

EFFECTO DEL CAUTIVERIO SOBRE LA DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA POBLACIONAL  
DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA NUTRIA NEOTROPICAL *Lontra longicaudis*  
(Olfers, 1818)

LAURA CAROLINA RODRIGUEZ REY

UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA  
BOGOTÁ DC  
2017

EFFECTO DEL CAUTIVERIO SOBRE LA DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA POBLACIONAL  
DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA NUTRIA NEOTROPICAL *Lontra longicaudis*  
(Olfers, 1818)

LAURA CAROLINA RODRIGUEZ REY

Trabajo de formación para la investigación para optar al título de Biólogo Marino

Directora  
JOHANNA SANTAMARÍA  
Bióloga PhD

UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA  
BOGOTÁ DC  
2017

Nota de Aceptación

---

---

---

---

Presidente del Jurado

---

Jurado

---

Jurado

Bogotá D.C 27 de junio de 2017

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres y mis hermanas

A mi directora Joanna Santamaría

A la fundación Omacha

Al profesor Álvaro Botero y su grupo de investigación de la Universidad del Quindío

Al parque zoológico Piscilago

Al zoológico de Cali

A la Universidad Jorge Tadeo lozano

## CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. OBJETIVOS .....	12
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	13
4. MARCO TEÓRICO .....	13
4.1. La microbiota y su función.....	13
4.2. Evolución y desarrollo de la microbiota intestinal en los mamíferos.....	15
4.3. Relación de la dieta y la microbiota .....	15
4.4 Caracterización de la nutria neotropical <i>L. longicaudis</i> .....	15
4.4.1 Generalidades .....	15
4.4.2 Habitat y distribución.....	16
4.4.3 Alimentación y comportamiento .....	16
4.4.4 Importancia ecológica .....	17
4.4.5 La nutria neotropical en cautiverio .....	18
4.5 Análisis de la diversidad y estructura de las poblaciones microbianas .....	18
4.5.1 Técnicas para el estudio de la microbiota intestinal .....	18
4.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis en gradiente denaturante (DGGE).....	19
5. ESTADO DEL ARTE.....	20
5.1 La microbiota de algunos mamíferos.....	20
5.2 Relación entre la microbiota intestinal y enfermedades de alta incidencia en humanos .....	21
6. METODOLOGÍA .....	22
6.1 Área de estudio .....	22
6.1.1 La cuenca del Río La Vieja (RV).....	22
6.1.2 La cuenca del Río Sinú (RS).....	23
6.1.3. Zoológicos .....	24
6.2 Recolección de muestras .....	24
6.3 Análisis de ácidos nucleicos .....	26

6.3.1 Extracción de ADN.....	26
6.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	26
6.3.3 Análisis DGGE.....	27
6.3.4 Análisis de la estructura de la comunidad bacteriana intestinal.....	27
6.3.5 Análisis de la diversidad de la comunidad bacteriana intestinal .....	28
7 RESULTADOS .....	28
7.1 Recolección de muestras y análisis de ácidos nucleicos .....	28
7.1.1 Muestras colectadas .....	28
7.1.2 Análisis de ácidos nucleicos .....	30
7.2 Resultados. ....	30
7.2.1 Reproducibilidad de los patrones de bandas obtenidos a través de DGGE .....	30
7.2.2 Análisis de la estructura de la comunidad bacteriana intestinal.....	33
7.2.3 Análisis de la riqueza de la comunidad bacteriana intestinal.....	35
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	38
CONCLUSIONES .....	40
RECOMENDACIONES.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41

## LISTA DE TABLAS

Pag

<b>Tabla 1.</b> Muestras de materia fecal colectadas en el Río La Vieja (RV), Río Sinú (RS), Zoológico de Psicilago (ZP) y Zoológico de Cali (ZC). La información presentada incluye el número total de muestras colectadas por zona, animal fuente de la muestra, su edad (cuando la información es conocida) y dieta. MF = Muestra fecal .....	29
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE FIGURAS

Pag

- Figura 1.** Ruta de recolección de muestras de materia fecal de nutria neotropical *Lontra longicaudis* por la cuenca del río La Vieja Quindío, Colombia. Se extrajeron del medio 12 muestras que son las que se identifican como RV= río La Vieja, MF= materia fecal..... 23
- Figura 2.** Ruta de recolección de muestras de materia fecal de nutria neotropical *Lontra longicaudis* por la cuenca del río Sinú Córdoba, Colombia. Se extrajeron del medio 2 muestras que son las que se identifican como RS= río Sinú, MF= materia fecal. .... 24
- Figura 3.** Muestra de materia fecal de nutria neotropical *L. longicaudis* depositada en una piedra en la cuenca del río La Vieja ..... 25
- Figura 4.** Perfiles de PCR-DGGE de la comunidad bacteriana presente en las muestras de heces fecales de la nutria neotropical *L. longicaudis*. Se observa el perfil de bandas de tres muestras de materia fecal colectadas en cada uno de los sitios de muestreo: Río La Vieja (RV), Río Sinú (RS), Zoológico de Piscilago (ZP) y Zoológico de Cali (ZC). MF = Materia fecal, a1 = Aislamiento de ADN total #1, HLII = Marcador de peso molecular..... 30
- Figura 5.** A-D Porcentaje de similitud de la región 16S rADN de las comunidades de bacterias obtenidas a partir de tres aislamientos de ADN total que se hicieron con cada una de las muestras de materia fecal de nutria (*L. longicaudis*) en el Río La Vieja (RV). Los dendogramas, fueron construidos con base en el coeficiente de Jaccard y el método de agrupamiento UPGMA. La similitud igual o mayor al 80% está demarcada por una línea roja, MF = materia fecal, a1 = aislamiento de ADN total #1, a2 = aislamiento de ADN total #2, a3 = aislamiento de ADN total #3..... 31
- Figura 6.** A-D Porcentaje de similitud de la región 16S rADN de las comunidades de bacterias obtenidas a partir de tres aislamientos de ADN total que se hicieron con cada una de las muestras de materia fecal de nutria (*L. longicaudis*) en el zoológico de Cali (ZC). Los dendogramas, fueron construidos con base en el coeficiente de Jaccard y el método de agrupamiento UPGMA. La similitud igual o mayor al 80% está demarcada por una línea roja, MF = materia fecal, a1 = aislamiento de ADN total #1, a2 = aislamiento de ADN total #2, a3 = aislamiento de ADN total #3..... 32
- Figura 7.** A y B Porcentaje de similitud de la región 16S rADN de las comunidades de bacterias. Estos resultados fueron obtenidos a partir de tres aislamientos de ADN total que se hicieron a cada una de las muestras de materia fecal de nutria (*L. longicaudis*) en el río Sinú (RS) y en el zoológico de Piscilago (ZP). Los dendogramas, fueron construidos con base en el coeficiente de Jaccard y el método de agrupamiento UPGMA. La similitud igual o mayor al 80% está demarcada por una línea roja, MF = materia fecal, a1 = aislamiento de ADN total #1, a2 = aislamiento de ADN total #2, a3 = aislamiento de ADN total #3.. 33
- Figura 8.** Perfiles de bandas arrojados por el análisis de PCR-DGGE y análisis de agrupamiento de los fragmentos 16S rADN. Estos resultados fueron obtenidos a partir del ADN total de materia fecal de la nutria neotropical (*L. longicaudis*) del río Sinú en Córdoba (RS-MF), de la cuenca del río La Vieja en Armenia (RV-MF), del zoológico de Cali (ZC-MF)

y del Parque zoológico Piscilago (ZP-MF). MF = materia fecal, a1 = aislamiento de ADN total #1.....	34
<b>Figura 9.</b> Perfiles de bandas arrojados por el análisis de PCR-DGGE y análisis de agrupamiento de los fragmentos 16S rADN. Estos resultados fueron obtenidos a partir del ADN total de materia fecal de la nutria neotropical ( <i>L. longicaudis</i> ) del río Sinú (RS-MF), de la cuenca del río La Vieja (RV-MF), del zoológico de Cali (ZC-MF) y del Parque zoológico Piscilago (ZP-MF) en cautiverio. MF = materia fecal, a1 = aislamiento de ADN total #1.	35
<b>Figura 10.</b> Riqueza de especies de comunidades bacterianas provenientes de muestras de materia fecal de animales silvestres y en cautiverio. Los valores de cada grupo son el promedio de la riqueza calculada para 14 muestras provenientes de individuos silvestres y 5 muestras provenientes de individuos en cautiverio. Las barras de error indican la desviación estándar. Diferencias no significativas están indicadas por las mismas letras minúsculas.....	36
<b>Figura 11.</b> Riqueza de especies de comunidades microbianas provenientes de muestras de materia fecal colectadas en las cuatro zonas de muestreo: río La Vieja (RV), n= 12; río Sinú (RS), n= 2; Zoológico de Piscilago (ZP), n= 2; y Zoológico de Cali (ZC), n= 3. Los valores de cada grupo son el promedio de la riqueza calculada para las muestras analizadas de cada zona. Las barras de error indican la desviación estándar. Diferencias no significativas están indicadas por las mismas letras minúsculas.....	36
<b>Figura 12.</b> Riqueza de especies de comunidades microbianas provenientes de muestras de materia fecal colectadas dentro de cada una de las cuatro zonas de muestreo: río La Vieja n=12 (A); río Sinú n= 2B), Zoológico de Piscilago n= 2 (C) y Zoológico de Cali n=3 (D). El valor de riqueza de cada muestra de materia fecal (MF) es el promedio de la riqueza calculada a partir de los tres aislamientos de ADN total extraídos de una misma muestra y en los zoológicos el promedio de las muestras del mismo individuo. Las barras de error indican la desviación estándar. Diferencias no significativas están indicadas por las mismas letras minúsculas.....	37

## LISTA DE ANEXOS

	Pág
<b>Anexo A.</b> Lista de muestras	47
<b>Anexo B.</b> Ficha de recolección para zoológicos	50
<b>Anexo C.</b> Fotos geles de agarosa	53
<b>Anexo D.</b> Fotos geles DGGE	59
<b>Anexo E.</b> Resultados estadísticos	61
<b>Anexo F.</b> Concentración de ADN total	76
<b>Anexo G.</b> vídeo metodología	CD

## RESUMEN

La nutria neotropical, *Lontra longicaudis*, es considerada como una especie bandera para la conservación de los ecosistemas en los que habita, actualmente se encuentra en estado vulnerable. Como estrategias de conservación se han propuesto programas de rehabilitación, crianza y reintroducción de individuos cautivos. Dentro de las estrategias de crianza, la dieta se convierte en uno de los aspectos del manejo más relevantes para ser estudiado, ya que afecta a la comunidad microbiana asociada al intestino. Esta comunidad es importante porque de ella dependen varios aspectos de la fisiología del animal.

Este es el primer trabajo en Suramérica sobre la comunidad bacteriana intestinal de la nutria neotropical *L. longicaudis*, en el cual se comparó la estructura y diversidad de la comunidad bacteriana de individuos silvestres y en cautiverio por medio de la técnica PRC-DGGE utilizando como marcador molecular la región del 16S rADN. Para evaluar la comunidad de bacterias del intestino de la nutria, se analizaron muestras de animales en cautiverio de los zoológicos de Piscilago y Cali y de animales en estado silvestre de la cuenca del río Sinú y de la cuenca del río La Vieja. Contrario a lo esperado, se observó que no hay diferencias en las características evaluadas de la comunidad de bacterias, entre individuos silvestres y en cautiverio.

PALABRAS CLAVE: microbiota intestinal, PCR-DGGE, riqueza de especies, 16S rADN.

## 1. INTRODUCCIÓN

La nutria neotropical, *Lontra longicaudis*, es considerada como una especie sombrilla para la conservación de los ecosistemas en los que habita, ya que su presencia es un indicador de alta disponibilidad energética y biodiversidad (Gallo *et al.*, 2008). Aunque su rango de distribución geográfico es amplio (Rodrigues *et al.*, 2013), actualmente se encuentra en estado vulnerable en Méjico, Venezuela, Colombia, Belice y Ecuador, a consecuencia de la contaminación, la extracción de oro, la pérdida de hábitat y la matanza por el conflicto con la pesca y la acuicultura (Rheingantz & Trinca, 2015). Sumado a las amenazas de origen antropogénico que diezman a las poblaciones de nutrias, también se ha detectado en ellas una creciente incidencia de enfermedades infecciosas de origen bacteriano (Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, 2007).

Como resultado de estas amenazas se estima que el número de individuos en la especie sufrirá un descenso del 25% en los próximos 27 años lo que equivale a tres generaciones de nutrias (Pacifi *et al.*, 2013). La propagación y mantenimiento de esta especie en cautiverio, puede convertirse en una de las estrategias que ayuden a mitigar el descenso que actualmente se está observando en el tamaño de las poblaciones de esta especie. El problema es que, se conoce poco sobre la nutria neotropical y para que los programas de reproducción sean exitosos es necesario llenar vacíos de información tanto biológica como de su crianza en cautiverio.

Dentro de la crianza de animales en cautiverio, la dieta se convierte en uno de los aspectos del manejo más importantes, no sólo porque a través de ella el animal obtiene todos los nutrientes y energía para apoyar sus procesos de crecimiento, reproducción y reparación, sino también porque la estructura y diversidad de la comunidad microbiana del intestino es afectada por el tipo de dieta (Morales *et al.*, 2010; Robles & Guarner, 2013; Sanz *et al.*, 2004).

La comunidad microbiana del intestino es importante porque determina en gran medida la eficiencia en la absorción de los nutrientes a nivel intestinal (Ruiz *et al.*, 2010). La dieta de una nutria silvestre tiene un amplio espectro que incluye las familias de peces Cichlidae, Pimelodidae, Characidae, y Mugilidae, crustáceos, pequeños, reptiles y aves (Mosquera *et al.*, 2013). En condiciones de cautiverio la dieta cambia y está constituida principalmente de pescado y suplementada con pollo, camarones, coco y vitaminas (Guerrero, 2002). Por lo tanto, es factible que la comunidad de microorganismos que habitan el intestino de la nutria neotropical cambie en condiciones de cautiverio con posibles consecuencias en el funcionamiento de su sistema inmune y de su sistema biológico en general, debido a una disminución en su capacidad de absorción de nutrientes (Ruiz *et al.*, 2010).

Como un primer paso para apoyar el desarrollo de metodologías de mantenimiento y crianza de nutrias tropicales en cautiverio, el objetivo general de este trabajo fue determinar a través un estudio comparativo, si la comunidad de microorganismos intestinales de las nutrias cautivas es diferente a la presente en las nutrias silvestres.

El proyecto, se llevó a cabo en colaboración con la fundación OMACHA y se ajusta al marco institucional de la universidad Jorge Tadeo Lozano. De acuerdo a la regulación vigente, el proyecto cuenta con el permiso marco de recolección de especímenes silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial de acuerdo a la resolución 1271 del 23 de octubre de 2014 y convenio con la CVS (Corporación Autónoma Regional de los Valles del Sinú y del San Jorge) a través de la fundación OMACHA.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Comparar la microbiota intestinal presente en animales de la nutria neotropical *L. longicaudis* que se encuentran en cautiverio con la microbiota de animales silvestres.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar la estructura de la comunidad bacteriana intestinal en individuos silvestres y en cautiverio de la nutria *L. longicaudis*.
- Determinar la diversidad de la comunidad bacteriana intestinal en individuos silvestres y en cautiverio de la nutria *L. longicaudis*.

- Comparar la estructura y diversidad de la comunidad bacteriana intestinal de la nutria *L. longicaudis* entre individuos silvestres y en cautiverio.

### 3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La nutria neotropical, un predador de amplio espectro que hace parte de la cima de la cadena alimenticia en algunos ecosistemas, es una especie utilizada como indicador del estado de la comunidad ecológica que habita. Actualmente se encuentra amenazada por los cambios ambientales que genera la actividad antrópica y por el aumento en la incidencia de infecciones bacterianas dentro de sus poblaciones.

La estrategia que se está implementando por la Fundación OMACHA en Córdoba y la universidad del Quindío en Armenia, para amortiguar el descenso en los tamaños poblacionales de la nutria neotropical, es su monitoreo constante, planes de manejo y protección del hábitad, así como programas de rehabilitación, crianza y reintroducción de organismos cautivos, a los cuales, se les ha cambiado una dieta silvestre compuesta por una amplia variedad de peces y crustáceos por pescado y ocasionalmente algún suplemento. Es muy probable que este cambio en la dieta afecte la microbiota intestinal de la nutria con consecuencias negativas en el funcionamiento fisiológico del animal, ya que la microbiota, tiene un papel importante en la absorción de nutrientes y en la protección contra infecciones causadas por bacterias patógenas.

Por esta razón, en este trabajo se comparó la microbiota intestinal de animales en cautiverio con aquella en animales silvestres, como un primer paso de las investigaciones que se deben realizar en el futuro para determinar cuáles son los efectos de un cambio de microbiota en la salud de la nutria y consecuentemente poder diseñar estrategias de manejo en relación a su alimentación, de tal forma que, se puedan criar animales sanos en cautiverio.

### 4. MARCO TEÓRICO

#### 4.1. La microbiota y su función

El término microbiota intestinal hace referencia a las comunidades microbianas presentes en los intestinos y hasta hace relativamente poco tiempo, era imposible estudiar con detalle estas comunidades debido que las técnicas de cultivo tradicionales en microbiología solo permiten el crecimiento de un porcentaje muy pequeño de microorganismos del total presentes en esta (Guinane & Cotter, 2013). Esto cambió con el desarrollo de técnicas moleculares como el PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), la secuenciación, el DGGE (Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante), que permiten estudiar los microorganismos viables pero no cultivables a través del análisis de los ácidos nucleicos que componen esas comunidades microbianas y del estudio de sus productos génicos.

Hoy en día, el término microbioma describe al conjunto formado por los microorganismos, sus genes y sus metabolitos (Khanna & Tosh, 2001). Por lo tanto, en estudios recientes es muy frecuente que el término "microbiota intestinal" sea reemplazado por "microbioma intestinal".

La microbiota intestinal de los mamíferos, conformada por trillones de bacterias en los intestinos (Khanna & Tosh, 2001), está compuesta fundamentalmente por 4 Fila del dominio Bacteria: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria (Lee & Hase, 2014; Ruiz *et al.*, 2010). En los mamíferos hay más células procariontas- que eucariotas, con más de 5 millones de genes microbianos que codifican para aproximadamente 20.000 funciones biológicas (Robles & Guarner, 2013).

Esta comunidad desarrolla una intensa actividad metabólica que le permite mantener una relación simbiótica controlada por la secreción de sustancias antimicrobianas de las células de Paneth situadas en el fondo de microvellosidades intestinales y de linfocitos ubicados entre las células epiteliales y en los folículos linfoides de las placas de peyer (Lorenzo, 2012).

La comunidad microbiana produce la gran mayoría de los ácidos grasos volátiles (AGV) (Lavery *et al.*, 2012). Las fibras consumidas por un animal son inicialmente hidrolizadas a almidón y poli- oligosacáridos. Estos productos son posteriormente fermentados por los microorganismos liberando agua, gases y AGV, que el huésped absorbe y oxida induciendo el reciclado de la energía (Lavery *et al.*, 2012). La microbiota intestinal también interviene en el almacenamiento de lípidos pues esta inhibe la fiaf (por sus siglas en inglés: "fasting induced adipocyte factor") y permite la expresión de la LPL (lipoproteína lipasa) que a su vez interviene en la captación celular de lipoproteínas a partir de triglicéridos (Morales *et al.*, 2010).

La microbiota intestinal influye además en la expresión de genes en la mucosa intestinal del huésped. Por ejemplo, la colonización de ratones axénicos por *Bacteroides thetaiotaomicron* induce la expresión de genes implicados en la defensa del organismo (Morales *et al.*, 2010). La microbiota además funciona como una barrera para impedir la colonización por patógenos lo que se conoce como 'interferencia bacteriana' la cual consiste en una barrera de mucosa que evita o atrofia el movimiento de bacterias patógenas, antígenos y sustancias tóxicas del lumen intestinal. La modulación del transporte de antígenos en la mucosa ha sido atribuida a los *Lactobacilli*. Las bacterias comensales también inhiben el crecimiento de sus competidores mediante la producción de sustancias antimicrobianas llamadas bacteriocinas que son péptidos también conocidos como "autobióticos" y que se expresan de forma específica para cada especie (Chagoyan *et al.*, 2004).

Otras funciones de la microbiota son la de proteger de patógenos, lo que se conoce como "resistencia a la colonización" y La influencia en la respuesta inmune. Por ejemplo, bacterias como *Bacteroides fragilis* produce un polisacárido capsular A que tiene efectos inmunomoduladores potentes mediante la supresión de la activación del factor-kB en huéspedes como ratones (Prakash *et al.*, 2011).

## 4.2. Evolución y desarrollo de la microbiota intestinal en los mamíferos

Los mamíferos ancestrales, que aparecieron en el paleoceno y proliferaron desde el triásico superior hace unos 228 millones de años, eran carnívoros (Pidal, 2006). Con el tiempo surge la herbivoría con mucho éxito de tal forma que el 80% de los mamíferos actuales pertenecen a este grupo alimenticio (Jaureguizar, 1986).

Sin importar las preferencias que los mamíferos tengan en su alimentación, la microbiota intestinal ha estado acompañándolos desde sus orígenes, con diferencias y semejanzas en la composición microbiana entre carnívoros, herbívoros y omnívoros. Por ejemplo, en el caso del panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*) su microbiota intestinal es muy similar a la de los carnívoros siendo él completamente herbívoro (Zhu *et al.*, 2011), y para la microbiota de los herbívoros, algunas características muy particulares son, primero, la capacidad que estos microorganismos le brindan a algunos de fermentar celulosa y segundo, un mayor número de fila dentro de su comunidad microbiana intestinal que en los carnívoros y omnívoros (Ley *et al.*, 2008).

La microbiota intestinal se adquiere y depende del ambiente (Ley *et al.*, 2008). Los embriones de los mamíferos se desarrollan dentro de una serie de capas como la placenta que lo mantienen en un ambiente estéril dentro de la madre (Sadler & Langman, 2007). Al nacer por parto natural este nuevo individuo es colonizado rápidamente por las bacterias de la vagina de su madre (Knight, 2014). Con el tiempo su microbiota comienza a cambiar, de ser dominada por una similar a la vaginal (en la que predominan las bacterias anaerobias facultativas que pertenecen a los fila Proteobacteria y Actinobacteria) comienza a parecerse a la bucal y finalmente a la intestinal de un individuo adulto donde dominan las bacterias que pertenecen a los fila Firmicutes y Bacteroidetes (Bäckhed, 2011; Knight, 2014).

## 4.3. Relación de la dieta y la microbiota

Hoy en día se sabe que cambios en la dieta de mamíferos y la malnutrición, ya sea por insuficiencia o exceso, pueden producir inflamación de los intestinos y deficiencias en el funcionamiento del sistema inmune (Ruiz *et al.*, 2010). El trabajo con ratones libres de bacterias ha demostrado como la dieta y la manipulación del microbioma pueden generar obesidad o diabetes y también abre las puertas a los tratamientos basados en manipulación de la microbiota al tratarla como un órgano más del cuerpo (Baquero & Nombela, 2012).

## 4.4 Caracterización de la nutria neotropical *L. longicaudis*

### 4.4.1 Generalidades

Las nutrias o *Tzulá* en el lenguaje maya que traduce 'perro de agua' fueron bien conocidas por los pueblos Nahuas y Mayas (Reynoso, 2004). La nutria neotropical (*Lontra longicaudis*) es un mamífero carnívoro perteneciente a la familia de los Mustelidae, esta especie se subdivide geográficamente en 3 subespecies: *L. longicaudis annectes* (que se

distribuye en México, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela y Ecuador), *L. longicaudis enudris* (distribuido a través de la Guayana Francesa, Surinam, Trinidad y Perú), y *L. longicaudis longicaudis* (Distribuidos en la mayor parte de Sudamérica, incluyendo Brasil y Uruguay) (Trinca *et al.*, 2012).

La nutria neotropical mide alrededor de 1,2 m, pesa aproximadamente 12 kg y presenta un dimorfismo sexual en el que los machos son más grandes en un 25%. Su cuerpo es alargado de color café claro y desde el labio superior hasta el vientre, tiene un color blanco crema uniforme. Su cola es cilíndrica, tiene un cráneo alargado, patas cortas y gruesas, orejas pequeñas y redondas y poseen glándulas anales de olor (Hans, 2006). Tienen el pelaje largo, con  $\frac{3}{4}$  de pulgada de espesor que les permite vivir en aguas extremadamente frías. También tienen un metabolismo rápido lo que les da la capacidad de mantener el calor de sus cuerpos (Larivière, 1999).

Con relación a su reproducción, la preñez dura 50 días aproximadamente, las crías nacen con pelo y duran en las madrigueras alrededor de 2 meses y luego hay un cuidado por parte de la madre hasta que la cría alcanza la madurez (Portocarrero *et al.*, 2009; Rodríguez & Trujillo, 2006).

#### 4.4.2 Hábitat y distribución

La nutria neotropical se distribuye a lo largo de Sur América, es muy común desde México, pasando por Uruguay, Paraguay y la parte norte de Argentina (Larivière, 1999). Esta especie se encuentra presente desde el nivel del mar hasta los 4.000 m (Rheingantz & Trinca, 2015). Habita en diversos tipos de ecosistemas como lo son zonas áridas con bosques espinosos y matorrales, bosques tropicales, zonas pantanosas, bosques sub andinos, ambientes costeros, zonas de manglar, en climas fríos y templados y hasta en ríos alto andinos (Duque *et al.*, 2013; Mayor & Botero, 2010; Trinca *et al.*, 2012). En Colombia, se distribuye en una amplia zona que abarca cerca del 60% del territorio nacional, comprendiendo la cuenca del río Orinoco (afluentes: Arauca, Casanare, Ele, Lipa, Cravo Sur, Cusiana, Pautó, Meta, Manacacías, Bitá, Vichada, Duda, Guayabero, Guaviare, Inírida) y la cuenca del Amazonas (afluentes: Putumayo, Caucajá, Caquetá, Cahuinarí, Apaporis, Mirití-Paraná y Vaupés (Avella *et al.*, 2016). A pesar de su amplia distribución, las aéreas que habita deben cumplir con dos principales requisitos como lo son una amplia vegetación ribereña y buena cobertura de escape. Aunque las nutrias prefieren zonas no intervenidas también se les ha visto en zonas ribereñas con influencia antrópica y ambientes degradados (Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, 2007).

#### 4.4.3 Alimentación y comportamiento

Son animales solitarios se encuentran en grupos únicamente cuando las madres tienen crías y se estima que cada 2-3 km se puede observar un individuo. La mayor parte de su vida la pasan en ecosistemas acuáticos, aunque comparten su nicho con la nutria gigante de río *Pteronura brasiliensis*. Se cree que estas dos especies no compiten y se

evitan dado que desarrollan actividades en diferentes horas del día. Mientras que la nutria neotropical es activa durante la puesta de sol y la noche, la otra es activa desde el amanecer hasta la puesta de sol. Para ellas la comunicación olfativa es muy importante y en los campamentos suelen revolver un poco la vegetación a las orillas (Portocarrero *et al.*, 2009). Se alimenta principalmente de insectos, crustáceos, pero su preferencia está principalmente en las familias de peces Cichlidae, (Pimelodidae), Characidae, y Mugilidae, aunque se ha reportado además aves, pequeños mamíferos, reptiles como Basiliscus y ocasionalmente frutas o material vegetal, que se ha detectado en sus heces (Chemes *et al.*, 2010.; Duque *et al.*, 2013; Gallo-Reynoso *et al.*, 2008.; Mosquera *et al.*, 2013).

Para la cuenca del río Roble (Alto Cauca), la dieta está representada por 14 categorías alimentarias. Las categorías más representativas fueron peces (76,7%), seguidos por insectos (12,67%), reptiles (0,70%) y un renglón que se clasificó como “otros” (9,86%). Dentro de los peces, la familia más consumida fue Loricariidae (corrunchos) donde *Chaetostoma* sp. Fue la especie más depredada por la nutria, representada con un 22,61%; seguida de *Hypostomus* sp. 9,55% y *Ancistrus* sp. 8,54%. Otras especies de peces que están siendo aprovechadas por la nutria, incluyen el jetaeperro *Apteronotus* sp. (11,6%), la sabaleta *Brycon henni* (9,86%), el rollizo *Lebiasina* sp. (0,70%) y el bagre *Rhamdia* sp. (9,15%). El siguiente grupo en importancia fueron los insectos representados por larvas de cigarras *Corydalus* sp. (Familia Corydalidae; 12,68%) y entre los reptiles se encontró al lagarto Jesucristo, *Basiliscus* sp (Mayor & Botero, 2010).

En el río La Vieja, se han clasificado en 13 categorías alimenticias: los peces dominan 10 de ellas, seguidos por insectos, mamíferos y gasterópodos. La nutria no varió el consumo de presas entre la temporada de altas y bajas lluvias, las tres especies que presentan mayor importancia para la dieta son: *Apteronotus* sp. (37,46 %), *Hypostomus* sp.(33,28 %), *R. quelen* (30,50 %) y en menor proporción, *Ichthyoelephas longirostris* (23,84 %) y *Ancistrus* sp. (22,91 %), siendo éstos, de carácter ocasional (Restrepo & Botero-Botero, 2012).

#### 4.4.4 Importancia ecológica

Al ser carnívoros y tener un amplio espectro en su dieta, se consideran bio-indicadores (Mosquera *et al.*, 2013). La disminución de las poblaciones de nutrias en Colombia comienza en la década de los 50s cuando por el valor comercial de sus pieles, estos animales fueron llevados a una dramática reducción de la cual surgió la resolución 574 de julio 24 de 1973 prohibiendo su caza y comercialización (Portocarrero *et al.*, 2009).

Adicionalmente el reciente aumento de la información disponible en grandes partes de su área de distribución ubica a la nutria neotropical (*L. longicaudis*) en un estado vulnerable (Rheingantz & Trinca, 2015; Rodríguez *et al.*, 2006). Aunque aún se desconocen muchos aspectos de su biología, demografía y comportamiento, hay una gran variedad de amenazas antropogénicas como la contaminación, la extracción de oro, la pérdida de hábitat, la matanza por el conflicto con la pesca y la acuicultura (Nidasio & González, 2009). Estas amenazas afectarán el estado de la población con una disminución probablemente

del 25% de su abundancia en los próximos 27 años (tres generaciones) (Pacifci *et al.*, 2013). Existen grandes vacíos en la información que se tiene sobre estos organismos puesto que son muy esquivos y esto dificulta su investigación. Además de las amenazas antropogénicas se han detectado también una serie de enfermedades las cuales se describen como infecciones bacterianas (Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, 2007).

#### 4.4.5 La nutria neotropical en cautiverio

La información del mantenimiento en cautiverio es muy escasa. Se han documentado algunos requerimientos nutricionales aunque no específicamente para *L. longicaudis*. Para mustélidos generalmente se ha propuesto una dieta de 30-38% de proteína, 18-22% de grasa, 7% de cenizas y 3% de fibra que son los formulados para la nutria asiática (*Aonyx cinérea*). Al no haber requerimientos nutricionales establecidos para la nutria Neotropical, se han utilizado como referencia los requerimientos del gato doméstico, según las tablas del NRC (National Research Council) y en otras ocasiones se han implementado como base, las recomendaciones de dietas para la nutria de río norteamericana (Maslanka *et al.*, 2002).

Algunos zoológicos y organizaciones ambientales han propuesto diferentes programas para la conservación de esta especie (Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, 2007; Mayor & Botero, 2010; Mosquera *et al.*, 2013). Uno de sus objetivos principales es lograr su cría en cautiverio, de modo que en el zoológico de Santa Fe, en el municipio de Antioquia, nacieron dos nutrias en abril de 1999, las cuales ~~que~~ murieron a causa de la falta de experiencia de la madre. Posteriormente, en el año 2002 nacieron dos crías más y una fue trasladada al zoológico de Santa Cruz en el departamento de Cundinamarca (Arcila & Ramírez, 2004). Para el cuidado de los neonatos se ha recomendado el uso de lactoreemplazadores (Ra, 2009). Para mustélidos se han recomendado los usados comercialmente para felinos y suplementar con Ensure® y/o Emulsión de Scott® de dos a tres veces por semana. Cuando la cría tiene ya tres meses de edad puede empezar a consumir pulpa de pescado. Luego que deja la leche, la cría puede consumir pescados pequeños y regularmente presas vivas para variarle la dieta (Ra, 2009).

### 4.5 Análisis de la diversidad y estructura de las poblaciones microbianas

#### 4.5.1 Técnicas para el estudio de la microbiota intestinal

Las metodologías usadas para el estudio de la microbiota son muy similares en términos de la recolección de muestras y extracción de ADN. En general se ha utilizado el gen 16S rADN como marcador molecular para evaluar tanto estructura como diversidad de las comunidades microbianas del intestino (Alfano *et al.*, 2015; Amato *et al.*, 2013; Lavery *et al.*, 2012).

Los ácidos nucleicos cambian con el tiempo, por ello, pueden considerarse como cronómetros moleculares, el fragmento de ADN que codifica para el ARN ribosómico (16S rADN) es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas desde que Woese & Fox (1977) propusieron la división por dominios. El 16S rADN se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnicas resulta difícil (Rodicio & Mendoza, 2004). El avance de las técnicas moleculares como la secuenciación de los clones de cromosomas artificiales bacterianos (BAC), las bibliotecas de inserto pequeño hechas directamente del ADN, etc. Han facilitado el estudio de la microbiota (Guinane & Cotter, 2013).

#### 4.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis en gradiente denaturante (DGGE)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis en gradiente denaturante (DGGE), son técnicas moleculares muy sencillas y sensibles, de relativo bajo costo, eficientes y rápidas (Castro, 2005). Por sus características y por la información que se puede obtener de muestras metagenómicas de ácidos nucleicos, son ampliamente utilizadas para el estudio de las comunidades microbianas.

La PCR es una técnica básica en casi todos los estudios moleculares, se fundamenta en la re amplificación de un segmento específico de ADN, y fue diseñada por Kary Mullis en 1986. Esta reacción se lleva a cabo en un medio acuoso con un buffer que mantiene el pH de la reacción durante todo el proceso.

En esta técnica se obtienen millones de copias de una región en particular al someter el ADN muestra a un ciclo de temperaturas (denaturación, alineamiento y extensión) que permiten que la enzima taq polimerasa copie una región de ADN utilizando unos oligonucleótidos o "primers" de secuencia específica, los cuales marcan el sitio de iniciación de la secuencia que se quiere estudiar y por lo tanto indican también el inicio de copiado. En cada ciclo que se repiten las temperaturas se obtienen copias de la región de interés de forma exponencial (Castro, 2005).

El DGGE es una técnica de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos (Fischer & Lerman, 1983) En esta técnica, los fragmentos de ADN de doble cadena migran por un gel hasta encontrar una determinada concentración de urea y formamida (concentración desnaturante) a la cual las cadenas se separan localmente y el desplazamiento de las moléculas disminuye o se interrumpe (Muyzer *et al.*, 2004).

El PCR es una técnica básica para el DGGE ya que a través de ella se obtienen millones de copias de una secuencia específica de ADN y a través del DGGE se pueden separar en un gel de poliacrilamida los diferentes alelos de esta secuencia amplificada (Muyzer *et al.*, 2004). Esto quiere decir que esta técnica permite separar la misma región de muchos organismos por sus diferencias en secuencias alélicas (Bernbom *et al.*, 2006), lo que significa que es posible separar las especies de bacterias que componen la microbiota intestinal de la nutria neotropical *L. longicaudis* por las diferencias que presenta la región del 16S rADN.

## 5. ESTADO DEL ARTE

### 5.1 La microbiota de algunos mamíferos

En los mamíferos como ya se mencionó anteriormente la microbiota es parte fundamental y se ha desarrollado junto con cada especie brindando la capacidad de adaptarse a diferentes dietas.

Utilizando la técnica de DGGE se ha caracterizado el microbioma en mamíferos como el manatí antillano *Trichechus manatus* por Otálora & Vives, (2012). En este estudio se encontraron 9 a 10 especies correspondientes a los géneros *Butyrivibrio*, *Robinsoniella*, *Proteiniborus*, *Mogibacterium*, *Mogibacterium*, *Anaerovorax*, *Acetobacterium* del filo Firmicutes. Los resultados también mostraron coincidencias entre la comunidad microbiana del manatí antillano y los rumiantes monogástricos.

Lavery *et al.*, (2012) trabajaron el microbioma intestinal del león marino *Neophoca cinerea* en el que se encontró que hay una relación entre la proporción de Firmicutes y Bacteriódetes en el león marino y la proporción de estos mismos filo en las personas con obesidad. Se sabe que los Firmicutes y Bacteroidetes están relacionados, con la síntesis de ácidos grasos, el reciclaje de la energía y el almacenamiento de grasas (Lavery *et al.*, 2012).

La relación mamífero-microbiota intestinal se ha descrito en primates con el fin de comprender mejor sus funciones y relaciones evolutivas (Yildirim *et al.*, 2010). Estos estudios evidencian que, además de que la microbiota está asociada con la dieta, la microbiota gastrointestinal de los primates está también asociada a sus taxones, y son quizás específicos de la especie o población. También se ha concluido que el sorprendente grado de especificidad podría sugerir que los patrones de evolución de los primates pueden haber influido en la estructura de la microbiota de los mismos. Finalmente se ha demostrado que la diversidad bacteriana es alta y varía entre las especies estudiadas (Yildirim *et al.*, 2010).

Trabajos en koalas (*Phascolarctos cinereus*) y en pandas gigantes (*Ailuropoda melanoleuca*) muestran la importancia que tiene la microbiota en los vertebrados para la digestión de sustancias que el organismo por sí solo no podría utilizar. En los koalas observaron la variación de la microbiota en diferentes partes del cuerpo de los animales en cautiverio, pero no en la microbiota intestinal. Esto se debe a que su dieta, sigue siendo a base de hojas de *Eucalyptus* en estado silvestre o en cautiverio. Sin embargo su microbiota ocular si varía en cautiverio, con un aumento del número de bacterias de la familia *Phyllobacteriaceae*, lo que podría explicar las altas incidencias de infecciones con *Chlamydia* en cautiverio (Alfano *et al.*, 2015).

Zhu *et al.*, (2011) proponen que la microbiota intestinal del panda gigante se ha especializado para el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, xenobióticos, nucleótidos, glucanos, vitaminas y lípidos, obteniendo como resultados, que los pandas gigantes son capaces de digerir parcialmente fibras de bambú a pesar de que carecen de

enzimas que pueden degradar la celulosa. En este trabajo también se reportó que la proporción de secuencias de 16S rRNA pertenecientes a la clase clostridios de Firmicutes en individuos silvestres (73% del total de 3361 secuencias) y en cautiverio (42% del total de 2161 secuencias) es alta. Este resultado induce a pensar que cuando la dieta del animal no cambia bajo cautiverio se favorece el mantenimiento de una microbiota intestinal similar a la presente cuando el animal está libre en su hábitat.

Nelson *et al.*, (2013) en su trabajo con animales silvestres y en cautiverio de focas leopardo (*Hydrurga leptonyx*) y elefantes marinos (*Mirounga leonina*), demostraron que la microbiota depende del tipo de dieta, la morfología y fisiología intestinal, las relaciones sociales y las bacterias captadas, por tanto habrán diferencias entre los organismos silvestres y en cautiverio de una misma especie.

## 5.2 Relación entre la microbiota intestinal y enfermedades de alta incidencia en humanos

Es importante considerar lo que se conoce de la microbiota intestinal de los seres humanos ya que a partir de esta información, se pueden inferir ciertos aspectos de la relación microbiota-mamífero. Esto debido a que la microbiota intestinal de los mamíferos es similar y tiende a comportarse de la misma forma (Lavery *et al.*, 2012).

El Proyecto Microbioma Humano (HMP) que duro alrededor de cinco años fue lanzado en el 2008 por los Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos (NIH) con el objetivo de identificar y caracterizar las comunidades microbianas presentes en diferentes cavidades del cuerpo humano y buscar las correlaciones entre los cambios en el microbioma y la salud y la enfermedad humana. El HMP ha caracterizado a las comunidades microbianas que se encuentran diferentes partes del cuerpo humano: fosas nasales, la cavidad bucal, la piel, el tracto gastrointestinal y del tracto urogenital (Turnbaugh *et al.*, 2007).

Dentro de los descubrimientos más importantes e inesperados reportados en la literatura científica se destaca el que afirma que cambios en la microbiota intestinal están relacionados de forma muy significativa, no solamente con la diabetes y enfermedades autoinmunes, sino también con la obesidad, las afectaciones en el colón, las enfermedades inflamatorias del intestino, la enfermedad celíaca y la diabetes mellitus tipo 1 (Baquero & Nombela, 2012; Icaza, 2012; Knight, 2014.; Prakash *et al.*, 2011).

En los últimos 30 a 40 años, se ha propuesto que el incremento de la higiene, una falta de exposición a diversos microorganismos y una disminución de la carga microbiana en los primeros meses de vida debido a una mayor frecuencia de nacimientos por cesárea (Knight, 2014; Rook & Brunet, 2005), son responsables del incremento de enfermedades respiratorias, autoinmunes (DM tipo1, esclerosis múltiple, y la enfermedad de graves), atopias (eczema, asma, rinitis, alergias) y de la obesidad. Por otro lado cambios en la dieta en las culturas humanas hacia un mayor consumo de alimentos procesados se han ligado a un incremento en las enfermedades asociadas a la inflamación de las mucosas (Sartor & Mazmanian, 2012) tales como la Disbiosis que es una alteración de la microbiota en el

intestino; si las bacterias intestinales se alteran pueden desencadenar el desarrollo de enfermedades, como en el síndrome de inflamación intestinal donde la alteración facilita la adhesión de los patógenos a la pared del intestino (Carding *et al.*, 2015). La Disbiosis además puede ser el resultado de la exposición a diversos factores ambientales, como la dieta, las toxinas, las drogas y los agentes patógenos, y estas alteraciones tienen el mayor potencial para causar alteraciones microbianas como se ha visto en modelos animales experimentales (Lee & Hase, 2014).

No toda la investigación se ha enfocado en buscar la causa de las enfermedades más comunes en las poblaciones humanas. Gracias a los resultados de las investigaciones científicas enfocadas en el estudio de la asociación entre microorganismos y animales, se han desarrollado tratamientos y estrategias para manipular la microbiota intestinal como lo son los pro bióticos (alimentos que contienen bacterias benéficas), los prebióticos (alimentos que benefician a la microbiota) y se ha planteado la hipótesis de que la combinación de pro bióticos y prebióticos tiene un efecto sinérgico (Prakash *et al.*, 2011).

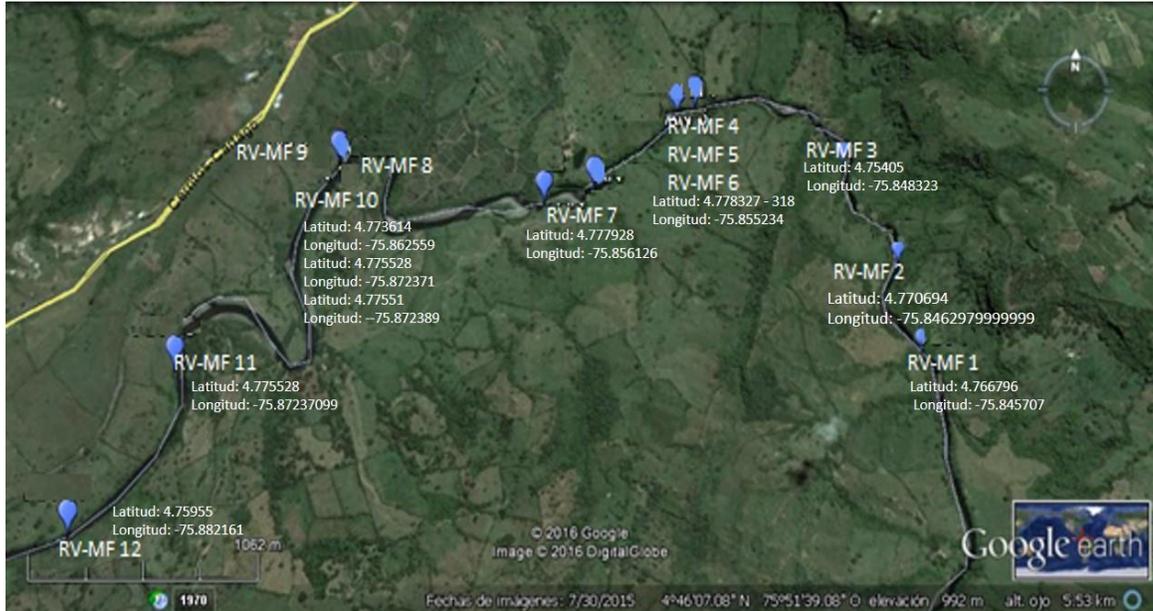
## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Área de estudio

Para comparar la microbiota intestinal presente en animales silvestres vs. la microbiota de animales en cautiverio, se usaron muestras de ADN total aisladas de materia fecal colectada en las cuencas del río La Vieja (RV) y el río Sinú (RS) como zonas silvestres y de los zoológicos de Piscilago (ZP) y Cali (ZP) como zonas de cautiverio.

#### 6.1.1 La cuenca del Río La Vieja (RV)

La cuenca hidrográfica del río La Vieja, se encuentra ubicada en el centro occidente colombiano, tienen jurisdicción los departamentos de Risaralda, Valle del Cauca y Quindío. La cuenca comprende una superficie total de 2880,14 Km<sup>2</sup>, geográficamente se enmarca entre las coordenadas: 4'04' y 4' 49' latitud norte y 75'24'y 75'57'longitud oeste (Restrepo & Botero-Botero, 2012). La cuenca forma parte de la eco región del eje cafetero donde predominan paisajes de piedemonte y valles interandinos, el paisaje en la cuenca se encuentra predominando la actividad agropecuaria (ganadería y cultivo), seguido de bosques de *Guadua angustifolia* y bosque sub andino (Botero *et al.*, 2010). La temperatura promedio es de 24°C, la temporada de lluvias va de octubre a diciembre y de abril a mayo, de junio a septiembre y de enero a marzo se considera época seca o de precipitaciones mínimas. Esta región está sometida a una fuerte degradación por parte de la actividad agropecuaria, vertimiento de aguas residuales, intervención de bosques ribereños, explotación de oro, arena, piedra y pesca con dinamita y veneno (Botero *et al.*, 2010). En la figura 1 se muestran los puntos en los que se encontraron las muestras en un recorrido en valsa por el río de aproximadamente 10 km que se realizó el 25 y 26 de enero del 2016. Las coordenadas fueron tomadas con un GPS y luego ubicadas en "Google Earth".



**Figura 1.** Ruta de recolección de muestras de materia fecal de nutria neotropical *Lontra longicaudis* por la cuenca del río La Vieja Quindío, Colombia. Se extrajeron del medio 12 muestras que son las que se identifican como RV= río La Vieja, MF= materia fecal.

### 6.1.2 La cuenca del Río Sinú (RS).

Las zonas de recolección de muestras, se ubicaron en la bahía de Cispatá, localizada en la zona costera del Departamento de Córdoba, Colombia. Esta zona tiene una extensión de 27.171 hectáreas, abarca áreas de mangle, humedales halófilos, playas y playones aluviales y fluviomarinos (CVS & Invemar, 2010)

La temporada de lluvias se inicia en abril y se prolonga hasta noviembre, con un pequeño descenso en el mes de julio a agosto. La temporada seca va desde mediados de noviembre hasta inicios de abril, siendo los meses más secos enero y febrero, siendo julio el más húmedo. La precipitación promedio anual es de 1,425 mm, la evaporación potencial es de 1,826 mm, con valores constantes durante todo el año (Jorge-CSV & Forestal-CONIF, 2005).

La temperatura ambiente registra sus valores más altos en mayo con 33°C y 29°C en los meses de diciembre a abril, el promedio mensual varía de 26,7 y 28°C (Jorge-CSV & Forestal-CONIF, 2005). En la figura 2, se muestran las coordenadas en las que se encontraron las muestras colectadas el 10 de mayo del 2016, las coordenadas fueron tomadas con un GPS y luego ubicadas en “Google Earth”.



**Figura 2.** Ruta de recolección de muestras de materia fecal de nutria neotropical *Lontra longicaudis* por la cuenca del río Sinú Córdoba, Colombia. Se extrajeron del medio 2 muestras que son las que se identifican como RS= río Sinú, MF= materia fecal.

### 6.1.3. Zoológicos

#### 6.1.3.1 Parque zoológico Piscilago (ZP)

Piscilago, es considerado como uno de los parques más visitados del país. Se encuentra ubicado en el Km 105 vía Bogotá – Girardot a 5 minutos de Melgar, cuenta con una reserva de bosque seco tropical con una temperatura promedio de 28°C. El parque lidera proyectos en pro del medio ambiente y proyectos para la conservación de especies en vía de extinción como por ejemplo el Proyecto Salvavidas Nutria, cuya finalidad es conservar a la nutria de río *L. longicaudis*, especie amenazada por la caza indiscriminada.

#### 6.1.3.2 Zoológico de Cali (ZC)

El zoológico de Cali ubicado en la Cra. 2 oeste Calle 14 - Santa Teresita. Cali – Colombia, es una organización ambiental que promueve y ejecuta programas de educación, comunicación, recreación e investigación para la conservación de la biodiversidad colombiana. Con programas de conservación como el de conservación nutria gigante de río (*Pteronura brasiliensis*), logró el nacimiento en cautiverio de 14 ejemplares de nutria gigante de río. Cinco de estos individuos se encuentran en zoológicos americanos y europeos fundando nuevas colonias.

### 6.2 Recolección de muestras

El procedimiento realizado para coleccionar muestras de materia fecal de animales silvestres, consistió en hacer un recorrido de 10-40 km en zonas con presencia de nutrias

por la cuenca del río (Álvarez, 2009; Chemes *et al.*, 2010) recolectando del suelo la mayor cantidad posible de muestras fecales frescas de *L. longicaudis* en las que se observaban las siguientes características (figura 3):

- Presencia de grandes cantidades de espinas y/o escamas
- Olor característico a pescado
- Secreción verdosa



**Figura 3.** Muestra de materia fecal de nutria neotropical *L. longicaudis* depositada en una piedra en la cuenca del río La Vieja

Al encontrar la muestra, ésta se colectó introduciendo un baja lenguas estéril en el centro del montículo de materia fecal, extrayendo la mayor cantidad posible. La muestra fue rápidamente almacenada en una bolsa con cierre hermético y marcada con su número de identificación, hora, características y coordenadas geográficas de colecta. Las muestras se mantuvieron en una nevera portátil de icopor con hielo. Al terminar el recorrido todas las muestras fueron congeladas y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

En los zoológicos, se siguió el procedimiento anterior, omitiendo los pasos de transeptos y localización de la muestra.

El número total de muestras colectadas en cada uno de los sitios de muestreo se reporta en la Tabla 1 y en el anexo A. Adicionalmente en la ficha de colecta se incluyó información adicional de los individuos de los cuales se obtuvieron muestras (anexo B).

No fue posible determinar si las muestras colectadas en los terrenos de los ríos La Vieja y Sinú provenían de animales diferentes o del mismo. En los zoológicos se obtuvieron varias muestras del mismo animal, lo que permite reconocer la variación de la comunidad bacteriana del mismo organismo.

### 6.3 Análisis de ácidos nucleicos

#### 6.3.1 Extracción de ADN

A partir de cada muestra de materia fecal, se extrajo ADN total por triplicado con el fin de confirmar la reproducibilidad de los patrones de bandas obtenidos por el análisis de PCR-DGGE. Las extracciones de ADN fueron reveladas en geles de agarosa al 0,7% con 5uL de muestra y 2uL de "loading buffer".

El aislamiento de ADN se realizó usando el kit de ADN Ultra Clean de Mo Bio Laboratories Inc. de acuerdo con las instrucciones del fabricante con modificaciones leves. Estas modificaciones incluyeron hervir los tubos de solución de perlas que contenían SDS más 0.5 g de la muestra en agua durante 10 minutos antes de proceder con el protocolo. Posteriormente, se añadió un volumen igual de fenol para eliminar el exceso de materia orgánica presente en las muestras tratadas previamente con el reactivo de precipitación de proteínas. Después de separar las fases acuosas / fenol por centrifugación, la fase acuosa se mezcló con la solución de sal de unión a ADN y se pasó a través de la membrana de sílice del filtro giratorio. Las muestras se re-suspendieron en 50 µl de tampón de elución (10 mM Tris, pH 8,5) y se almacenaron a -20°C.

#### 6.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La estructura y diversidad de la comunidad de bacterias fue evaluada por medio de marcadores moleculares amplificados a partir de la región 16S rADN. La reacción de amplificación del gen 16S rADN se llevó a cabo a partir del ADN aislado de cada una de las muestras.

Se realizó una primera ronda de amplificaciones con la técnica de PCR usando los oligonucleótidos 8F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'- y 1541R 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3' para verificar la calidad del ADN.

Posteriormente, se utilizaron los oligonucleótidos 968F-GC 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG AAC GCG AAG AAC CTT AC-3' y 1401R 5'- CGG TGT GTA CAA GAC CCG GGA ACG-3' para amplificar una región más pequeña del 16S rADN de 433pb. Esta amplificación también se hizo a partir del ADN total aislado y se llevó a cabo para obtener los fragmentos a ser analizados en la técnica del DGGE. Una secuencia de GC fue adicionada al oligonucleotido 968F (Felske *et al.*, 1996), para evitar la denaturalización completa de la hebra de ADN en la electroforesis denaturante. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de reacción

de 50  $\mu$ l. La mezcla de la reacción estuvo compuesta de buffer de reacción (1X), 0.2 mM de cada nucleótido, 0.02 Unidades/ $\mu$ l de taq polimerasa, 250 nM de cada uno de los "primers", 2.0 mM de  $MgCl_2$ , 400 ng/ $\mu$ l de suero fetal bovino (BSA de Bioline) y 1  $\mu$ l de la solución de DNA de la muestra. Se usó el siguiente programa de gradiente de temperatura para el termociclador: 94°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 50 segundos, 48°C de temperatura de anillamiento por 20 segundos, 45 segundos de extensión a 72°C y un paso final de extensión a 72°C por 5 minutos. Los productos de PCR fueron revelados en geles de agarosa al 2% con 8  $\mu$ L de muestra.

### 6.3.3 Análisis DGGE

El análisis de DGGE se llevó a cabo en un sistema Bio Rad Decode. Los productos de amplificación de PCR del gen 16S rADN, con los cuales se analizó la microbiota intestinal de bacterias en las muestras, se corrieron en un gel de poliacrilamida del 6% con un gradiente paralelo del 37% de urea formamida en la parte superior y de 65% en la base del gel. Este se corrió por 17 h a 35 V  $cm^{-1}$  a 60°C en buffer TAE 1X. Para visualizar las bandas de ADN, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml) por último se tomó una fotografía con el sistema fotodocumentador UVP Gel Doc-ittm 300 se anexa un video en CD del procedimiento (Anexo G).

Para probar la reproducibilidad de los datos obtenidos a partir del análisis del DGGE, se analizaron los productos de amplificación de 433 pb de la región 16S rDNA de las tres muestras de ADN total obtenidas a partir de cada muestra de materia fecal.

Para comparar la estructura de la comunidad bacteriana obtenida a partir de las muestras colectadas, se corrieron varios geles de poliacrilamida que incluyeron los productos de amplificación del 16S rADN obtenidos a partir de los tres aislamientos de ADN total de todas las muestras de materia fecal. Para verificar los resultados, y poder comparar los perfiles de bandas en un solo gel de poliacrilamida, nuevamente se corrieron los productos de amplificación de solo tres muestras de materia fecal por sitio en un solo gel.

### 6.3.4 Análisis de la estructura de la comunidad bacteriana intestinal

Con la ayuda del programa Gel Compare II (Applied Maths, NV. Bélgica) se generó una tabla binaria de presencia ausencia a partir de los perfiles de bandas obtenidos en el análisis de DGGE. El criterio de búsqueda de las bandas fue el siguiente: optimización 0%, tolerancia de la posición 0.5%, altura mínima 0.5%. Posteriormente, esta tabla binaria se utilizó para generar una matriz de similitud usando el índice de Jaccard la cual fue representada en un dendograma UPGMA.

Este método también se utilizó para evaluar la reproducibilidad de los datos obtenidos a partir de las tres muestras de ADN total aislados de una misma muestra de materia fecal.

### 6.3.5 Análisis de la diversidad de la comunidad bacteriana intestinal

La diferencia en diversidad entre las comunidades bacterianas que habitan en las nutrias silvestres y en cautiverio se evaluó en términos de la riqueza especies (S)(Cedeño, 2005).

$$s = \sum \text{bandas presentes en una muestra}$$

Los valores de S se obtuvieron a partir de la tabla binaria. Este valor se calculó a partir de la tabla, totalizando el número de bandas presentes en cada muestra analizada con ayuda del programa estadístico Primer 5 de "Plymouth Marine Laboratory, Reino Unido".

Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza de los datos de riqueza, fueron evaluados usando las pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene. Se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar diferencias entre los datos obtenidos a partir del ADN total de la materia fecal colectada de los animales silvestres y en cautiverio. Para este análisis se utilizó el promedio de riqueza calculado para cada individuo muestreado en los zoológicos y se utilizó el promedio de diversidad calculado para cada muestra fecal colectada en las zonas silvestres. El ANOVA también se utilizó para determinar diferencias entre sitios de muestreo, diferencias entre las muestras de cada sitio y diferencias entre las muestras que provienen del mismo individuo. Los datos de riqueza obtenidos para cada grupo analizado fueron comparados con una prueba de LSD de Fisher 'posthoc'. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  desviación estándar y considerados significativamente diferentes con un valor  $p \leq 0,05$ . Todos los resultados fueron analizados en el programa Statgraphics Centurión XV. II.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Recolección de muestras y análisis de ácidos nucleicos

#### 7.1.1 Muestras colectadas

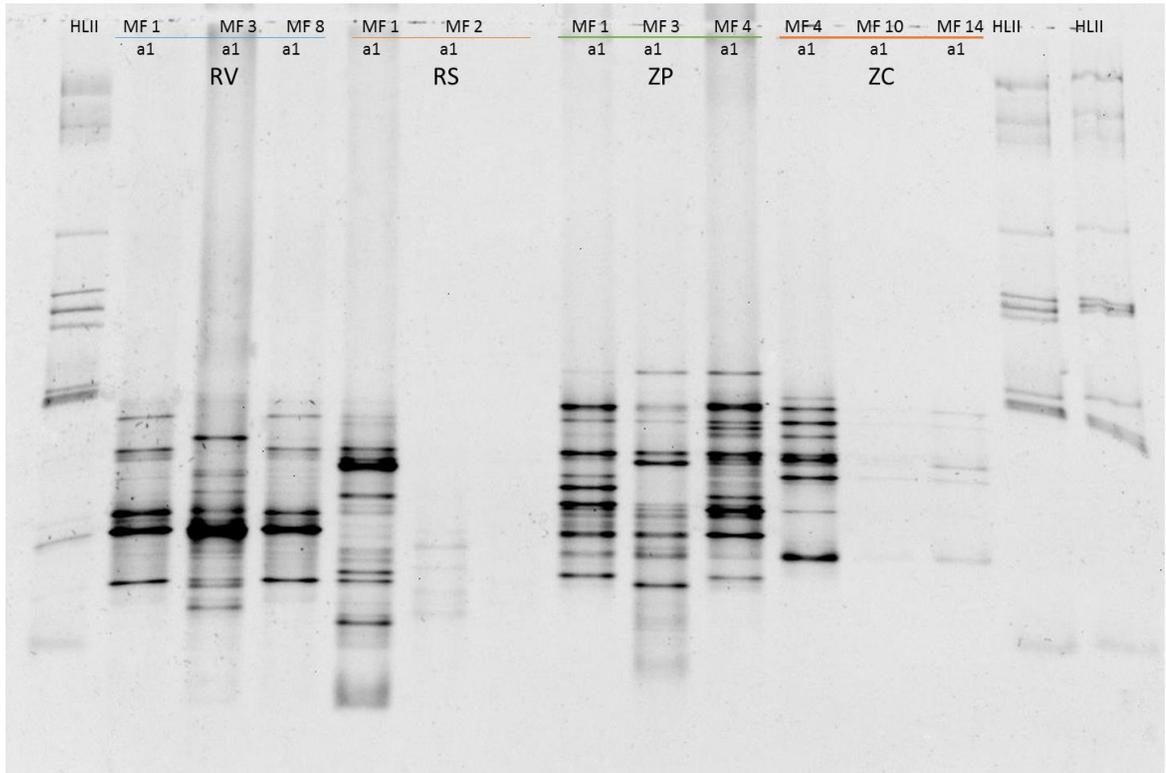
Se recolectaron en total 33 muestras de materia fecal de nutria neotropical *L. longicaudis*. De éstas, 14 corresponden a materia fecal depositada por nutrias silvestres en el suelo, de las cuales se desconoce su identidad. No se sabe si dentro del material colectado existen muestras depositadas por un mismo animal. Las 19 muestras restantes fueron colectadas de animales en cautiverio (Tabla 1).

**Tabla 1.** Muestras de materia fecal colectadas en el Río La Vieja (RV), Río Sinú (RS), Zoológico de Psicilago (ZP) y Zoológico de Cali (ZC). La información presentada incluye el número total de muestras colectadas por zona, animal fuente de la muestra, su edad (cuando la información es conocida) y dieta. MF = Muestra fecal

sitio de muestreo	ID Muestras	origen de la muestra	Dieta
RV	RV-MF 1	Suelo. Animal no identificado	Peces (76,7%), seguidos por insectos (12,67%), reptiles (0,70%) y un renglón que se clasificó como "otros" (9,86%), Dentro de los peces, la familia más consumida fue Loricariidae (corronchos) donde Chaetostoma sp. fue la especie más depredada
	RV-MF 2	Suelo. Animal no identificado	
	RV-MF 3	Suelo. Animal no identificado	
	RV-MF 4	Suelo. Animal no identificado	
	RV-MF 5	Suelo. Animal no identificado	
	RV-MF 6	Suelo. Animal no identificado	
	RV-MF 7	Suelo. Animal no identificado	
	RV-MF 8	Suelo. Animal no identificado	
	RV-MF 9	Suelo. Animal no identificado	
	RV-MF 10	Suelo. Animal no identificado	
	RV-MF 11	Suelo. Animal no identificado	
	RV-MF 12	Suelo. Animal no identificado	
RS	RS-MF 1	Suelo. Animal no identificado	Apterotonus sp. (37,46 %), Hypostomus sp. (33,28 %), R. quelen (30,50 %).
	RS-MF 2	Suelo. Animal no identificado	
ZP	ZP-MF 1	Suelo. Animal de origen: Toto. Edad 11 años	Mojaras vivas únicamente
	ZP-MF 2	Suelo. Animal de origen: Toto. Edad 11 años	
	ZP-MF 3	Suelo. Animal de origen: Toto. Edad 11 años	
	ZP-MF 4	Suelo. Animal de origen: Burbuja. Edad 2 años	
ZC	ZC-MF 1	Suelo. Animal de origen: Juliana. Edad 8 años	Pez vivo y congelado o de dispensador y en algunos momentos y se les da coco como incentivo.
	ZC-MF 2	Suelo. Animal de origen: Pipe. Edad 12 años	
	ZC-MF 3	Suelo. Animal de origen: Juliana. Edad 8 años	
	ZC-MF 4	Suelo. Animal de origen: Mariana. Edad 5 años	
	ZC-MF 5	Suelo. Animal de origen: Mariana. Edad 5 años	
	ZC-MF 6	Suelo. Animal de origen: Mariana. Edad 5 años	
	ZC-MF 7	Suelo. Animal de origen: Mariana. Edad 5 años	
	ZC-MF 8	Suelo. Animal de origen: Juliana. Edad 8 años	
	ZC-MF 9	Suelo. Animal de origen: Mariana. Edad 5 años	
	ZC-MF 10	Suelo. Animal de origen: Juliana. Edad 8 años	
	ZC-MF 11	Suelo. Animal de origen: Juliana. Edad 12 años	
	ZC-MF 12	Suelo. Animal de origen: Pipe. Edad 12 años	
	ZC-MF 13	Suelo. Animal de origen: Pipe. Edad 12 años	
	ZC-MF 14	Suelo. Animal de origen: Pipe. Edad 12 años	
	ZC-MF 15	Suelo. Animal de origen: Pipe. Edad 12 años	

### 7.1.2 Análisis de ácidos nucleicos

De las 33 muestras obtenidas, se extrajo el ADN con éxito (Anexo F) y en todas se pudo amplificar una región de 433 pb del 16S rADN, con ayuda de los oligonucleótidos 968F GC- 1401R (Anexo C). Todas las muestras mostraron un perfil de bandas en el análisis de DGGE (figura 4, anexo D).

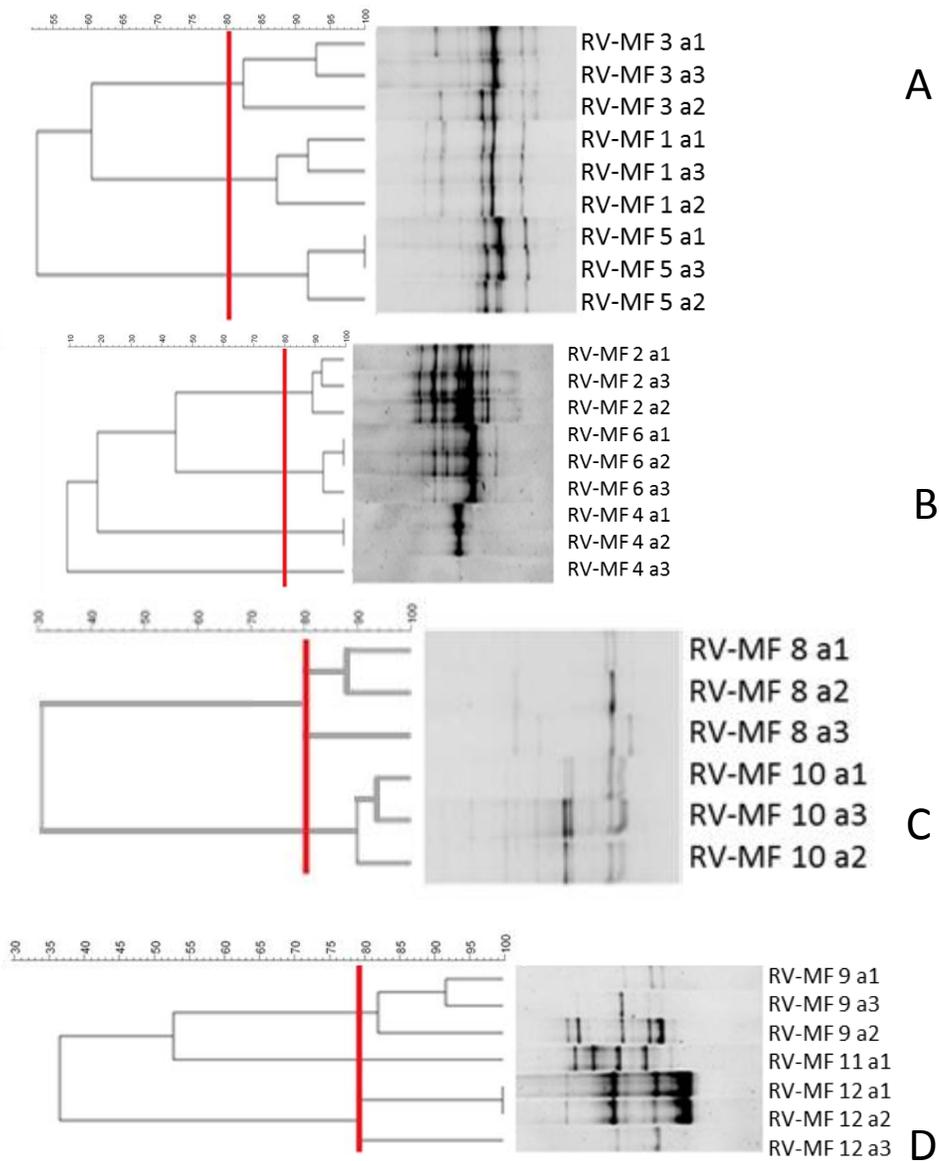


**Figura 4.** Perfiles de PCR-DGGE de la comunidad bacteriana presente en las muestras de heces fecales de la nutria neotropical *L. longicaudis*. Se observa el perfil de bandas de tres muestras de materia fecal colectadas en cada uno de los sitios de muestreo: Río La Vieja (RV), Río Sinú (RS), Zoológico de Piscilago (ZP) y Zoológico de Cali (ZC). MF = Materia fecal, a1 = Aislamiento de ADN total #1, HLII = Marcador de peso molecular.

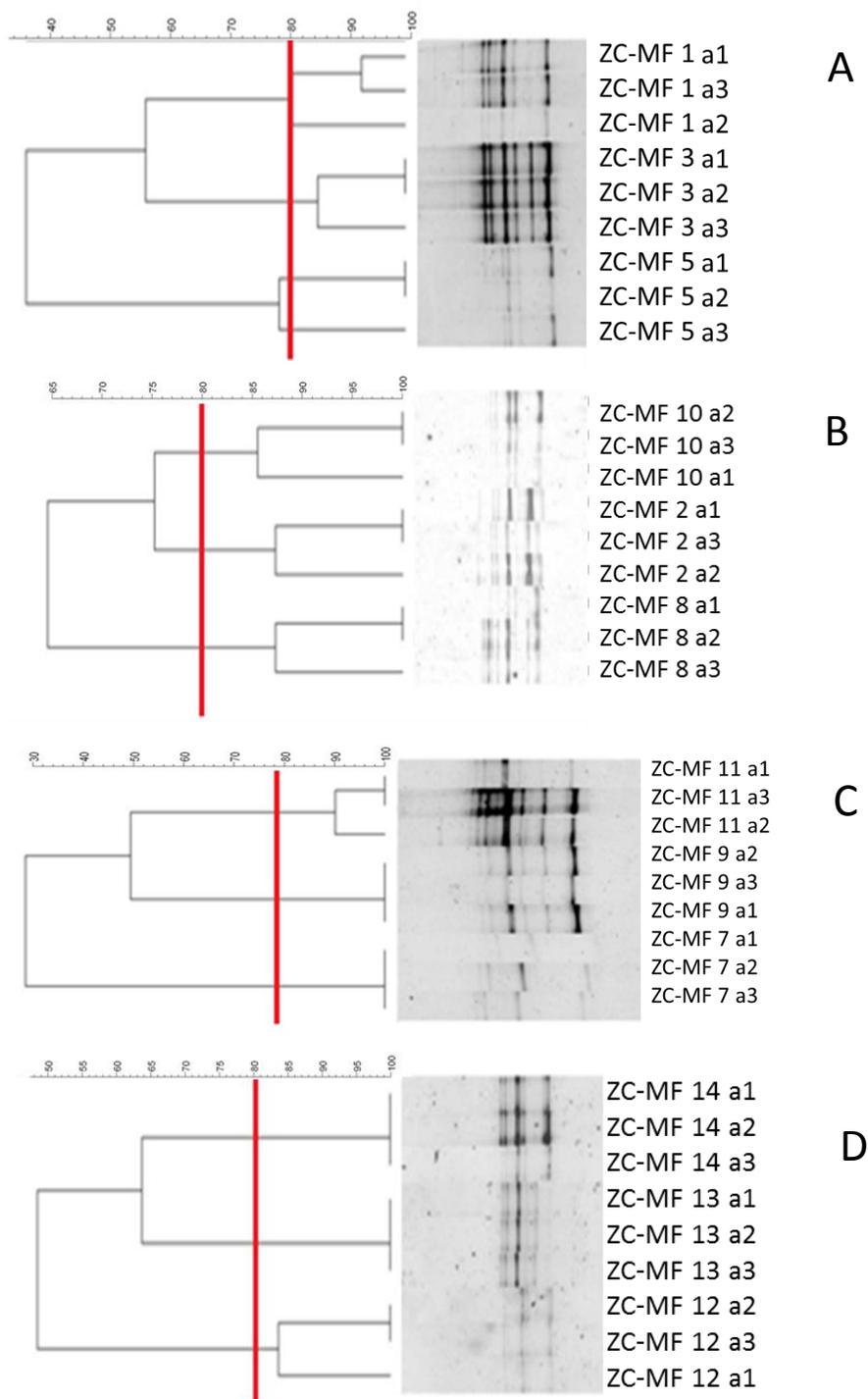
## 7.2 Resultados.

### 7.2.1 Reproducibilidad de los patrones de bandas obtenidos a través de DGGE

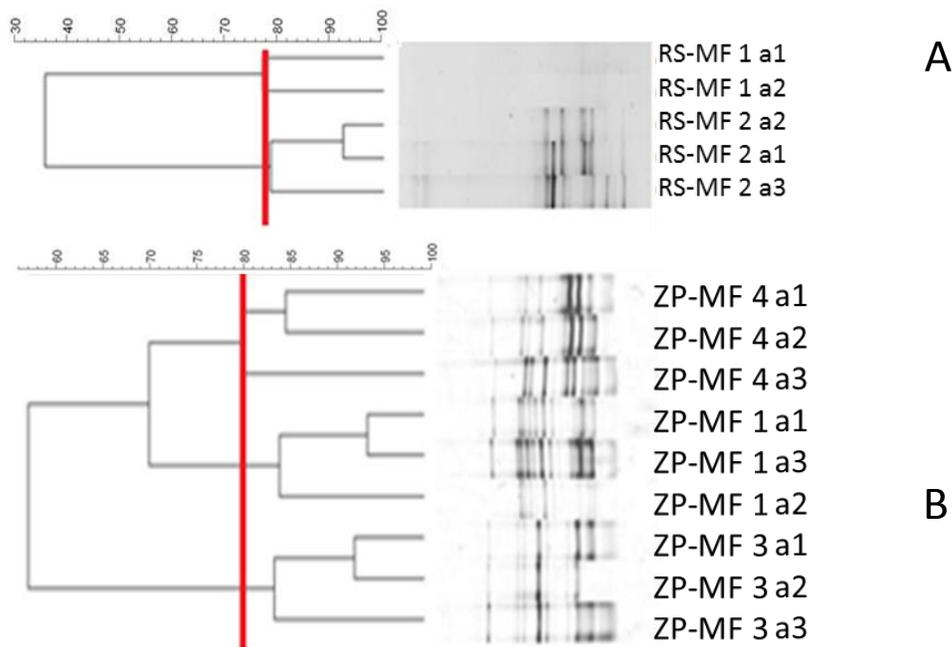
La estructura de las comunidades bacterianas en los tres aislamientos de ADN total extraído de una misma muestra de materia fecal, tienen porcentajes de similitud iguales o mayores al 80% (Figuras 5, 6 y 7). Esto quiere decir, que los patrones moleculares de los triplicados de ADN total aislados de cada muestra son reproducibles. Este resultado, facilita la comparación de la estructura de la comunidad microbiana de los intestinos de los animales que habitan las diferentes localidades usando el DGGE.



**Figura 5.** A-D Porcentaje de similitud de la región 16S rADN de las comunidades de bacterias obtenidas a partir de tres aislamientos de ADN total que se hicieron con cada una de las muestras de materia fecal de nutria (*L. longicaudis*) en el Río La Vieja (RV). Los dendogramas, fueron construidos con base en el coeficiente de Jaccard y el método de agrupamiento UPGMA. La similitud igual o mayor al 80% está demarcada por una línea roja, MF = materia fecal, a1 = aislamiento de ADN total #1, a2 = aislamiento de ADN total #2, a3 = aislamiento de ADN total #3.



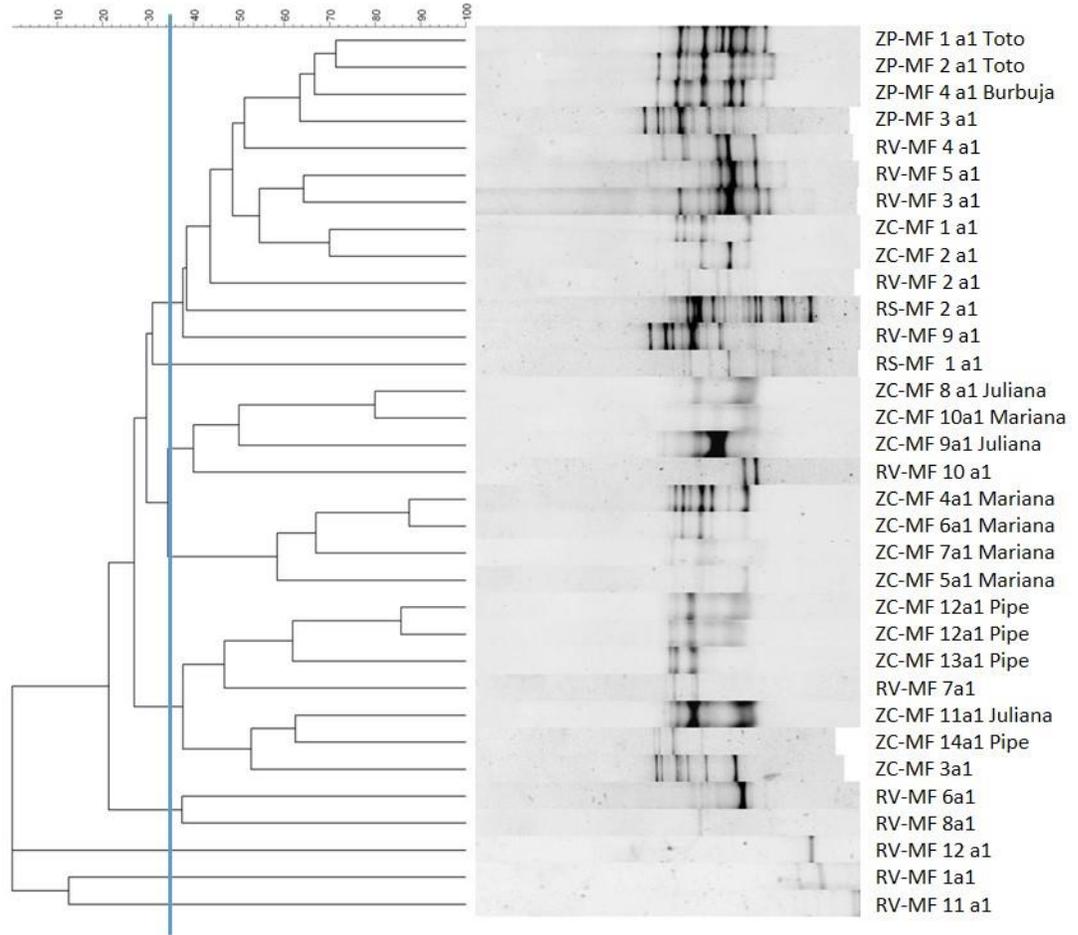
**Figura 6.** A-D Porcentaje de similitud de la región 16S rADN de las comunidades de bacterias obtenidas a partir de tres aislamientos de ADN total que se hicieron con cada una de las muestras de materia fecal de nutria (*L. longicaudis*) en el zoológico de Cali (ZC). Los dendrogramas, fueron construidos con base en el coeficiente de Jaccard y el método de agrupamiento UPGMA. La similitud igual o mayor al 80% está demarcada por una línea roja, MF = materia fecal, a1 = aislamiento de ADN total #1, a2 = aislamiento de ADN total #2, a3 = aislamiento de ADN total #3



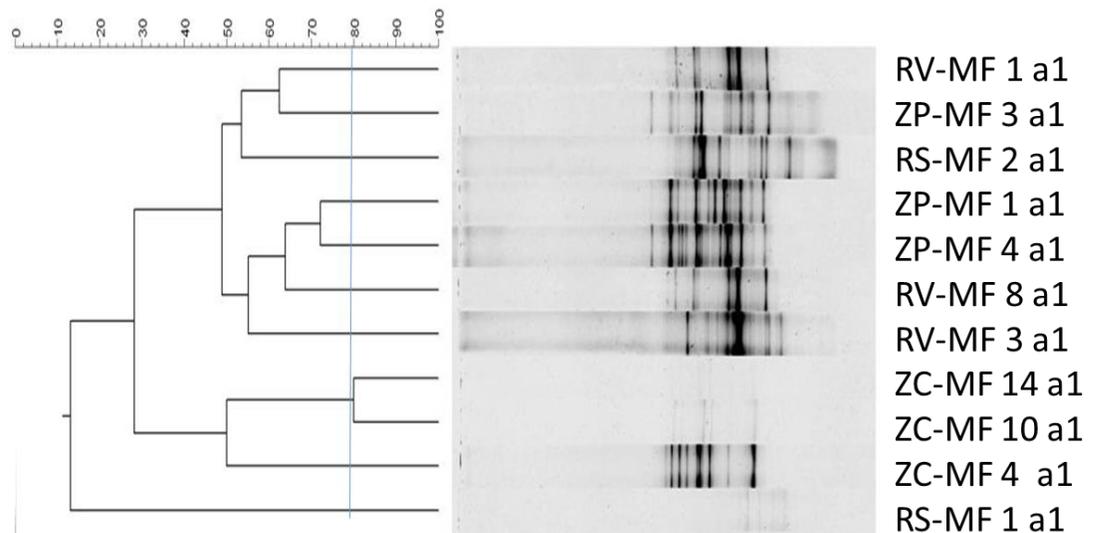
**Figura 7.** A y B Porcentaje de similitud de la región 16S rADN de las comunidades de bacterias. Estos resultados fueron obtenidos a partir de tres aislamientos de ADN total que se hicieron a cada una de las muestras de materia fecal de nutria (*L. longicaudis*) en el río Sinú (RS) y en el zoológico de Piscilago (ZP). Los dendogramas, fueron construidos con base en el coeficiente de Jaccard y el método de agrupamiento UPGMA. La similitud igual o mayor al 80% está demarcada por una línea roja, MF = materia fecal, a1 = aislamiento de ADN total #1, a2 = aislamiento de ADN total #2, a3 = aislamiento de ADN total #3

### 7.2.2 Análisis de la estructura de la comunidad bacteriana intestinal

El análisis de agrupamiento hecho con base en el polimorfismo genético de la región 16S rADN no muestra mayores similitudes entre comunidades bacterianas que provienen de animales silvestres o que provienen de animales en cautiverio. El dendograma de la figura 8, construido con base en el perfil de bandas obtenido a partir del ADN total de todas las muestras colectadas y sus triplicados, no muestra agrupaciones que tengan altos porcentajes de similitud. Estos porcentajes varían entre 35 al 60% entre individuos de la misma zona y porcentajes menores del 85% entre las muestras de un mismo individuo. Estos resultados se repiten en los perfiles de bandas obtenidos del análisis de DGGE que se corrió en un solo gel de poliacrilamida incluyendo solo tres muestras por sitio. La figura 9, muestra que no hay agrupaciones con un porcentaje de similitud mayor al 80% y también muestra que las comunidades de bacterias no se agrupan por zonas de colecta.



**Figura 8.** Perfiles de bandas arrojados por el análisis de PCR-DGGE y análisis de agrupamiento de los fragmentos 16S rADN. Estos resultados fueron obtenidos a partir del ADN total de materia fecal de la nutria neotropical (*L. longicaudis*) del río Sinú en Córdoba (RS-MF), de la cuenca del río La Vieja en Armenia (RV-MF), del zoológico de Cali (ZC-MF) y del Parque zoológico Piscilago (ZP-MF). MF = materia fecal, a1 = aislamiento de ADN total #1.

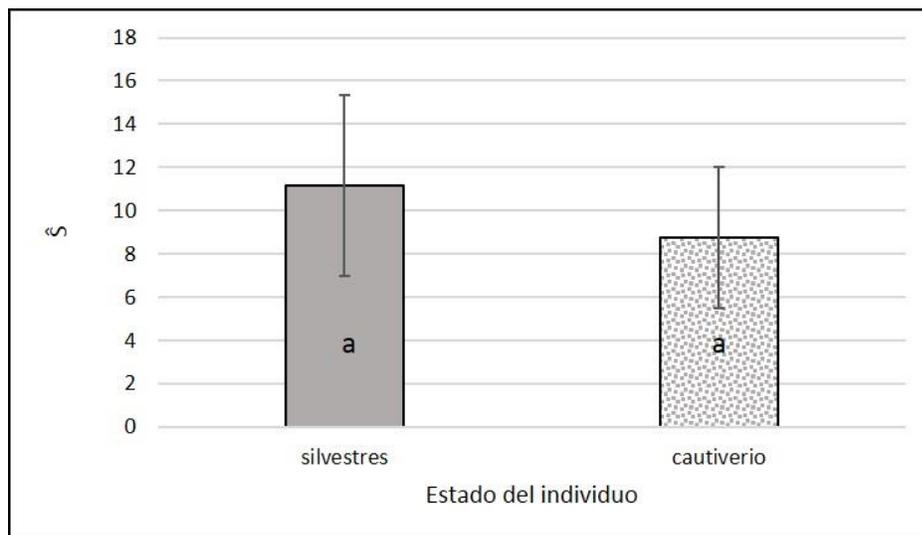


**Figura 9.** Perfiles de bandas arrojados por el análisis de PCR-DGGE y análisis de agrupamiento de los fragmentos 16S rADN. Estos resultados fueron obtenidos a partir del ADN total de materia fecal de la nutria neotropical (*L. longicaudis*) del río Sinú (RS-MF), de la cuenca del río La Vieja (RV-MF), del zoológico de Cali (ZC-MF) y del Parque zoológico Piscilago (ZP-MF) en cautiverio. MF = materia fecal, a1 = aislamiento de ADN total #1.

### 7.2.3 Análisis de la riqueza de la comunidad bacteriana intestinal

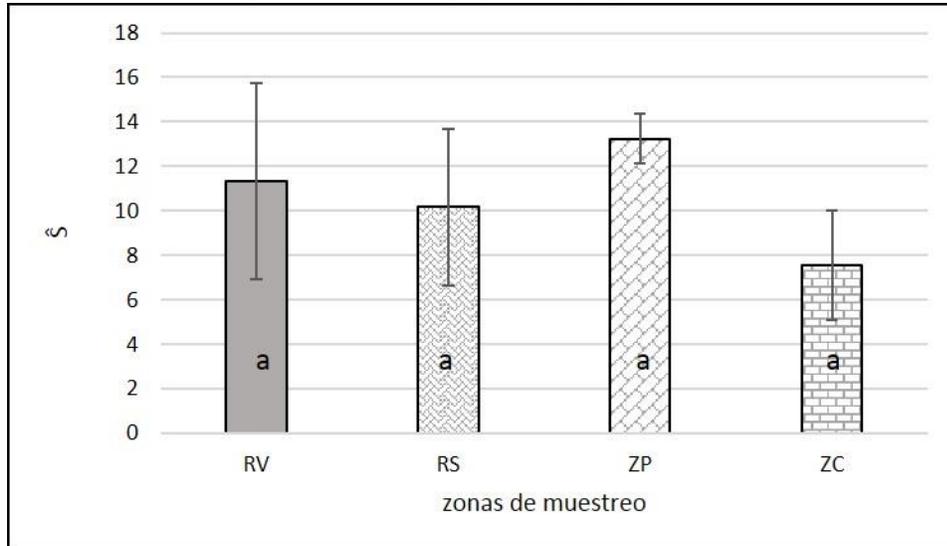
Los datos de riqueza (S) cumplen con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas (Anexo E, tabla 3), por lo tanto fueron analizados con el ANOVA de una vía.

Los resultados muestran que, no hay diferencias significativas en riqueza cuando se comparan las comunidades bacterianas que provienen de animales silvestres vs. Animales en cautiverio ( $P > 0.05$ ) (Figura 10, anexo E).



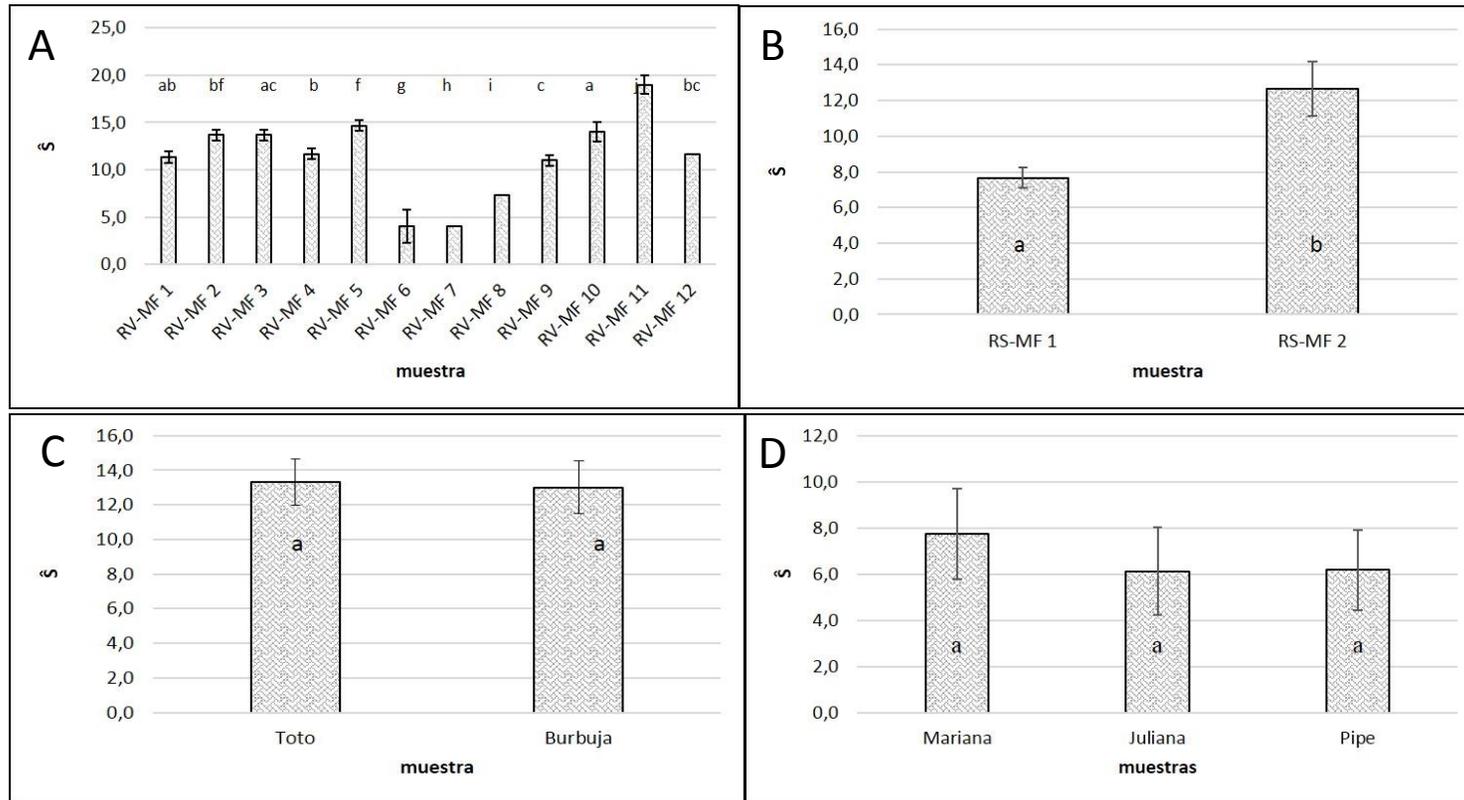
**Figura 10.** Riqueza de especies de comunidades bacterianas provenientes de muestras de materia fecal de animales silvestres y en cautiverio. Los valores de cada grupo son el promedio de la riqueza calculada para 14 muestras provenientes de individuos silvestres y 5 muestras provenientes de individuos en cautiverio. Las barras de error indican la desviación estándar. Diferencias no significativas están indicadas por las mismas letras minúsculas.

Se observan similitudes entre la riqueza de las comunidades de bacterias en animales silvestres del río La Vieja y el río Sinú y las comunidades de bacterias de animales en cautiverio de los zoológicos de Piscilago y Cali. (Figura 11, Anexo E, tablas 7, 8 y 9).



**Figura 11.** Riqueza de especies de comunidades microbianas provenientes de muestras de materia fecal colectadas en las cuatro zonas de muestreo: río La Vieja (RV), n= 12; río Sinú (RS), n= 2; Zoológico de Piscilago (ZP), n= 2; y Zoológico de Cali (ZC), n= 3. Los valores de cada grupo son el promedio de la riqueza calculada para las muestras analizadas de cada zona. Las barras de error indican la desviación estándar. Diferencias no significativas están indicadas por las mismas letras minúsculas.

Cuando se analiza la diversidad dentro de cada sitio de muestreo, se ven diferencias entre las comunidades bacterianas provenientes de muestras de materia fecal colectadas en zonas silvestres ( $P < 0.05$ ); sin embargo, no se ven diferencias entre las muestras de materias fecales colectadas de los zoológicos (Figura 12, Anexo E, tablas 10 a la 21).



**Figura 12.** Riqueza de especies de comunidades microbianas provenientes de muestras de materia fecal colectadas dentro de cada una de las cuatro zonas de muestreo: río La Vieja n=12 (A); río Sinú n= 2(B), Zoológico de Piscilago n= 2 (C) y Zoológico de Cali n=3 (D). El valor de riqueza de cada muestra de materia fecal (MF) es el promedio de la riqueza calculada a partir de los tres aislamientos de ADN total extraídos de una misma muestra y en los zoológicos el promedio de las muestras del mismo individuo. Las barras de error indican la desviación estándar. Diferencias no significativas están indicadas por las mismas letras minúsculas.

Al realizar las comparaciones de la riqueza específica entre las comunidades bacterianas de las muestras colectadas del mismo individuo pero en momentos del día o días diferentes se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre las muestras de Mariana, Juliana y Pipe, pero no se encontraron diferencias en las muestras de Toto (Anexo E, tablas 22 a la 33).

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Este es el primer estudio referente a la microbiota intestinal de la nutria, neotropical *L. longicaudis*, en el cual se comparó la estructura y diversidad de la comunidad bacteriana presente en muestras de materia fecal de individuos silvestres con la estructura y diversidad de la comunidad bacteriana presente en muestras de materia fecal de individuos en cautiverio.

Los resultados obtenidos en esta evaluación preliminar muestran que la estructura de las comunidades de bacterias detectada en animales silvestres no tiene porcentajes de similitud lo suficientemente altos como para formar una agrupación separada de las comunidades de bacterias detectadas en los animales en cautiverio. Tampoco se observan diferencias en diversidad, la cual se determinó en términos de riqueza. Por lo tanto, al parecer, las diferencias en la dieta entre los animales en estado silvestre y aquellos que están en cautiverio, no están determinando estas importantes características de la comunidad bacteriana intestinal de *L. longicaudis*.

Es probable que estos resultados se expliquen por el hecho de que, a pesar que los animales en cautiverio consumen especies diferentes a las que consumen los animales en estado silvestre, en los zoológicos se busca que la adecuación del espacio para los animales imite las condiciones silvestres, por lo tanto, la dieta en cautiverio se basa principalmente en pescado y no concentrado u otro tipo de alimento (Alfano *et al.*, 2015; Lavery *et al.*, 2012; Schwab *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2011). Se sabe que la dieta, del río La Vieja es principalmente peces (76,7%), seguidos por insectos (12,67%), reptiles (0,70%) y que dentro de los peces, la familia más consumida es Loricariidae (corronchos) (Restrepo & Botero-Botero, 2012). En el río Sinú, la dieta es a base de peces de las especies *Apteronotus sp.* (37,46 %), *Hypostomus sp.* (33,28 %) y *R. quelen* (30,50 %) (Mayor & Botero, 2010). En ambas regiones las presas más predadas son peces. En los zoológicos se suministran mojarra vivas, peces congelados o de dispensador y en algunos momentos y se les da coco como complemento. La dieta que los zoológicos suministran, al ser similar a la dieta en estado silvestre, aporta al individuo los requerimientos necesarios para su reproducción (Arcila & Ramírez, 2004; Hans, 2006; Ra, 2009), como lo demostró el zoológico de Cali, donde lograron tener exitosamente una cría en cautiverio que a la fecha tiene 5 años.

Tampoco se observaron porcentajes de similitud altos entre las comunidades de bacterias de animales que habitan una misma zona de muestreo. Se ha demostrado en humanos que en los individuos que conviven juntos, su microbiota es más similar en comparación con otros individuos que viven más lejos (Knight, 2014). Al ser la nutria un animal solitario en estado silvestre, su microbiota varía más de un individuo a otro, que en los zoológicos, ya que en este los individuos están juntos.

Estos resultados no son concluyentes. Al evaluar los resultados de este estudio, es necesario tener en cuenta que primero, el número de muestras obtenidas fue limitado y segundo, la forma de obtener la muestra de ADN de la comunidad bacteriana no fue la más apropiada. En el zoológico de Cali se colectó materia fecal de tres individuos y en el zoológico de Piscilago de dos individuos. En río La Vieja no se sabe a cuantos individuos corresponden las muestras colectadas, pero teniendo en cuenta el radio de dispersión de los animales y la ubicación de la materia fecal, se estima que estas muestras provienen probablemente de tres animales. En el río Sinú se estima que las muestras provienen de dos animales. Para poder tener una imagen más real de la estructura y la diversidad de las comunidades microbianas en los dos tipos de hábitat, sería conveniente incluir en el muestreo materia fecal de un mayor número de individuos. Adicionalmente, sería conveniente poder tomar una muestra de materia fecal directamente del ano del animal y no de materia fecal depositada en el suelo. Esto, porque cuando la materia fecal recorre el intestino, recoge gran cantidad de microorganismos (Guinane & Cotter, 2013; Icaza-Chávez, 2012), pero al salir del cuerpo del animal, las heces sufren un proceso de degradación acompañado por una disminución significativa de las poblaciones microbianas debido a la desecación por altas temperaturas, a la exposición a la radiación UV y a la exposición al oxígeno (Vičková et al., 2012). Al observar los resultados de riqueza del zoológico de Piscilago en comparación con los resultados de río La Vieja, se concluye que es muy probable que, largos tiempos de exposición al ambiente hayan afectado los microorganismos de materia fecal de las muestras colectadas en el río La Vieja, ya que estas muestras estuvieron expuestas al ambiente por largo tiempo. Las únicas muestras que pudieron ser colectadas inmediatamente después de que el animal las depositara en el suelo fueron las del zoológico de Piscilago, evitando largos períodos de exposición. De modo coincidente, estas son las muestras que tienen una tendencia a tener mayores índices de riqueza. Por lo tanto es muy importante que, la muestra sea tomada y congelada en el menor tiempo posible (Bernbom et al., 2006; Vičková et al., 2012). Es probable que al aumentar el número de animales muestreados y al mejorar el muestreo colectando la materia fecal directamente en el ano del animal, los resultados sean diferentes. Sin embargo, mejorar el muestreo se dificulta porque los individuos silvestres son difíciles de localizar, el área de estudio es muy grande y de difícil acceso. Obtener el permiso para colectar muestras de zoológico no es fácil y, tanto para animales en cautiverio como para silvestres, colectar muestras directamente del animal implica la gestión de permisos y dado que contamos con el permiso marco de recolección de especímenes silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial de acuerdo a la

resolución 1271 del 23 de octubre de 2014, no está permitida la captura del animal para toma de muestras.

Otro aspecto importante al analizar los resultados de este estudio es que los 0,5g de materia fecal usados para la extracción de ADN son representativos. La prueba de reproducibilidad, demuestra que las réplicas analizadas a partir de una misma muestra tienen porcentaje de similitud iguales o mayores a 80%. Lo cual significa que a través de la técnica PCR DGGE se puede detectar la gran mayoría de las bacterias presentes en la muestra. Sin embargo, es importante tener en cuenta que, muestras de materia fecal de un mismo individuo colectadas a diferentes horas del día, pueden tener una comunidad de bacterias con estructura y diversidad diferentes, como en el caso de las tres muestras analizadas para Mariana, Juliana y Pipe, que responde a diferentes factores. Esto puede significar que, para tener un conocimiento más preciso de la estructura y diversidad de la comunidad de bacterias en un animal en particular, es necesario coleccionar más de una muestra.

## **CONCLUSIONES**

La estructura y riqueza específica de las comunidades de bacterias no difiere entre individuos de la especie *L. longicaudis* en estado silvestre y animales mantenidos en condiciones de cautiverio.

Es probable que la estructura y la diversidad de la comunidad de bacterias de la nutria estén siendo afectadas por otras variables diferentes a la dieta del animal o a la zona en que habitan.

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda continuar con el trabajo para dilucidar que especies componen la comunidad de cada muestra usando técnicas como la pirosecuenciación.

Se recomienda tomar un número de muestras mayor, así como varias muestras de un mismo individuo, con el fin de conocer más acerca de la microbiota intestinal de la nutria.

Se recomienda tomar más datos de otros factores tales como edad, sexo, estado de ánimo, interacciones sociales, etc. Para explicar por qué pueden darse las variaciones dentro de un mismo organismo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alfano, N., Courtiol, A., Vielgrader, H., Timms, P., Roca, A. L., & Greenwood, A. D. (2015). Variation in koala microbiomes within and between individuals: effect of body region and captivity status. *Scientific Reports*, 5, 10189. <https://doi.org/10.1038/srep10189>
- Álvarez-León, R. (2009). IMPORTANCIA DE LOS PECES EN LA NUTRICIÓN DE LA NUTRIA GIGANTE DE RÍO (PTERONURA BRASILIENSIS) (CARNIVORA: MUSTELIDAE) EN COLOMBIA. *Revista Luna Azul*, (28), 8–14. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321727230008>
- Amato, K. R., Yeoman, C. J., Kent, A., Righini, N., Carbonero, F., Estrada, A., ... Leigh, S. R. (2013). Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *The ISME Journal*, 7(7), 1344–53. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.16>
- Arcila, D. a., & Ramírez, M. (2004). Captive Reproduction of the Neotropical Otter in the Santa Fe Zoological Park in Medellin, Colombia. *Iucn Otter Specialist Group Bulletin*, 21(1), 16–18.
- Avella, C., Trujillo, F., Caicedo, D., Mosquera, F., & Botero, Á. (2016). *Plan de manejo para la conservación de las nutrias (Lontra longicaudis y Pteronura brasiliensis) en Colombia*. Bogota, Colombia: Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Retrieved from <http://www.omacha.org/component/jdownloads/finish/12-documentos-de-gestion/1130-plan-de-manejo-para-la-conservacion-de-las-nutrias-en-colombia?Itemid=0>
- Bäckhed, F. (2011). Programming of host metabolism by the gut microbiota. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 58(SUPPL. 2), 44–52. <https://doi.org/10.1159/000328042>
- Baquero, F., & Nombela, C. (2012). The microbiome as a human organ. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18 Suppl 4, 2–4. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03916.x>
- Bernbom, N., Nørrung, B., Saadbye, P., Mølbak, L., Vogensen, F. K., & Licht, T. R. (2006). Comparison of methods and animal models commonly used for investigation of fecal microbiota: Effects of time, host and gender. *Journal of Microbiological Methods*, 66(1), 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.014>
- Botero-Botero A. , J., A., Sánchez-Pachón , G., A. Cárdenas-Saldarriaga & C., N., C.-C. (2010). Registro Y Distribución De Una Población Introducida De Chigüiros. *Rev. Invest. Univ. Quindío*, (6), 29–35.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M., & Owen, L. J. (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26, 26191. Retrieved from

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4315779&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- CASTRO, J. E. Z. (2005). *Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular, Volumen 7*. Retrieved from <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=RcMak8yKAHcC&pgis=1>
- Cedeño, R. (2005). Caracterización de Comunidades Bacterianas en sistemas de engorde de camarón mediante electroforesis en geles de gradiente denaturante (DGGE). *CENAIM INFORMA, No. 133*, 593–4. Retrieved from <http://www.revistaaquatic.com/documentos/docs/bquinc133.pdf>
- Chagoyan, O., Lozano, J., & Hernández, A. (2004). La microbiota intestinal en el niño y la influencia de la dieta sobre su composición. ... *Nutricion Y Salud, 11*, 37–48. Retrieved from [http://www.ugr.es/~cts461/documentos/artic\\_microbiota.pdf](http://www.ugr.es/~cts461/documentos/artic_microbiota.pdf)
- Chemes, S. B., Giraudo, A. R., & Gil, G. (n.d.). Dieta de Lontra Longicaudis (Carnivora, Mustelidae) en el Parque Nacional El Rey (Salta, Argentina) y su comparación con otras poblaciones de la cuenca del Paraná. *Mastozoología Neotropical, 17*(1), 19–29. Retrieved from [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0327-93832010000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0327-93832010000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, C. (2007). Nutria de río: planes de manejo para 18 vertebrados amenazados del departamento del Valle del Cauca.
- CVS, C. A. R. de los V. del S. y del S. J.-, & Invemar, I. de I. M. y C. (2010). plan de manejo integrado. Dim cispata. La balsa. Tinajones y sectores aledaños del delta del estuario del rio del sinu y departamento de cordoba . *Serie de Publicaciones Especiales No 18 de Invemar Santa Marta 141p*.
- Duque-Dávila, D. L., Martínez-Ramírez, E., Botello-López, F. J., & Sánchez-Cordero, V. (2013). Distribución, abundancia y hábitos alimentarios de la nutria (Lontra longicaudis annectens Major, 1897) en el Río Grande, Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán Oaxaca, México. *Therya, 4*(2), 281–296. <https://doi.org/10.12933/therya-13-128>
- Felske, A., Engelen, B., Nübel, U., & Backhaus, H. (1996). Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Applied and Environmental Microbiology, 62*(11), 4162–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8900007>
- Fischer, S. G., & Lerman, L. S. (1983). *DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory*. The Academy. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/80/6/1579.short>
- Gallo-Reynoso, J. P., Ramos-Rosas, N. N., & Rangel-Aguilar, Ó. (n.d.). Depredación de aves acuáticas por la nutria neotropical (Lontra longicaudis annectens), en el río Yaqui, Sonora, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad, 79*(1), 275–279. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-34532008000100023&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532008000100023&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

- Guerrero Sánchez, S. (2002). Contribución al estudio de los valores hemáticos y bioquímicos de mustélidos del zoológico regional Miguel Álvares del Toro, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Retrieved from <http://cdigital.uv.mx/handle/12345678/72>
- Guinane, C. M., & Cotter, P. D. (2013). Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6(4), 295–308. <https://doi.org/10.1177/1756283X13482996>
- Hans, K. (2006). *ecología de la nutria, Comportamiento y conservación*. Oxford, new york: Departamento de Zoología, Aberdeen, scotland. Universidad de Oxford.
- Icaza-Chávez, M. E. (2012). Microbiota intestinal en salud y enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*, 77, 23-2.
- Jaureguizar, E. (1986). Evolución de las comunidades de mamíferos cenozoicos sudamericanos: un estudio basado en técnicas de análisis multivariado. In *Simp. Evolución de los vertebrados cenozoico, Vol. 2, pp*, 191–207.
- Jorge-CSV, C. A. de los V. del S. y del S., & Forestal-CONIF., C. N. de I. y F. (2005). Plan de manejo integral de los manglares de la zona de uso sostenible del sector estuarino de la bahía de Cispata, departamento de Córdoba - Colombia. *Publicaciones Especiales de Invemar Santa Marta* 40p.
- Khanna, S., & Tosh, P. (2001). El microbioma humano. Retrieved from [www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=83120](http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=83120)
- Knight, R. (2014). Rob Knight: Cómo nuestros microbios nos hacen lo que somos | TED Talk | TED.com. Retrieved March 26, 2016, from [https://www.ted.com/talks/rob\\_knight\\_how\\_our\\_microbes\\_make\\_us\\_who\\_we\\_are?language=es](https://www.ted.com/talks/rob_knight_how_our_microbes_make_us_who_we_are?language=es)
- Larivière, S. (1999). Lontra longicaudis. *Mammalian Species*. <https://doi.org/10.2307/3504393>
- Lavery, T. J., Roudnew, B., Seymour, J., Mitchell, J. G., & Jeffries, T. (2012). High nutrient transport and cycling potential revealed in the microbial metagenome of Australian sea lion (*Neophoca cinerea*) faeces. *PloS One*, 7(5), e36478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036478>
- Lee, W.-J., & Hase, K. (2014). Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nature Chemical Biology*, 10(6), 416–24. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1535>
- Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., ... Gordon, J. I. (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science (New York, N. Y.)*, 320(5883), 1647–51. <https://doi.org/10.1126/science.1155725>
- Lorenzo, D. de. (2012). Perspectivas presentes y futuras de la Nutrigenómica y la Nutrigenética en la medicina preventiva. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*. Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación (SEDCA). Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4187166&info=resumen&idoma=SPA>

- Maslanka, M. T., Crissey, S. D., Ullrey, D. E., & Reed-Smith, J. (2002). Asian small-clawed otter: Nutrition and dietary husbandry. *Nutrition Advisory Group Handbook*, Columbus Zoological Gardens, Columbus, OH. pp1-13.
- Mayor-victoria, R., & Botero-Botero, A. (2010). Uso del Hábitat por la nutria neotropical Lontra longicaudis ( Carnívora : Mustelidae ) en la Zona baja del Río Roble, Alto Cauca, Colombia. *Boletín Científico Museo de Historia Natural*, 14(12), 121–130.
- MORALES, P., BRIGNARDELLO, J., & GOTTELAND, M. (2010). La microbiota intestinal: Un nuevo actor en el desarrollo de la obesidad. *Revista Médica de Chile*, 138(8), 1020–1027. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872010000800013>
- Mosquera, F., Cañon, S., Patiño, S., Cristancho, D., & Quintero, P. (2013). Las nutrias los perros de agua y la gente del rio cuduyari. *CDA- Fundación Omacha. Cartilla Divulgativa Serie de Especies Amenazadas ., No5: 44 pa.*
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H., Wawer, C., ... Elsas, J. D. van. (2004). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology., (Ed.2), 743–769. Retrieved from <http://www.cabdirect.org/abstracts/20043173179.html;jsessionid=19DC779CB86FCC5F08CC0054665646F8>
- Nelson, T. M., Rogers, T. L., Carlini, A. R., & Brown, M. V. (2013). Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic seals: a comparison of wild and captive animals. *Environmental Microbiology*, 15(4), 1132–45. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12022>
- Nidasio, D., & González, P. (2009). Nutria Neotropical Lontra longicaudis annectens: Memorias de tres zoológicos de Guatemala 1996-2009. *Manejo Integral de Fauna Silvestre En Cautiverio. Guatemala. 8p.*
- Otálora, P., & Vives, M. (2012). *caracterizacion de la microbiota intestinal en el manatí antillano(Trichechus manatus)*. universidad de los andes.
- Pacifici, M., Santini, L., Di Marco, M., Baisero, D., Francucci, L., Grottole Marasini, G., ... Rondinini, C. (2013). Generation length for mammals. *Nature Conservation*, 5, 89–94. <https://doi.org/10.3897/natureconservation.5.5734>
- Pidal, A. P. P. (2006). Tabla cronoestratigráfica preparada para la Feria de Madrid por la Ciencia de 2006. In *Feria de Madrid por la Ciencia*. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/280644575\\_Tabla\\_cronoestratigrafica\\_preparada\\_para\\_la\\_Feria\\_de\\_Madrid\\_por\\_la\\_Ciencia\\_de\\_2006](https://www.researchgate.net/publication/280644575_Tabla_cronoestratigrafica_preparada_para_la_Feria_de_Madrid_por_la_Ciencia_de_2006)
- Portocarrero, A., Morales, D., & Diaz, D. (2009). nutrias de colombia. *Fundación Omacha- Fundación Horizonte Verde. Proyecto Pijiwi.orinoko.*
- Prakash, S., Rodes, L., Coussa-Charley, M., & Tomaro-Duchesneau, C. (2011). Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics*, 5, 71–86. <https://doi.org/10.2147/BTT.S19099>
- Ra, P.-F. (2009). Anotaciones sobre neonatología de nutrias neotropicales (Pteronura brasiliensis y Lontra longicaudis). *Mem. Conf. Innterna Med. Aprovech. Fauna Silv. Exót. Conv*, 5:1, 8–10.
- Restrepo, C. A., & Botero-Botero, Á. (n.d.). TROPHIC ECOLOGY OF NEOTROPICAL OTTER LONTRA LONGICAUDIS (CARNÍVORA, MUSTELIDAE) IN LA VIEJA RIVER, ALTO CAUCA, COLOMBIA. *Boletín*

- Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 16(1), 207–214.  
Retrieved from  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-30682012000100017&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-30682012000100017&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- Reynoso, J. P. G. (2004, January 1). SITUACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LAS NUTRIAS EN MÉXICO, CON ÉNFASIS EN *Lontra longicaudis annectens* MAJOR, 1897. *REVISTA MEXICANA DE MASTOZOLOGÍA (Nueva Época)*. Retrieved from  
<http://revistamexicanademastozoologia.com.mx/ojs/index.php/rmm/article/view/70>
- Rheingantz, M. L., & Trinca, C. S. (2015). *Lontra longicaudis*, 8235. Retrieved from  
<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T12304A21937379.en>
- Robles-Alonso, V., & Guarner, F. [Progress in the knowledge of the intestinal human microbiota]. *Nutrición Hospitalaria*, 28(3), 553–7.  
<https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.3.6601>
- Rodicio, M., & Mendoza, M. (2004). *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Doyma. Retrieved from  
<http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-identificacion-bacteriana-mediante-secuenciacion-del-13059055>
- Rodrigues, L. de A., Leuchtenberger, C., Kasper, C. B., Junior, O. C., & Silva, V. C. F. da. (2013, October 17). Avaliação do risco de extinção da *Lontra neotropical Lontra longicaudis* (Olfers, 1818) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*. Retrieved from  
<http://www.icmbio.gov.br/revistaeletronica/index.php/BioBR/article/view/389>
- Rodríguez-Mahecha, J., Alberico, M., & Trujillo, F. (2006). Libro rojo de los mamíferos de Colombia. *Internacional Colombia* .... Retrieved from  
<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=UNIBA.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=003009>
- Rook, G. A. W., & Brunet, L. R. (2005). Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut*, 54(3), 317.
- Ruiz Álvarez, V., Puig Peña, Y., & Rodríguez Acosta, M. (n.d.). Microbiota intestinal, sistema inmune y obesidad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 29(3), 364–397. Retrieved from  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002010000300007&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002010000300007&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Sadler, T. W., & Langman, J. (2007). *Langman embriología médica: con orientación clínica*. Retrieved from  
<https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=KEw1RjJQ6hEC&pgis=1>
- Sanz, Y., Collado, M. C., Haros, M., & Dalmau, J. (2004). Funciones metabólicas-nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: Probióticos y prebióticos. *Acta Pediátrica Española*, 62(11), 520–526.
- Sartor, R. B., & Mazmanian, S. K. (2012). Intestinal Microbes in Inflammatory Bowel Diseases. *The American Journal of Gastroenterology Supplements*,

- 1(1), 15–21. <https://doi.org/10.1038/ajgsup.2012.4>
- Schwab, C., Cristescu, B., Northrup, J. M., Stenhouse, G. B., & Gänzle, M. (2011). Diet and Environment Shape Fecal Bacterial Microbiota Composition and Enteric Pathogen Load of Grizzly Bears. *PLoS ONE*, 6(12), e27905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027905>
- Trinca, C. S., de Thoisy, B., Rosas, F. C. W., Waldemarin, H. F., Koepfli, K.-P., Vianna, J. A., & Eizirik, E. (2012). Phylogeography and demographic history of the neotropical otter (*Lontra longicaudis*). *The Journal of Heredity*, 103(4), 479–92. <https://doi.org/10.1093/jhered/ess001>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, 449(7164), 804–10. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
- Vlčková, K., Mrázek, J., Kopečný, J., & Petrželková, K. J. (2012). Evaluation of different storage methods to characterize the fecal bacterial communities of captive western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). *Journal of Microbiological Methods*, 91(1), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.07.015>
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 5088–90. <https://doi.org/10.1073/PNAS.74.11.5088>
- Yildirim, S., Yeoman, C. J., Sipos, M., Torralba, M., Wilson, B. A., Goldberg, T. L., ... Nelson, K. E. (2010). Characterization of the fecal microbiome from non-human wild primates reveals species specific microbial communities. *PloS One*, 5(11), e13963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013963>
- Zhu, L., Wu, Q., Dai, J., Zhang, S., & Wei, F. (2011). Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(43), 17714–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017956108>

## ANEXO A

### LISTA DE MUESTRAS

**Tabla 2.** Identificación, descripción o nombre, número de aislamiento y Riquezas de especies en cada una de las muestras. Promedio de las tres réplicas de cada muestra del valor de riqueza de especies. RV-MF = río La Vieja, RS-MF = río Sinú Córdoba, ZP-MF= zoológico de Piscilago, ZC-MF= zoológico de Cali.

zona	muestra	individuo	replica	S	promedio S
Cuenca del río La Vieja	RV-MF 1	grande	1	11	11,3
			2	12	
			3	11	
Cuenca del río La Vieja	RV-MF 2	pequeña	4	14	13,7
			5	13	
			6	14	
Cuenca del río La Vieja	RV-MF 3	grande	7	14	13,7
			8	14	
			9	13	
Cuenca del río La Vieja	RV-MF 4	pequeña de cría	13	12	11,7
			14	12	
			15	11	
Cuenca del río La Vieja	RV-MF 5	mediana	16	15	14,7
			17	15	
			18	14	
Cuenca del río La Vieja	RV-MF 6	grande	19	3	4,0
			20	3	
			21	6	
Cuenca del río La Vieja	RV-MF 7	mediana	24	4	4,0
			25	4	
			26	4	
Cuenca del río La Vieja	RV-MF 8	mediana	36	8	7,3
			37	7	
			38	7	
Cuenca del río La Vieja	RV-MF 9	pequeña	39	10	11,0
			40	11	
			41	12	
Cuenca del río La Vieja	RV-MF 10	mediana	42	15	14,0
			43	14	
			44	13	
Cuenca del río La Vieja	RV-MF 11	pequeña	45	19	19,0
			46	19	
			47	19	
Cuenca del río La Vieja	RV-MF 12	grande	48	12	11,7
			49	12	
			50	11	

zona	muestra	individuo	replica	S	promedio S
zoológico de Cali	ZC-MF 1	Juliana	78	13	11,7
			79	12	
			80	10	
zoológico de Cali	ZC-MF 2	Pipe	81	7	7,3
			82	7	
			83	8	
zoológico de Cali	ZC-MF 3	Juliana	84	13	12,3
			85	13	
			86	11	
zoológico de Cali	ZC-MF 4	Mariana	87	8	8,0
			88	8	
			89	8	
zoológico de Cali	ZC-MF 5	Mariana	90	9	8,3
			91	9	
			92	7	
zoológico de Cali	ZC-MF 6	Mariana	93	7	7,0
			94	7	
			95	7	
zoológico de Cali	ZC-MF 7	Mariana	96	5	5,0
			97	5	
			98	5	
zoológico de Cali	ZC-MF 8	Juliana	102	4	4,0
				4	
				4	
zoológico de Cali	ZC-MF 9	Juliana	103	8	7,7
			104	8	
			105	7	
zoológico de Cali	ZC-MF 10	Mariana	106	10	10,3
			107	10	
			108	11	
zoológico de Cali	ZC-MF 11	Juliana	109	7	6,7
			110	7	
			111	6	
zoológico de Cali	ZC-MF 12	Pipe	112	6	5,7
			113	6	
			114	5	
zoológico de Cali	ZC-MF 13	Pipe	115	4	4,0
			116	4	
			117	4	
zoológico de Cali	ZC-MF 14	Pipe	118	7	7,0
			119	7	
			120	7	
zoológico de Cali	ZC-MF 15	Pipe	121	8	8,0
			122	8	
			123	8	

<b>zona</b>	<b>muestra</b>	<b>Individuo</b>	<b>replica</b>	<b>S</b>	<b>promedio S</b>
Cuenca del río Sinú	RS-MF 1	Cb 01	54	6	7,7
			55	8	
			56	9	
Cuenca del río Sinú	RS-MF 2	Cb 04	63	11	12,7
			64	12	
			65	15	
zoológico de Piscilago	ZP-MF 1	Toto	66	15	14,7
			67	16	
			68	13	
zoológico de Piscilago	ZP-MF 2	Toto	69	12	12,0
			70	12	
			71	12	
zoológico de Piscilago	ZP-MF 3	Toto	72	13	13,3
			73	12	
			74	15	
zoológico de Piscilago	ZP-MF 4	Burbuja	75	12	13,0
			76	12	
			77	15	

**ANEXO B**

**FICHA DE RECOLECCIÓN PARA ZOOLOGICOS**

Parque zoológico Piscilago

Ficha de recolección para zoológicos		
No. Individuo	1	Foto Opcional
Nombre	Toto	
Edad	11 años aproximados	
Zoológico	Piscilago	
Fecha de colecta	28 de mayo 2016	
dieta		
Mojaras vivas		
¿Ha encontrado restos de aves u otros animales que Ud no haya suministrado?		
No, no se observa comportamiento de caza solo con su alimento diario		
¿Ha observado Ud Comportamiento de caza?		
Solo con las mojaras vivas		
¿Cuál fue la última fecha en la que se suministró antibiótico y porque?		
No se ha suministrado antibióticos ni desparasitado desde hace tiempo		
Historia del animal (breve descripción de su procedencia, comportamiento, etc.)		
Fue traído muy pequeño al zoológico por signos de abandono		

Ficha de recolección para zoológicos		
No. Individuo	2	Foto Opcional
Nombre	Burbuja	
Edad	2 años aproximadamente	
Zoológico	Pscilago	
Fecha de colecta	28 de mayo 2016	
dieta		
Mojaras vivas		
¿Ha encontrado restos de aves u otros animales que Ud no haya suministrado?		
No, no se observa comportamiento de caza solo con su alimento diario		
¿Ha observado Ud Comportamiento de caza?		
Solo con las mojaras vivas		
¿Cuál fue la última fecha en la que se suministró antibiótico y porque?		
No se ha suministrado antibióticos ni desparasitado desde hace tiempo		
Historia del animal (breve descripción de su procedencia, comportamiento, etc.)		
Fue traída de la zona, se encontró con signos de abandono y esta fura de exhibición		

Zoológico de Cali

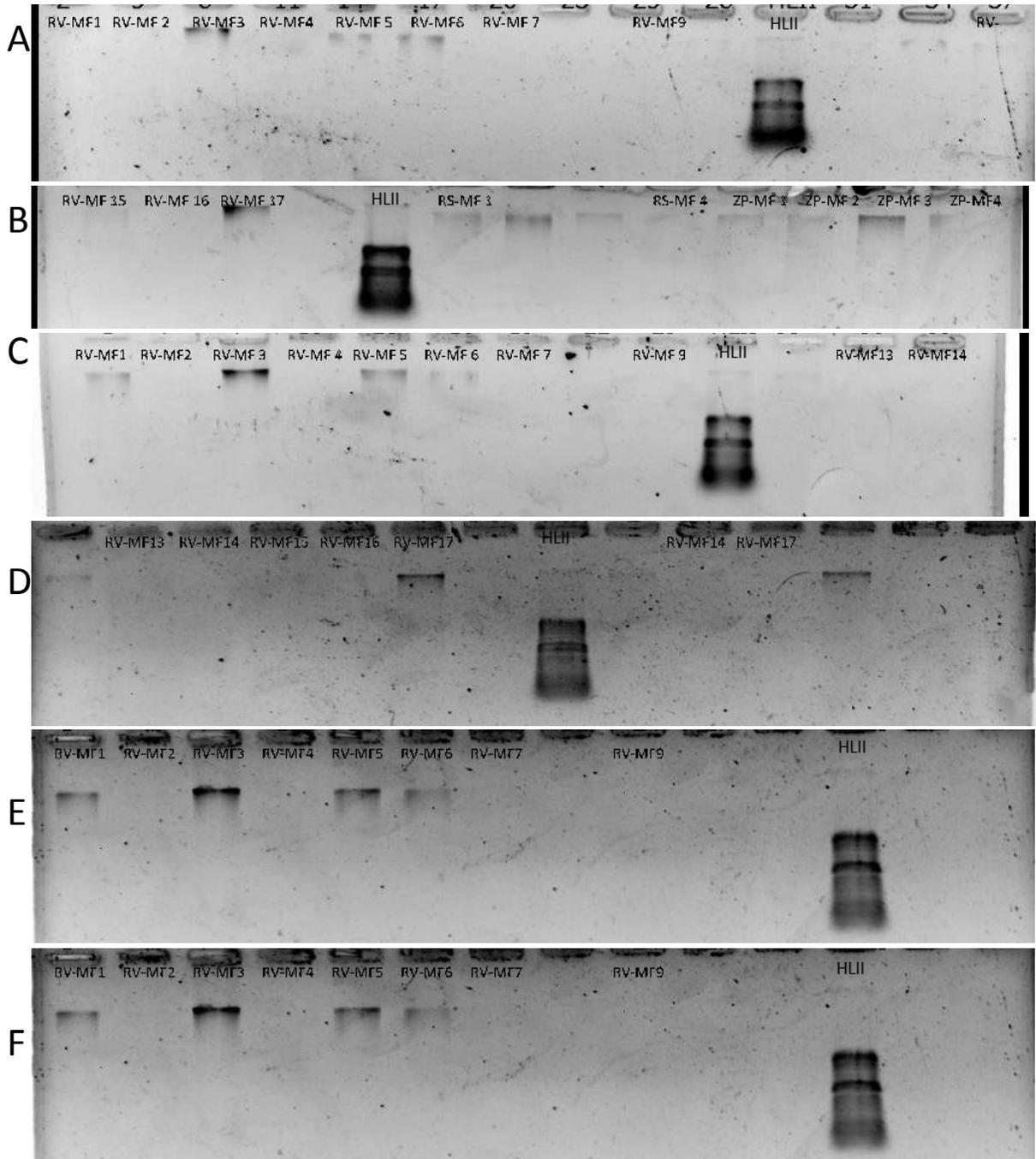
Ficha de recolección para zoológicos		
No. Individuo	1	Foto Opcional
Nombre	Pipe	
Edad	12 años	
Zoológico	Zoológico de Cali	
Fecha de colecta		
dieta		
Todos son alimentados con pez vivo y congelado o de dispensador y en algunos momentos y se les da coco como incentivo.		
¿Ha encontrado restos de aves u otros animales que Ud no haya suministrado?		
No		
¿Ha observado Ud Comportamiento de caza?		
No		
¿Cuál fue la última fecha en la que se suministró antibiótico y porque?		
No se suministra antibióticos en fechas cercanas a la colecta		
Historia del animal (breve descripción de su procedencia, comportamiento, etc.)		
Donado del zoológico de Piscilago también obtenido del medio por signos de maltrato y abandono		

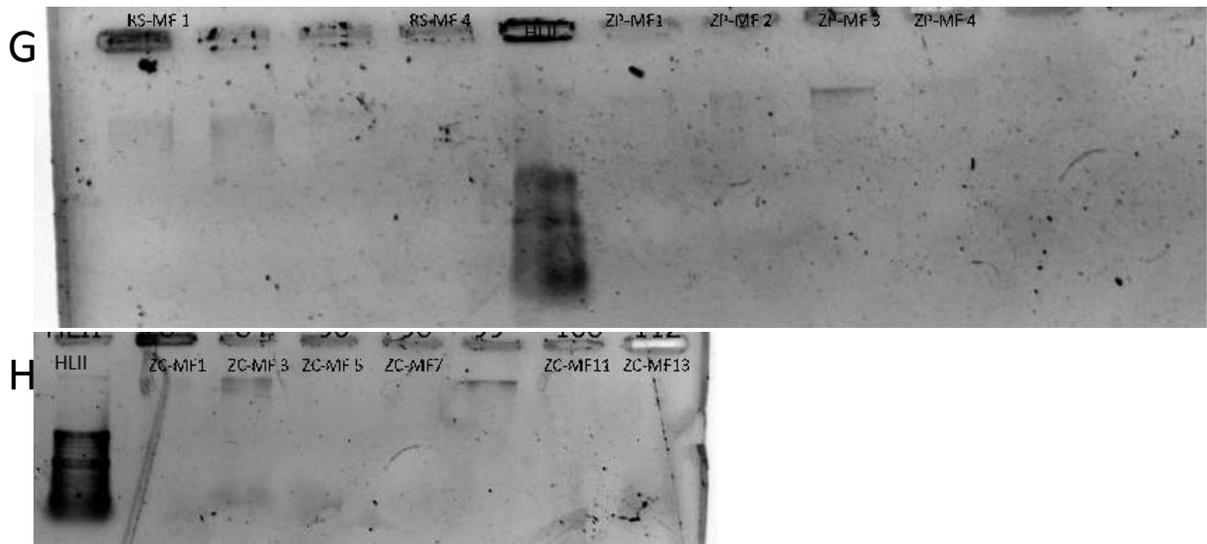
Ficha de recolección para zoológicos		
No. Individuo	2	Foto Opcional
Nombre	Mariana	
Edad	8 años	
Zoológico	Zoológico de Cali	
Fecha de colecta		
dieta		
Todos son alimentados con pez vivo y congelado o de dispensador y en algunos momentos y se les da coco como incentivo.		
¿Ha encontrado restos de aves u otros animales que Ud no haya suministrado?		
No		
¿Ha observado Ud Comportamiento de caza?		
No		
¿Cuál fue la última fecha en la que se suministró antibiótico y porque?		
No se suministra antibióticos en fechas cercanas a la colecta		
Historia del animal (breve descripción de su procedencia, comportamiento, etc.)		

extraída del medio por signos de abandono y en noviembre del 2011 da a luz a Juliana

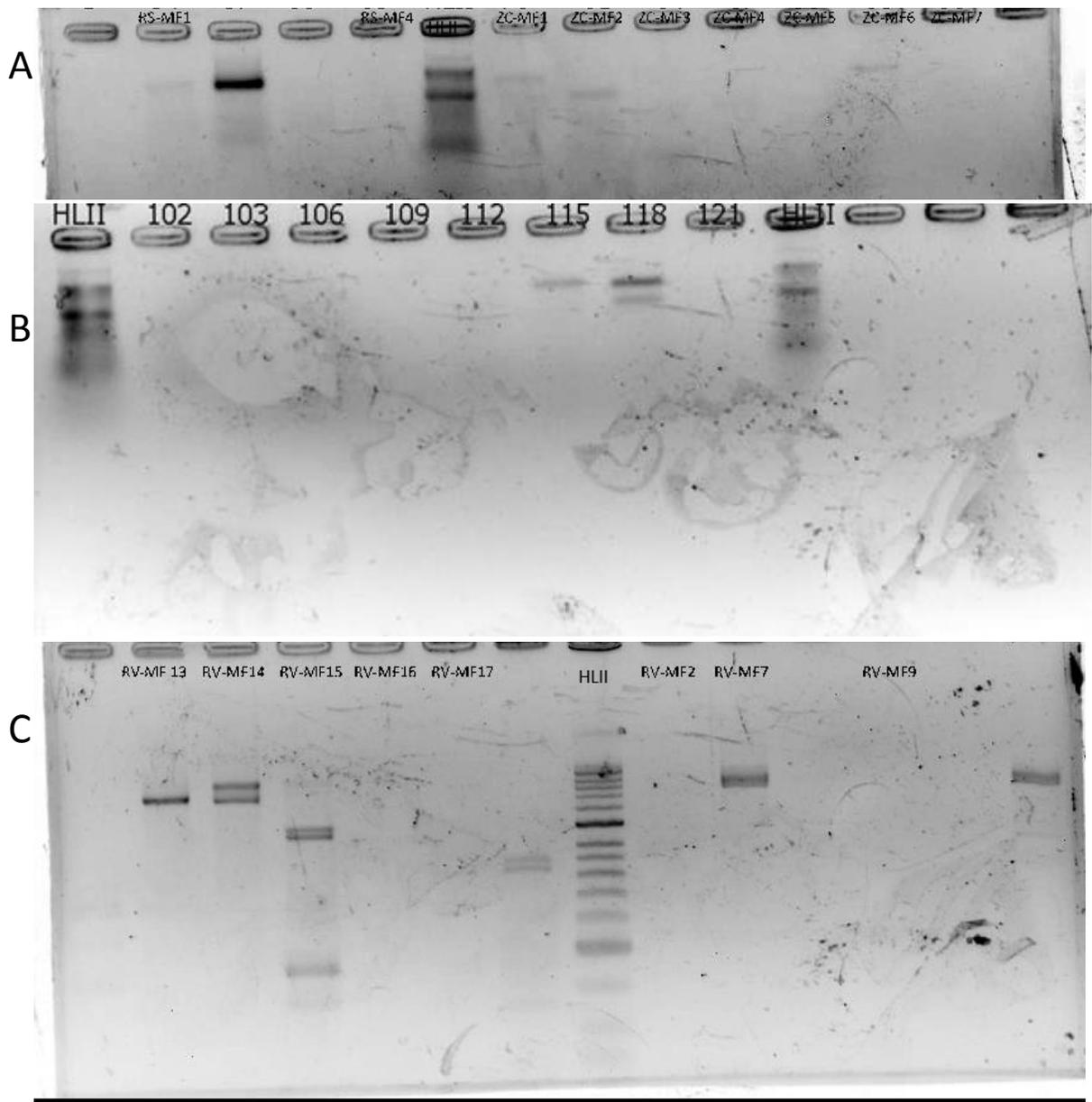
Ficha de recolección para zoológicos		
No. Individuo	3	Foto Opcional
Nombre	Juliana	
Edad	5 años	
Zoológico	Zoológico de Cali	
Fecha de colecta		
dieta		
Todos son alimentados con pez vivo y congelado o de dispensador y en algunos momentos y se les da coco como incentivo.		
¿Ha encontrado restos de aves u otros animales que Ud no haya suministrado?		
No		
¿Ha observado Ud Comportamiento de caza?		
No		
¿Cuál fue la última fecha en la que se suministró antibiótico y porque?		
No se suministra antibióticos en fechas cercanas a la colecta		
Historia del animal (breve descripción de su procedencia, comportamiento, etc.)		
se ha mantenido en cautiverio desde su nacimiento		

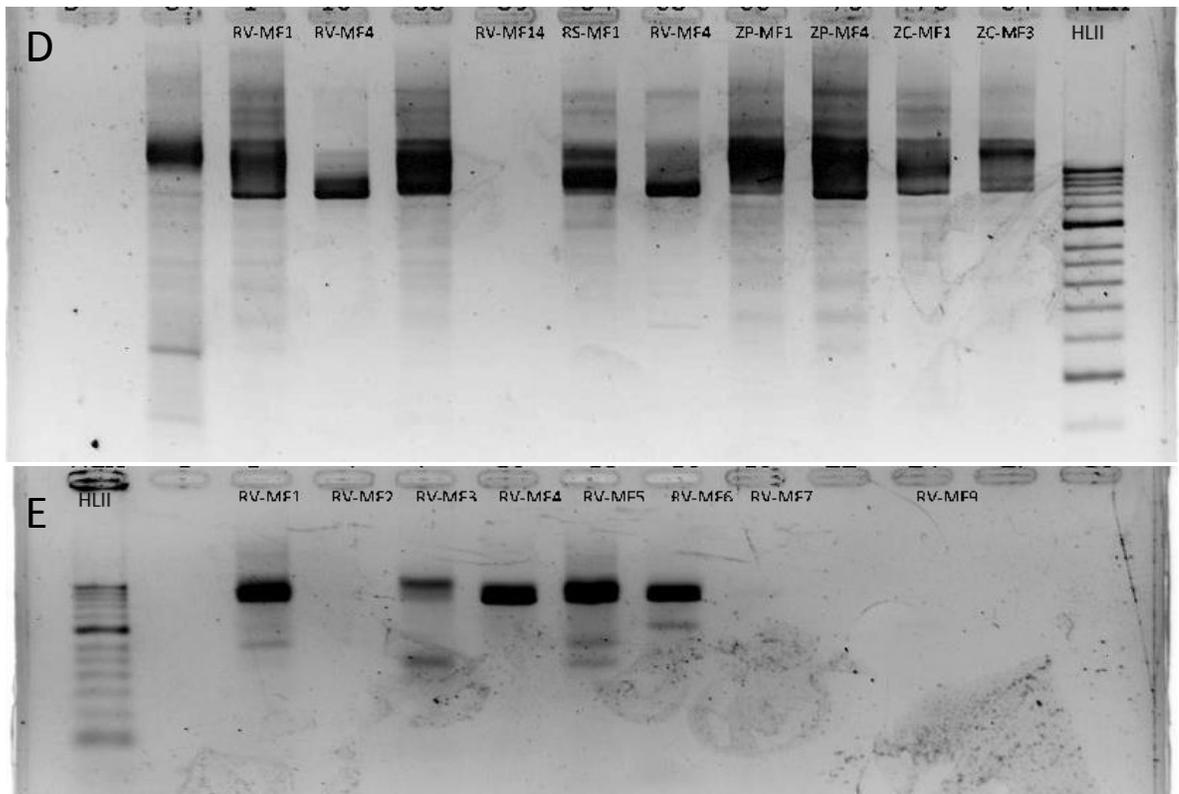
**ANEXO C**  
**FOTOS GELES DE AGAROSA**



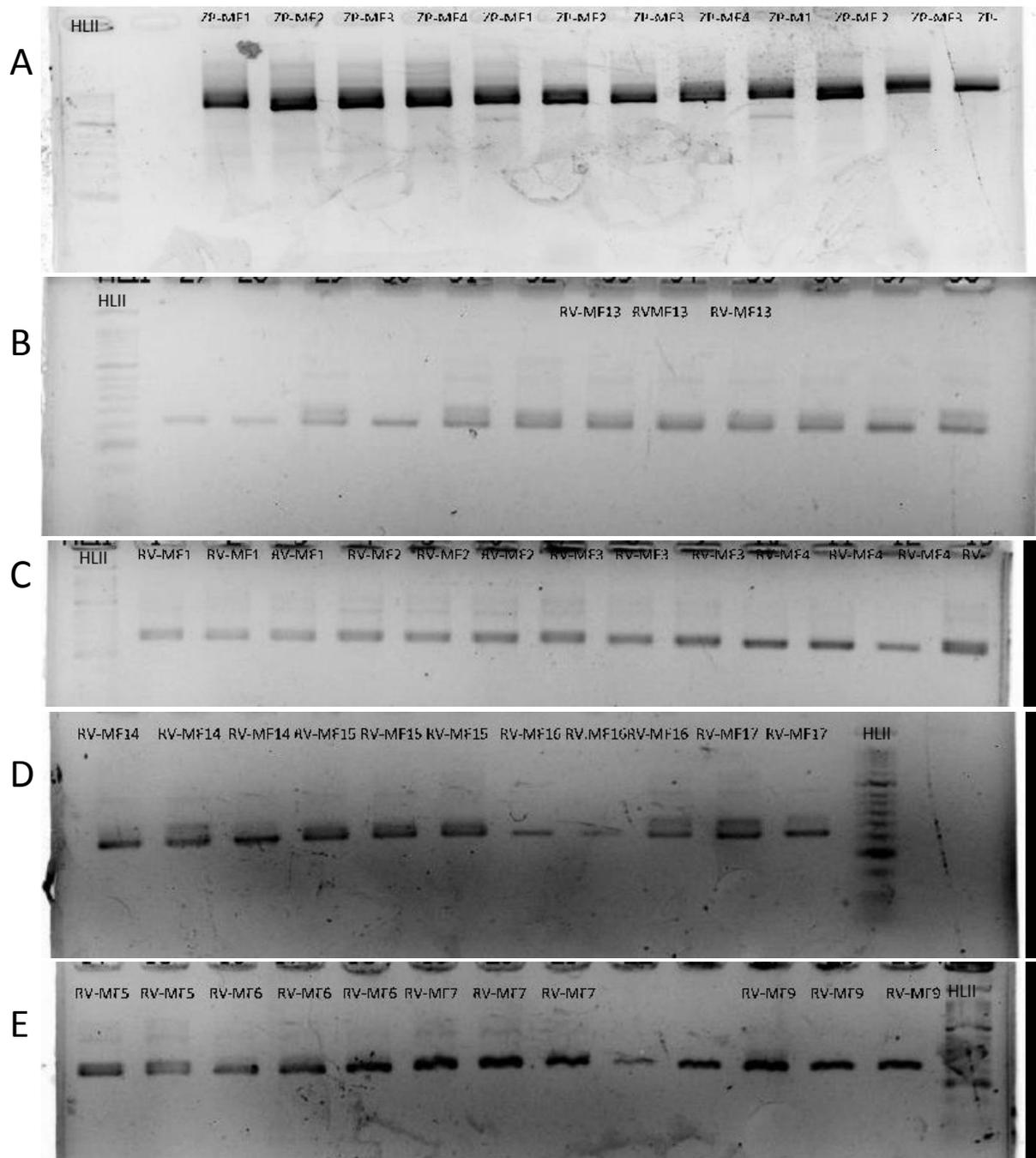


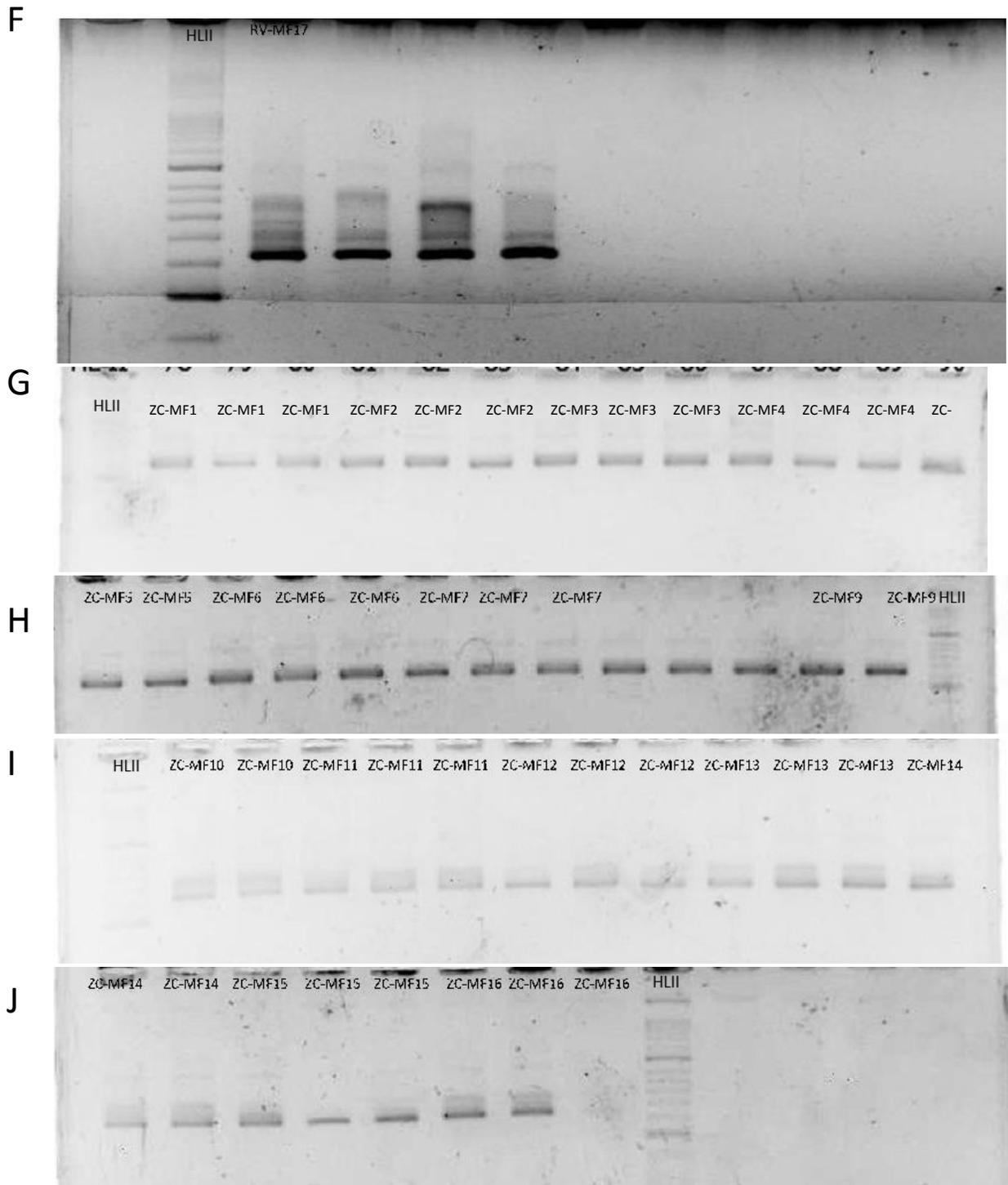
Figuras 12 A-H. Productos de ADN total extraído de muestras de materia fecal de nutria neotropical *L. longicaudis* en gel de agarosa al 0,7%, Río La Vieja (RV), Río Sinú (RS), Zoológico de Piscilago (ZP) y Zoológico de Cali (ZC). MF = Materia fecal, a1 = Aislamiento de ADN total #1, HLII = Marcador de peso molecular HyperLadder™ II.





Figuras 13 A-E. Productos de PCR 16s para la region que codifican los primers 8F-1541R. de nutria neotropical *L. longicaudis* en gel de agarosa al 2%, Río La Vieja (RV), Río Sinú (RS), Zoológico de Piscilago (ZP) y Zoológico de Cali (ZC). MF = Materia fecal, a1 = Aislamiento de ADN total #1, HLII = Marcador de peso molecular HyperLadder™ II.

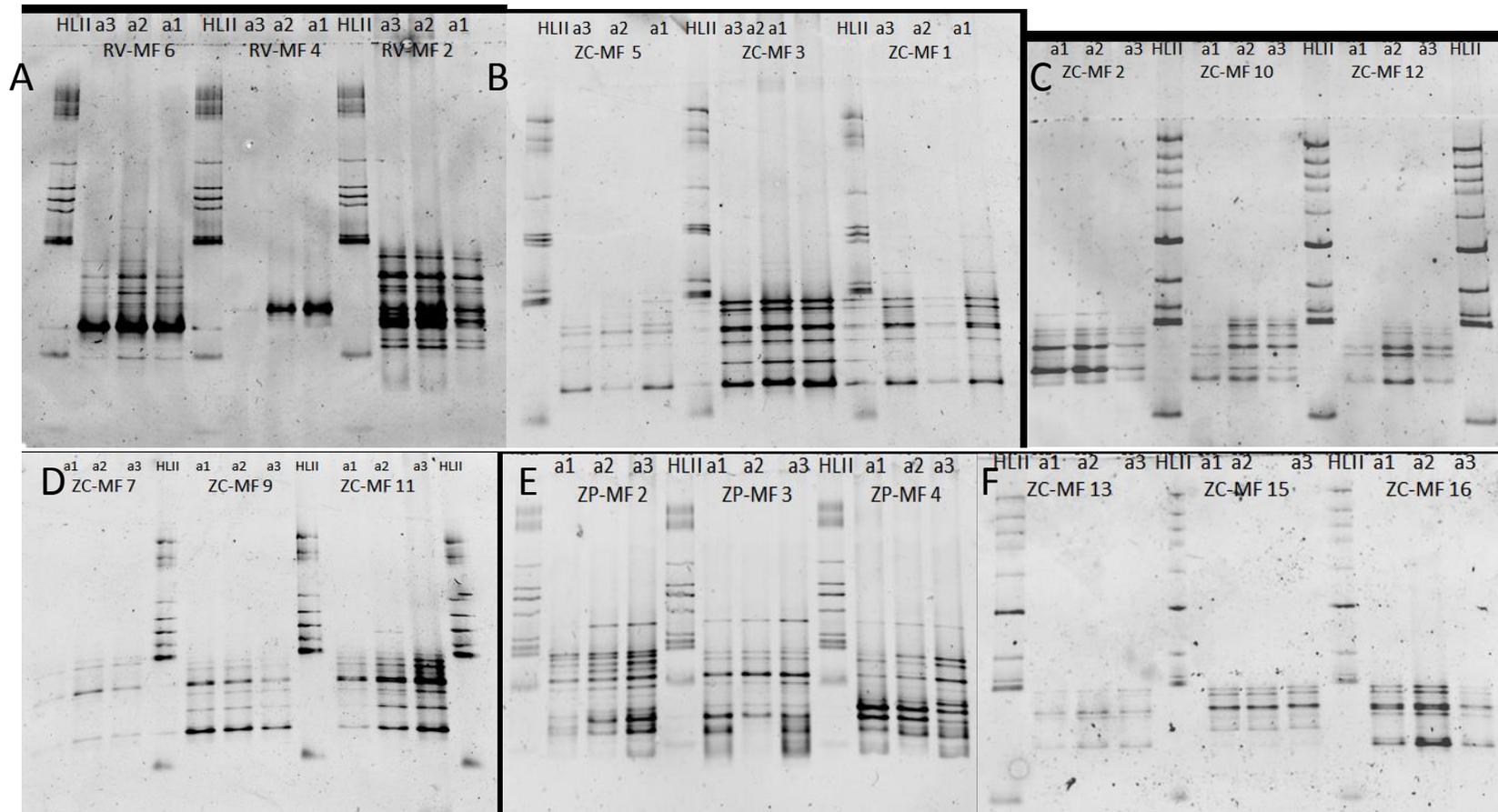




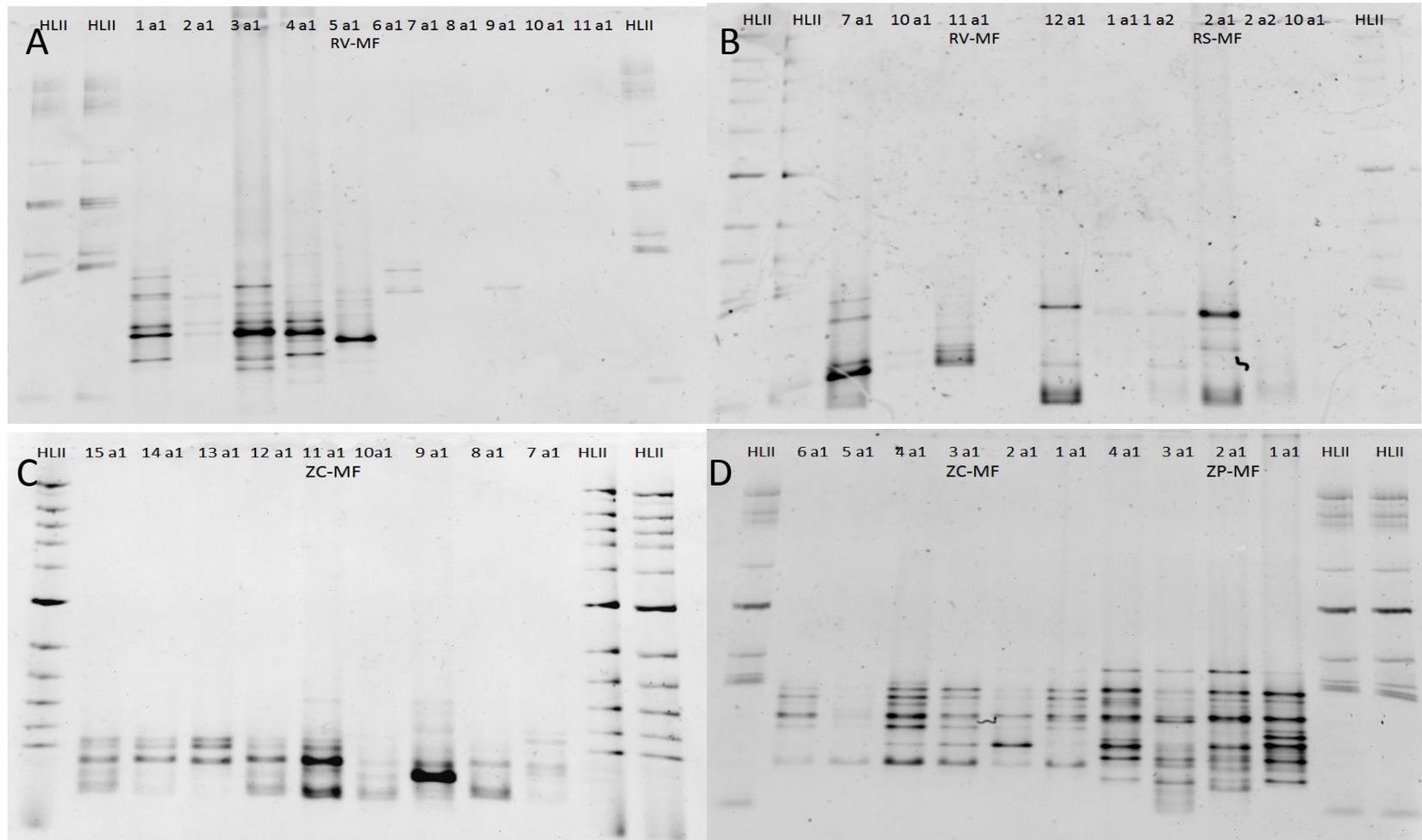
Figuras 14.A-J. Productos de PCR 16s para la region que codifican los primers 698F-1401R. De nutria neotropical *L. longicaudis* en gel de agarosa al 2%, Río La Vieja (RV), Río Sinú (RS), Zoológico de Piscilago (ZP) y Zoológico de Cali (ZC). MF = Materia fecal, a1 = Aislamiento de ADN total #1, HLII = Marcador de peso molecular HyperLadder™ II.

## ANEXO D

### FOTOS DGGE



Figuras 15. A-F. Perfiles de PCR-DGGE de la comunidad bacteriana presente en las muestras de heces fecales de la nutria neotropical *L. longicaudis*. Se observa el perfil de bandas de muestras de materia fecal colectadas en cada uno de los sitios de muestreo: Río La Vieja (RV), Río Sinú (RS), Zoológico de Piscilago (ZP) y Zoológico de Cali (ZC). MF = Materia fecal, a1 = Aislamiento de ADN total #1, HLII = Marcador de peso molecular.



Figuras 16. A-D. Perfiles de PCR-DGGE de la comunidad bacteriana presente en las muestras de heces fecales de la nutria neotropical *L. longicaudis*. Se observa el perfil de bandas de muestras de materia fecal colectadas en cada uno de los sitios de muestreo: Río La Vieja (RV), Río Sinú (RS), Zoológico de Piscilago (ZP) y Zoológico de Cali (ZC). MF = Materia fecal, a1 = Aislamiento de ADN total #1, HLII = Marcador de peso molecular.

## ANEXO E

### RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Tabla 3. Prueba de normalidad (a) y homogeneidad de varianza (b) para la riqueza de especies S, n = 33 muestras con un (P >0.05).

(a)

<b>Pruebas de Normalidad para los datos de riqueza</b>	<b>Estadístico W de Shapiro-Wilk</b>	<b>Valor-P</b>
	0,960818	0,328785

(b)

<b>Verificación de Varianza</b>	<b>Levene's</b>	<b>Valor-P</b>
	7,83023	0,0728455

Tabla 4. Riqueza específica (S) de las comunidades de bacterias que habitan muestras de materia fecal de nutrias silvestres (Río La Vieja y Río Sinú) y en cautiverio (zoológicos de Piscilago y Cali). En una misma columna, letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre los datos de la columna ( $P > 0.05$ ).

Estado de la nutria neotropical	$\hat{S} \pm DS$
Silvestre n = 14	11,2 <sup>a</sup> ±4.2
Cautiverio n = 18	8.7 <sup>a</sup> ±3.2

Tabla 5. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para evaluar diferencias en riqueza entre comunidades bacterianas de individuos silvestres y en cautiverio con un ( $P > 0.05$ ).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	48,0577	1	48,0577	3,55	0,0688
Intra grupos	419,148	31	13,5209		
Total (Corr.)	467,205	32			

Tabla 6. Prueba de múltiples rangos para S con el Método LSD de 2 niveles: silvestre o cautiverio, el asterisco en la columna Sig (significancia) representa las diferencias significativas.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
S – Z	*	-0,804511	2,76318

Tabla 7. Riqueza específica (S) de las comunidades de bacterias para cada sitio de muestreo. En una misma columna, letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre los datos de la columna ( $P > 0.05$ ).

Sitio de muestreo	$\bar{S} \pm DS$
Río La Vieja (RV) n = 12	11,3 <sup>a</sup> ±4.4
Río Sinú (RS) n = 2	10,2 <sup>a</sup> ±3.5
Piscilago (ZP) n=2	13,2 <sup>a</sup> ±0,2
Cali (ZC) n=3	6,7 <sup>a</sup> ±0,9

Tabla 8. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para evaluar diferencias en riqueza entre los sitios de muestreo Río La Vieja (RV), Río Sinú (RS), Zoológico de Piscilago (ZP) y Zoológico de Cali (ZC) con un ( $P > 0.05$ ).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	66,236	3	22,0787	1,46	0,2652
Intra grupos	226,781	15	15,1187		
Total (Corr.)	293,017	18			

Tabla 9. Prueba de múltiples rangos para S con el Método LSD de 4 niveles: Río La Vieja (RV), Río Sinú (RS), Zoológico de Piscilago (ZP) y Zoológico de Cali (ZC), el asterisco en la columna Sig (significancia) representa las diferencias significativas.

Contraste	Sig.	Diferencia +/-	Límites
RS - RV		-1,14167	6,32983
RS - ZC		3,53333	7,56559
RS - ZP		-2,95	8,28769
RV - ZC		4,675	5,34968
RV - ZP		-1,80833	6,32983
ZC - ZP		-6,48333	7,56559

Tabla 10. Riqueza específica (S) de las comunidades de bacterias para las muestras del Zoológico de Piscilago (ZP). En una misma columna, letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre los datos de la columna ( $P > 0.05$ ).

Zoológico Piscilago	$\bar{S} \pm DS$
Toto n = 3	13,3 <sup>a</sup> ±1,3
Burbuja n =1	13,0 <sup>a</sup> ±1,5

Tabla 11. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para evaluar las diferencias de las muestras del Zoológico de Piscilago (ZP) con un ( $P > 0.05$ )

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,0833333	1	0,0833333	0,05	0,8505
Intra grupos	3,64667	2	1,82333		
Total (Corr.)	3,73	3			

Tabla 12. Prueba de múltiples rangos para S con 4 muestras pertenecientes al Zoológico de Piscilago (ZP), el asterisco en la columna Sig (significancia) representa las diferencias significativas.

<i>Contraste</i>	<i>Sig. Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Burbuja - Toto	-0,333333	6,70871

Tabla 13. Riqueza específica (S) de las comunidades de bacterias para las muestras del río La Vieja (RV). En una misma columna, letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre los datos de la columna ( $P > 0.05$ ).

Río La Vieja	$\bar{S} \pm DS$
RV-MF 1 n=3	11,3 <sup>ab</sup> ±0,57
RV-MF 2 n=3	13,7 <sup>bf</sup> ±0,57
RV-MF 3 n=3	13,7 <sup>ac</sup> ±0,57
RV-MF 4 n=3	11,7 <sup>b</sup> ±0,57
RV-MF 5 n=3	14,7 <sup>f</sup> ±0,57
RV-MF 6 n=3	4,0 <sup>g</sup> ±1,7
RV-MF 7 n=3	4,0 <sup>h</sup> ±0
RV-MF 8 n=3	7,3 <sup>i</sup> ±0
RV-MF 9 n=3	11,0 <sup>c</sup> ±0,57
RV-MF 10 n=3	14,0 <sup>a</sup> ±1
RV-MF 11 n=3	19,0 <sup>j</sup> ±1
RV-MF 12 n=3	11,7 <sup>bc</sup> ±0

Tabla 14. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para evaluar las diferencias de las muestras de la cuenca del río La Vieja (RV) con un ( $P > 0.05$ ).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	635,333	11	57,7576	94,51	0,0000
Intra grupos	14,6667	24	0,611111		
Total (Corr.)	650,0	35			

Tabla 15. Prueba de múltiples rangos para S con el Método: LSD de 12 muestras de la cuenca del río La Vieja (RV), el asterisco en la columna Sig (significancia) representa las diferencias significativas.

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
RV-MF 1 - RV-MF 10	*	-2,66667	1,31736
RV-MF 1 - RV-MF 11	*	-7,66667	1,31736
RV-MF 1 - RV-MF 12		-0,333333	1,31736
RV-MF 1 - RV-MF 2	*	-2,33333	1,31736
RV-MF 1 - RV-MF 3	*	-2,33333	1,31736

RV-MF 1 - RV-MF 4	-0,333333	1,31736
RV-MF 1 - RV-MF 5	* -3,33333	1,31736
RV-MF 1 - RV-MF 6	* 7,33333	1,31736
RV-MF 1 - RV-MF 7	* 7,33333	1,31736
RV-MF 1 - RV-MF 8	* 4,0	1,31736
RV-MF 1 - RV-MF 9	0,333333	1,31736
RV-MF 10 - RV-MF 11	* -5,0	1,31736
RV-MF 10 - RV-MF 12	* 2,33333	1,31736
RV-MF 10 - RV-MF 2	0,333333	1,31736
RV-MF 10 - RV-MF 3	0,333333	1,31736
RV-MF 10 - RV-MF 4	* 2,33333	1,31736
RV-MF 10 - RV-MF 5	-0,666667	1,31736
RV-MF 10 - RV-MF 6	* 10,0	1,31736
RV-MF 10 - RV-MF 7	* 10,0	1,31736
RV-MF 10 - RV-MF 8	* 6,66667	1,31736
RV-MF 10 - RV-MF 9	* 3,0	1,31736
RV-MF 11 - RV-MF 12	* 7,33333	1,31736
RV-MF 11 - RV-MF 2	* 5,33333	1,31736
RV-MF 11 - RV-MF 3	* 5,33333	1,31736
RV-MF 11 - RV-MF 4	* 7,33333	1,31736
RV-MF 11 - RV-MF 5	* 4,33333	1,31736
RV-MF 11 - RV-MF 6	* 15,0	1,31736
RV-MF 11 - RV-MF 7	* 15,0	1,31736
RV-MF 11 - RV-MF 8	* 11,6667	1,31736
RV-MF 11 - RV-MF 9	* 8,0	1,31736
RV-MF 12 - RV-MF 2	* -2,0	1,31736
RV-MF 12 - RV-MF 3	* -2,0	1,31736
RV-MF 12 - RV-MF 4	0,0	1,31736
RV-MF 12 - RV-MF 5	* -3,0	1,31736
RV-MF 12 - RV-MF 6	* 7,66667	1,31736
RV-MF 12 - RV-MF 7	* 7,66667	1,31736
RV-MF 12 - RV-MF 8	* 4,33333	1,31736
RV-MF 12 - RV-MF 9	0,666667	1,31736
RV-MF 2 - RV-MF 3	0,0	1,31736
RV-MF 2 - RV-MF 4	* 2,0	1,31736
RV-MF 2 - RV-MF 5	-1,0	1,31736
RV-MF 2 - RV-MF 6	* 9,66667	1,31736
RV-MF 2 - RV-MF 7	* 9,66667	1,31736
RV-MF 2 - RV-MF 8	* 6,33333	1,31736
RV-MF 2 - RV-MF 9	* 2,66667	1,31736
RV-MF 3 - RV-MF 4	* 2,0	1,31736
RV-MF 3 - RV-MF 5	-1,0	1,31736
RV-MF 3 - RV-MF 6	* 9,66667	1,31736
RV-MF 3 - RV-MF 7	* 9,66667	1,31736
RV-MF 3 - RV-MF 8	* 6,33333	1,31736
RV-MF 3 - RV-MF 9	* 2,66667	1,31736
RV-MF 4 - RV-MF 5	* -3,0	1,31736
RV-MF 4 - RV-MF 6	* 7,66667	1,31736
RV-MF 4 - RV-MF 7	* 7,66667	1,31736

RV-MF 4 - RV-MF 8	*	4,33333	1,31736
RV-MF 4 - RV-MF 9		0,666667	1,31736
RV-MF 5 - RV-MF 6	*	10,6667	1,31736
RV-MF 5 - RV-MF 7	*	10,6667	1,31736
RV-MF 5 - RV-MF 8	*	7,33333	1,31736
RV-MF 5 - RV-MF 9	*	3,66667	1,31736
RV-MF 6 - RV-MF 7		0,0	1,31736
RV-MF 6 - RV-MF 8	*	-3,33333	1,31736
RV-MF 6 - RV-MF 9	*	-7,0	1,31736
RV-MF 7 - RV-MF 8	*	-3,33333	1,31736
RV-MF 7 - RV-MF 9	*	-7,0	1,31736
RV-MF 8 - RV-MF 9	*	-3,66667	1,31736

---

Tabla 16. Riqueza específica (S) de las comunidades de bacterias para las muestras del río Sinú (RS). En una misma columna, letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre los datos de la columna ( $P > 0.05$ ).

Río Sinú	$\hat{S} \pm DS$
RS-MF 1 n=3	11,3 <sup>a</sup> ±0,57
RS-MF 2 n=3	13,7 <sup>b</sup> ±0,57

Tabla 17. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) con muestras de la cuenca del río Sinú (RS) ( $P > 0.05$ ).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	37,5	1	37,5	11,25	0,0285
Intra grupos	13,3333	4	3,33333		
Total (Corr.)	50,8333	5			

Tabla 18. Prueba de múltiples rangos para S con el Método LSD de con 2 muestras de la cuenca del río Sinú (RS), el asterisco en la columna Sig (significancia) representa las diferencias significativas.

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
RS-MF 1 - RS-MF 2	*	-5,0	4,13889

Tabla 19. Riqueza específica (S) de las comunidades de bacterias para las muestras del zoológico de Cali (ZC). En una misma columna, letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre los datos de la columna ( $P > 0.05$ ).

zoológico de Cali	$\hat{S} \pm DS$
Juliana n=5	6,1 <sup>a</sup> ± 1,2
Mariana n=5	7,7 <sup>a</sup> ± 1,9
Pipe n=5	6,2 <sup>a</sup> ± 1,7

Tabla 20. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) con muestras del zoológico de Cali (ZC) con un ( $P > 0.05$ ).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	7,127	2	3,5635	1,03	0,3971
Intra grupos	31,2822	13	3,4758		
Total (Corr.)	38,4092	15			

Tabla 21. Prueba de múltiples rangos para S con el Método LSD con 3 muestras del zoológico de Cali (ZC), el asterisco en la columna Sig (significancia) representa las diferencias significativas.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Juliana - Mariana	*	-1,58667	3,08
Juliana - Pipe	*	-0,0416667	3,22114
Mariana - Pipe	*	1,545	2,82916

Tabla 22. Riqueza específica (S) de las comunidades de bacterias para las muestras de Pipe la nutria macho del zoológico de Cali (ZC). En una misma columna, letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre los datos de la columna ( $P > 0.05$ ).

Pipe	$\hat{S} \pm DS$
ZC-MF 12 n=3	5,7 <sup>a</sup> ±0,57
ZC-MF 13 n=3	4 <sup>b</sup> ±0
ZC-MF 14 n=3	7 <sup>c</sup> ±0
ZC-MF 15 n=3	8 <sup>d</sup> ±0
ZC-MF 2 n=3	7,3 <sup>c</sup> ±0

Tabla 23. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) con muestras de Pipe la nutria macho del zoológico de Cali (ZC) con un ( $P > 0.05$ ).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	30,2667	4	7,56667	56,75	0,0000
Intra grupos	1,33333	10	0,133333		
Total (Corr.)	31,6	14			

Tabla 24. Prueba de múltiples rangos para S con el Método LSD con 4 muestras de Pipe la nutria macho del zoológico de Cali (ZC), el asterisco en la columna Sig (significancia) representa las diferencias significativas.

Contraste	Sig.	Diferencia +/-	Límites
ZC-MF 12 - ZC-MF 13	*	1,66667	0,664304
ZC-MF 12 - ZC-MF 14	*	-1,33333	0,664304
ZC-MF 12 - ZC-MF 15	*	-2,33333	0,664304
ZC-MF 12 - ZC-MF 2	*	-1,66667	0,664304
ZC-MF 13 - ZC-MF 14	*	-3,0	0,664304
ZC-MF 13 - ZC-MF 15	*	-4,0	0,664304
ZC-MF 13 - ZC-MF 2	*	-3,33333	0,664304
ZC-MF 14 - ZC-MF 15	*	-1,0	0,664304
ZC-MF 14 - ZC-MF 2		-0,333333	0,664304
ZC-MF 15 - ZC-MF 2	*	0,66667	0,664304

Tabla 25. Riqueza específica (S) de las comunidades de bacterias para las muestras de Mariana una nutria hembra del zoológico de Cali (ZC). En una misma columna, letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre los datos de la columna ( $P > 0.05$ ).

Mariana	$\bar{S} \pm DS$
ZC-MF 4 n=3	8 <sup>a</sup> ± 1,1
ZC-MF 5 n=3	8,3 <sup>b</sup> ± 0
ZC-MF 6 n=3	7 <sup>bc</sup> ± 1,1
ZC-MF 7 n=3	5 <sup>c</sup> ± 0
ZC-MF 10 n=3	10,3 <sup>d</sup> ± 0,57

Tabla 26. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) con muestras de Mariana una nutria hembra del zoológico de Cali (ZC) con un ( $P > 0.05$ ).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	45,6	4	11,4	34,20	0,0000
Intra grupos	3,33333	10	0,333333		
Total (Corr.)	48,9333	14			

Tabla 27. Prueba de múltiples rangos para S con el Método LSD con 5 muestras de Mariana una nutria hembra zoológico de Cali (ZC), el asterisco en la columna Sig (significancia) representa las diferencias significativas.

Contraste	Sig.	Diferencia +/-	Límites
Mariana 10 - Mariana 4	*	2,33333	1,05036
Mariana 10 - Mariana 5	*	2,0	1,05036
Mariana 10 - Mariana 6	*	3,33333	1,05036
Mariana 10 - Mariana 7	*	5,33333	1,05036
Mariana 4 - Mariana 5		-0,333333	1,05036
Mariana 4 - Mariana 6		1,0	1,05036
Mariana 4 - Mariana 7	*	3,0	1,05036
Mariana 5 - Mariana 6	*	1,33333	1,05036
Mariana 5 - Mariana 7	*	3,33333	1,05036
Mariana 6 - Mariana 7	*	2,0	1,05036

Tabla 28. Riqueza específica (S) de las comunidades de bacterias para las muestras de Juliana una nutria hembra del zoológico de Cali (ZC). En una misma columna, letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre los datos de la columna ( $P > 0.05$ ).

Juliana	$\bar{S} \pm DS$
ZC-MF 8 n=3	7,7 <sup>a</sup> ±0,57
ZC-MF 9 n=3	4 <sup>b</sup> ±0
ZC-MF 11 n=3	6,7 <sup>c</sup> ±0,57
ZC-MF 1 n=3	11,7 <sup>c</sup> ±1,7
ZC-MF 3 n=3	12,3 <sup>c</sup> ±0,57

Tabla 29. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) con muestras de Juliana una nutria hembra del zoológico de Cali (ZC) con un ( $P > 0.05$ ).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	147,067	4	36,7667	42,42	0,0000
Intra grupos	8,66667	10	0,866667		
Total (Corr.)	155,733	14			

Tabla 30. Prueba de múltiples rangos para S con el Método LSD con 3 muestras de Juliana una nutria hembra del zoológico de Cali (ZC), el asterisco en la columna Sig (significancia) representa las diferencias significativas.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ZC-MF 1 - ZC-MF 11	*	5,0	1,69365
ZC-MF 1 - ZC-MF 3		-0,666667	1,69365
ZC-MF 1 - ZC-MF 8	*	7,66667	1,69365
ZC-MF 1 - ZC-MF 9	*	4,0	1,69365
ZC-MF 11 - ZC-MF 3	*	-5,66667	1,69365
ZC-MF 11 - ZC-MF 8	*	2,66667	1,69365
ZC-MF 11 - ZC-MF 9		-1,0	1,69365
ZC-MF 3 - ZC-MF 8	*	8,33333	1,69365
ZC-MF 3 - ZC-MF 9	*	4,66667	1,69365
ZC-MF 8 - ZC-MF 9	*	-3,66667	1,69365

Tabla 31. Riqueza específica (S) de las comunidades de bacterias para las muestras de Toto una nutria macho del zoológico de Piscilago (ZP). En una misma columna, letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre los datos de la columna ( $P > 0.05$ ).

Toto	$\bar{S} \pm DS$
ZP-MF 1 n=3	14,7 <sup>a</sup> ±2,1
ZP-MF 2 n=3	12 <sup>b</sup> ±1,5
ZP-MF 3 n=3	13,3 <sup>ab</sup> ±0

Tabla 32. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) con muestras de Toto una nutria macho del zoológico de Piscilago (ZP) con un ( $P > 0.05$ ).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	10,6667	2	5,33333	3,43	0,1016
Intra grupos	9,33333	6	1,55556		
Total (Corr.)	20,0	8			

Tabla 33. Prueba de múltiples rangos para S con el Método LSD con 3 muestras de Toto una nutria macho del zoológico de Piscilago (ZP), el asterisco en la columna Sig (significancia) representa las diferencias significativas.

Contraste	Sig.	Diferencia +/-	Límites
Toto 1 - Toto 2 *	2,66667	2,49182	
Toto 1 - Toto 3	1,33333	2,49182	
Toto 2 - Toto 3	-1,33333	2,49182	

## Anexo F

### Concentración de ADN total

Tabla 34. Concentración inicial de las muestras de ADN por triplicado

Muestra	Aislamiento	ng/ul	A260	260/280	Constante	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
RV-MF 1	1	29,24	0,585	1,49	50	260	0,585	0,183
	2	312,38	6,248	1,6	50	260	6,248	2,049
	3	52,99	1,06	1,46	50	260	1,06	0,226
RV-MF 2	1	56,15	1,123	1,31	50	260	1,123	0,305
	2	43,42	0,868	1,28	50	260	0,868	0,363
	3	39,19	0,784	1,38	50	260	0,784	0,238
RV-MF 3	1	99,3	1,986	1,46	50	260	1,986	-0,638
	2	45,83	0,917	1,58	50	260	0,917	0,188
	3	53,58	1,072	1,64	50	260	1,072	0,126
RV-MF 4	1	28,9	0,578	1,58	50	260	0,578	0,126
	2	115,16	2,303	1,42	50	260	2,303	7,52
	3	22,08	0,442	1,54	50	260	0,442	0,11
RV-MF 5	1	89,09	1,782	0,91	50	260	1,782	35,255
	2	33,2	0,664	1,48	50	260	0,664	0,116
	3	57,69	1,154	1,46	50	260	1,154	0,083
RV-MF 6	1	24,38	0,488	1,34	50	260	0,488	0,139
	2	13,85	0,277	1,41	50	260	0,277	0,174
	3	15,69	0,314	1,41	50	260	0,314	3,057
RV-MF 7	1	50,53	1,011	1,41	50	260	1,011	0,136
	2	13,35	0,267	1,47	50	260	0,267	0,188
	3	507,64	10,153	1,9	50	260	10,153	0,668
RV-MF 8	1	34,88	0,698	1,38	50	260	0,698	0,161
	2	9,18	0,184	1,46	50	260	0,184	0,099
	3	25,96	0,519	1,45	50	260	0,519	0,091
RV-MF 9	1	5,53	0,111	1,35	50	260	0,111	0,081
	2	27,1	0,542	1,47	50	260	0,542	0,096
	3	23,09	0,462	1,48	50	260	0,462	0,093
RV-MF 10	1	129,71	2,594	1,45	50	260	2,594	0,113
	2	62,52	1,25	1,42	50	260	1,25	0,093
	3	119,51	2,39	1,42	50	260	2,39	5,088
RV-MF 11	1	19,4	0,388	1,45	50	260	0,388	0,132
	2	49,69	0,994	1,39	50	260	0,994	0,226
	3	11,56	0,231	1,69	50	260	0,231	0,094
RV-MF 12	1	32,11	0,642	1,66	50	260	0,642	-0,192
	2	27,17	0,543	1,39	50	260	0,543	0,134
	3	22,7	0,454	1,47	50	260	0,454	0,118

Muestra	Aislamiento	ng/ul	A260	260/280	Constante	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
RS-MF 1	1	23,91	0,478	1,58	50	260	0,478	0,16
	2	34,67	0,693	1,48	50	260	0,693	0,124
	3	22,48	0,45	1,46	50	260	0,45	0,149
RS-MF 2	1	11,69	0,234	1,44	50	260	0,234	0,098
	2	14,24	0,285	1,42	50	260	0,285	0,122
	3	23,87	0,477	1,4	50	260	0,477	0,115
ZP-MF 1	1	27,69	0,554	1,54	50	260	0,554	0,106
	2	111,09	2,222	1,44	50	260	2,222	2,354
	3	33,08	0,662	1,51	50	260	0,662	0,111
ZP-MF 2	1	30,71	0,614	1,48	50	260	0,614	0,132
	2	20,49	0,41	1,54	50	260	0,41	0,109
	3	28,27	0,565	1,46	50	260	0,565	0,115
ZP-MF 3	1	35,51	0,71	1,53	50	260	0,71	0,526
	2	19,41	0,388	1,5	50	260	0,388	0,183
	3	29,64	0,593	1,45	50	260	0,593	-0,189
ZP-MF 4	1	76,91	1,538	1,34	50	260	1,538	4,544
	2	36,45	0,729	1,46	50	260	0,729	0,112
	3	165,15	3,303	1,41	50	260	3,303	8,636
ZC-MF 1	1	121,7	2,434	1,47	50	260	2,434	0,122
	2	21,54	0,431	1,43	50	260	0,431	0,109
	3	21,84	0,437	1,42	50	260	0,437	0,099
ZC-MF 2	1	26,78	0,536	1,45	50	260	0,536	0,121
	2	6,22	0,124	1,72	50	260	0,124	0,116
	3	0,22	0,004	1,32	50	260	0,004	0,041
ZC-MF 3	1	34,63	0,693	1,46	50	230	0,2	-0,026
	2	44,52	0,89	1,68	50	230	0,318	-0,029
	3	31,4	0,628	1,48	50	230	0,278	0,002
ZC-MF 4	1	22,37	0,447	1,4	50	230	0,037	-0,014
	2	2,75	0,055	1,3	50	230	-0,192	-0,02
	3	26,21	0,524	1,49	50	230	0,277	-0,024
ZC-MF 5	1	23,81	0,476	1,39	50	230	0,106	0,002
	2	4,79	0,096	1,24	50	230	-0,131	-0,11
	3	23,3	0,466	1,45	50	230	0,428	-0,021
ZC-MF 6	1	6,92	0,138	1,33	50	230	-0,119	-0,028
	2	8,2	0,164	1,41	50	230	-0,052	-0,033
	3	10,69	0,214	1,5	50	230	0,076	0,388
ZC-MF 7	1	6,82	0,136	1,47	50	230	-0,153	-0,025
	2	13,4	0,268	1,89	50	230	-0,025	0,007
	3	13,8	0,276	1,53	50	230	0,082	0,028

Muestra	Aislamiento	ng/ul	A260	260/280	Constante	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
ZC-MF 8	1	11,39	0,228	1,34	50	230	-0,021	-0,002
	2	33	0,66	1,41	50	230	0,413	-0,019
	3	30,77	0,615	1,45	50	230	0,524	-0,02
ZC-MF 9	1	10,43	0,209	1,32	50	230	0,032	-0,032
	2	44,23	0,885	1,48	50	230	0,881	-0,019
	3	11,07	0,221	1,45	50	230	-0,03	-0,006
ZC-MF 10	1	35,34	0,707	1,36	50	230	0,33	0,005
	2	58,7	1,174	1,43	50	230	0,994	0,01
	3	12,51	0,25	1,38	50	230	0,051	-0,025
ZC-MF 11	1	22,71	0,454	1,56	50	230	0,103	-0,047
	2	18,26	0,365	1,46	50	230	0,111	-0,02
	3	16,68	0,334	1,39	50	230	0,164	-0,068
ZC-MF 12	1	22,9	0,458	1,59	50	230	0,044	10,614
	2	51,63	1,033	1,51	50	230	1,291	-0,024
	3	23,8	0,476	1,52	50	230	0,492	-0,019
ZC-MF 13	1	46,7	0,934	1,46	50	230	0,39	-0,019
	2	48,72	0,974	1,46	50	230	0,773	-0,043
	3	74,92	1,498	1,42	50	230	1,766	2,522
ZC-MF 14	1	1,96	0,039	1,29	50	230	-0,214	-0,02
	2	6,95	0,139	1,24	50	230	0,182	0,023
	3	18,79	0,376	1,7	50	230	0,342	-0,678
ZC-MF 15	1	1,96	0,039	1,29	50	230	-0,214	-0,02
	2	18,26	0,365	1,46	50	230	0,111	-0,02
	3	10,69	0,214	1,5	50	230	0,076	0,388