

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biología con Énfasis en Biotecnología**

Informe Escrito Final

Determinación de la microbiota bacteriana asociada al tracto intestinal de la nutria neotropical *Lontra longicaudis* (Mustelidae) en el río Peñas Blancas, Alajuela, Costa Rica, como un aporte para la evaluación de la salud poblacional y el manejo de la especie

“Tesis de Grado” presentada como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Biología con Énfasis en Biotecnología

Estudiante: B.Sc. Joshua Vargas Calvo (cédula: 402320703, carné: 141461)

**Campus Omar Dengo
Heredia, 2025**

Este trabajo de graduación fue Aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.



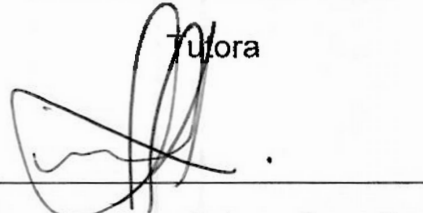
Dr. Frank Solano Campos
Representante, Decano, quién preside



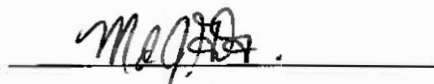
M.Sc. Rodolfo Umaña Castro
Representante de la Dirección de la (ECB)



Dra. Kinndle Blanco Peña



Dra. Stefany Solano González
Asesora



Dra. María de Jesús Arias Andrés
Asesora

M.Ed. Carolina Sancho Blanco
Invitada especial

Agradecimientos

Agradezco a mi comité asesor por la guía brindada durante este trabajo y al PhD. Frank Solano Campos, encargado del Laboratorio de Biotecnología de Plantas (LBP) por el gran aporte a esta investigación.

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a Mary por ser mi apoyo en este proceso y a Steven, que su espíritu siempre camina conmigo.

Índice

Miembros del tribunal	I
Agradecimientos.....	II
Dedicatoria.....	III
Índice.....	IV
Índice de cuadros.....	V
Índice de figuras.....	VI
Índice de anexos.....	VIII
Abreviaturas.....	IX
Resumen	X
1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Justificación.....	5
1.3. Planteamiento del problema.....	6
1.4. Objetivos.....	6
1.4.1. Objetivo general.....	6
1.4.2. Objetivos específicos.....	6
2. Marco Teórico.....	7
3. Marco Metodológico.....	14
4. Resultados.....	20
5. Discusión.....	28
6. Conclusiones y Recomendaciones.....	32
7. Fuentes de financiamiento.....	32
8. Conflictos de interés.....	33
9. Referencias.....	33
10. Anexos.....	44

Índice de cuadros

No se presentan cuadros en el cuerpo de esta investigación.

Índice de figuras

Figura 1. Mapa del sector de la cuenca del río Peñas Blancas, en donde se colectaron las 94 muestras fecales (2019–2020) de los ríos Burro, Burrito, Chachagua, Chachagüita, Fortuna, Pajuila y Peñas Blancas, los cuales se ubican en los cantones de San Ramón y San Carlos, Alajuela (10°15'-10°31' N, 84°28'-84°46' O). La parte alta de la cuenca es mayoritariamente formada bosques protegidos, mientras las partes media e inferior tienen mayor diversidad de usos del suelo.....	15
Figura 2. Mapas de calor de la abundancia relativa de los 20 filos (A), clases (B) y géneros (C) más abundantes en las muestras fecales de nutrias de las diferentes subdivisiones de la cuenca.....	21
Figura 3. Abundancia relativa del filo Acidobacteriota en los diferentes sitios de muestreo: RPb (Represa Peñas Blancas, n= 2), Pb (Peñas Blancas, n= 11), Paj (Pajuila, n= 4), ChA (Chachagua, n= 4), Chta (Chachagüita, n= 1), Bto (Burrito, n= 1), Bb (Burro, n= 28), For (Fortuna, n= 24). ALDEx2 reveló un aumento significativo en Acidobacteriota en el sitio de la represa.....	22
Figura 4. Relación lineal entre géneros utilizando SECOM, estimada mediante la medida de correlación de distancias, filtrada por valor p. Se observan correlaciones negativas entre <i>Cetobacterium</i> y seis géneros distintos, además de correlación positiva entre <i>Paraclostridium</i> y <i>Romboutsia</i>	23
Figura 5. Diferencias en los índices de diversidad alfa entre los tipos de uso de la tierra en la cuenca del río Peñas Blancas, Costa Rica, basadas en la diversidad de Shannon. Las muestras se distribuyeron en las categorías de bosque (n= 2), pasto (n= 50), agricultura en pastizales (n= 14) y cultivos permanentes (n= 9).....	24
Figura 6. Diferencias en la diversidad de Shannon entre las muestras de la subdivisión media de la cuenca. Las muestras se distribuyeron en las categorías de bosque (n = 0), pasto (n = 40), agricultura en pastizales (n = 12) y cultivos permanentes (n = 9).....	25
Figura 7. Diversidad filogenética entre las tres subdivisiones de la cuenca del Río Peñas Blancas. Se observan diferencias significativas entre la parte alta y media (p = 0.03). PD = Diversidad filogenética.....	26

Figura 8. Diagrama de Venn de las ASVs centrales compartidas por diferentes subdivisiones de cuenca. Las ASVs centrales representan el 0.1% de la abundancia total y están presentes en al menos el 80% de las muestras de un grupo determinado.....27

Figura 9. PCoA con distancias UniFrac ponderadas para el uso del suelo y el sitio de muestreo.....28

Índice de anexos

Cuadro 1S. Datos de colecta de las muestras en la cuenca del Río Peñas Blancas entre los años 2019 y 2020.....	44
Cuadro 2S. Índice y longitud de la secuencia consenso de las secuencias de la región de control del ADNmt obtenidas de las muestras.....	49
Figura 1S. Relación linear con SECOM a nivel de clase, estimada mediante la medida de correlación de distancias, filtrada por valor p. Se destaca la correlación positiva entre Negativicutes y Coriobacteriia (Pearson 0.91).....	51
Figura 2S. Relación linear con SECOM a nivel de filo, estimada mediante la medida de correlación de distancias, filtrada por valor p. Se destaca la correlación positiva entre Verrucomicrobiota y Actinobacteriota (Pearson 0.78).....	52

Abreviaturas o acrónimos

IUCN	<i>Union for Conservation of Nature</i>
NGS	Secuenciación de Nueva Generación
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
COI	Subunidad 1 de la Citocromo oxidasa C mitocondrial
INSDC	<i>Nucleotide Sequence Database Collaboration</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
DDBJ	<i>DNA DataBank of Japan</i>
ENA	<i>European Nucleotide Archive</i>
IRET	Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas
ECOTOX	Laboratorio de Estudios Ecotoxicológicos
ASV	<i>Amplified Sequence Variants</i>

Resumen

La nutria neotropical (*Lontra longicaudis*) es un mustélido ampliamente distribuido en América, que posee un rol clave como depredador superior en ecosistemas acuáticos. Su adaptabilidad a diferentes climas la convierte en un bioindicador potencial de la salud de los ecosistemas. A pesar de su importancia ecológica, la investigación sobre esta especie es limitada, especialmente en Costa Rica. Este estudio explora su microbiota intestinal en una cuenca costarricense, con el objetivo de mejorar el entendimiento de su salud y contribuir a su conservación. Se analizaron 75 muestras de heces utilizando secuenciación del gen 16S ARNr, obteniendo 5.590.892 lecturas y 9.287 ASV, con 25 filos bacterianos identificados. Los más abundantes fueron Fusobacteriota, Proteobacteria y Firmicutes. La proporción elevada de Firmicutes/Bacteroidota (F/B) sugiere una posible disbiosis, relacionada con alteraciones en el microbioma de mamíferos. El análisis de correlación reveló relaciones significativas entre filos, destacando la asociación entre Verrucomicrobiota y Actinobacteriota, vinculados a la respuesta inmunitaria. Los análisis de diversidad alfa mostraron diferencias significativas entre muestras según el uso del suelo ($p = 0.0043$), siendo las zonas de cultivos permanentes las de menor diversidad microbiana, lo que indica un impacto antropogénico. Por otro lado, los análisis de diversidad beta confirmaron que la composición microbiana variaba entre lugares ($p = 0.002$) y usos del suelo ($p = 0.015$), con los paisajes agrícolas como los de mayor influencia. Además, se identificaron taxones bacterianos clave asociados a lugares específicos, como Desulfobacterota y Bdellovibrionota. El enriquecimiento de Acidobacteriota en el embalse de una presa sugiere presiones de selección ambiental. Este estudio resalta la relevancia del microbioma como indicador de salud ecológica, subrayando su potencial para monitorear cambios ambientales y orientar estrategias de conservación.

1. Introducción

Un enfoque que está tomando importancia para la biología de la conservación es el estudio del microbioma asociado a los mamíferos mediante el *metabarcoding* de ADN (Schmidt et al., 2013), apoyado por herramientas de Secuenciación de Nueva Generación (NGS). Las comunidades microbianas participan de forma activa en la nutrición, desarrollo y salud de los animales que habitan, tanto a nivel individual como poblacional (McFall-Ngai et al., 2013). Además, la resistencia de las poblaciones animales al estrés y a enfermedades provocadas por cambios en su hábitat está asociada a la composición microbiana que poseen (Bahrndorff et al., 2016), la cual podría verse afectada por la calidad de los ecosistemas.

Ciertos microorganismos han sido utilizados como indicadores para evaluar la calidad del agua. Sin embargo, análisis ecológicos más profundos sobre animales requieren del conocimiento de su composición microbiana (Van Rossum et al., 2015). El microbioma animal también es sensible a cambios externos a su hospedero (Adamovsky et al., 2018), como aquellos que pueden ocurrir en las aguas donde habitan mamíferos acuáticos y estos pueden afectar el mantenimiento de la salud del hospedero (Moun et al., 2024).

La nutria neotropical *Lontra longicaudis* es un mamífero mustélido ampliamente distribuido en América, desde el norte de México hasta Argentina, conocido por su alta tolerancia a diversas perturbaciones ambientales (Rheingantz et al., 2014). Pese a encontrarse en una gran cantidad de países, esta especie es una de las menos estudiadas dentro de los 13 miembros de la subfamilia Lutrinae (Rheingantz et al., 2014). Como depredador dominante en los ecosistemas acuáticos que habita, desempeña un papel vital al regular las poblaciones de otros organismos (Gomez et al., 2014), pero su estado de conservación según la última actualización de la Lista Roja de Especies Amenazadas de la *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), es de “Casi Amenazada” (NT, por sus siglas en inglés) (Rheingantz & Trinca, 2015).

Los cambios ambientales y las actividades antropogénicas pueden influir en la densidad poblacional, lo que la convierte en un posible bioindicador de la salud de los ecosistemas acuáticos (Gomez et al., 2014). Sin embargo, la investigación sobre estos animales en Costa Rica y otras regiones sigue siendo limitada, especialmente en lo que respecta a sus aspectos

ecológicos (Navarro-Picado et al., 2017; Smith et al., 2020). Por lo tanto, la exploración de nuevos enfoques, como el estudio de la microbiota intestinal, es fundamental para comprender la salud de esta especie y contribuir a su conservación (Adamovsky et al., 2018; Trevelline et al., 2019).

El metabarcoding de ADN, que implica la secuenciación de productos de PCR obtenidos a partir de ADN ambiental, permite la identificación de taxones microbianos con alta resolución en muestras complejas (Schmidt et al., 2013). Se ha demostrado que la microbiota intestinal desempeña un papel crucial en la comunicación y puede reflejar el estado de salud de un individuo (Yu et al., 2017). Por tanto, comprender la composición y variabilidad de la microbiota intestinal en *L. longicaudis* puede proporcionar información valiosa sobre la salud de su población, particularmente en respuesta a cambios externos (Bahrndorff et al., 2016; Valentini et al., 2016).

Los estudios sobre la microbiota de los mamíferos suelen basarse en métodos no invasivos, como el análisis de muestras fecales, lo que permite una asignación taxonómica eficiente (Combrink et al., 2023). Sin embargo, la investigación sobre la microbiota intestinal de *L. longicaudis* es limitada, especialmente en Costa Rica, donde la especie está protegida legalmente (Dias et al., 2019). Por ello, este estudio tiene como objetivo determinar la composición y variabilidad de la comunidad bacteriana asociada al tracto intestinal de *L. longicaudis* en el río Peñas Blancas, Costa Rica. Al establecer una línea base para futuras investigaciones y programas de manejo, esta investigación puede aportar información sobre la salud de esta especie y contribuir a su conservación (Rheingantz, Santiago-Plata, et al., 2017).

1.1. Antecedentes

Dentro de los carnívoros mustélidos, la nutria neotropical *L. longicaudis* es una especie de interés por su amplia distribución en el continente americano (Rheingantz et al., 2014). La alimentación de esta especie ha sido estudiada a partir del análisis de excretas y se ha determinado que su dieta está principalmente compuesta por crustáceos y peces (Navarro-Picado et al., 2017).

En Costa Rica, la investigación sobre *L. longicaudis* es reducida (Guizado-Batista et al., 2024; Guizado-Batista et al., 2025). En un estudio de habitabilidad de ríos se documentó

que el ancho del río y la proporción de bosque adyacente a este son los factores principales para la presencia de la especie (Navarro-Picado et al., 2017). Además, evidencia obtenida a partir de un estudio en el río Paraná, Argentina, reveló que estos animales también prefieren sitios que los protegen de fuertes corrientes y aquellos en donde se desarrolla la silvicultura, por la creación indirecta de canales acuáticos que aprovechan para moverse (Gomez et al., 2014).

Mediante distintos modelos de distribución se ha observado una disminución en la presencia de *L. longicaudis* cerca de asentamientos humanos, por lo que la caza podría ser una de las principales limitantes antropogénicas en la expansión de sus territorios (Gomez et al., 2014). En la Península de Osa en Costa Rica se ha implementado el uso de cámaras trampa junto con el muestreo indirecto por heces y huellas para estudiar la selección de hábitat de esta especie. Con base en los datos recabados, se determinó que es atraída por ríos cercanos a pastizales con tramos de bosque fragmentados en lugar de bosques densos y que su tolerancia frente a los ambientes perturbados por humanos se debe a una estrategia para evitar a sus depredadores, los cuales son más sensibles a estas alteraciones (Smith et al., 2020). Además, distintas propiedades del agua, como el pH, la temperatura, el nivel de oxígeno disuelto y la turbidez, pueden alterar indirectamente la presencia de nutrias (Cruz García et al., 2017; Moun et al., 2024).

El metabarcoding se basa en la amplificación de regiones específicas de ADN que funcionan como códigos de barra genéticos en distintos grupos de organismos, así como en el uso de herramientas de Secuenciación de Nueva Generación (NGS) para conocer la identidad de esos organismos (Schmidt et al., 2013). Una de las plataformas de NGS más utilizadas es Illumina, la cual ofrece una ventaja por su bajo costo y la gran cantidad de información genética disponible en bases de datos que se ha generado con esta tecnología (Hodkinson & Grice, 2015). De esta forma se puede maximizar la representatividad de cada organismo presente en muestras complejas, ya que en ocasiones es posible descartar secuencias que no se adecúan a las condiciones necesarias para análisis posteriores (Schmidt et al., 2013).

El uso de plataformas de NGS se ha implementado en el estudio de la comunidad microbiana (microbioma) intestinal y la relación que tiene con aspectos evolutivos de su hospedero mediante la secuenciación de la región codificante para el ARNr (ARN ribosomal) 16S (Sanders et al., 2015). A partir de muestras fecales se han realizado análisis de

metabarcoding en distintos grupos de mamíferos terrestres como el hormiguero gigante (*Myrmecophaga tridactyla*), murciélagos de familias con distintos hábitos alimenticios e incluso, mamíferos acuáticos (Delsuc et al., 2014; Sanders et al., 2015; Ingala et al., 2018). Además, la detección de taxones en ecosistemas acuáticos utilizando metabarcoding puede ser mayor que con métodos tradicionales, con el fin de generar conocimiento aplicable a la ecología y conservación de especies frágiles ante cambios climáticos (Valentini et al., 2016). El metabarcoding se ha empleado en la determinación de la dieta de la nutria euroasiática (*Lutra lutra*) a partir de muestras fecales (Kumari et al., 2019), y ha revelado además que existen cambios estacionales en las especies de peces consumidas por estos mamíferos (Martínez-Abraín et al., 2020).

El metabarcoding también ha sido aplicado para conocer la composición y diversidad viral en muestras fecales de mamíferos carnívoros, así como para hallar nuevos virus y variantes previamente no registradas en sus poblaciones (Bodewes et al., 2014). En humanos, se ha determinado la variación del microbioma intestinal por el uso de medicamentos mediante la estrategia de *pooling* de ADN, con el fin de disminuir costos (Ray et al., 2019). Además, al estudiar la asociación entre enfermedades como el cáncer colorrectal y la microbiota intestinal en poblaciones humanas, se ha encontrado cambios en el enriquecimiento de ciertas bacterias en muestras fecales de individuos sanos y enfermos, así como nuevos genes marcadores por PCR en tiempo real (Yu et al., 2017).

El microbioma asociado a un animal cumple funciones en diversos aspectos de su salud, como el aprovechamiento de energía a partir del alimento, defensa contra distintos patógenos e incluso en su comportamiento (McFall-Ngai et al., 2013; Suzuki, 2017). Las interacciones entre hospederos pueden provocar variaciones en su microbioma, el cual incluso participa recíprocamente en la comunicación de individuos. En mamíferos, las señales de olor son importantes para el reconocimiento, y el microbioma involucrado en glándulas productoras de estos olores difiere en especies similares, así como entre grupos sociales, o en dependencia del sexo y estado de madurez que posea el animal (Suzuki, 2017). Dentro de los mamíferos que utilizan este tipo de comunicación se encuentran carnívoros como los tejones y las nutrias (Roberts et al., 2016).

Gran cantidad de los estudios en *L. longicaudis* están dirigidos a la descripción de su alimentación y distribución, pero aún no se conoce su microbiota gastrointestinal. El

microbioma central de una especie brinda información relevante sobre su fisiología y estado de salud (Singh & Kothari, 2017), por lo tanto, este podría utilizarse como una base para la detección de alteraciones en poblaciones de animales (Trevelline et al., 2019). Existe un creciente interés por complementar la biología de la conservación con análisis del microbioma gastrointestinal (Bahrndorff et al., 2016). Con base en esto, se resalta la importancia de estudiar la comunidad bacteriana y los factores que inciden sobre la calidad del agua en los ecosistemas donde habitan poblaciones de especies como la nutria neotropical, por su relevancia ecológica y su estado de conservación a nivel mundial (Rheingantz & Trinca, 2015).

1.2. Justificación

Los miembros de la especie *L. longicaudis* son depredadores que se encuentran en la cima de la red trófica dentro de los ecosistemas en los que habitan, funcionando como controladores de otros organismos en los cuerpos de agua dulce (Gomez et al., 2014). Viven principalmente en ríos y lagunas de aguas claras, y su densidad poblacional se puede ver afectada por factores ambientales y antropogénicos, por lo que se puede considerar un organismo bioindicador de la calidad de ciertos ecosistemas acuáticos (Gomez et al., 2014). Por esta razón, la generación de nueva información sobre la biología de esta especie es de gran importancia para los proyectos de conservación aplicados a sus hábitats.

La información concerniente a esta especie está centrada principalmente en aspectos de distribución, alimentación y comportamiento, además de que la mayoría de las investigaciones han sido realizadas en pocos países, como: México, Brasil y Uruguay (Ramírez-Bravo et al., 2013), por lo que hay un déficit importante en otros aspectos ecológicos relacionados con estos mamíferos. La microbiota asociada a una especie puede brindar mucha información con respecto a su estado de salud, así como para ampliar el conocimiento a nivel ecológico desde un punto de vista distinto al que ha sido generado hasta el momento (Bahrndorff et al., 2016; Trevelline et al., 2019). Las herramientas basadas en el estudio de ADN ambiental han sido utilizadas para conocer las comunidades microbianas asociadas a distintos organismos, principalmente a partir de tejidos o excretas obtenidos de los mismos (Singh & Kothari, 2017).

Implementar el uso de análisis basados en ADN como el metabarcoding constituye un avance promisorio hacia un mejor entendimiento de las dinámicas poblacionales de las

nutrias de río y su relación con parámetros que permitan el manejo de esta especie. Por lo anterior el uso de herramientas bioinformáticas para el análisis de este tipo de datos resulta esencial para comprender la comunidad bacteriana asociada al tracto intestinal de *L. longicaudis* y visualizar potenciales modificaciones a este microbioma por las características físico-químicas del agua en su hábitat. Esta información proveerá conocimiento a nivel ecológico de las poblaciones de nutrias en los ecosistemas de agua dulce en Costa Rica y su aplicación se podría ver reflejada en futuros programas de manejo.

1.3. Planteamiento del problema

Teniendo en cuenta el rol que cumplen las nutrias en los ecosistemas acuáticos como depredadores y su estado de conservación actual, es necesario generar nueva información ecológica mediante la aplicación de las distintas herramientas biotecnológicas. Además, el estudio de la microbiota gastrointestinal asociada puede utilizarse como un indicador de la salud poblacional de *L. longicaudis*; factor que ha sido inexistente en las poblaciones de nutrias en Costa Rica. Por tanto, se pretende responder a las siguientes preguntas:

- ¿Cómo varía la comunidad bacteriana asociada al tracto intestinal de la población de nutrias que habitan en la cuenca del río Peñas Blancas con base en las características físicas del mismo?
- ¿De qué forma puede asociarse esta variabilidad con la ecología de la especie?

1.4. Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Generar información que pueda utilizarse para el mejoramiento de los planes de manejo de la nutria neotropical (*Lontra longicaudis*), con base en la posible influencia de las características físicas de la cuenca del río Peñas Blancas en la salud poblacional de estos animales, tomando como indicador la variabilidad en la composición de su microbiota bacteriana intestinal.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Estimar la composición de la microbiota bacteriana asociada al tracto intestinal de las nutrias que habitan en la cuenca del río Peñas Blancas mediante un análisis

- bioinformático de asignación de taxonomía para la generación de conocimiento en esta especie.
2. Contrastar la variación en la composición bacteriana del tracto intestinal de las nutrias respecto a las características físicas del río Peñas Blancas, para la identificación de aspectos que podrían influir en los resultados.
 3. Identificar las posibles implicaciones de la microbiota bacteriana sobre la conservación de la especie en la zona de estudio, como un insumo para el mejoramiento de los planes de manejo.

2. Marco Teórico

2.1. Aspectos ecológicos de la nutria neotropical

2.1.1. Ecología y alimentación de las nutrias

Las nutrias son mamíferos semi-acuáticos pertenecientes a la subfamilia Lutrinae, la cual a su vez se encuentra dentro de la familia Mustelidae, la más grande del orden Carnivora (Rheingantz, Santiago-Plata, et al., 2017). En el continente americano se encuentran seis de las 13 especies de nutrias conocidas actualmente y entre ellas *L. longicaudis*, conocida como la nutria neotropical.

L. longicaudis destaca por tener la más amplia distribución geográfica, ya que puede encontrarse desde México hasta el norte de Argentina. Por ello, se considera que su tolerancia para los distintos climas presentes en esta región es alta (Rheingantz et al., 2014). Poseen una longitud similar a la nutria norteamericana (*L. canadensis*), ya que miden entre 1.2 y 1.7 m cuando son adultos. Generalmente no sobrepasan los 12 kg, aunque pueden llegar a pesar hasta 15 kg. Su cuerpo es elongado, con una cola que mide cerca de un tercio de este y una cabeza pequeña con un cuello grueso y musculoso. Además, presentan un dimorfismo sexual en donde el macho es cerca de un 25% más grande que la hembra (Rheingantz, Santiago-Plata, et al., 2017).

Las características anatómicas de *L. longicaudis* lo vuelven un especialista en cazar presas acuáticas, siendo los peces su fuente de alimentación principal (Rheingantz, de Menezes, et al., 2017). Sin embargo, su dieta está compuesta además por crustáceos, anfibios,

aves y reptiles gracias a sus hábitos oportunistas y a su adaptabilidad ante la disponibilidad de alimento (de Pinho et al., 2018; López-Ruiz et al., 2023).

2.1.2. Selección de hábitat y estado de conservación

Las nutrias neotropicales se consideran organismos solitarios, aunque en época reproductiva se pueden encontrar parejas y grupos pequeños formados principalmente por hembras y sus crías (de Almeida Rodrigues et al., 2013). Tienen un importante mecanismo de marcaje y comunicación por olores, principalmente mediante la deposición de heces y mucus en lugares visibles y recurrentes que utilizan como letrinas (de Pinho et al., 2018; Laurentino et al., 2019; Roberts et al., 2016). Además, realizan actividades como acicalamiento de su propio pelaje e incluso rasgan el suelo o troncos con sus garras (Rheingantz, Santiago-Plata, et al., 2017).

Dentro de los factores que inciden sobre la ocurrencia de las nutrias en ecosistemas acuáticos se encuentra la cobertura boscosa, el ancho de los ríos, la presencia de canales acuáticos y la disponibilidad de guaridas, ya sea creadas por ellos mismos o preexistentes (Gomez et al., 2014; Navarro-Picado et al., 2017). A pesar de ser considerados animales tolerantes a la presencia humana y a ciertos cambios en su ambiente, las aguas de mala calidad hacen menos habitables los ecosistemas para las nutrias (de Almeida & Pereira, 2018). En este sentido, las características fisicoquímicas del agua, así como el tipo de vegetación en ecosistemas acuáticos pueden tener un efecto importante sobre la presencia de las nutrias (Moun et al., 2024). De igual forma, la alteración antropogénica de los ríos por descarga de residuos, la fragmentación de hábitats, la caza e incluso la disputa que se genera entre nutrias y humanos en comunidades que utilizan la pesca para subsistir, pueden alterar sus dinámicas poblacionales (Andrade et al., 2019; Gomez et al., 2014; Rheingantz, Santiago-Plata, et al., 2017).

Por lo anterior, aunado a las propias características crípticas de la especie y el amplio espacio que puede ocupar un solo individuo, la información necesaria para elaborar planes dirigidos a su conservación es muy limitada (Rheingantz, Santiago-Plata, et al., 2017), y su estado de conservación en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN es de Casi Amenazada (NT) (Rheingantz & Trinca, 2015). Sin embargo, se encuentra protegida legalmente en varios países incluyendo a Costa Rica (Ley de Conservación de la Vida Silvestre

No. 7317), de ahí que se hayan llevado a cabo proyectos para concientizar a la sociedad sobre su importancia como controlador del equilibrio en la red trófica y como una potencial especie bandera para la conservación (Dias et al., 2019).

2.2. Metabarcoding en análisis ecológicos

2.2.1. Definición de metabarcoding y consideraciones generales

El metabarcoding de ADN consiste en la identificación de los taxones presentes en una muestra ambiental mediante la amplificación por PCR de regiones específicas de ADN, conocidas como códigos de barra genéticos, y su secuenciación a través del uso de plataformas de NGS (Schmidt et al., 2013). A diferencia del *barcoding*, en donde se utiliza generalmente ADN de mejor calidad obtenido a partir de aislamientos, la secuenciación de amplicones, comúnmente llamada metabarcoding, utiliza el ADN total de los microorganismos contenidos en la muestra (Salis et al., 2024).

Al utilizar el metabarcoding generalmente se trabaja de forma directa con el material genético obtenido de la muestra sin necesidad de realizar cultivos microbianos. Cerca del 99% de microorganismos aún no tienen una forma eficaz de ser cultivados en el laboratorio, ya sea por requerimientos metabólicos o por su dependencia con otros microorganismos, por lo que no es posible obtenerlos como un cultivo monoespecífico (Navgire et al., 2022). En este sentido, los enfoques basados en secuencias ofrecen una ventaja por la amplia gama de material genético que puede ser analizado a partir de una sola muestra compleja (Nam et al., 2023). Por otra parte, se deben afrontar ciertas limitaciones, como el hecho de que los *metabarcodes* (códigos de barras para metabarcoding) se diseñan de forma distinta dependiendo del objetivo de la investigación y se depende de un solo marcador, el ARNr 16S. Además, durante la amplificación por PCR del ADN se introduce un sesgo y la secuenciación de los amplicones también puede generar errores (Salis et al., 2024).

2.2.2. Pasos para análisis de metabarcoding y plataformas de secuenciación

Los estudios de metabarcoding inician con un diseño experimental que permita llegar a responder la pregunta de investigación. Generalmente los pasos a seguir conllevan la toma de muestras y su almacenamiento óptimo hasta la extracción de ADN, que es seguida por la amplificación por PCR con los *primers* diseñados para la región deseada. Después se realiza

la secuenciación de los productos de PCR mediante herramientas de NGS y las lecturas obtenidas se utilizan para la identificación de los taxones presentes en la muestra mediante distintos análisis bioinformáticos. De igual forma, los metadatos que se obtienen desde el muestreo deben tomarse en cuenta tanto para la estadística como para el almacenamiento y distribución de los datos generados (Ruppert et al., 2019).

Por la necesidad de obtener una mayor cantidad de lecturas por experimento, en los estudios de metabarcoding se utilizan primordialmente las tecnologías de NGS (Salis et al., 2024). Las principales plataformas de NGS como Illumina, SOLiD, Ion Torrent y PacBio varían en aspectos como la tasa de error, el tipo de amplificación, la química empleada para la secuenciación (síntesis o ligación) y la longitud máxima promedio de las secuencias que producen (Hodkinson & Grice, 2015). En los estudios más recientes hay una predilección por las plataformas de Illumina y PacBio, por la gran cantidad de información génica disponible en bases de datos y la gran longitud que producen, respectivamente (Hodkinson & Grice, 2015; Salis et al., 2024).

2.2.3. Aplicaciones del metabarcoding

Así como existe variedad dentro de las plataformas de secuenciación, también hay distintas fuentes de donde obtener el material genético que va a ser estudiado. Muchas de las investigaciones se han dirigido al análisis de suelos, que son una gran fuente de diversidad microbiana, aunque las aguas marinas también han sido objeto de varios estudios de metabarcoding (Valentini et al., 2016). Las muestras utilizadas también pueden provenir de organismos como plantas o animales, partes de ellos o hasta de excretas, en el caso de animales (Bodewes et al., 2014; Ingala et al., 2018; Kartzinel et al., 2015).

Para la identificación de los taxones presentes en muestras ambientales se usan códigos de barras genéticos que dependen del tipo de organismo objetivo (Salis et al., 2024). Los metabarcodes típicos utilizados para asignar taxonomía corresponden a la subunidad pequeña 16S del ARN ribosomal para organismos procariontes, mientras que para los eucariotes corresponde usar el 18S. Ambas son zonas que presentan cierta variabilidad dependiendo de la especie, pero están flanqueadas por regiones conservadas para cada grupo de organismos (Navgire et al., 2022).

Mediante el uso de regiones conservadas como la COI (subunidad 1 de la Citocromo oxidasa C mitocondrial) y la región trnL-P6 del cloroplasto se han realizado estudios sobre la dieta de herbívoros con ADN aislado de muestras fecales (Kartzinel et al., 2015). Las aplicaciones del metabarcoding se extienden a estudios del efecto de nanopartículas sobre microorganismos ambientales (Metch et al., 2018) e incluso análisis de distribución de hábitat para reconocer grupos como anfibios y peces de forma no invasiva (Valentini et al., 2016).

2.3. Comunidades microbianas en mamíferos

2.3.1. Interacción del microbioma con su hospedero

Las comunidades microbianas tienen un importante rol en la nutrición, desarrollo y salud del organismo hospedero al cual están asociados (McFall-Ngai et al., 2013). Se considera que el hospedero y su microbioma han co-evolucionado bajo los cambios ocurridos en el ambiente desde hace millones de años, llegando al punto en el que hay un microbioma central que siempre está con el hospedero, lo asiste en su fisiología y disminuye su propensión a enfermarse (Singh & Kothari, 2017).

El microbioma de los animales es moldeado desde las primeras etapas de su desarrollo con la formación de barreras físicas o químicas para la exclusión de ciertos microorganismos, a la vez que muchos animales tienen transmisión de bacterias por parte de sus padres o las adquieren por transmisión horizontal. Estas bacterias participan en procesos como maduración post-embionaria, activación del sistema inmune y en el desarrollo normal del cerebro en los mamíferos mediante señalización a nivel celular y sistémica principalmente (McFall-Ngai et al., 2013). El microbioma asociado al tracto digestivo de algunos mamíferos es indispensable, ya que permite la digestión y extracción de energía a partir de compuestos que normalmente no pueden ser utilizados directamente por estos animales (Suzuki, 2017).

2.3.2. Microbioma del tracto digestivo de mamíferos

El microbioma gastrointestinal en mamíferos incluye microorganismos eucariotas y arqueas, pero está dominado por bacterias, haciendo que el número de filos presentes sean mayores que en cualquier otra cavidad o tejido del animal y que la cantidad de células bacterianas supere a las propias células somáticas de su hospedero (Combrink et al., 2023). La convergencia en el microbioma de mamíferos alejados a nivel filogenético, pero con dietas

similares apoyan el papel que cumplen estos microorganismos para la especialización ante ciertos tipos de alimentación (Suzuki, 2017). La dieta también tiene relación con la diversidad microbiana presente en el tracto gastrointestinal de un mismo grupo de animales, como los murciélagos, en donde se ha demostrado que especies frugívoras y hematófagas tienen baja diversidad mientras que en las insectívoras esta aumenta (Ingala et al., 2018).

Una gran cantidad de estudios enfocados en la microbiota gastrointestinal están basados en el análisis de muestras fecales por ser un método no invasivo y eficiente para asignar taxonomía a los mamíferos (Combrink et al., 2023). En estudios llevados a cabo en mirme-cófagos como armadillos y hormigueros se apoya el hecho de que la microbiota gastrointestinal está en gran parte delimitada por la dieta y filogenia del animal (Delsuc et al., 2014). Mamíferos acuáticos como las ballenas que tienen una dieta basada en crustáceos, pero comparten un ancestro común con los herbívoros terrestres, han sido blanco de estudios comparativos con otros mamíferos, en donde se demuestra que tanto factores evolutivos como alimenticios moldean la microbiota de los animales (Sanders et al., 2015).

La comunidad microbiana de los organismos no participa solo en aspectos fisiológicos y metabólicos a nivel de individuos, sino que es un componente clave en la salud y comunicación en poblaciones de animales. La fragmentación de hábitat está relacionada con pérdida de diversidad microbiana en distintas poblaciones, la cual a su vez incide sobre la respuesta que estas pueden tener en términos de supervivencia, resistencia a enfermedades y estrés ambiental (Bahrndorff et al., 2016). De igual forma, el microbioma gastrointestinal puede alterar el comportamiento de los animales mediante cambios provocados sobre el sistema nervioso central (Suzuki, 2017).

2.4. Herramientas bioinformáticas para análisis de metabarcoding

2.4.1. Bases de datos biológicas

A partir de estudios de metabarcoding se pueden generar millones de lecturas correspondientes a los metabarcodes secuenciados en los organismos de interés, las cuales requieren ser comparadas con bases de datos. En términos generales una base de datos biológica se define como un repositorio en donde se almacenan, organizan y comparten datos biológicos, integrando gran cantidad de datos -ómicos (Zou et al., 2015). Las bases de datos se clasifican en primarias y secundarias, con la diferencia de que las primarias contienen solo los datos

con algún grado de explicación, pero no están curados, como sí ocurre con las bases secundarias, que derivan de las primeras y no son redundantes (Choudhuri, 2014).

Existen tres bases de datos primarias principales, las cuales conforman el *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* (INSDC), son redundantes entre ellas y corresponden a: el GenBank (Benson et al., 2013), perteneciente al National Center for Biotechnology Information (NCBI), el DNA DataBank of Japan (DDBJ) y el European Nucleotide Archive (ENA) (Zou et al., 2015). Entre las bases de datos secundarias se encuentra SILVA, que contiene datos de secuencias de ARNr de organismos procariontes y eucariontes accesibles, actualizadas y filtradas por diversos parámetros de calidad (Quast et al., 2013), las cuales sirven de referencia cuando es necesario asignar taxonomía molecular en experimentos de metabarcoding.

2.4.2. Programas bioinformáticos para análisis de microbiomas

Para el análisis de calidad de las lecturas de NGS se pueden utilizar programas como FASTQC (Andrews, 2010), el cual permite filtrar aquellas que están contaminadas con ADN ajeno al de interés, no tienen la longitud deseada o presentan bases asignadas con Ns (no definidas). Por medio de programas como UCHIME se pueden eliminar quimeras producidas durante los pasos de amplificación por PCR (Edgar et al., 2011). Posteriormente, con los datos ya depurados, las secuencias normalmente son concatenadas en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) o clasificadas directamente en Variantes de Secuencia de Amplicones (ASVs), que son comparadas contra bases de datos secundarias como SILVA o Greengenes, en dependencia de los microorganismos a identificar (Sanders et al., 2015).

Los sets de datos obtenidos pueden ser procesados mediante programas como QIIME (Caporaso et al., 2010) o Mothur (Schloss et al., 2009), los cuales son muy personalizables para las tareas que realizan durante la asignación de taxonomía, aunque no son tan automatizados como MG-RAST (Meyer et al., 2008). Tras la caracterización de los microbiomas es importante identificar posibles asociaciones con factores de los metadatos colectados durante el muestreo (Ruppert et al., 2019). Además, con base en los taxones identificados se pueden realizar mapas de calor o Análisis de Componentes Principales (PCA) mediante softwares con lenguajes estadísticos como R (Hodkinson & Grice, 2015; Sanders et al., 2015). Todos

los programas anteriormente citados corresponden a desarrollos colaborativos gratuitos, por lo cual son de acceso libre.

3. Marco Metodológico

3.1. Objeto de estudio

El objeto de estudio de esta investigación corresponde a 94 muestras fecales de nutria colectadas durante 2019 y 2020 por el B.Sc. Adonay Jiménez Serrano para su tesis de grado. Las muestras se recolectaron en la cuenca del río Peñas Blancas, Costa Rica, específicamente en los ríos Burro (Bb), Burrito (Bto), Chachagua (ChA), Chachagüita (Chta), Fortuna (For), Pajuila (Paj), Peñas Blancas (Pb) y en las cercanías de la represa de Peñas Blancas (RPb) (Cuadro 1S). Esta área se encuentra entre los distritos de Los Ángeles y Peñas Blancas en San Ramón, y La Tigra, La Fortuna, Florencia y Cutris en San Carlos, Alajuela (10°15'-10°31' N, 84°28'-84°46' O). Aproximadamente el 95% de la parte alta de la cuenca está cubierta por bosques protegidos, incluyendo sectores del Bosque Lluvioso Eterno de los Niños y la Reserva Biológica Monteverde. Las regiones media e inferior presentan una mayor diversidad de usos del suelo, incluyendo agricultura, pastizales y asentamientos rurales (Figura 1) (Guizado-Batista et al., 2025).

Las muestras recolectadas fueron consideradas visualmente como frescas, debido a que estaban cubiertas de moco, y fueron almacenadas en un congelador a -20°C para reducir la degradación del ADN ambiental. Una vez que fueron trasladadas al Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET) se mantuvieron a -80°C hasta su análisis.

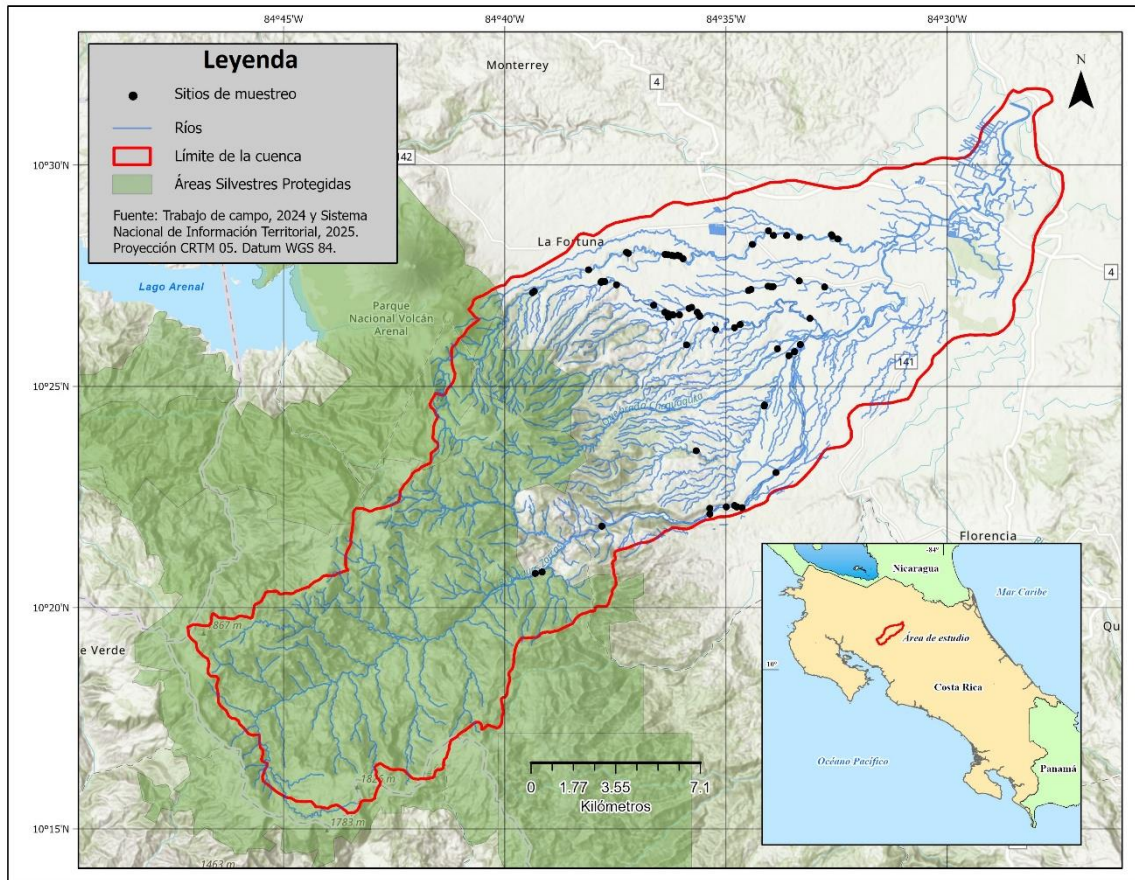


Figura 1. Mapa del sector de la cuenca del río Peñas Blancas, en donde se colectaron las 94 muestras fecales (2019–2020) de los ríos Burro, Burrito, Chachagua, Chachagüita, Fortuna, Pajuila y Peñas Blancas, los cuales se ubican en los cantones de San Ramón y San Carlos, Alajuela ($10^{\circ}15'-10^{\circ}31'$ N, $84^{\circ}28'-84^{\circ}46'$ O). La parte alta de la cuenca es mayoritariamente formada bosques protegidos, mientras las partes media e inferior tienen mayor diversidad de usos del suelo.

La variable de ubicación corresponde al río del cual se colectó la muestra, mientras que la variable de altura se definió de manera visual y se dividió en parte alta, media y baja de la cuenca. Finalmente, el uso de suelo se determinó con base en la observación del sitio de colecta e información proveída por los residentes y trabajadores locales. Las categorías definidas fueron pasto, bosque, agricultura en pastizales y cultivos permanentes.

3.2. Área de estudio

El manejo y procesamiento de las muestras previo a la secuenciación del ADN se realizó en el Laboratorio de Estudios Ecotoxicológicos (ECOTOX) del IRET, el cual está

ubicado en el Campus Omar Dengo de la Universidad Nacional de Costa Rica, Heredia, Costa Rica.

3.3. Diseño de investigación y descripción de variables

Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído utilizando el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración y pureza del ADN se estimaron mediante espectrofotometría con un NanoDrop 2000 (Thermo) para garantizar la ausencia de contaminación con otras moléculas orgánicas (230 nm) o proteínas (280 nm). Las muestras de ADN fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior uso. Las muestras fueron procesadas bajo el permiso CPI-SINAC-PNI-ACAHN-010-2020 otorgado por parte de CONAGEBIO.

Amplificación del ADN mitocondrial

Para confirmar que las muestras fecales provenían de nutrias, se realizó la amplificación de ADN mitocondrial (ADNmt) mediante PCR, utilizando los cebadores ProL (5'-CACCACCAACACCCAAAGCT-3') y DLH (5'-CCTGAAGTAAGAACCAGATG-3') (Valqui et al., 2010) en un grupo representativo de 28 muestras de ADN genómico, seleccionadas aleatoriamente. El protocolo de termociclado se basó en Guerrero et al. (2015) y la amplificación se llevó a cabo en un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch (Bio-Rad). Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar la presencia del amplicón esperado, que correspondía a una región de 355 pb de la región de control del ADNmt. La secuenciación de los productos de PCR se realizó mediante secuenciación Sanger bidireccional (Macrogen Inc., Corea), y las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software Geneious v9.1.8, donde se evaluó su calidad y se generaron secuencias consenso fusionando las lecturas forward y reverse correspondientes. Posteriormente, las secuencias consenso fueron sometidas a un alineamiento global basada en el algoritmo BLASTN para determinar el género.

Metabarcoding del gen 16S ARNr

Se evaluó la presencia de la región V4 del gen 16S ARNr en todas las muestras mediante amplificación por PCR, utilizando los cebadores 515Frcbc47 (5'-TCGAAGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 806R (5'-AGTCAGCCAGCCGGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'), modificados de Caporaso et al. (2011), junto con el kit FastStart Essential DNA Green Master (Roche). Los productos de PCR obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar la presencia de los amplicones deseados, los cuales tenían un tamaño aproximado de 300 pb.

Para determinar la abundancia relativa, diversidad y estructura de la comunidad microbiana presente en las muestras fecales, las 75 muestras de ADN que mostraron una amplificación exitosa del fragmento objetivo mediante PCR fueron enviadas a Novogene Corporation Inc. (California, EE. UU.) para la secuenciación metagenómica del amplicón del gen 16S ARNr bacteriano con la tecnología Illumina NovaSeq 6000 y extremos pareados de 250 pares de bases (2x250). Se utilizaron los cebadores 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) y 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (Caporaso et al., 2011).

Control de calidad de las lecturas e inferencia de ASV

Para simplificar la gestión de los datos, se asignó un número de índice a cada una de las 75 muestras secuenciadas (Cuadro 2S). Primero, los cebadores y adaptadores utilizados durante la amplificación y preparación de la biblioteca fueron eliminados de las secuencias crudas mediante Cutadapt (Martin, 2011), descartando aquellas secuencias que no contenían cebadores o adaptadores.

El filtrado y procesamiento de datos se realizaron en R v4.3.1 (R Core Team, 2023). Se incluyeron pasos de filtrado de calidad, eliminación de réplicas, estimación del modelo de error, inferencia de la composición de la muestra, fusión de lecturas pareadas y eliminación de quimeras mediante DADA2 v1.28.0 (Callahan et al., 2016). Las variantes de secuencias de amplicón (ASVs) inferidas por DADA2 fueron asignadas a taxones conocidos mediante un clasificador naïve Bayes previamente entrenado, utilizando los datos taxonómicos de la subunidad ribosómica pequeña procarionta (SSU) de Silva 138.1 (McLaren & Callahan,

2021). Se eliminaron las ASVs clasificadas como mitocondrias, cloroplastos o eucariotas. Además, se eliminaron las ASVs que no pertenecían a los reinos *Bacteria* o *Archaea*.

Las ASVs filtradas fueron sometidas a posicionamiento filogenético mediante HMMER (Punta et al., 2011), EPA-ng (Barbera et al., 2019) y GAPP (Czech et al., 2020) en un árbol de referencia (Markowitz et al., 2012), como se implementa en el pipeline PICRUST2 v2.5.2 (Douglas et al., 2020). Adicionalmente, se eliminaron las ASVs que no pudieron ser ubicadas en el árbol de referencia. Los archivos de datos crudos para las 75 muestras secuenciadas fueron accesados bajo el BioProject ID PRJNA1244904 en el National Center for Biotechnology (NCBI).

Abundancia relativa, diversidad y estructura de la comunidad

Se generaron mapas de calor de la abundancia relativa de filos, clases y géneros en las muestras de heces de nutria y diagramas de Venn de la comunidad núcleo mediante *ampvis2* (Andersen et al., 2018). Además, para categorizar las ASVs como miembros de la comunidad central, se utilizó *ampvis2* con parámetros predeterminados ($cut_a = 0.1$, $cut_f = 80$).

Para normalizar los datos de conteo entre las muestras, se realizó un método de escalado con muestreo por submuestras ordenadas (SRS) (Heidrich et al., 2021) con 27,583 lecturas por muestra, basado en las curvas de SRS para las métricas de riqueza y diversidad. La diversidad alfa se estimó mediante ASVs observados, Chao1, diversidad filogenética (PD), y los índices de Simpson y Shannon. Además, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si existía una diferencia significativa entre los índices de diversidad entre los grupos de muestras, dependiendo de la ubicación, subdivisiones de la cuenca y uso del suelo. También se aplicaron pruebas de Dunn ajustadas con el método de Benjamini-Hochberg (BH) para comparar medias entre pares de grupos.

En el análisis de diversidad beta, se eliminaron las ASVs con menos de 5 lecturas en al menos el 5% de las muestras. Para el análisis de escalado multidimensional, se utilizó la distancia euclidiana de los datos de abundancia transformados por logaritmo centrado en la razón (CLR) (distancia Aitchison) (Gloor et al., 2017) para el análisis de componentes principales (PCA). Además, los datos de conteo fueron transformados a proporciones, y se calcularon las distancias UniFrac no ponderadas/ponderadas (Lozupone et al., 2011) para el

análisis de coordenadas principales (PCoA). Se realizó un análisis de varianza multivariada permutacional (PERMANOVA) para evaluar diferencias significativas en la comunidad microbiana general según la ubicación, la división de la cuenca y el uso del suelo. Si se encontraban diferencias para una variable, se utilizaba un MANOVA permutacional pareado para evaluar las diferencias entre pares de grupos con valores p ajustados por BH. Cuando la dispersión entre grupos no era igual, se implementó un análisis de similitudes (ANOSIM).

Abundancia diferencial

Se realizó un análisis de abundancia diferencial con microbiomeMarker (Cao et al., 2022), después de filtrar los sitios con menos de tres muestras (recogidas de los ríos Burrito y Chachagüita). El análisis de especies indicadoras se realizó mediante el paquete `indicspecies` (De Cáceres & Legendre, 2009) en R v4.3.1 (R Core Team, 2023) para las variables de los sitios sobre las ASVs. Posteriormente, se llevó a cabo una estimación escasa de las correlaciones entre microbiomas (SECOM) (Lin et al., 2022) para determinar las relaciones entre pares de taxones. En lugar de usar únicamente el coeficiente de Pearson, como es habitual para evaluar correlaciones lineales, el coeficiente de relaciones no lineales de SECOM calcula la correlación de distancias para medir la dependencia estadística entre dos taxones, lo que incluye otros tipos de relaciones no lineales (Lin et al., 2022). Finalmente, se realizó una prueba de correlación de expresión diferencial tipo ANOVA (ALDEx2 v1.32.0) (Fernandes et al., 2013) para determinar la asociación entre la abundancia relativa de los taxones (a nivel de filo, clase y género) y la subdivisión de la cuenca o el uso del suelo, tomando como referencia el valor de A (taxones exclusivos del sitio) y B (taxones que están en todas las muestras del sitio).

4. Resultados

Secuenciación de ADNmt y gen 16S ARNr

Después de realizar el control de calidad manual y la fusión de las secuencias forward y reverse, se retuvieron 28 secuencias consenso con una longitud promedio de 327 pb (Cuadro 2S). Estas secuencias se buscaron en la base de datos non-redundant (*nr*) del NCBI utilizando el algoritmo BLASTN y los resultados confirmaron su similitud con otras secuencias del género *Lontra*.

Basado en los requisitos de calidad de ADN para la secuenciación Illumina y los datos obtenidos de la amplificación de la región V4, se secuenciaron 75 muestras de ADN. Después del procesamiento con Cutadapt y DADA2, se obtuvieron 5,590,892 lecturas (un promedio de 74,547 lecturas por muestra) que se agruparon en 9,287 ASVs (un promedio de 1,454 ASVs por muestra).

Resúmenes taxonómicos

Según los datos filtrados por abundancia y prevalencia, la comunidad microbiana de las muestras fecales de nutrias estuvo compuesta por 25 filos, 51 clases y 462 géneros. La mayoría de los ASVs fueron asignados a los filos *Proteobacteria* (779), *Firmicutes* (573), *Bacteroidota* (155) y *Actinobacteriota* (151).

En cuanto a la abundancia relativa, los filos más abundantes fueron *Fusobacteriota*, *Proteobacteria* y *Firmicutes*, que representaron entre el 18% y el 43% de las lecturas (Figura 2A). Las clases *Fusobacteriia*, *Gammaproteobacteria* y *Clostridia* y los géneros *Cetobacterium*, *Romboutsia*, *Escherichia-Shigella*, *Acinetobacter* y *Paraclostridium* fueron los más comunes (Figura 2B y C).

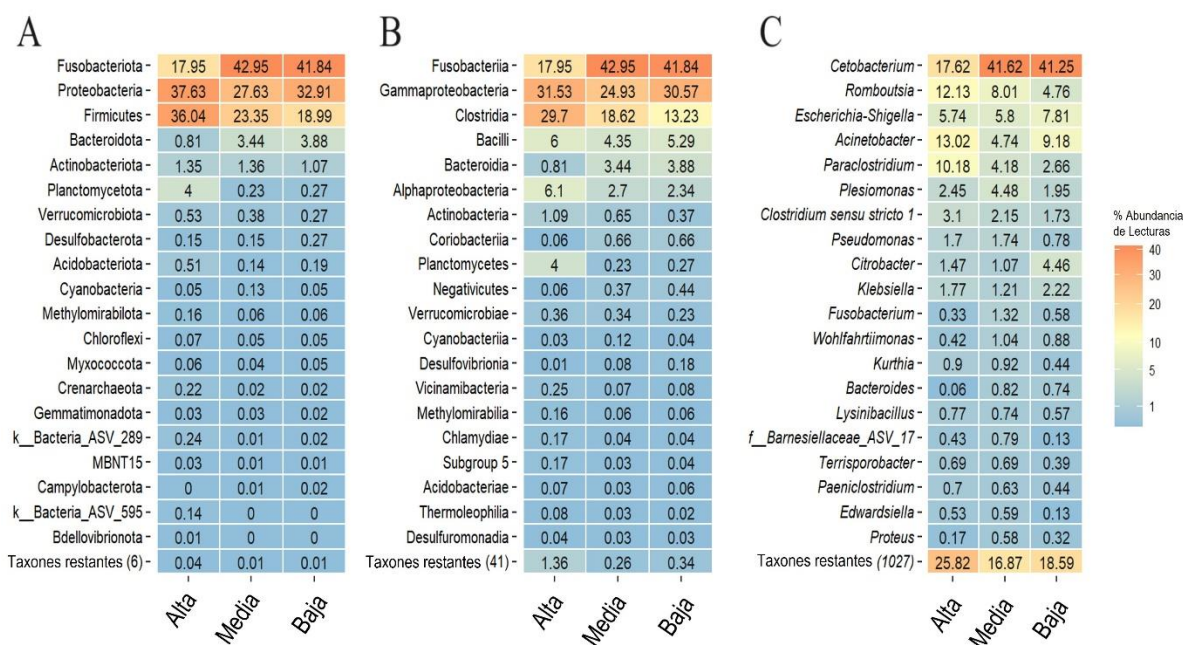


Figura 2. Mapas de calor de la abundancia relativa de los 20 filos (A), clases (B) y géneros (C) más abundantes en las muestras fecales de nutrias de las diferentes subdivisiones de la cuenca.

Se realizó un análisis de ALDEx2 (Fernandes et al., 2013) utilizando el valor p corregido por Benjamini-Hochberg esperado de la prueba de Kruskal-Wallis. Cinco filas estuvieron asociados con un sitio específico. Los mejores indicadores fueron Desulfobacterota para Chachagüita ($A=0.5697$, $B=1.0000$, $p=0.028$) y Bdellovibrionota para Represa Peñas Blancas ($A=0.8149$, $B=1.0000$, $p=0.018$). A nivel de clase, nueve taxones estuvieron asociados con un sitio. Los mejores indicadores para estos sitios fueron Desulfovibrionia para Chachagüita ($A=0.7462$, $B=1.0000$, $p=0.019$) y Bdellovibrionia para Represa Peñas Blancas ($A=0.8149$, $B=1.0000$, $p=0.017$). Finalmente, 33 géneros estuvieron asociados con un sitio específico. Los mejores indicadores fueron *Thalassolituus* para Burrito ($A=0.7416$, $B=1.0000$, $p=0.028$), *Eubacterium nodatum* para Chachagüita ($A=0.9355$, $B=1.0000$, $p=0.019$) y *Rickettsiella* para Represa Peñas Blancas ($A=0.8741$, $B=1.0000$, $p=0.047$).

ALDEx2 reveló un aumento significativo en el filo Acidobacteriota en las muestras recolectadas en el sitio de la represa ($\text{glm } p=0.046$) (Figura 3). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la abundancia relativa de los taxones (filo, clase o género) entre los tipos de uso del suelo o subdivisiones de la cuenca.

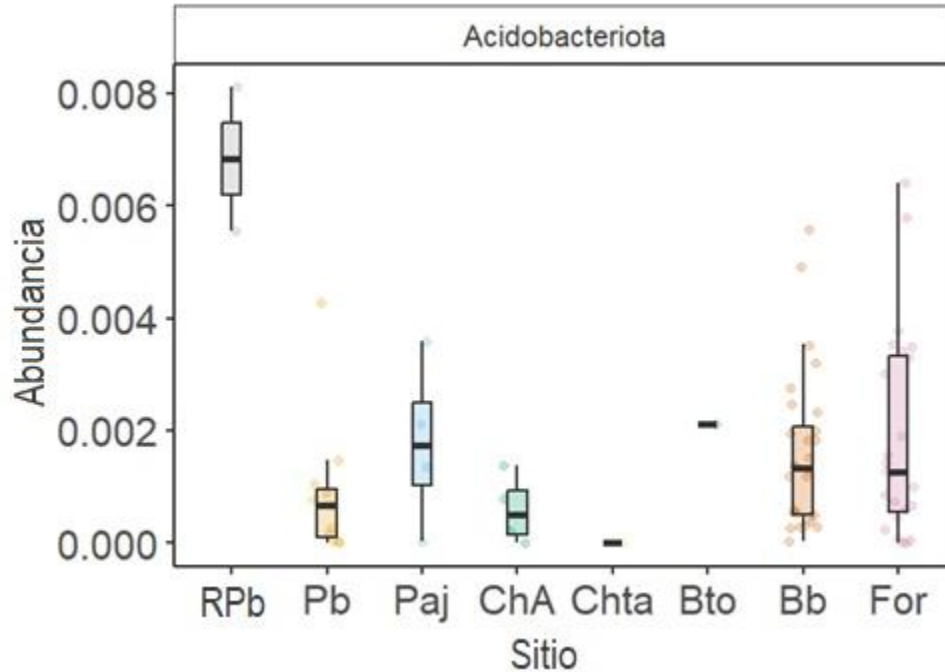


Figura 3. Abundancia relativa del filo Acidobacteriota en los diferentes sitios de muestreo: RPb (Represa Peñas Blancas, n= 2), Pb (Peñas Blancas, n= 11), Paj (Pajuila, n= 4), ChA (Chachagua, n= 4), Chta (Chachagüita, n= 1), Bto (Burrito, n= 1), Bb (Burro, n= 28), For (Fortuna, n= 24). ALDEx2 reveló un aumento significativo en Acidobacteriota en el sitio de la represa.

A nivel de género, la prueba SECOM detectó 33 relaciones lineales dentro del microbioma fecal de las nutrias (Figura 4), de las cuales se destacan las positivas de *Paraclostridium* con *Romboutsia* (Pearson 0.88) y *Escherichia-Shigella* con *Klebsiella* (Pearson 0.67). Además, hubo varias relaciones negativas que involucran a *Cetobacterium*, como la que tuvo con *Bacteroides* (Pearson -0.36), *Acinetobacter* (Pearson -0.38), *Escherichia-Shigella* (Pearson -0.61) y *Pseudomonas* (Pearson -0.66). También destacan las relaciones entre *Fusobacterium* y *Bacteroides* (Pearson -0.53), y entre *Romboutsia* y *Bacteroides* (Pearson -0.42). Dentro de las Clases, la relación más fuerte se dio entre Coriobacteriia y Negativicutes (Pearson 0.91) (Figura 1S). Finalmente, a nivel de filo se detectaron 15 relaciones lineales, donde se destaca la que se dio entre Verrucomicrobiota y Actinobacteriota (Pearson 0.82) (Figura 2S).

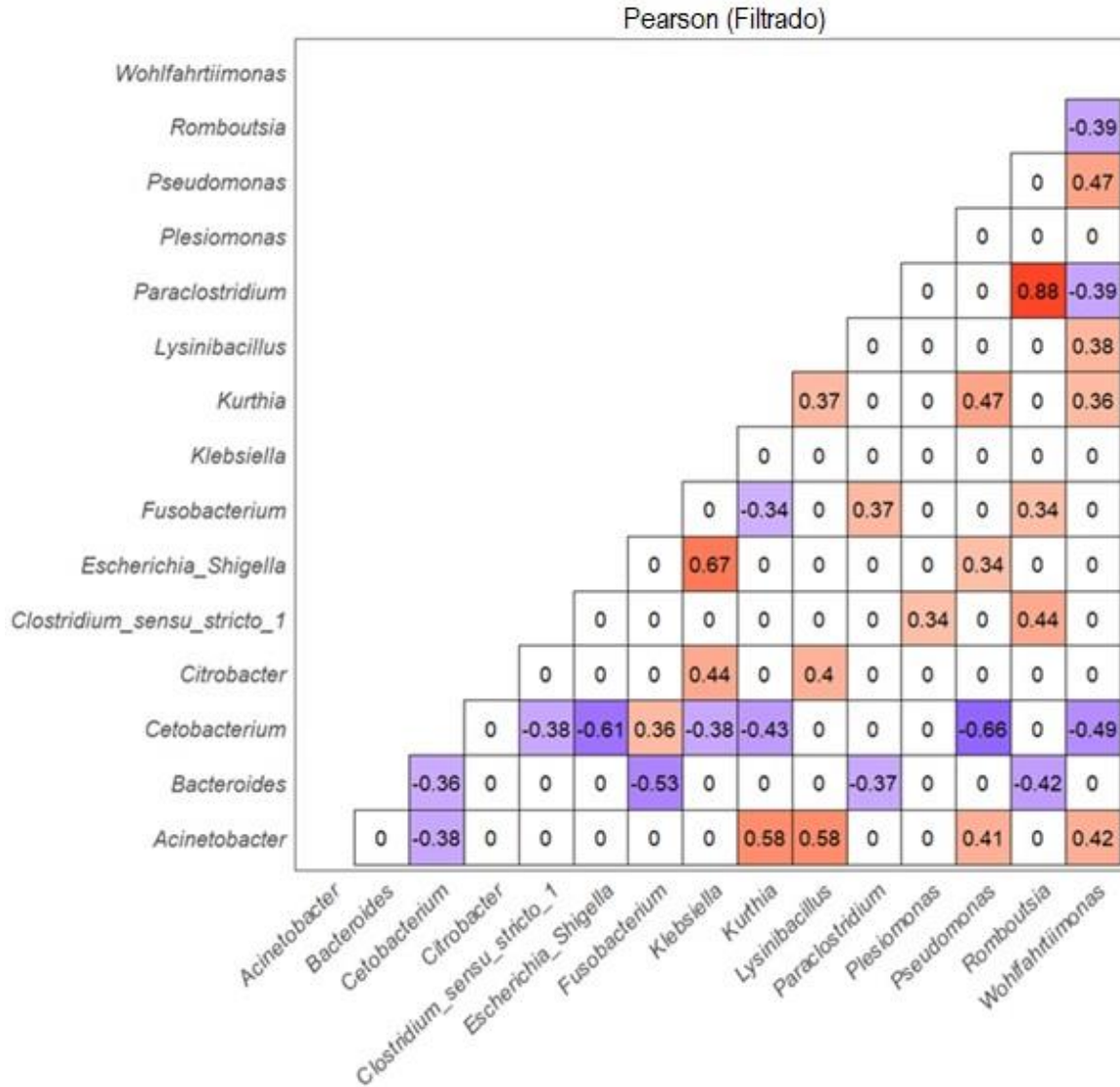


Figura 4. Relación lineal entre géneros utilizando SECOM, estimada mediante la medida de correlación de distancias, filtrada por valor p. Se observan correlaciones negativas entre *Cetobacterium* y seis géneros distintos, además de correlación positiva entre *Paraclostridium* y *Romboutsia*.

Diversidad Alfa

Después de normalizar los datos mediante SRS, las medidas de diversidad de Shannon revelaron diferencias significativas entre los diferentes tipos de uso de la tierra, como lo indicó el resultado de la prueba de Kruskal-Wallis ($\chi^2(3) = 13.2, p = 0.004$), y se detectó una diferencia significativa similar para los ASVs observados, la diversidad filogenética (PD) y el índice de Simpson. El posterior análisis post hoc de Dunn reveló diferencias significativas generales entre los dos pares de tratamientos: pasto-agricultura en

pastizales ($p = 0.01$) y agricultura en pastizales-cultivos permanentes ($p = 0.04$) (Figura 5). Los bosques emergieron como el tipo de uso de la tierra con los valores más altos de diversidad, pero este resultado no fue significativo debido a que solo dos muestras se asociaron con este tipo de uso de la tierra. Por otro lado, la agricultura en pastizales presentó el segundo valor más alto de Shannon, lo cual fue estadísticamente significativo en comparación con el pasto y los cultivos permanentes (Figura 5). Además, también se evidenciaron diferencias significativas entre los usos de la tierra pasto-agricultura en pastizales ($p = 0.0052$) y agricultura en pastizales-cultivos permanentes ($p = 0.03$) para las muestras de la subdivisión media de la cuenca (Figura 6).

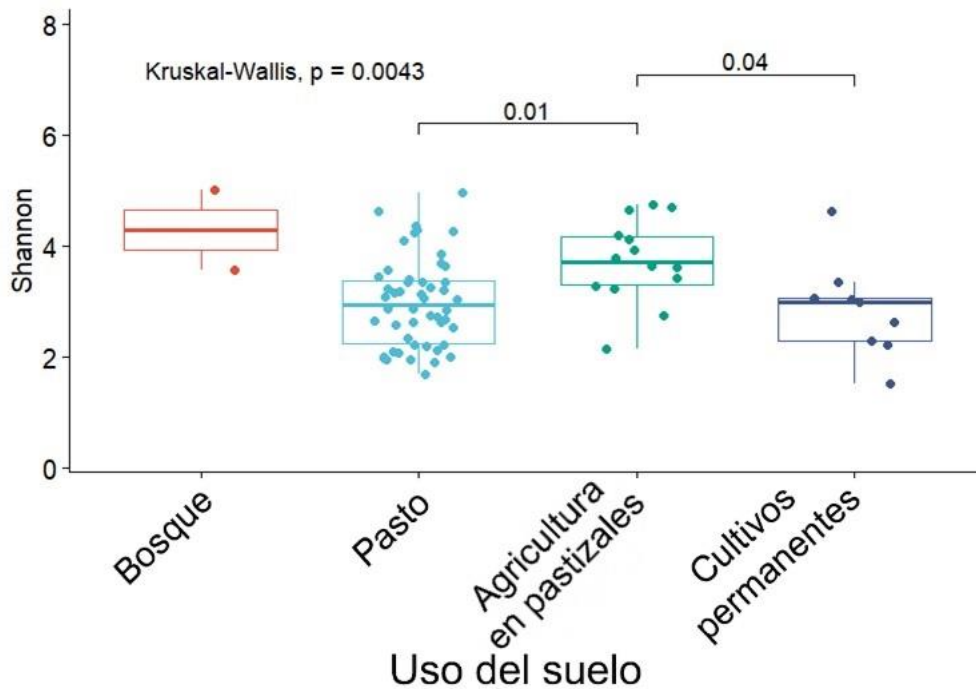


Figura 5. Diferencias en los índices de diversidad alfa entre los tipos de uso de la tierra en la cuenca del río Peñas Blancas, Costa Rica, basadas en la diversidad de Shannon. Las muestras se distribuyeron en las categorías de bosque ($n= 2$), pasto ($n= 50$), agricultura en pastizales ($n= 14$) y cultivos permanentes ($n= 9$).

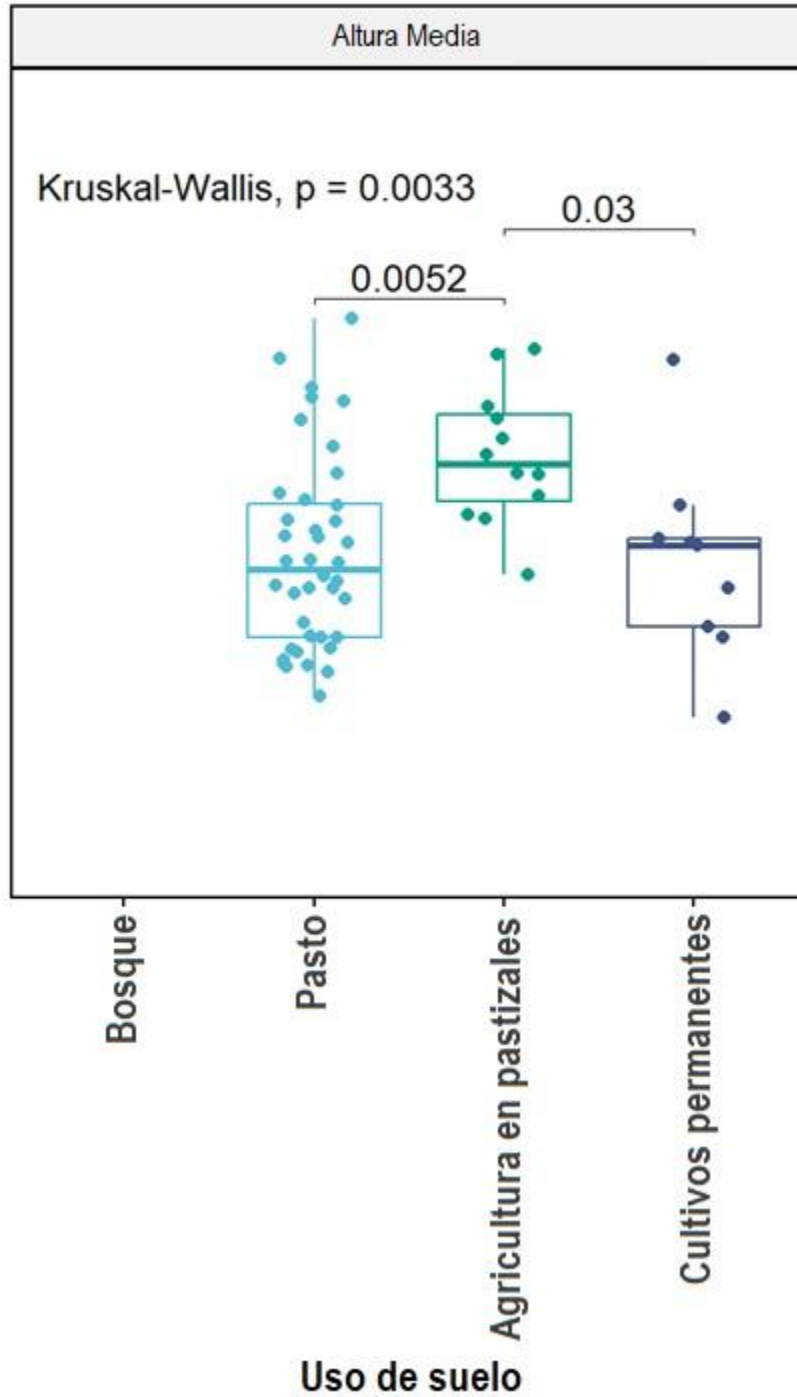


Figura 6. Diferencias en la diversidad de Shannon entre las muestras de la subdivisión media de la cuenca. Las muestras se distribuyeron en las categorías de bosque ($n = 0$), pasto ($n = 40$), agricultura en pastizales ($n = 12$) y cultivos permanentes ($n = 9$).

Se observaron diferencias notables en la diversidad de Shannon en función del uso de la tierra y la subdivisión de la cuenca. Además, se detectaron diferencias significativas en la

diversidad filogenética (PD) y los ASVs observados entre las subdivisiones de la cuenca, siendo la subdivisión alta la que presentó una mayor diversidad filogenética ($p = 0.03$) en comparación con la subdivisión media (Figura 7).

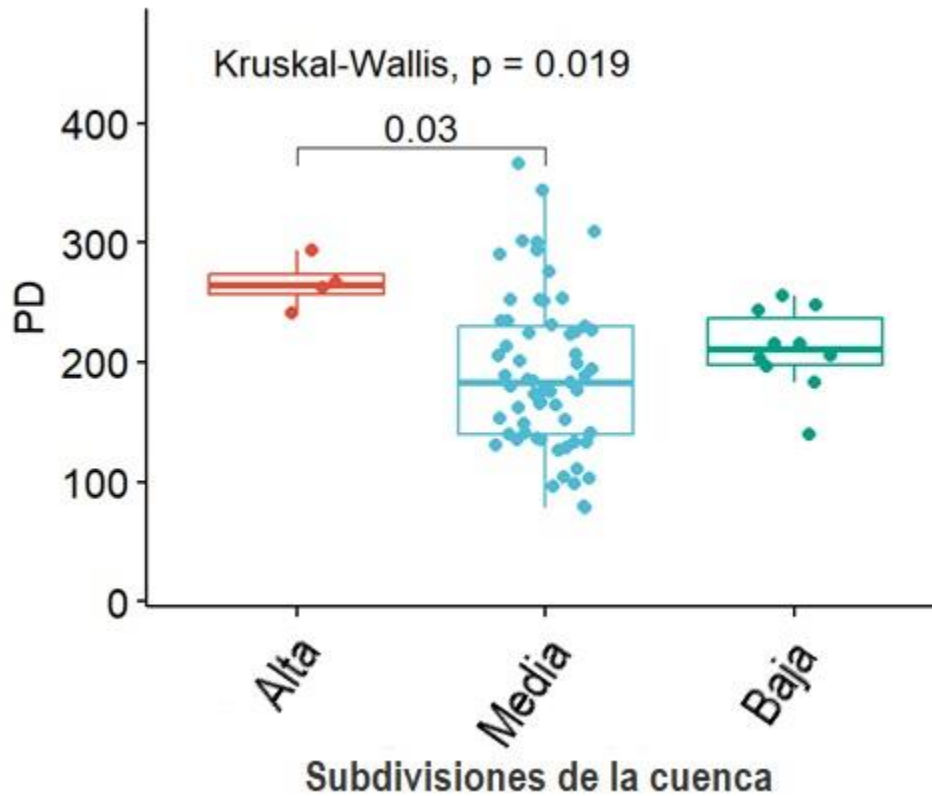


Figura 7. Diversidad filogenética entre las tres subdivisiones de la cuenca del río Peñas Blancas. Se observan diferencias significativas entre la parte alta y media ($p = 0.03$). PD = Diversidad filogenética.

Nuestra investigación tuvo como objetivo evaluar las subdivisiones de la cuenca y el uso del suelo como predictores de la diversidad microbiana intestinal. Se observaron diferencias significativas en la diversidad alfa entre pares de usos de la tierra y entre las diferentes subdivisiones de la cuenca, como lo demostraron los análisis de Kruskal-Wallis y los análisis post hoc (Figuras 5, 6 y 7). Cabe destacar que todos los pares de usos de la tierra que mostraron diferencias significativas en este estudio incluyeron alguna forma de agricultura, ya sea cultivos permanentes o agricultura de pasto. Además, el índice de Shannon

indicó consistentemente que los cultivos permanentes eran el uso del suelo con menor diversidad microbiana (Figura 5).

Identificamos una comunidad central de 20 ASVs, que juntas representaban el 62.4% de las lecturas totales; de estas, solo 12 ASVs fueron compartidas entre las 3 subdivisiones de la cuenca, representando el 58.1% de las lecturas totales. Estas ASVs centrales se distribuyen en 8 géneros: *Cetobacterium*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia-Shigella*, *Klebsiella*, *Paraclostridium*, *Plesiomonas* y *Romboutsia*. Por el contrario, las 8,976 ASVs no centrales representaron el 37.6% de las lecturas totales (Figura 8).

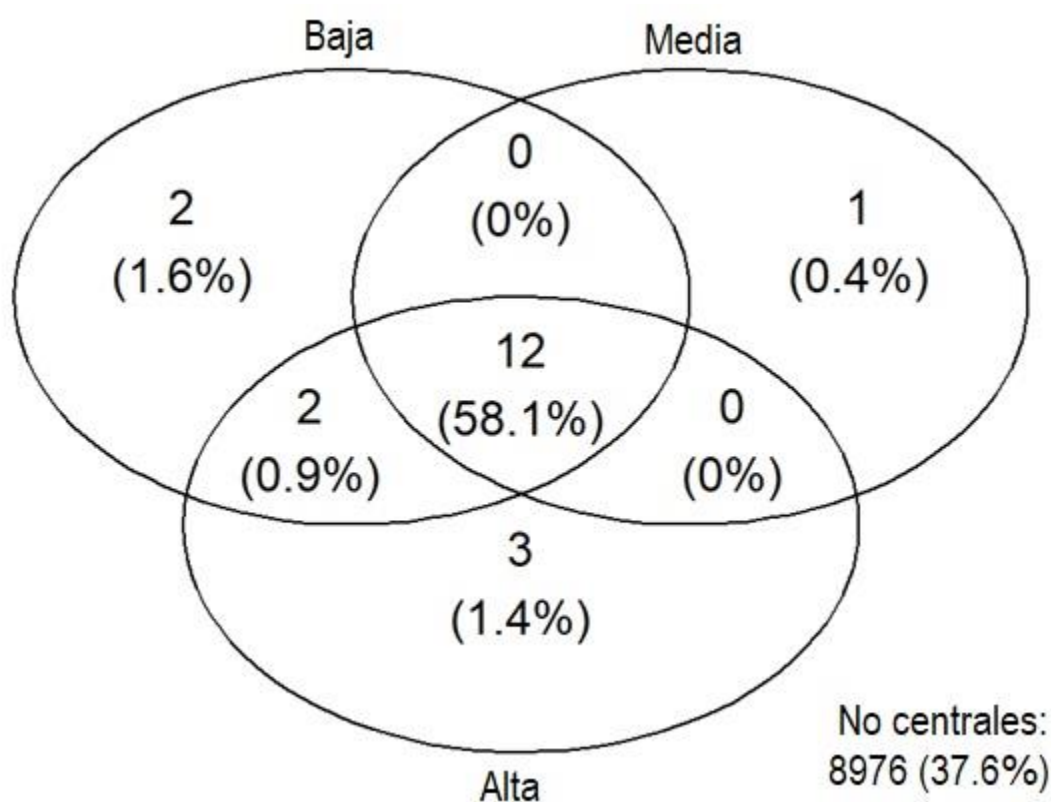


Figura 8. Diagrama de Venn de las ASVs centrales compartidas por diferentes subdivisiones de cuenca. Las ASVs centrales representan el 0.1% de la abundancia total y están presentes en al menos el 80% de las muestras de un grupo determinado.

Diversidad Beta

Se detectaron diferencias significativas en la composición de la comunidad microbiana entre los sitios mediante ANOSIM ($r = 0.178$, $p = 0.002$). De manera similar, una

PERMANOVA detectó diferencias significativas en la composición de la comunidad entre los tipos de uso de la tierra ($r^2 = 0.10$, $p = 0.015$) y una interacción significativa entre el uso de la tierra y la subdivisión de la cuenca ($r^2 = 0.16$, $p = 0.013$). Una PERMANOVA por pares destacó diferencias significativas en la composición de la comunidad microbiana entre la agricultura en pastizales y el pasto ($p = 0.03$).

Mientras que la distancia UniFrac se enfoca en la información filogenética (Chen et al., 2021), no logró mostrar una tendencia clara en la distribución de la varianza con respecto a la subdivisión de la cuenca (Figura 9).

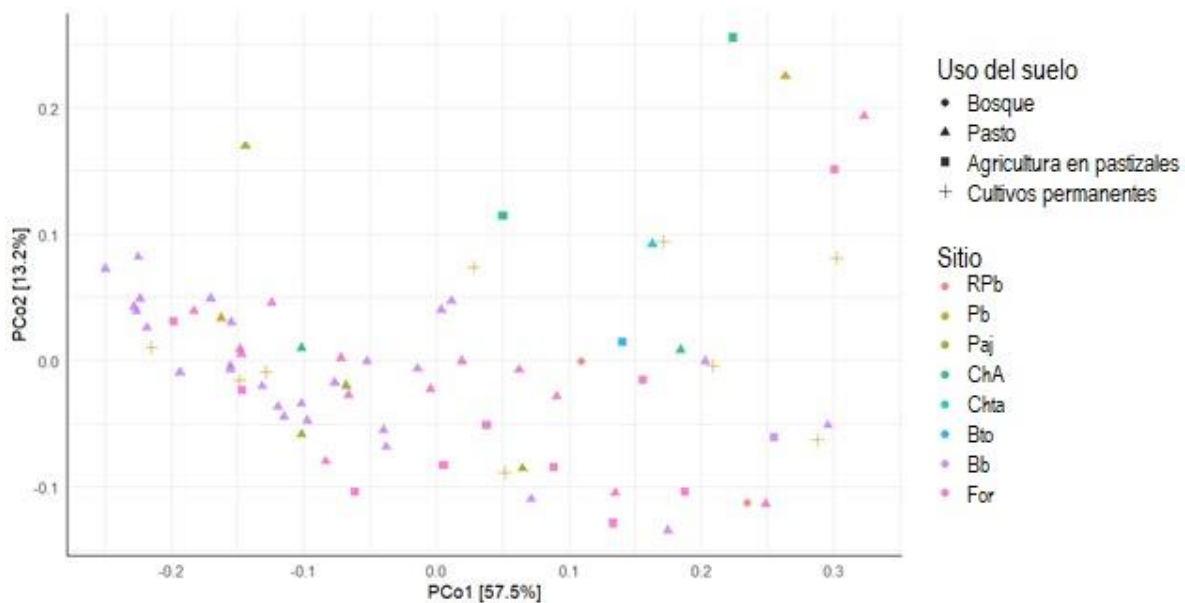


Figura 9. PCoA con distancias UniFrac ponderadas para el uso del suelo y el sitio de muestreo.

5. Discusión

Nuestra investigación tuvo como objetivo evaluar las subdivisiones de la cuenca y el uso del suelo como predictores de la diversidad microbiana intestinal de *L. longicaudis*. Estudios previos informaron que los excrementos de los individuos de esta especie son fácilmente distinguibles de los de otros animales en las letrinas donde generalmente se depositan. En este estudio, hemos demostrado que la secuenciación de ADNmt puede

complementar la identificación visual para determinar con precisión el origen de las muestras (de Pinho et al., 2018).

Firmicutes y Bacteroidota se han reportado como componentes principales del microbioma intestinal de mamíferos (de Jonge et al., 2022), lo cual concuerda con los resultados de este estudio. *Cetobacterium* también es abundante en carnívoros y muchas especies de peces, lo que indica la importancia de la dieta en el microbioma del tracto intestinal. Además, la abundancia del género *Bacteroides* fue muy baja en comparación con la de *Cetobacterium* (Figura 4), lo que indica una correlación negativa entre estos géneros, como se sugirió anteriormente (Ramírez et al., 2018).

Aunque *Proteobacteria* se considera un filo menos abundante en mamíferos, fue predominante en nuestras muestras. Esta situación se ha asociado con disbiosis y desbalances en el microbioma de otros animales (Shin et al., 2015). Una alta relación Firmicutes/Bacteroidetes (relación F/B) se asocia con enfermedades como la osteoartritis en humanos (Chisari et al., 2021) y trastornos metabólicos en otros mamíferos (Li et al., 2022), pero un desequilibrio entre estos dos filios también puede ser causado por la edad (Spychala et al., 2018) y cambios estacionales en la dieta (Bensch et al., 2023). La edad, la dieta y el estado de salud no fueron incluidos en los metadatos recolectados durante el muestreo, por lo que no se puede vincular claramente la predominancia de *Firmicutes* sobre *Bacteroidota* con estos factores. Sin embargo, estos componentes podrían ser incluidos en futuros estudios, posiblemente mediante el uso de cámaras trampa u otros métodos indirectos.

Tanto *Verrucomicrobiota* como *Actinobacteriota* están relacionadas con la respuesta inmune. *Verrucomicrobiota* participa en la inducción de una respuesta regulatoria en el microbioma intestinal y tiene miembros con el potencial de degradar mucina, por lo que también tienen funciones metabólicas (Gryaznova et al., 2022). Por su parte, *Actinobacteriota* promueve la respuesta inmune mediante la estimulación y producción de inmunoglobulinas y linfocitos (Binda et al., 2018). Debido a la correlación positiva observada entre estos filios (Figura 2S), podríamos inferir que participan en la homeostasis y la respuesta inmune cuando se encuentran juntos en el tracto intestinal de la nutria.

Todos los pares de usos de la tierra que mostraron diferencias significativas respecto a la diversidad Shannon en este estudio incluyeron alguna forma de agricultura, ya sea cultivos permanentes o agricultura en pastizales. Esta observación está en línea con hallazgos

previos (Heni et al., 2023), donde se demostró que la composición del microbioma intestinal no solo está influenciada por la filogenia, sino también por factores ambientales como los bosques fragmentados o los paisajes agrícolas. Estas influencias antropogénicas se han señalado como posibles disruptores de la homeostasis del microbioma, lo que conduce a la disbiosis y a una posterior disminución en la diversidad alfa, como se observó en el uso de tierras agrícolas con cultivos permanentes (Bouilloud et al., 2024). Debido a la importancia del microbioma intestinal (Heni et al., 2023), es posible que las ASVs compartidas entre las subdivisiones de cuenca puedan tener funciones relacionadas con el mantenimiento de la salud del huésped y la homeostasis. Por otro lado, el número relativamente alto de ASVs no centrales indica una comunidad microbiana diversa, con muchas ASVs que difieren según las condiciones, lo que podría estar influenciado por la diversidad de usos de la tierra en cada subdivisión de la cuenca.

Anteriormente, se han reportado diferencias en la composición microbiana entre usos de la tierra relacionados con la agricultura y los pastizales (Romdhane et al., 2022), lo que sugiere que este factor puede afectar la diversidad beta del microbioma. Por otro lado, se ha propuesto que factores ambientales pueden influir individualmente en la diversidad del microbioma sin tener un efecto de interacción entre ellos (URycki et al., 2020), pero en este estudio se identificó que el uso de la tierra y las subdivisiones de la cuenca interactúan e influyen en la diversidad del microbioma. Además, investigaciones sobre nutrias eurasiáticas (*Lutra lutra*) han destacado la importancia de la edad del animal en la diversidad de la composición del microbioma (Okamoto et al., 2021), un factor que, lamentablemente, no se capturó en nuestros metadatos durante la recolección de muestras debido a las limitaciones del muestreo.

En varios estudios sobre heces de mamíferos, existe un consenso sobre dos aspectos: 1) las muestras deben recolectarse lo antes posible después de la deposición, y 2) las muestras deben mantenerse congeladas o en soluciones que reduzcan la degradación de los ácidos nucleicos (Ingala et al., 2018; Kumari et al., 2019). Sin embargo, no existe un protocolo o guía estándar para recolectar tales muestras de fauna silvestre. En nuestro estudio, analizamos la comunidad bacteriana de 75 de las 94 muestras recolectadas inicialmente, ya que no todas las muestras presentaron la calidad y concentración de ADN requeridas para secuenciar la región V4 del gen 16S ARNr. Esto podría deberse a la pérdida de integridad del material

genético antes de la recolección, durante el procesamiento, o incluso porque los componentes de una muestra compleja, como las heces, interfieren con los reactivos utilizados durante la extracción de ADN o la amplificación por PCR.

Otros tipos de muestras podrían utilizarse para estudiar el microbioma asociado con el tracto intestinal, como hisopos rectales y muestras frescas tomadas directamente de diferentes secciones del tracto intestinal, pero estas prácticas requieren cuidados y monitoreo especiales para asegurar el bienestar de los animales (Ingala et al., 2018; Wang et al., 2017). Además, la aplicación de muestreo más invasivo no sería factible en mamíferos grandes y de vida libre, como las nutrias de río, ya que podría afectar negativamente al número de individuos muestreados debido tanto al costo económico como al tiempo necesario para manejar a los individuos. Además, el uso de heces puede ser efectivo para varios estudios de metabarcoding en mamíferos (Delsuc et al., 2014; Kumari et al., 2019).

Por lo tanto, para maximizar las posibilidades de extraer ADN microbiano de las muestras, recomendamos aplicar una metodología en la que se siga visualmente al individuo para recolectar la muestra poco después de que haya sido excretada, aprovechando la alta tasa de deposición de las nutrias (Rheingantz, Santiago-Plata, et al., 2017). Además, sugerimos utilizar heces impregnadas con moco, ya que esto puede indicar que la muestra sigue siendo fresca después de la deposición (Roberts et al., 2016) y puede facilitar el procesamiento durante la extracción de ADN al mantenerla suave.

Con base en los resultados obtenidos resulta imperativo identificar los factores potenciales que puedan impactar la composición y funcionalidad del microbioma de las nutrias. Las actividades humanas parecen influir en la salud de la fauna silvestre, ya que pueden afectar la presencia de bacterias asociadas con la salud de las nutrias. Por lo tanto, considerando la importancia de las nutrias en los ecosistemas de cuenca, son necesarios más datos para mejorar las regulaciones y los esfuerzos de mitigación en la zona de estudio, especialmente dado su papel como especies paraguas y como bioindicadores de la salud del ecosistema.

6. Conclusiones y Recomendaciones

Este estudio tuvo como objetivo establecer una línea base para el análisis del microbioma en *Lontra longicaudis*. Se utilizó un método no invasivo para recolectar las muestras fecales, y con este enfoque obtuvimos el ADN necesario para amplificar y secuenciar dos regiones del ADN: el ADNmt y la sección V4 del gen 16S ARNr. Dado que confirmamos que el ADNmt corresponde al género *Lontra*, recomendamos usar esta técnica cuando las heces se recojan sin una observación directa de la deposición.

La diversidad alfa se diferenció significativamente según el uso del suelo, mientras que la diversidad filogenética varió según la subdivisión de la cuenca. Aquí, aunque realizamos una normalización de los datos, el número de muestras podría ser un factor que afecta la diversidad, por lo que es importante que futuras investigaciones apunten a un número similar de muestras para cada subdivisión de la cuenca y tipo de uso del suelo. Además, destacamos la importancia de definir los grupos taxonómicos mediante técnicas moleculares, ya que la correlación y diferencia en abundancia entre grupos específicos puede proporcionar una comprensión más profunda de la salud de la especie basada en su microbioma.

Finalmente, en este estudio encontramos una comunidad central compartida entre las tres subdivisiones de la cuenca del río Peñas Blancas, que podría establecerse como el punto de partida para complementar los estudios ecológicos de esta especie.

7. Fuentes de financiamiento

Esta investigación fue realizada gracias al apoyo financiero recibido por parte del Fondo para el Fortalecimiento de las Capacidades Estudiantiles en Investigación de la Universidad Nacional (FOCAES-INV/TFG) y el Fondo Institucional de Desarrollo Académico, Universidad Nacional (FIDA).

8. Conflictos de interés

Yo, B.Sc. Joshua Vargas Calvo, junto con mi tutora PhD. Kinndle Blanco Peña y mis asesoras Dra. María de Jesús Arias Andrés y PhD. Stefany Solano González, declaramos que no existe ningún conflicto de interés que haya influido en la elaboración, contenido o resultados de la presente tesis titulada “Determinación de la microbiota bacteriana asociada al tracto intestinal de la nutria neotropical *Lontra longicaudis* (Mustelidae) en el río Peñas Blancas, Alajuela, Costa Rica, como un aporte para la evaluación de la salud poblacional y el manejo de la especie”.

9. Referencias

- Adamovsky, O., Buerger, A. N., Wormington, A. M., Ector, N., Griffitt, R. J., Bisesi, J. H., & Martyniuk, C. J. (2018). The gut microbiome and aquatic toxicology: An emerging concept for environmental health. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(11), 2758–2775. <https://doi.org/10.1002/etc.4249>
- Andersen, K. S., Kirkegaard, R. H., Karst, S. M., & Albertsen, M. (2018). ampvis2: An R package to analyse and visualise 16S rRNA amplicon data. *BioRxiv*, 10–11. <https://doi.org/10.1101/299537>
- Andrade, A. M., Arcoverde, D. L., & Albernaz, A. L. (2019). Relationship of neotropical otter vestiges with environmental and anthropogenic factors. *Acta Amazonica*, 49(3), 183–192. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201801122>
- Andrews, S. (2010). *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Bahrndorff, S., Alemu, T., Alemneh, T., & Lund Nielsen, J. (2016). The Microbiome of Animals: Implications for Conservation Biology. *International Journal of Genomics*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5304028>
- Barbera, P., Kozlov, A. M., Czech, L., Morel, B., Darriba, D., Flouri, T., & Stamatakis, A. (2019). EPA-ng: Massively Parallel Evolutionary Placement of Genetic Sequences. In

Systematic Biology (Vol. 68, Issue 2, pp. 365–369).
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syy054>

- Bensch, H. M., Tolf, C., Waldenström, J., Lundin, D., & Zöttl, M. (2023). Bacteroidetes to Firmicutes: captivity changes the gut microbiota composition and diversity in a social subterranean rodent. *Animal Microbiome*, 5(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s42523-023-00231-1>
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 36–42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Binda, C., Lopetuso, L. R., Rizzatti, G., Gibiino, G., Cennamo, V., & Gasbarrini, A. (2018). Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Digestive and Liver Disease*, 50(5), 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.02.012>
- Bodewes, R., Ruiz-Gonzalez, A., Schapendonk, C. M. E., Van Den Brand, J. M. A., Osterhaus, A. D. M. E., & Smits, S. L. (2014). Viral metagenomic analysis of feces of wild small carnivores. *Virology Journal*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-89>
- Bouilloud, M., Galan, M., Pradel, J., Loiseau, A., Ferrero, J., Gallet, R., Roche, B., & Charbonnel, N. (2024). Exploring the potential effects of forest urbanization on the interplay between small mammal communities and their gut microbiota. *Animal Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s42523-024-00301-y>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Cao, Y., Dong, Q., Wang, D., Zhang, P., Liu, Y., & Niu, C. (2022). microbiomeMarker: an R/Bioconductor package for microbiome marker identification and visualization. *Bioinformatics*, 38(16), 4027–4029. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac438>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., Mcdonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Publishing Group*, 7(5), 335–336.

<https://doi.org/10.1038/nmeth0510-335>

- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(SUPPL. 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Chen, B., He, X., Pan, B., Zou, X., & You, N. (2021). Comparison of beta diversity measures in clustering the high-dimensional microbial data. *PLoS ONE*, *16*(2 February), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246893>
- Chisari, E., Wouthuyzen-Bakker, M., Friedrich, A. W., & Parvizi, J. (2021). The relation between the gut microbiome and osteoarthritis: A systematic review of literature. *PLoS ONE*, *16*(12), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261353>
- Choudhuri, S. (2014). *Bioinformatics for beginners: genes, genomes, molecular evolution, databases and analytical tools*. Elsevier. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2012-0-07153-0](https://doi.org/10.1016/C2012-0-07153-0)
- Combrink, L., Humphreys, I. R., Washburn, Q., Arnold, H. K., Stagaman, K., Kasschau, K. D., Jolles, A. E., Beechler, B. R., & Sharpton, T. J. (2023). Best practice for wildlife gut microbiome research: A comprehensive review of methodology for 16S rRNA gene investigations. *Frontiers in Microbiology*, *14*(February), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1092216>
- Cruz García, F., Contreras Balderas, A. J., Nava Castillo, R., & Gallo Reynoso, J. P. (2017). Habitat and abundance of the Neotropical otter (*Lontra longicaudis annectens*) in Pueblo Nuevo, Durango, Mexico. *Therya*, *8*(2), 123–130. <https://doi.org/10.12933/therya-17-470>
- Czech, L., Barbera, P., & Stamatakis, A. (2020). *Genesis and Gappa : processing , analyzing and visualizing phylogenetic (placement) data*. *36*(February), 3263–3265. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa070>
- de Almeida, L. R., & Pereira, M. J. R. (2018). Influence of the water quality on the occurrence of the Neotropical otter (*Lontra longicaudis*) (Olfers, 1818) in a human-altered river basin. *Marine and Freshwater Research*, *69*(1), 122–127. <https://doi.org/10.1071/MF17020>

- de Almeida Rodrigues, L., Leuchtenberger, C., Kasper, C. B., Junior, O. C., & Fonseca da Silva, V. C. (2013). Avaliação do risco de extinção da Lontra neotropical *Lontra longicaudis* (Olfers, 1818) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, 3(1), 216–227.
- De Cáceres, M., & Legendre, P. (2009). Associations between species and groups of sites: Indices and statistical inference. *Ecology*, 90(12), 3566–3574. <https://doi.org/10.1890/08-1823.1>
- de Jonge, N., Carlsen, B., Christensen, M., Pertoldi, C., & Nielsen, J. (2022). The gut microbiome of 54 mammalian species. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.886252/full>
- de Pinho, F. F., Ferreira, G. B., & Barata, I. M. (2018). Feeding ecology and spraint deposition sites of the Neotropical otter (*Lontra longicaudis*) at Cavernas do Peruaçu National Park, Brazil. *IUCN/SCC Otter Specialist Group Bulletin*, 35(1), 11–21.
- Delsuc, F., Metcalf, J. L., Wegener Parfrey, L., Song, S. J., González, A., & Knight, R. (2014). Convergence of gut microbiomes in myrmecophagous mammals. *Molecular Ecology*, 23(6), 1301–1317. <https://doi.org/10.1111/mec.12501>
- Dias, S. V., Verdade, L. M., Prado, B., Zanetti, V., Almeida, N., Santos-Reis, M., & Pedrosa, N. M. (2019). Neotropical otters as promoters of environmental awareness. *IUCN/SCC Otter Specialist Group Bulletin*, 36(1), 17–27.
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. In *Nature Biotechnology* (Vol. 38, Issue 6, pp. 685–688). <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- Fernandes, A. D., Macklaim, J. M., Linn, T. G., Reid, G., & Gloor, G. B. (2013). ANOVA-Like Differential Expression (ALDEx) Analysis for Mixed Population RNA-Seq. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067019>
- Gloor, G. B., Macklaim, J. M., Pawlowsky-Glahn, V., & Egozcue, J. J. (2017). Microbiome datasets are compositional: and this is not optional. *Frontiers in Microbiology*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02224/full>

- Gomez, J. J., Túnez, J. I., Fracassi, N., & Cassini, M. H. (2014). Habitat suitability and anthropogenic correlates of Neotropical river otter (*Lontra longicaudis*) distribution. *Journal of Mammalogy*, *95*(4), 824–833. <https://doi.org/10.1644/13-mamm-a-265>
- Gryaznova, M., Dvoretzkaya, Y., Burakova, I., Syromyatnikov, M., Popov, E., Kokina, A., Mikhaylov, E., & Popov, V. (2022). Dynamics of Changes in the Gut Microbiota of Healthy Mice Fed with Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Microorganisms*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051020>
- Guerrero, J., Gallo-Reynoso, J. P., & Biek, R. (2015). Mitochondrial DNA diversity, genetic structure, and demographic history of the neotropical otter (*Lontra longicaudis*) in Mexico. *Journal of Mammalogy*, *96*(6), 1162–1173. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyv124>
- Guizado-Batista, A., Porres-Camacho, A., Vargas-Villalobos, S., Cortez-Martínez, M., Umaña-Castro, R., Sancho-Blanco, C., Solano-Campos, F., Quesada-Alvarado, F., Spínola-Parallada, M., Madrigal-Mora, A., Jiménez-Serrano, A., Vargas-Calvo, J., Villalobos-Sequeira, J., Stoos, K. B., & Blanco-Peña, K. (2024). Antimicrobial-resistant genes in feces from otters (*Lontra longicaudis*) within the Peñas Blancas river basin, Costa Rica. *Heliyon*, *10*(24). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e40927>
- Guizado-Batista, A., Vargas-Villalobos, S., Spínola Parallada, M., Salas-Gonzalez, D., Porres-Camacho, A., Cortez-Martínez, M., Quesada-Alvarado, F., Umaña-Castro, R., Sancho-Blanco, C., Solano-Campos, F., Madrigal-Mora, A., Villalobos-Sequeira, J., Medrano-Lozano, J., & Blanco-Peña, K. (2025). Pesticide contamination and antimicrobial resistance: Two threats to the Neotropical Otter (*Lontra longicaudis*) in the Peñas Blancas River Basin, Costa Rica. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *117*(104743). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.etap.2025.104743>
- Heidrich, V., Karlovsky, P., & Beule, L. (2021). ‘SRS’ R package and ‘q2-srs’ QIIME 2 plugin: Normalization of microbiome data using scaling with ranked subsampling (SRS). *Applied Sciences (Switzerland)*, *11*(23). <https://doi.org/10.3390/app112311473>
- Heni, A. C., Fackelmann, G., Eibner, G., Kreinert, S., Schmid, J., Schwensow, N. I., Wiegand, J., Wilhelm, K., & Sommer, S. (2023). Wildlife gut microbiomes of sympatric generalist species respond differently to anthropogenic landscape disturbances. *Animal*

- Microbiome*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s42523-023-00237-9>
- Hodkinson, B. P., & Grice, E. A. (2015). Next-Generation Sequencing: A Review of Technologies and Tools for Wound Microbiome Research. *Advances in Wound Care*, 4(1), 50–58. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0542>
- Ingala, M. R., Simmons, N. B., Wultsch, C., Krampis, K., Speer, K. A., & Perkins, S. L. (2018). Comparing microbiome sampling methods in a wild mammal: Fecal and intestinal samples record different signals of host ecology, evolution. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00803>
- Kartzinel, T. R., Chen, P. A., Coverdale, T. C., Erickson, D. L., Kress, W. J., Kuzmina, M. L., Rubenstein, D. I., Wang, W., & Pringle, R. M. (2015). DNA metabarcoding illuminates dietary niche partitioning by African large herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(26), 8019–8024. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503283112>
- Kumari, P., Dong, K., Eo, K. Y., Lee, W. S., Kimura, J., & Yamamoto, N. (2019). DNA metabarcoding-based diet survey for the Eurasian otter (*Lutra lutra*): Development of a Eurasian otter-specific blocking oligonucleotide for 12S rRNA gene sequencing for vertebrates. *PLoS ONE*, 14(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226253>
- Laurentino, I., Sousa, R., Corso, G., & Sousa-lima, R. (2019). To eat or not to eat: ingestion and avoidance of fecal content from communal latrines of *Lontra longicaudis* (Olfers, 1818). *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 14(1), 2–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.5597/lajam00248>
- Li, F., Yang, S., Zhang, L., Qiao, L., Wang, L., He, S., Li, J., Yang, N., Yue, B., & Zhou, C. (2022). Comparative metagenomics analysis reveals how the diet shapes the gut microbiota in several small mammals. *Ecology and Evolution*, 12(1), 1–16. <https://doi.org/10.1002/ece3.8470>
- Lin, H., Eggesbø, M., & Peddada, S. Das. (2022). Linear and nonlinear correlation estimators unveil undescribed taxa interactions in microbiome data. *Nature Communications*, 13(1), 14–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32243-x>
- López-Ruiz, J., Delgado-Estrella, A., Vázquez-Maldonado, L., & Poot-Delgado, C. (2023). Presence of Neotropical otter, *Lontra longicaudis annectens*, on Champotón River Banks, Campeche. *Therya Notes*, 4, 236–241. <https://doi.org/10.12933/therya>

- Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., & Knight, R. (2011). UniFrac : an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME Journal*, 169–172. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.133>
- Markowitz, V. M., Chen, I. M. A., Palaniappan, K., Chu, K., Szeto, E., Grechkin, Y., Ratner, A., Jacob, B., Huang, J., Williams, P., Huntemann, M., Anderson, I., Mavromatis, K., Ivanova, N. N., & Kyrpides, N. C. (2012). IMG: The integrated microbial genomes database and comparative analysis system. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), 115–122. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1044>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10–12.
- Martínez-Abraín, A., Marí-Mena, N., Vizcaíno, A., Vierna, J., Veloy, C., Amboage, M., Guitián-Caamaño, A., Key, C., & Vila, M. (2020). Determinants of Eurasian otter (*Lutra lutra*) diet in a seasonally changing reservoir. *Hydrobiologia*, 847(8), 1803–1816. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04208-y>
- McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C. G., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert, S. F., Hentschel, U., King, N., Kjelleberg, S., Knoll, A. H., Kremer, N., Mazmanian, S. K., Metcalf, J. L., Neelson, K., Pierce, N. E., ... Wernegreen, J. J. (2013). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9), 3229–3236. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218525110>
- McLaren, M. R., & Callahan, B. J. (2021). Silva 138.1 prokaryotic SSU taxonomic training data formatted for DADA2 [Data set]. *Zenodo*. <https://doi.org/https://doi.org/10.5281/zenodo.4587955>
- Metch, J. W., Burrows, N. D., Murphy, C. J., Pruden, A., & Vikesland, P. J. (2018). Metagenomic analysis of microbial communities yields insight into impacts of nanoparticle design. *Nature Nanotechnology*, 13(3), 253–259. <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0029-3>
- Meyer, F., Paarmann, D., D’Souza, M., Olson, R., Glass, E. M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., & Edwards, R. A. (2008). The metagenomics RAST server - A public resource for the automatic phylogenetic and

- functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-386>
- Moun, A., Ramesh, T., & Kalle, R. (2024). Riparian habitat quality and seasonality drives spatiotemporal habitat ecology of sympatric Asian otters in southern Western Ghats. *Frontiers in Mammal Science*, 3(December), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmamm.2024.1504722>
- Nam, N. N., Dang, H., Do, K., The, K., Trinh, L., & Lee, N. Y. (2023). Metagenomics : An Effective Approach for Exploring Microbial. *Foods*, 12, 2140.
- Navarro-Picado, J., Spínola-Parallada, M., Madrigal-Mora, A., & Fonseca-Sánchez, A. (2017). Selección de hábitat de Lontra longicaudis (Carnivora, Mustelidae) bajo la influencia de la represa hidroeléctrica del río Peñas Blancas y sus tributarios, Alajuela, Costa Rica. *Uniciencia*, 31(1), 73. <https://doi.org/10.15359/ru.31-1.8>
- Navgire, G. S., Goel, N., Sawhney, G., Sharma, M., Kaushik, P., Mohanta, Y. K., Mohanta, T. K., & Al-Harrasi, A. (2022). Analysis and Interpretation of metagenomics data: an approach. *Biological Procedures Online*, 24(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s12575-022-00179-7>
- Okamoto, Y., Ichinohe, N., Woo, C., Han, S. Y., Kim, H. H., Ito, S., Nakamura, C., Kumura, J., Nagaoka, K., & Yamamoto, N. (2021). Contrasting gut microbiota in captive Eurasian otters (*Lutra lutra*) by age. *Archives of Microbiology*, 203(9), 5405–5416. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02526-w>
- Punta, M., Coghill, P. C., Eberhardt, R. Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K., Ceric, G., Clements, J., Heger, A., Holm, L., Sonnhammer, E. L. L., Eddy, S. R., Bateman, A., & Finn, R. D. (2011). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D290–D301. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1065>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- R Core Team. (2023). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Ramírez-Bravo, O. E., Moreno Barrera, P. L., & Hernández-Santín, L. (2013). Public

- participation as an aid to conserve little known species: The case of the neotropical otter *Lontra longicaudis* (Olfers, 1818) in central Mexico. *IUCN/SCC Otter Specialist Group Bulletin*, 30(1), 39–43.
- Ramírez, C., Coronado, J., Silva, A., & Romero, J. (2018). *Cetobacterium* is a major component of the microbiome of giant amazonian fish (*Arapaima gigas*) in Ecuador. *Animals*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/ani8110189>
- Ray, K. J., Cotter, S. Y., Arzika, A. M., Kim, J., Boubacar, N., Zhou, Z., Zhong, L., Porco, T. C., Keenan, J. D., Lietman, T. M., & Doan, T. (2019). High-throughput sequencing of pooled samples to determine community-level microbiome diversity. *Annals of Epidemiology*, 39, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2019.09.002>
- Rheingantz, M. L., de Menezes, J. F. S., & de Thoisy, B. (2014). Defining Neotropical otter *Lontra longicaudis* distribution, conservation priorities and ecological frontiers. *Tropical Conservation Science*, 7(2), 214–229. <https://doi.org/10.1177/194008291400700204>
- Rheingantz, M. L., de Menezes, J. F. S., Galliez, M., & dos Santos Fernandez, F. A. (2017). Biogeographic patterns in the feeding habits of the opportunist and semiaquatic Neotropical otter. *Hydrobiologia*, 792(1). <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3095-5>
- Rheingantz, M. L., Santiago-Plata, V. M., & Trinca, C. S. (2017). The Neotropical otter *Lontra longicaudis*: a comprehensive update on the current knowledge and conservation status of this semiaquatic carnivore. *Mammal Review*, 47(4), 291–305. <https://doi.org/10.1111/mam.12098>
- Rheingantz, M. L., & Trinca, C. S. (2015). *The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T12304A21937379*. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T12304A21937379.en>
- Roberts, N. J., Clark, R. M., & Williams, D. (2016). Otter (*Lontra longicaudis*) spraint and mucus depositions: Early ecological insights into the differences in marking site selection and implications for monitoring prey availability. *IUCN/SCC Otter Specialist Group Bulletin*, 33(1), 8–17.
- Romdhane, S., Spor, A., Banerjee, S., Breuil, M. C., Bru, D., Chabbi, A., Hallin, S., van der Heijden, M. G. A., Saghai, A., & Philippot, L. (2022). Land-use intensification differentially affects bacterial, fungal and protist communities and decreases

- microbiome network complexity. *Environmental Microbiomes*, 17(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1186/s40793-021-00396-9>
- Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 17.
<https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>
- Salis, R., Sunde, J., Gubonin, N., Franzén, M., & Forsman, A. (2024). Performance of DNA metabarcoding, standard barcoding and morphological approaches in the identification of insect biodiversity. *Molecular Ecology Resources*, 24(8), 1–15.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.14018>
- Sanders, J. G., Beichman, A. C., Roman, J., Scott, J. J., Emerson, D., McCarthy, J. J., & Girguis, P. R. (2015). Baleen whales host a unique gut microbiome with similarities to both carnivores and herbivores. *Nature Communications*, 6, 1–8.
<https://doi.org/10.1038/ncomms9285>
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537 LP – 7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Schmidt, P. A., Bálint, M., Greshake, B., Bandow, C., Römbke, J., & Schmitt, I. (2013). Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biology and Biochemistry*, 65(June), 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.05.014>
- Shin, N. R., Whon, T. W., & Bae, J. W. (2015). Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*, 33(9), 496–503.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>
- Singh, R. P., & Kothari, R. (2017). The Omics Era and Host Microbiomes. In R. P. Singh, R. Kothari, P. G. Koringa, & S. P. Singh (Eds.), *Understanding Host-Microbiome Interactions - An Omics Approach* (pp. 3–12). Springer Nature.
<https://doi.org/10.1007/978-981-10-5050-3>
- Smith, C., Whitworth, A., Brunner, E., & Pomilia, M. (2020). Habitat selection and diet of

- the Neotropical otter (*Lontra longicaudis*) on the Osa Peninsula, Costa Rica, and range-wide monitoring recommendations. *Neotropical Biodiversity*, 6(1), 62–74. <https://doi.org/10.1080/23766808.2020.1739453>
- Spychala, M. S., Venna, V. R., Jandzinski, M., Doran, S. J., Durgan, D. J., Ganesh, B. P., Ajami, N. J., Putluri, N., Graf, J., Bryan, R. M., & McCullough, L. D. (2018). Age-related changes in the gut microbiota influence systemic inflammation and stroke outcome. *Annals of Neurology*, 84(1), 23–36. <https://doi.org/10.1002/ana.25250>
- Suzuki, T. A. (2017). Links between natural variation in the microbiome and host fitness in wild mammals. *Integrative and Comparative Biology*, 57(4), 756–769. <https://doi.org/10.1093/icb/ix104>
- Trevelline, B. K., Fontaine, S. S., Hartup, B. K., & Kohl, K. D. (2019). Conservation biology needs a microbial renaissance: A call for the consideration of host-associated microbiota in wildlife management practices. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1895). <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2448>
- URycki, D. R., Good, S. P., Crump, B. C., Chadwick, J., & Jones, G. D. (2020). River Microbiome Composition Reflects Macroscale Climatic and Geomorphic Differences in Headwater Streams. *Frontiers in Water*, 2(November). <https://doi.org/10.3389/frwa.2020.574728>
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J. M., ... Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25(4), 929–942. <https://doi.org/10.1111/mec.13428>
- Valqui, J., Hartl, G. B., & Zachos, F. E. (2010). Non-invasive genetic analysis reveals high levels of mtDNA variability in the endangered South-American marine otter (*Lontra felina*). *Conservation Genetics*, 11(5), 2067–2072. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0069-9>
- Van Rossum, T. V., Peabody, M. A., Uyaguari-Diaz, M. I., Cronin, K. I., Chan, M., Slobodan, J. R., Nesbitt, M. J., Suttle, C. A., Hsiao, W. W. L., Tang, P. K. C., Prystajek, N. A., & Brinkman, F. S. L. (2015). Year-long metagenomic study of river

- microbiomes across land use and water quality. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01405>
- Wang, J., Fan, H., Han, Y., Zhao, J., & Zhou, Z. (2017). Characterization of the microbial communities along the gastrointestinal tract of sheep by 454 pyrosequencing analysis. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30(1), 100–110. <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0166>
- Yu, J., Feng, Q., Wong, S. H., Zhang, D., Yi Liang, Q., Qin, Y., Tang, L., Zhao, H., Stenvang, J., Li, Y., Wang, X., Xu, X., Chen, N., Wu, W. K. K., Al-Aama, J., Nielsen, H. J., Kiilerich, P., Jensen, B. A. H., Yau, T. O., ... Wang, J. (2017). Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. *Gut*, 66(1), 70–78. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309800>
- Zou, D., Ma, L., Yu, J., & Zhang, Z. (2015). Biological databases for human research. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 13(1), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.01.006>

10. Anexos

Cuadro 1S. Datos de colecta de las muestras en la cuenca del Río Peñas Blancas entre los años 2019 y 2020.

Código	Sitio	Uso de Suelo	Altura de la Cuenca	Fecha de Colecta	Coordenadas del Sitio de Colecta
A01	Chachagua	Agricultura en pastizales	Media	2020-01-12	10°24'33.83"N 84°34'8.21"O
A02	Pajuila	Pasto	Media	2020-02-05	10°27'15.30"N 84°33'55.88"O
A03	Burro	Pasto	Media	2019-11-19	10°26'40.22"N 84°35'39.13"O
A04	Peñas Blancas	Cultivos permanentes	Media	2019-10-11	10°22'16.55"N 84°34'45.46"O
A05	Fortuna	Pasto	Media	2019-10-22	10°28'1.11"N 84°37'13.41"O
A06	Burro	Pasto	Media	2019-10-17	10°27'17.58"N

Código	Sitio	Uso de Suelo	Altura de la Cuenca	Fecha de Colecta	Coordenadas del Sitio de Colecta
					84°37'28.66"O
A07	Burro	Pasto	Media	2020-02-06	10°26'35.32"N 84°35'35.63"O
A08	Represa Peñas Blancas	Bosque	Alta	2019-09-11	10°21'50.59"N 84°37'48.53"O
A09	Peñas Blancas	Cultivos permanentes	Media	2019-09-11	10°22'6.83"N 84°35'21.95"O
A10	Peñas Blancas	Cultivos permanentes	Media	2019-09-11	10°22'16.85"N 84°34'59.82"O
A11	Peñas Blancas	Cultivos permanentes	Media	2019-09-11	10°22'15.82"N 84°34'38.19"O
A12	Burro	Pasto	Media	2019-10-17	10°27'22.78"N 84°37'48.61"O
A13	Fortuna	Pasto	Media	2019-10-22	10°28'0.39"N 84°37'12.55"O
A14	Burro	Pasto	Media	2020-02-06	10°26'35.54"N 84°35'35.83"O
A15	Burro	Pasto	Media	2020-02-06	10°26'35.08"N 84°35'35.36"O
A16	Peñas Blancas	Cultivos permanentes	Media	2020-02-10	10°22'18.75"N 84°34'48.32"O
A17	Fortuna	Agricultura en pastizales	Media	2019-09-25	10°27'57.48"N 84°36'5.39"O
A18	Peñas Blancas	Cultivos permanentes	Media	2019-10-09	10°25'56.69"N 84°33'19.37"O
A19	Peñas Blancas	Pasto	Media	2019-12-18	10°25'56.74"N 84°33'19.30"O
A20	Chachagua	Agricultura en pastizales	Media	2020-01-12	10°24'33.83"N 84°34'8.21"O
A21	Chachaguita	Pasto	Media	2020-02-10	10°25'51.18"N 84°33'50.21"O
A22	Fortuna	Agricultura en pastizales	Baja	2019-10-24	10°28'12.79"N 84°34'24.29"O
A23	Fortuna	Pasto	Baja	2019-10-24	10°28'24.75"N 84°33'37.91"O

Código	Sitio	Uso de Suelo	Altura de la Cuenca	Fecha de Colecta	Coordenadas del Sitio de Colecta
A24	Burro	Pasto	Media	2020-01-18	10°26'35.01"N 84°36'18.46"O
A25	Represa Peñas Blancas	Bosque	Alta	2019-09-11	10°20'46.58"N 84°39'18.49"O
A26	Pajuila	Pasto	Baja	2019-10-14	10°27'22.91"N 84°33'20.93"O
A27	Fortuna	Pasto	Baja	2019-11-14	10°28'22.52"N 84°33'20.26"O
A28	Burro	Pasto	Media	2019-11-19	10°26'36.16"N 84°35'36.01"O
A29	Fortuna	Pasto	Baja	2019-12-16	10°28'20.08"N 84°32'28.25"O
A30	Burro	Pasto	Media	2020-02-23	10°26'37.17"N 84°36'3.39"O
A31	Fortuna	Agricultura en pastizales	Media	2019-09-25	10°27'57.60"N 84°36'13.39"O
A32	Chachagua	Pasto	Media	2019-10-14	10°25'46.94"N 84°33'27.10"O
A33	Peñas Blancas	Cultivos permanentes	Media	2019-11-27	10°22'16.56"N 84°34'45.18"O
A34	Pajuila	Pasto	Media	2020-02-05	10°27'15.90"N 84°34'2.66"O
A35	Burrito	Agricultura en pastizales	Media	2020-02-06	10°25'56.54"N 84°35'53.31"O
A36	Fortuna	Agricultura en pastizales	Media	2019-09-25	10°27'53.41"N 84°35'58.12"O
A37	Fortuna	Pasto	Alta	2019-09-25	10°27'9.07"N 84°39'19.97"O
A38	Fortuna	Pasto	Baja	2019-12-16	10°28'25.54"N 84°32'37.08"O
A39	Peñas Blancas	Cultivos permanentes	Media	2019-12-17	10°22'16.59"N 84°34'45.42"O
A40	Burro	Pasto	Media	2019-10-17	10°27'21.12"N 84°37'49.59"O
A41	Burro	Pasto	Media	2020-02-06	10°26'35.97"N

Código	Sitio	Uso de Suelo	Altura de la Cuenca	Fecha de Colecta	Coordenadas del Sitio de Colecta
					84°35'35.97"O
A42	Fortuna	Agricultura en pastizales	Media	2019-09-25	10°27'57.12"N 84°36'9.73"O
A43	Fortuna	Agricultura en pastizales	Media	2019-09-25	10°27'58.65"N 84°36'18.51"O
A44	Fortuna	Pasto	Media	2019-10-22	10°28'1.97"N 84°37'14.94"O
A45	Fortuna	Agricultura en pastizales	Baja	2019-10-24	10°28'12.79"N 84°34'24.29"O
A46	Fortuna	Pasto	Baja	2019-10-24	10°28'30.89"N 84°34'2.60"O
A47	Peñas Blancas	Cultivos permanentes	Media	2019-09-11	10°22'14.63"N 84°35'10.70"O
A48	Burro	Pasto	Media	2019-10-17	10°27'22.27"N 84°37'44.51"O
A49	Burro	Agricultura en pastizales	Media	2019-11-26	10°26'23.96"N 84°34'40.86"O
A50	Burro	Pasto	Baja	2019-11-26	10°26'32.08"N 84°33'6.32"O
A51	Burro	Pasto	Media	2020-01-18	10°26'34.19"N 84°36'18.33"O
A52	Pajuila	Pasto	Media	2020-02-05	10°27'15.90"N 84°34'2.66"O
A53	Burro	Pasto	Media	2020-02-23	10°26'36.93"N 84°36'13.18"O
A54	Burro	Pasto	Media	2020-02-23	10°26'38.89"N 84°36'19.10"O
A55	Burro	Pasto	Media	2019-10-17	10°27'21.12"N 84°37'49.59"O
A56	Burro	Pasto	Media	2019-10-17	10°27'22.78"N 84°37'48.61"O
A57	Burro	Pasto	Media	2019-11-19	10°26'50.22"N 84°36'38.14"O
A58	Burro	Pasto	Media	2020-02-23	10°26'45.72"N 84°35'49.96"O

Código	Sitio	Uso de Suelo	Altura de la Cuenca	Fecha de Colecta	Coordenadas del Sitio de Colecta
A59	Fortuna	Agricultura en pastizales	Media	2019-09-25	10°27'59.09"N 84°36'22.42"O
A60	Fortuna	Pasto	Baja	2019-11-14	10°28'24.83"N 84°33'55.59"O
A61	Fortuna	Agricultura en pastizales	Media	2019-09-25	10°27'57.04"N 84°36'3.37"O
A62	Burro	Pasto	Media	2019-10-17	10°27'21.82"N 84°37'49.28"O
A63	Burro	Pasto	Media	2019-10-17	10°27'22.27"N 84°37'44.51"O
A64	Burro	Pasto	Media	2020-01-18	10°26'40.27"N 84°36'23.28"O
A65	Fortuna	Agricultura en pastizales	Media	2019-09-25	10°27'57.48"N 84°36'5.39"O
A66	Fortuna	Pasto	Alta	2019-09-25	10°27'7.24"N 84°39'22.32"O
A67	Burro	Pasto	Media	2019-10-17	10°27'22.27"N 84°37'44.51"O
A68	Peñas Blancas	Pasto	Media	2019-12-17	10°23'3.09"N 84°33'52.43"O
A69	Fortuna	Pasto	Media	2019-10-17	10°27'38.18"N 84°38'6.42"O
A70	Fortuna	Pasto	Media	2019-10-22	10°28'1.97"N 84°37'14.94"O
A71	Chachagua	Pasto	Media	2019-09-25	10°24'33.18"N 84°34'8.45"O
A72	Burro	Pasto	Media	2020-01-18	10°26'35.43"N 84°36'18.67"O
A73	Fortuna	Pasto	Media	2019-10-22	10°28'1.97"N 84°37'14.94"O
A74	Burro	Pasto	Media	2019-11-19	10°26'37.02"N 84°36'13.01"O
A75	Burro	Pasto	Media	2019-11-19	10°26'37.22"N 84°36'16.62"O

Cuadro 2S. Índice y longitud de la secuencia consenso de las secuencias de la región de control del ADNmt obtenidas de las muestras.

Código	Nombre de la muestra	Longitud de la secuencia consenso de la región control ADNmt (bp)	Especie del hit más alto	Número de accesión
A01	Cha5A	NA	NA	NA
A02	Paj7	283	NA	NA
A03	Bur12	354	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A04	PeB6	378	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A05	For12	326	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A06	Bur7	276	<i>Lontra longicaudis</i>	KY271062.1
A07	Bur23	NA	NA	NA
A08	E-PBA3	344	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A09	PeB1	NA	NA	NA
A10	PeB3	NA	NA	NA
A11	PeB4	343	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A12	Bur5B	NA	NA	NA
A13	For11	352	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A14	Bur22	NA	NA	NA
A15	Bur24	NA	NA	NA
A16	PeB12	NA	NA	NA
A17	For5A	NA	<i>Lontra longicaudis</i>	KY271062.1
A18	PeB5	355	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A19	PeB11	NA	NA	NA
A20	Cha5B	NA	NA	NA
A21	Cht1	340	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A22	For14A	325	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A23	For16B	NA	NA	NA
A24	Bur18	NA	NA	NA
A25	E-PBA1	NA	NA	NA
A26	Paj2	338	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A27	For18	NA	NA	NA
A28	Bur13	NA	NA	NA
A29	For21	351	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A30	Bur28	340	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A31	For2	NA	NA	NA
A32	Cha4A	NA	NA	NA
A33	PeB7	324	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1

Código	Nombre de la muestra	Longitud de la secuencia consenso de la región control ADNmt (bp)	Especie del hit más alto	Número de accesión
A34	Paj5A	NA	NA	NA
A35	But2	342	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A36	For7	NA	NA	NA
A37	For9	NA	NA	NA
A38	For19	NA	NA	NA
A39	PeB10	NA	NA	NA
A40	Bur3B	294	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A41	Bur21	NA	NA	NA
A42	For1	342	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A43	For3	191	<i>Lontra longicaudis</i>	KY271058.1
A44	For13C	354	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A45	For14B	NA	NA	NA
A46	For15	NA	NA	NA
A47	PeB2	NA	NA	NA
A48	Bur6B	NA	NA	NA
A49	Bur15	NA	NA	NA
A50	Bur16	NA	NA	NA
A51	Bur19	NA	NA	NA
A52	Paj5B	NA	NA	NA
A53	Bur27	398	<i>Lontra longicaudis</i>	KY271058.1
A54	Bur25	NA	NA	NA
A55	Bur3A	NA	NA	NA
A56	Bur5A	272	<i>Lontra longicaudis</i>	KY271062.1
A57	Bur8	NA	NA	NA
A58	Bur29	NA	NA	NA
A59	For4	NA	NA	NA
A60	For17	NA	NA	NA
A61	For6	NA	NA	NA
A62	Bur4	NA	NA	NA
A63	Bur6A	NA	NA	NA
A64	Bur17	NA	NA	NA
A65	For5B	338	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A66	For8	326	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A67	Bur6C	287	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A68	PeB8	328	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1

Código	Nombre de la muestra	Longitud de la secuencia consenso de la región control ADNmt (bp)	Especie del hit más alto	Número de accesión
A69	For10	NA	NA	NA
A70	For13A	NA	NA	NA
A71	Cha3	325	<i>Lontra longicaudis</i>	NC_079649.1
A72	Bur20	NA	NA	NA
A73	For13B	NA	NA	NA
A74	Bur10	NA	NA	NA
A75	Bur9	320	<i>Lontra longicaudis</i>	KY271058.1

NA = La región de ADNmt de la muestra no fue secuenciada.

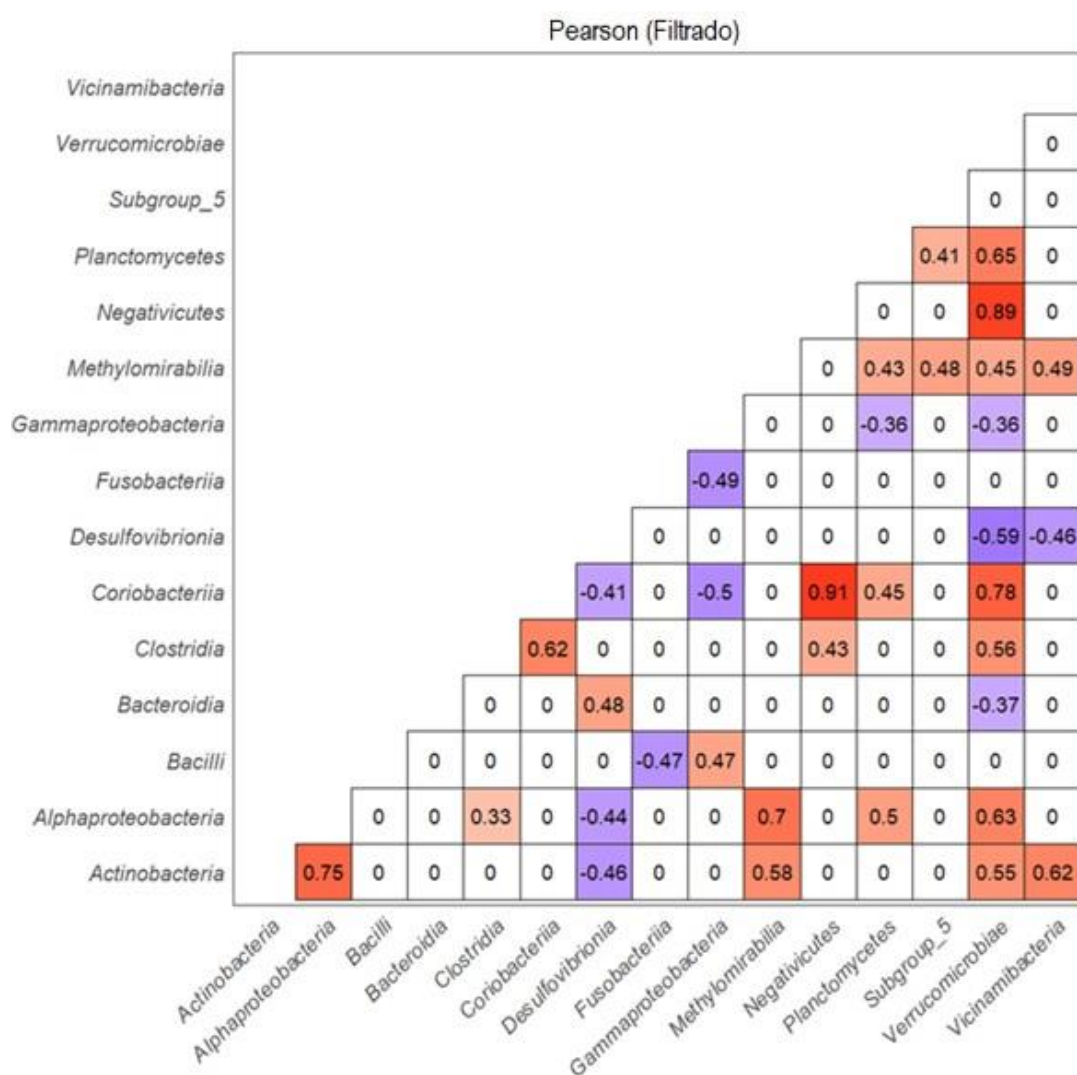


Figura 1S. Relación lineal con SECOM a nivel de clase, estimada mediante la medida de correlación de distancias, filtrada por valor p . Se destaca la correlación positiva entre Negativicutes y Coriobacteriia (Pearson 0.91).

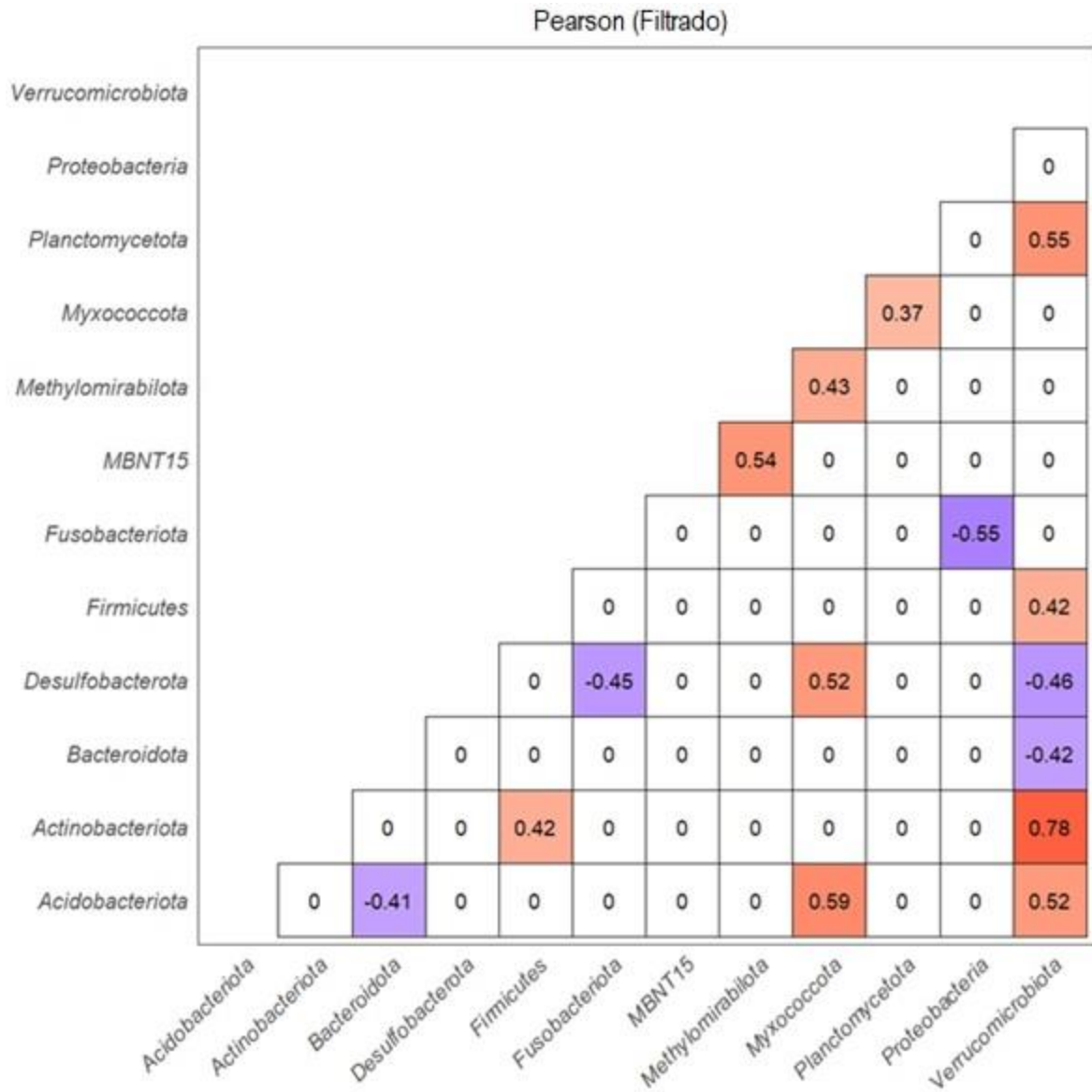


Figura 2S. Relación lineal con SECOM a nivel de filo, estimada mediante la medida de correlación de distancias, filtrada por valor *p*. Se destaca la correlación positiva entre Verrucomicrobiota y Actinobacteriota (Pearson 0.78).