba en cajas-nido en el centro de España. *Salmonella arizonae* fue aislada en heces de una hembra pero no en huevos. *Yersinia* no fue detectada ni en heces ni en huevos. Estos resultados indican que *Salmonella* y *Yersinia* son raras en nuestra población de estudio y que por tanto es poco probable que estas aves silvestres actúen como reservorios de estas bacterias.

Rafael Ruiz-de-Castañeda,
Ana Isabel Vela, Elisa Lobato, Víctor Briones y Juan Moreno

S
O
V
E
D
H

Prevalence of *Salmonella* and *Yersinia* in Free-Living Pied Flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) in Central Spain

Author(s): Rafael Ruiz-de-Castañeda, M.Sc., Ana I. Vela, M.Sc., Ph.D., Elisa Lobato, M.Sc., Ph.D., Víctor Briones, M.Sc., Ph.D., and Juan Moreno, M.Sc., Ph.D.

Source: Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 42(2):313-316. 2011.

Published By: American Association of Zoo Veterinarians

DOI: 10.1638/2010-0056.1

URL: <http://www.bioone.org/doi/full/10.1638/2010-0056.1>

BioOne (www.bioone.org) is a nonprofit, online aggregation of core research in the biological, ecological, and environmental sciences. BioOne provides a sustainable online platform for over 170 journals and books published by nonprofit societies, associations, museums, institutions, and presses.

Your use of this PDF, the BioOne Web site, and all posted and associated content indicates your acceptance of BioOne's Terms of Use, available at www.bioone.org/page/terms_of_use.

Usage of BioOne content is strictly limited to personal, educational, and non-commercial use. Commercial inquiries or rights and permissions requests should be directed to the individual publisher as copyright holder.

BioOne sees sustainable scholarly publishing as an inherently collaborative enterprise connecting authors, nonprofit publishers, academic institutions, research libraries, and research funders in the common goal of maximizing access to critical research.

PREVALENCE OF *SALMONELLA* AND *YERSINIA* IN FREE-LIVING PIED FLYCATCHERS (*FICEDULA HYPOLEUCA*) IN CENTRAL SPAIN

Rafael Ruiz-de-Castañeda, M.Sc., Ana I. Vela, M.Sc., Ph.D., Elisa Lobato, M.Sc., Ph.D., Víctor Briones, M.Sc., Ph.D., and Juan Moreno, M.Sc., Ph.D.

Abstract: *Salmonella* and *Yersinia* are important enteropathogens in poultry and can affect birds of all ages, including embryos. These food-borne zoonotic enteropathogens are of great economic and medical concern worldwide and are intensely studied in poultry. Information regarding the prevalence of these bacteria in wild birds is scarce and biased toward avian species ecologically linked to humans, which have often been incriminated as both reservoirs and disseminators of these enteropathogens. The prevalence of *Salmonella* and *Yersinia* recovered from both the feces and eggs in a population of female pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) breeding in nest-boxes in central Spain was evaluated. *Salmonella arizonae* was recovered from the feces of one female but was not recovered from eggs. *Yersinia* was not detected in either the feces or eggs. These results may suggest that *Salmonella* and *Yersinia* may be uncommon in this population studied and may indicate that these birds are unlikely reservoirs of *Salmonella* and *Yersinia*.

Key words: Feces, *Ficedula hypoleuca*, eggshells, egg, pied flycatchers, *Salmonella*, *Yersinia*.

BRIEF COMMUNICATION

Salmonella and *Yersinia* are important food-borne zoonotic pathogens of great economic and medical concern worldwide and are intensely studied in poultry.^{10,11,14} Free-living birds have often been incriminated as reservoirs and disseminators of enteropathogenic bacteria.^{3,13,26} *Salmonella* and *Yersinia* prevalence and their sublethal effects on fitness in avian populations needs to be further documented since a majority of these studies were performed on dead or clinically ill birds.^{3,13,21}

In spring 2008, the prevalence of *Salmonella* and *Yersinia* recovered from the feces and eggs of free-living female pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) breeding in nest boxes in central Spain (40°54'N, 04°01'W) was evaluated. The pied flycatcher is a small migratory passerine bird used as a model

From Departamento de Ecología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, José Abascal 2, Madrid 28006, Spain (Ruiz-de-Castañeda, Lobato, Moreno); Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta del Hierro s/n, Madrid 28040, Spain (Vela, Briones); and Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta del Hierro s/n, Madrid 28040, Spain (Vela, Briones). Present address (Lobato): Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, Université de Montpellier 5175, Route de Mende Montpellier F-34293 Cedex 5, France. Correspondence should be directed to Mr. Ruiz-de-Castañeda (rrdcb@mncn.csic.es).

species in avian biology.¹⁸ No previous information regarding the health status of the sampled females was available and captures were randomly performed. Since there is the potential of egg transmission for both *Salmonella* and *Yersinia* via the eggshells and egg contents, the prevalence of these bacteria was also evaluated for both the shell surface and the internal contents.² This present study is unique from previous studies because, to the authors' knowledge, this is the first time eggs from free-living pied flycatchers were evaluated for the prevalence of *Salmonella* and *Yersinia*.

Eggshells were sampled at the early (mean number of days after clutch completion \pm SEM) and late (mean number of days after eggshell microbiological sampling during the early stages of incubation \pm SEM) stages of incubation, which were 0.56 ± 0.09 days and 10.24 ± 0.10 days, respectively. Sterile field sampling techniques were used. Briefly, the eggshells of the entire clutch were swabbed with a sterile cotton swab (Meus s.r.l., Piove di Sacco 35028 PD, Italy) that was previously moistened with sterile phosphate-buffered saline for approximately 8 sec. One pooled sample from the whole clutch was obtained to evaluate for bacterial prevalence.

Females were captured during the nesting period when mean number of days after eggshell microbiological sampling at the early stage of incubation \pm SEM was 6.6 ± 1.5 days. Feces produced by the female during handling and/or present on the immediate outer membrane of the cloacal orifice were sampled with a flexible sterile



INCUBAR

INICIO TEMPRANO DE LA INCUBACIÓN Y CARGA BACTERIANA SOBRE HUEVOS EN UN PASERIFORME TROGLODITA EN UN HÁBITAT TEMPLADO

Se ha hipotetizado que la incubación comienza antes de completar la puesta por que podría controlar la proliferación bacteriana sobre los huevos así como la infección de los mismos. Así pues, la incubación temprana debería estar asociada a una reducción de la carga bacteriana sobre los huevos. No existe información detallada de la actividad temprana de incubación durante los días o las noches del periodo de puesta así como de su asociación con la carga bacteriana sobre los huevos en aves. Usamos sensores de temperatura colocados en estrecho contacto con los huevos en el nido conectados a dispositivos de memoria para medir la incubación temprana de hembras de papamos cerrojillo *Ficedula hypoleuca*, un passeriforme troglodita, iniciando el día de puesta del tercer huevo (día 3). La incubación generalmente se inició en el día de puesta del cuarto huevo (día 4), siendo el tamaño modal de puesta en nuestra población de seis huevos. Muestreamos las bacterias heterótrofas de toda la puesta después de que se completara. Usamos los conteos de unidades formadoras de colonias en el medio TSA como estimas de la carga bacteriana presente sobre las puestas. Aquellas puestas que fueron incubadas más intensamente en el día 4 así como durante las noches 3-5, tenían menos bacterias que aquellas que fueron incubadas en menor medida. La temperatura alrededor de los huevos no fue la variable explicativa más importante, sugiriendo la existencia de mecanismos alternativos a los cambios de temperatura asociados a la incubación, más relevantes para el control de la proliferación bacteriana. Este es el primer estudio que muestra una correlación entre valores altos de intensidad de incubación durante el día de inicio de incubación durante la puesta, y una reducción de la carga bacteriana sobre huevos de aves silvestres, apoyando por tanto que la incubación temprana es una defensa antimicrobiana para las puestas.

Rafael Ruiz-de-Castañeda,
Ana Isabel Vela, Elisa Lobato, Víctor Briones y Juan Moreno

EARLY ONSET OF INCUBATION AND EGGSHELL BACTERIAL LOADS IN A TEMPERATE CAVITY-NESTING PASSERINE

RAFAEL RUIZ-DE-CASTAÑEDA*1, ANA ISABEL VELA2,3, ELISA LOBATO1, VICTOR BRIONES2,3, JUAN MORENO1

1Departamento de Ecología Evolutiva, MNCN-CSIC. José Abascal 2, 28002, Madrid, Spain

2Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense. Avenida Puerta del Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.

3Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense. Avenida Puerta del Hierro s/n, 28040 Madrid Spain.

4Present address: Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE)-UMR 5175. Route de Mende F-34293 Montpellier Cedex 5, France.

* Corresponding author: rrdcb@mncn.csic.es. Phone: +34 91 411 13 28 Ext. 1218.

Abstract: It has been hypothesized that incubation begins before laying is completed because it controls bacterial growth on eggshells and infection of eggs. Thus, early incubation should be associated with decreased bacterial abundance on eggshells. There is no detailed information of early incubation activity during daytimes or night-times of the laying period and its association with eggshell bacterial loads in birds. We used temperature sensors placed in contact with eggs and connected to data-loggers to measure early incubation of female Pied Flycatchers *Ficedula hypoleuca*, a hole-nesting passerine, beginning with laying of the third egg (daytime 3). Incubation usually began with laying of the fourth egg (daytime 4), the modal clutch size being 6 in our population. Eggshell heterotrophic bacteria from the whole clutch were sampled soon after clutch completion. Colony-forming units counted on trypticase soy agar were used to estimate bacterial loads. Clutches that were incubated more intensively during daytime 4 and also during the total of night-times 3-5, had fewer bacteria on eggshells than clutches that were incubated less. Air temperature in contact with the eggs seemed not the key explanatory variable for eggshell bacterial loads, suggesting that alternative mechanisms to thermal changes associated with incubation may be more relevant to control bacterial proliferation. This is the first study to show a correlation between higher daytime incubation on the day of incubation onset during laying and reduction in bacterial loads on eggshells of wild birds and supports the hypothesis that early incubation is an antimicrobial defence of clutches.

Key words: Behavioural antimicrobial defences, culturable bacteria, eggshells, *Ficedula hypoleuca*, onset of incubation.

INTRODUCTION

Avian parents can influence the initiation of development of eggs and the resultant synchrony of hatching through incubation onset (O'Connor 1984). The onset of incubation prior to clutch completion occurs in many avian taxa, most especially in Passeriformes (Hébert 2002, Wang and Beissinger 2009). Most hypotheses regarding the significance of hatching patterns in birds assume that hatching patterns reflect patterns of incubation during laying (Hébert 2002, Wang and Beissinger 2009). However, despite much study, the evolution of hatching patterns remains still controversial (Magrath 1990, Stoleson and Bessinger 1995, Stenning 1996). Far less attention has been paid to factors that may select for an early onset of incubation in relation to embryo and not nestling survival (Cook et al. 2003, Massaro et al. 2007, Wang and Bessinger 2009). In the present study, we will only deal with hypotheses related to factors promoting early incubation onset independently of hatching patterns.

A recent hypothesis suggests that the onset of incubation may have evolved to reduce bacterial growth on eggshells, thereby reducing mortality from trans-shell infection during laying (Cook et al. 2003, 2005a). Thus, experimental evidence has shown that incubation inhibits bacteria on eggshells in a tropical (Cook et al. 2005b, Shawkey et al. 2009) and temperate cavity-nesting passerine (D'Alba et al. 2010), though the underlying mechanisms of such inhibition are poorly understood. Incubation may limit bacterial growth on eggshells by keeping eggs dry through greatly increasing temperature around them (Cook et al. 2003, 2005a,b, D'Alba et al. 2010). Also, direct thermal effects can occur by raising temperatures above the optimum for bacterial growth (Cook et al. 2003, 2005a,b). Alternatively chemicals in uropygial gland secretions

SECAR LOS HUEVOS PARA INHIBIR A LAS BACTERIAS: LA INCUBACIÓN DURANTE LA PUESTA EN UN PASERIFORME TROGLODITA

La incubación parcial durante la puesta ha sido sugerida como una adaptación defensiva frente a las bacterias patógenas que colonizan la superficie de los huevos en condiciones silvestres. Los mecanismos inhibitorios subyacentes a esta adaptación son poco conocidos y tan sólo evidencias experimentales recientes demuestran que mantener los huevos secos es un mecanismo próximo asociado a los efectos antibacterianos de la incubación en aves. Estimamos la intensidad de incubación parcial (actividad de incubación que desarrollan ciertas aves durante la puesta, días de puesta de los huevos 3-5 en nuestra población) de hembras de papamoscas cerrojillo dentro de cajas-nido usando para ello registradores de datos que permitieron la medición precisa de la temperatura en íntimo contacto con los huevos dentro del cuenco del nido. También medimos la humedad relativa dentro de las cajas-nido y la relacionamos con la actividad de incubación, mostrando que una intensidad de incubación parcial mayor contribuye a secar el aire que rodea a los huevos. Analizamos independientemente los efectos de la incubación y de la humedad relativa sobre la carga viable de tres tipos de bacterias cultivables prevalentes sobre las puestas, heterótrofas generales, entéricas Gram-negativas y pseudomonas. Nuestros resultados muestran una asociación entre la incubación parcial y la inhibición de la carga de bacterias por medio de un efecto de secado de los huevos en tanto que la intensidad de incubación y la humedad relativa se asociaban negativa y positivamente con la carga de los tres tipos de bacterias estudiadas, aunque con diferente significación. Estos resultados apuntan a que los efectos de la incubación sobre las bacterias de los huevos están mediados por efectos microclimáticos en esta especie de passeriforme troglodita.

Rafael Ruiz-de-Castañeda,
Ana Isabel Vela, Sonia González-Braojos, Víctor Briones y Juan Moreno



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Behavioural Processes

journal homepage: www.elsevier.com/locate/behavproc

Drying eggs to inhibit bacteria: Incubation during laying in a cavity nesting passerine

R. Ruiz-De-Castañeda^{a,*}, A.I. Vela^{b,c}, S. González-Braojos^a, V. Briones^{b,c}, J. Moreno^a

^a Departamento de Ecología Evolutiva, MNCN-CSIC, José Abascal 2, 28006 Madrid, Spain

^b Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense, Avenida Puerta del Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

^c Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Avenida Puerta del Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 June 2011
Received in revised form 18 August 2011
Accepted 19 August 2011

Keywords:
Early incubation
Eggshell bacteria
Ficedula hypoleuca
Nest microclimate
Pied flycatchers
Relative humidity
Temperature

ABSTRACT

Early incubation has been suggested as a defensive adaptation against potentially pathogenic bacteria colonizing avian eggshells in the wild. The inhibitory mechanisms underlying this adaptation are poorly understood and only recent experimental evidence demonstrates that keeping eggs dry is a proximate mechanism for the antimicrobial effects of avian incubation. We estimated partial incubation (the bouts of incubation that some birds perform during the egg-laying period, days of lay 3–5 in our population) intensity of female pied flycatchers breeding in nest-boxes using data loggers that allowed a precise measurement of temperature just between the eggs in the nest-cup. We also measured relative humidity within the nest-boxes and related it to incubation intensity, showing that more intense incubation during laying contributes to drying the air near the eggs. We analyzed separately the effects of incubation and of relative humidity on loads of three types of culturable bacteria known to be present on eggshells, heterotrophic bacteria, Gram-negative enterics and pseudomonads. Our results show an association of early incubation with an inhibition of bacterial proliferation through a drying effect on eggshells, as we found that incubation intensity was negatively and relative humidity positively associated with eggshell bacterial loads for heterotrophic bacteria, Gram-negative bacteria and pseudomonads, although the significance of these associations varied between bacterial groups. These results point to microclimatically driven effects of incubation on bacterial proliferation on eggshells during laying in a temperate cavity nesting passerine.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The study of behavioural defences against bacterial infection of eggs and embryos may contribute to our understanding of some important aspects of avian breeding biology. During laying and incubation eggs are exposed during variable periods of time (Wang and Beissinger, 2009) to different sources of environmental and maternal bacteria such as air, nest-material, cloacae and plumage (Burt and Ichida, 1999; Cook et al., 2003, 2005a; Shawkey et al., 2009; Peralta-Sánchez et al., 2010; Ruiz-de-Castañeda et al., 2011a). Some of these bacteria could ultimately infect egg contents and kill the developing embryo (Cook et al., 2005a; Soler et al., 2008 but see Peralta-Sánchez et al., 2010; Ruiz-de-Castañeda et al., 2011a,b; D'Alba et al., 2010). Both Cook et al. (2005b) and Shawkey et al. (2009), based on culture dependent and independent methods, respectively, have demonstrated experimentally that partial incubation, the bouts of incubation that some birds perform during the egg-laying period (D'Alba et al., 2010), inhibits bacterial pro-

liferation and diversification on eggshells in a tropical hole-nesting passerine. This was also found in temperate passerine in a correlative study by Ruiz-de-Castañeda et al. (in press). Several possible inhibitory mechanisms operating during early incubation have been proposed. For instance, antibacterial secretions produced in the uropygial gland of some species (Shawkey et al., 2003; Soler et al., 2008; Martin-Vivaldi et al., 2010), but also other secretions produced on the brood patch (Menon and Menon, 2000) may be transferred onto eggshells through contact with the incubating adult. Other species may have evolved the capacity to include in their nests certain types of biologically active plants that could release volatile antibacterial compounds during incubation (Clark and Mason, 1985; Mennerat et al., 2009).

Besides these specialized adaptations, the most obvious effect of incubation itself is a strong modification of microclimatic conditions within the nest, and this may be particularly true for cavity nesters. Thus, the presence of the incubating bird in the nest together with the nest structure may create a local environment that differs from conditions outside the cavity (Ar and Sidis, 2002). It is well known that humidity is among the most limiting abiotic factors affecting bacterial proliferation under laboratory and natural conditions (Maier et al., 2000; Madigan et al.,

2005). Thus, behavioural strategies of incubating adults that have the potential to control humidity around the eggs may have been selected, at least in part, to prevent proliferation of harmful bacteria on eggshells. Cook et al. (2003, 2005a,b) first hypothesized about the possibility that by incubating, parents may potentially minimize the build up of harmful bacteria by reducing moisture on eggshells. Interestingly, D'Alba et al. (2010) recently demonstrated experimentally for a temperate western hole-nesting passerine that keeping eggs dry is a proximate mechanism for the antimicrobial effects of avian incubation. Removal of water from eggshells may itself occur through a number of mechanisms. For instance, increasing the temperature of eggs may cause water to evaporate faster and prevent condensation (Cook et al., 2003, 2005a,b; D'Alba et al., 2010) and/or egg turning (Deeming, 2002) may cause water to become absorbed by nest materials.

In this study we measured nest microclimatic relative humidity (RH) and temperature around the eggs during daytime periods of the critical part of the laying period for incubation onset in a population of pied flycatchers *Ficedula hypoleuca* breeding in nest-boxes in a temperate montane habitat in Central Spain (Ruiz-de-Castañeda et al., in press). We used the temperature record to detect partial incubation activity and related this activity to microclimatic variation of RH within the nest-box. We analyzed the association of incubation intensity and RH with loads of three prevalent types of culturable bacteria on eggshells, namely heterotrophic bacteria, Gram-negative enterics and pseudomonads. We specifically selected these types of culturable bacteria based on a previous descriptive study of culturable eggshell microbiota in this population (Ruiz-de-Castañeda et al., 2011b). We have tested the following predictions derived from the fact that incubation during laying serves to reduce eggshell bacterial loads through a drying effect (D'Alba et al., 2010):

- (1) Incubation activity during laying produces a reduction of microclimatic RH within the nest-box.
- (2) Eggshell bacterial loads are negatively affected by the reduction of RH effected by incubation activity, although the intensity of these effects may differ between bacterial groups.

To our knowledge, this is the first study specifically testing effects of incubation driven microclimatic variation of RH within a cavity nest in a wild European passerine in a temperate habitat.

2. Methods

2.1. Study area and species

We conducted this study during the spring of 2009 on a population of pied flycatchers breeding in artificial nest-boxes in a montane forest of pyrenean oak, *Quercus pyrenaica*, at 1200 m above the sea level in central Spain (40° 54' N, 04° 01' W). The pied flycatcher is a small hole-nesting passerine of European woodlands that readily accepts artificial nest-boxes for breeding and is frequently used as a model species in behavioural ecology (Lundberg and Alatalo, 1992). Egg laying in this population typically begins in late May, and modal clutch size is six. Eggs are laid within a well defined semi-spherical nest-cup mainly composed of strips of bark (Moreno et al., 2009) and are incubated solely by the female.

2.2. Nest microclimatic relative humidity and temperature measurements

We visited nest-boxes daily at early morning once nests were fully lined indicating that females were about to lay. Thus, we exactly recorded the day of clutch initiation. On the day of lay of

the third egg (day 3, hereafter), we placed HOBO® Data Loggers (Onset Computer Corporation, MA) inside 36 nest-boxes occupied by pied flycatchers. We unwound the temperature sensor wire from the circuit board and extended it through the nest material until the small sensor (1.5 mm) showed up in the middle of the nest-cup just between the eggs. This setup allowed the measurement of temperature just between the eggs. The humidity sensor could not be used outside the logger box according to technical indications of use of the logger. Thus, we measured relative humidity of the air within the nest-box just below the position of the eggs in the nest-cup. We started measurements at 13:00 h on day 3 and programmed the data-loggers with a 1 min measuring interval covering part of the daytime period for day 3 and complete daytime periods for days 4 and 5. A previous study in this population showed that most females start nocturnal incubation after completion of the clutch (Ruiz-de-Castañeda et al., in press), so we will only consider daytime incubation in this study. Observatorio Astronómico Nacional provided us with information about sunrise and sunset in our study site during the study period (May 12 to June 2). We specifically selected day 3 to initiate measurements as no female has been found on eggs prior to that day during more than two decades of nest checks in our study population.

To control for the effects of nest material on microclimate inside nests, we also measured microclimatic humidity and temperature within 28 nest-boxes containing unoccupied nests randomly distributed in the study area. The entrance of these nest-boxes was blocked using a metallic mesh only allowing the circulation of air but preventing the entrance of birds. Within 16 of these nest-boxes we placed pied flycatcher nests collected during previous breeding seasons in nearby study areas, while in the remaining 12 nest-boxes we introduced similar amount of material and constructed artificial nests with equivalent composition and structure as in natural nests. Data loggers were then placed in these control nest-boxes in the same way as we did in nests occupied by pied flycatchers. We programmed data-loggers with a 24 s measuring interval covering part of two daytime periods from 13:00 h on a randomly selected day during the laying period of flycatchers in the study area to 10:15 h on the day after. We specifically considered the daytime period of the first day of measurements because it covered the central daytime hours when ambient temperature is expected to reach its maximum (13:00–16:00 h).

We did not visit nest-boxes while data-loggers were measuring. The program BoxCar® Pro 4 (Onset Computer Corporation, MA) allowed a read-out of the loggers after removal from nest-boxes. From this read-out we calculated the mean RH in % during incubation activity for the total period covering days 3–5.

2.3. Field microbiological sampling

We marked eggs 1–3 with a small dot on the morning they were laid using a permanent marker pen. We could not mark the remaining eggs of the clutch since data-loggers were measuring while they were laid and we did not visit nest-boxes during this period. We identified the last laid egg among the 2 (clutch size 5) or 3 (clutch size 6) non-marked eggs by the size of the air bubble (Pitts, 1995). We sampled eggshell bacteria once on the same morning of removal of the data-loggers from the nest. We sampled all eggs in the clutch excepting the last laid egg, as it was not exposed to incubation during the laying period. There were no significant differences in eggshell loads of each of the three types of bacteria due to differences in the number of eggs sampled (4 and 5 in clutches of 5 and 6 eggs, respectively) (all $F \leq 1.02$, $P \geq 0.32$).

To minimize the possible contamination of the sample with external bacteria not directly associated with the sampling surface we always handled eggs with latex gloves previously disinfected

* Corresponding author. Tel.: +34 91 411 13 28x1218.
E-mail address: rrdcb@mncn.csic.es (R. Ruiz-De-Castañeda).



P L U M A S

DEGRADABILIDAD BACTERIANA DE UN ORNAMENTO NO MELANIZADO A NIVEL INTRA-PLUMA: ¿UN ROL PARA LAS BACTERIAS DEGRADADORAS DE PLUMAS EN LA SELECCIÓN SEXUAL?

Rafael Ruiz-de-Castañeda,
Edward H. Burt Jr, Sonia González-Braojos y Juan Moreno

El impacto de los bacilos degradadores de plumas sobre éstas depende de la presencia o ausencia de melanina. Estudios *in vitro* han mostrado que las plumas no melanizadas (blancas) son más degradables por las bacterias que las melanizadas (oscuras). Sin embargo, no existe ningún estudio previo que haya analizado los posibles efectos de los bacilos degradadores de plumas sobre la ocurrencia de patrones de bandas o manchas no melanizadas en plumas melanizadas. El papamoscas cerrojillo *Ficedula hypoleuca* es un paseriforme sexualmente dimórfico con bandas alares blancas que consisten en bandas no melanizadas en plumas de vuelo oscuras. Estas bandas están consideradas como una señal sexualmente seleccionada en papamoscas del género *Ficedula*, especialmente en machos donde estas bandas son más conspicuas (mayor tamaño y posiblemente más blancas) que en hembras. Usando tests de degradación de plumas *in vitro*, comparamos la degradabilidad de áreas no melanizadas y melanizadas dentro de la misma pluma para 127 primarias obtenidas de 58 machos y 69 hembras durante su reproducción en el centro de España. También estudiamos posibles diferencias entre sexos en la degradabilidad de estos fragmentos de plumas. En base a la teoría de la honestidad de las señales y al hecho de que la selección sexual es más intensa en machos que en hembras para señalar la calidad de las plumas, predcimos que las áreas no melanizadas deberían ser más degradables por las bacterias que las melanizadas dentro de la misma pluma, y que estas áreas no melanizadas también deberían ser más degradables en machos que en hembras. Confirmamos ambas predicciones. Diferencias microestructurales entre las dimensiones de la sección transversal de barbas no melanizadas y melanizadas pero la ausencia de diferencias en la densidad de barbas entre áreas no melanizadas y melanizadas en machos y hembras, podría explicar en parte las diferencias en degradabilidad. Este es el primer estudio que muestra diferencias en la degradabilidad entre marcas dentro de la misma pluma y entre bandas no melanizadas entre machos y hembras en el sentido esperado según la teoría de la selección sexual.

S A M W L P

BACTERIAL DEGRADABILITY OF AN INTRA-FEATHER UNMELANIZED ORNAMENT: A ROLE FOR FEATHER-DEGRADING BACTERIA IN SEXUAL SELECTION?

RAFAEL RUIZ-DE-CASTAÑEDA¹, *, EDWARD H. BURTT JR², SONIA GONZÁLEZ-BRAJOS¹ and JUAN MORENO¹

¹Departamento de Ecología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC, José Abascal 2, 28006, Madrid, Spain

²Department of Zoology, Ohio Wesleyan University, Delaware, OH 43015, USA

The impact of feather-degrading bacilli on feathers depends on the presence or absence of melanin. *In vitro* studies have demonstrated that unmelanized (white) feathers are more degradable by bacteria than melanized (dark) ones. However, no previous study has looked at the possible effect of feather-degrading bacilli on the occurrence of patterns of unmelanized patches on otherwise melanized feathers. The pied flycatcher *Ficedula hypoleuca* is a sexually dimorphic passerine with white wing bands consisting of unmelanized patches on dark flight feathers. These patches are considered to be a sexually selected trait in *Ficedula* flycatchers, especially in males where these patches are more conspicuous (larger and possibly whiter) than in females. Using *in vitro* tests of feather bacterial degradation, we compared degradability of unmelanized and melanized areas of the same feather for 127 primaries collected from the same number of individuals in a population breeding in central Spain (58 males and 69 females). In addition, we also looked for sex differences in feather degradability. Based on honest signalling theory and on the fact that there is stronger sexual selection on males to signal feather quality than in females, we predicted that unmelanized areas should be more degradable by bacteria than melanized ones within the same feather, and that these unmelanized areas should also be more degradable in males than in females. We confirmed both predictions. Micro-structural differences between cross-section dimensions of unmelanized and melanized barbs but not differences in the density of barbs within unmelanized and melanized areas of feathers in males and females, could partly explain differences in degradability. This is the first study to show differences in bacterial degradability among markings on the same feather and among unmelanized patches between males and females in the sense predicted by sexual selection theory.

KEYWORDS: Feather-degrading bacteria - melanin-based signal - sexual selection - pied flycatchers.

INTRODUCTION

Feather-degrading bacteria (FDB), a polyphyletic assemblage of microorganisms that colonize the plumage of most wild birds (Burt & Ichida, 1999; Whitaker et al., 2005; Shawkey et al., 2007, 2009; Gunderson et al., 2009), have recently received increasing attention from avian ecologists (see for a review Gunderson, 2008; Burt, 2009). Although no experimental study has to date demonstrated the detrimental effects of FDB on feathers under natural conditions, correlative evidence suggests that these bacteria are active on the plumage and can damage it (Gunderson et al., 2009; Shawkey et al., 2009). Moreover, the evolution of antibacterial defences such as uropygial oils (Shawkey et al., 2003; Reneerkens et al., 2008) suggests that FDB are a real threat for avian plumage in the wild.

An important issue in the context of avian optical communication is the association of the keratinolytic activity of *Bacillus licheniformis*, the most studied FDB, with feather coloration. Previous studies have shown that the expression of carotenoid-dependent plumage signals is negatively related to endogenous (Nolan et al., 1998; Brawner et al., 2000; Hill et al., 2004) and exogenous bacterial infections (Shawkey et al., 2009). FDB also alter the blue structural coloration of feathers (Shawkey et al., 2007; Gunderson et al., 2009). Evidence for domestic (Goldstein et al., 2004; Gunderson et al., 2008) and wild avian species (Burt et al., 2010) suggests that

Biological Journal of Linnean Society in press

DEGRADABILIDAD BACTERIANA DE UNA SEÑAL BLANCA DEL PLUMAJE: ASOCIACIONES CON EL ESFUERZO PARENTAL Y FECHA DE REPRODUCCIÓN EN UN PASERIFORME MIGRADOR

Rafael Ruiz-de-Castañeda,
Edward H. Burt Jr, Sonia González-Braojos y Juan Moreno

El desgaste de las plumas en aves adultas se acentúa durante el periodo de pollos, cuando los padres afrontan mayores cargas de trabajo y tienen menor disponibilidad de tiempo y recursos para la protección de su plumaje. Los costes de la reproducción en términos de condición de las plumas podrían ser diferente para machos y hembras, especialmente cuando consideramos señales sexualmente seleccionadas. Asumiendo que las plumas en peor condición son más vulnerables a daños futuros, nos interesamos particularmente en la degradabilidad bacteriana *in vitro* de un ornamento sexual y socialmente seleccionado, la banda blanca de las plumas alares primarias y secundarias en papamoscas cerrojillos *Ficedula hypoleuca* durante la etapa de reproducción. Esta banda se compone de la porción blanca no melanizada en la base de las plumas de vuelo, que en un estudio previo ya han sido descritas como mayores y más degradables en machos que en hembras. Comparamos la degradabilidad bacteriana *in vitro* de la banda blanca y su área melanizada contigua de la cuarta pluma primaria en machos y hembras adultos cuando sus pollos tenían 13 días de vida y lo relacionamos con el peso y tamaño de nidada, y la fecha de puesta. Los machos de papamoscas cerrojillo pero no las hembras mostraron una correlación positiva entre la degradabilidad de su ornamento y el peso y tamaño de la nidada, lo cual sugiere que el ornamento del macho es una señal honesta de la capacidad de afrontar lesiones en plumas de vuelo, por el contrario en hembras la señal es menos indicadora. La degradabilidad bacteriana de los ornamentos de machos y hembras estaba positivamente correlacionada con la fecha de puesta, lo que indica que los individuos tempranos tienen plumas de vuelo más resistentes. El peso de la nidada y la fecha de puesta no estaban asociadas con la degradabilidad bacteriana *in vitro* del área melanizada de las plumas. Un coste adicional de la reproducción para los padres podría ser una mayor degradación de las plumas por el ataque bacteriano.

S
A
M
D
P

BACTERIAL DEGRADABILITY OF A WHITE PLUMAGE SIGNAL: ASSOCIATIONS WITH PARENTAL EFFORT AND BREEDING DATE IN A MIGRATORY BIRD

RAFAEL RUIZ-DE-CASTAÑEDA¹ , *, EDWARD H. BURTT JR², SONIA GONZÁLEZ-BRAOJOS¹, JUAN MORENO¹

¹Departamento de Ecología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC José Abascal 2, 28006, Madrid, Spain

²Department of Zoology, Ohio Wesleyan University, Delaware, OH 43015, USA

*Corresponding author: rrdcb@mncn.csic.es

Feather wear of parent birds becomes accentuated during the nestling period, when they face higher workloads and have less time and resources available to protect their plumage. Costs of reproduction in terms of feather condition could be different for males and females, especially when considering sexually selected plumage markings. Assuming that feathers in poor condition are more vulnerable to future threats, we were particularly interested in *in vitro* bacterial degradability of a sexually and socially selected plumage ornament, the white wing patch of primary and secondary feathers in reproducing pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. This band is composed of the unmelanized white basal sections of flight feathers which have been shown in another study to be larger and more degradable by bacteria in males than in females. We compared the *in vitro* bacterial degradability of the white patch and of the contiguous melanized area of the fourth primary feather in male and female parents when their nestlings were 13 days and related it to brood mass, brood size and laying date. Male pied flycatchers but not females showed a positive correlation between bacterial degradability of their ornament and brood mass and size, which suggests that the male ornament is an honest signal of the capacity to sustain flight feather damage, while the signal is less indicative in females. Bacterial degradability of male and female ornaments was positively correlated with laying date, which indicates that early breeders have more resistant flight feathers. Brood mass and laying date were not associated with *in vitro* bacterial degradability of the melanized area of the feathers. Parents may pay the cost of reproduction also in terms of increased feather degradation by bacteria.

Key words: Feather degrading bacteria, melanin, sexual selection, parental care, breeding phenology.

INTRODUCTION

Feathers are inert tegumental appendages of birds that wear down and break gradually under natural conditions since their production during molt (Vágási et al. 2011). Physical abrasion, which mainly results from the impact of airborne particles and/or the rubbing of different objects in the environment against feathers, is the most obvious cause of damage and has thus for long been known by avian ecologists (Barrowclough and Sibley 1980; Burt 1986; Bonser 1995). Feather lice have also received considerable attention and have been suggested as the cause of holes on feathers, though this conclusion is still controversial (Pap et al. 2005; Vas et al. 2008). Thus, certain damages initially attributed to feather lice could be instead the consequence of bacterial degradation of feathers (Vágási et al. 2010). However, feather degrading bacteria (FDB) have only been recently considered in this context (Burt and Ichida 1999) and only a few studies have explored their effects under natural conditions (Shawkey et al. 2009; Gunderson et al. 2009; Saag et al. 2011). These abiotic and biotic factors may operate simultaneously, complementarily and additively in natural environments (Vágási et al. 2011), thereby partly driving the evolution of feathers towards the production of more resistant structures, for instance through their melanisation (Bonser 1995; Goldstein et al. 2004, Ruiz-de-Castañeda et al. in press) or through the application of external chemical substances such as uropygial oil during preening (Shawkey et al. 2003; Moreno-Rueda 2011).

By the end of the reproductive cycle feathers reach their poorest physical state and are thus