



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Caracterización del microbioma bacteriano intestinal
del críticamente amenazado Cocodrilo del Orinoco
(*Crocodylus intermedius*) presente en la mayor
población *ex situ* en la Estación de Biología Tropical
Roberto Franco (EBTRF) en Villavicencio, Colombia**

María Camila Polanco Rodríguez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia

2023

**Caracterización del microbioma bacteriano intestinal
del críticamente amenazado Cocodrilo del Orinoco
(*Crocodylus intermedius*) presente en la mayor
población *ex situ* en la Estación de Biología Tropical
Roberto Franco (EBTRF) en Villavicencio, Colombia**

María Camila Polanco Rodríguez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Microbiología

Director:

Mario Vargas Ramírez. M.Sc., Ph.D.

Coordinador

Grupo Biodiversidad y Conservación Genética

Instituto de Genética

Director

Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF)

Universidad Nacional de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología

Bogotá, Colombia

2023

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



María Camila Polanco Rodríguez

Fecha

28/07/2023

Agradecimientos

Al profesor Mario Vargas por aventurarse a desarrollar este proyecto, siempre con paciencia, disposición y apoyo incondicional.

Al profesor Diego Gómez, quien gracias a su trabajo, conocimiento, disposición y asesoría permanente hizo que este proyecto fuera posible.

A todos los funcionarios de la Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF) de la Universidad Nacional de Colombia, por enseñarme sobre la conservación del Cocodrilo del Orinoco y por asistir la colecta de las muestras utilizadas en este estudio, siempre con amabilidad y deseo de enseñar.

Al profesor Alejandro Caro y a todos los miembros del Semillero de investigación de Diversidad, Adaptación y Resiliencia Microbiana DARMA de la Universidad Nacional de Colombia, por mostrarme este maravilloso mundo y generar un enriquecedor espacio de discusión.

Al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia por permitirme el uso sus laboratorios.

A la Universidad Nacional de Colombia y al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia de investigación, quienes permitieron el desarrollo de esta investigación.

A mi madre y a Mario Alejandro, quienes fueron mi apoyo constante y me acompañaron de manera incondicional durante este camino.

Resumen

Caracterización del microbioma bacteriano intestinal del críticamente amenazado Cocodrilo del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) presente en la mayor población ex situ en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF) en Villavicencio, Colombia

El Cocodrilo del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) es un reptil endémico de zonas bajas de la cuenca del río Orinoco. Actualmente la especie enfrenta serias amenazas para su supervivencia, por lo cual es necesario un plan de conservación integral que incluya programas modernos como el mantenimiento de un microbioma saludable, lo cual puede mejorar su mantenimiento, reproducción y liberación. Este estudio tuvo como objetivo caracterizar la microbiota bacteriana de las heces de *C. intermedius*, mantenidos en la mayor población *ex-situ* colombiana (EBTRF, Villavicencio, Meta) y comparar las poblaciones bacterianas entre cocodrilos juveniles y adultos. Se realizó la secuenciación del gen rRNA 16S de 24 muestras de materia fecal (Juveniles n=15; Adultos n=9), utilizando el equipo Illumina MiSeq (2x250 bp). Los resultados indican que la microbiota fecal de está predominada por Firmicutes, seguido por Bacteroidetes y Proteobacterias. Los índices de medición de Alfa diversidad y la estructura bacteriana no tuvieron una diferencia significativa entre los Juveniles y Adultos, sin embargo, el *membership* de las poblaciones bacterianas difirió significativamente entre los grupos. La composición de la microbiota fecal de ambos estuvo fuertemente predominada por Firmicutes y Bacteroidetes, distribución que se ha relacionado con enfermedades como la obesidad y desórdenes endocrinos. A pesar de que investigaciones previas han reportado bacterias patógenas en la microbiota fecal, los reptiles poseen un fuerte sistema inmunológico que podría conferir una mayor resistencia a infecciones, cáncer y senescencia. Esta investigación presenta una herramienta para la conservación del Cocodrilo del Orinoco y amplía el conocimiento de la microbiota en reptiles.

Palabras clave: Microbiota, Cocodrilos, Heces, *Crocodylus intermedius*, reptiles

Abstract

Characterization of the gut bacterial microbiome of the critically endangered Orinoco Crocodile (*Crocodylus intermedius*), present in the largest ex situ population at the Roberto Franco Tropical Biology Station (EBTRF) in Villavicencio, Colombia

The Orinoco Crocodile (*Crocodylus intermedius*) is an endemic reptile found in lowland areas of the Orinoco River basin. Currently, the species faces serious threats to its survival, demanding an all-encompassing conservation program that includes modern programs such as maintaining a healthy microbiome, which can improve its maintenance, reproduction, and release. This study aimed to characterize the bacterial microbiota of feces from *C. intermedius* kept in the largest *ex-situ* Colombian population (EBTRF, Villavicencio, Meta) and compare the bacterial populations between juvenile and adult crocodiles. The 16S rRNA gene sequencing was performed on 24 fecal samples (Juveniles n=15; Adults n=9), using the Illumina MiSeq platform (2x250 bp). The results indicate that the fecal microbiota is predominantly composed of Firmicutes, followed by Bacteroidetes and Proteobacteria in both groups. Alpha diversity and bacterial structure measurements did not show significant differences between juveniles and adults; however, the membership of bacterial populations differed significantly between the groups. The majority presence of Firmicutes and Bacteroidetes have been associated with diseases such as obesity and endocrine disorders in reptiles. Despite previous reports of pathogenic bacteria in the fecal microbiota, reptiles possess a robust immune system that may confer greater resistance to infections, cancer, and senescence. This research provides a tool for the conservation of the Orinoco Crocodile and expands our understanding of reptilian fecal microbiota.

Key words: Microbiota, Crocodile, Feces, Gut, *Crocodylus intermedius*, reptiles

Contenido

	Pág.
1. Marco teórico.....	3
1.1 El Cocodrilo del Orinoco.....	3
1.1.1 El sistema digestivo de los cocodrilos.....	7
1.2 El Microbioma	9
1.3 La complejidad del microbioma intestinal	10
1.4 La composición del microbioma intestinal en reptiles	11
1.4.1 Reptiles herbívoros.....	12
1.4.2 Reptiles omnívoros	13
1.4.3 Reptiles carnívoros	15
2. Pregunta de Investigación.....	19
3. Justificación	21
4. Objetivos.....	23
4.1 Objetivo general	23
4.2 Objetivos específicos	23
5. Metodología.....	24
5.1 Elección de los individuos y toma de las muestras.....	24
5.2 Procesamiento de las muestras	25
5.3 Análisis bioinformático y estadístico	27
6. Resultados.....	30
6.1 Análisis de las secuencias de la microbiota fecal	30
6.2 Mediciones de Alfa diversidad	31
6.3 Mediciones de Beta diversidad.....	33
6.3.1 Abundancia relativa y análisis LefSe.....	33
6.3.2 Phylum	33
6.3.3 Familia.....	34
6.3.4 Género	35
6.3.5 Metacomunidades	37
6.3.6 Análisis PCoA.....	37

7. Discusión.....	39
7.1 Diferencias en la Alfa diversidad	39
7.2 Diferencias en la Beta diversidad.....	41
7.3 Impacto de la microbiota bacteriana en la conservación del Cocodrilo del Orinoco.....	44
8. Conclusiones y recomendaciones	47
8.1 Conclusiones	47
8.2 Recomendaciones	48
9. Anexos.....	49
9.1 Tabla Suplementaria 1	49
10. Bibliografía	53

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Cocodrilo del Orinoco (<i>Crocodylus intermedius</i>) hembra en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco.	3
Figura 2. Rango geográfico y estado de conservación de <i>Crocodylus intermedius</i> en Colombia y Venezuela	4
Figura 3. Sistema digestivo del <i>Caiman crocodilus</i> , vista ventral.	8
Figura 4. Composición taxonómica de la microbiota del intestino y las heces de <i>Caretta caretta</i> a diferentes niveles taxonómicos.	14
Figura 5. Bacterias presentes en el intestino de la Pitón Birmana (<i>Python bivittatus</i>) (puntos azules) y el roedor (puntos rojos) dado como alimento (rata entera).....	16
Figura 6. Representación de las comunidades bacterianas gastrointestinales a nivel de filo, de individuos de <i>Alligator mississippiensis</i>	18
Figura 7. Recinto de <i>C. Intermedius</i> adultos en Estación de Biología Tropical Roberto Franco de la Universidad Nacional de Colombia, Villavicencio (Meta).....	24
Figuras 8 y 9. Materia fecal de <i>C. intermedius</i> adulto recolectada de manera directa en el sustrato.	30
Figura 10. Índice de Chao-1 (riqueza) de las muestras estudiadas de individuos juveniles y adultos de <i>Crocodylus intermedius</i>	32
Figura 11. Índice de Shannon (<i>evenness</i>) de las muestras estudiadas de individuos juveniles y adultos de <i>Crocodylus intermedius</i>	32

Figura 12. Índice de inverso de Simpson's (diversidad) de las muestras estudiadas de individuos juveniles y adultos de <i>Crocodylus intermedius</i>	32
Figura 13. Abundancia relativa (promedio) de bacterias a nivel Phylum, encontradas en las muestras fecales estudiadas de individuos juveniles y adultos de <i>Crocodylus intermedius</i>	34
Figura 14. Abundancia relativa (promedio) de bacterias a nivel familia, encontradas en las muestras fecales estudiadas de individuos juveniles y adultos de <i>Crocodylus intermedius</i>	35
Figura 15. Abundancia relativa (promedio) de bacterias a nivel género, encontradas en las muestras fecales estudiadas de individuos juveniles y adultos de <i>Crocodylus intermedius</i>	36
Figura 16. Análisis de PCoA de la estructura bacteriana de la microbiota fecal presente en muestras de <i>Crocodylus intermedius</i> jóvenes y adultos.....	38
Figura 17. Análisis de PCoA de la distribución de las poblaciones bacterianas de la microbiota fecal presente en muestras de <i>Crocodylus intermedius</i> jóvenes y adultos.....	38

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la caracterización de la microbiota bacteriana de la tortuga marina Cagüama (<i>Caretta caretta</i>), de los OTUs más abundantes.....	14
Tabla 2. Características de los individuos mantenidos en cautiverio en a la Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF) de la Universidad Nacional de Colombia.....	25
Tabla 3. Índices de alfa diversidad de la microbiota fecal de <i>Crocodylus intermedius</i> juveniles y adultos.....	31

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos

Unidad	Definición
bp	Pares de bases
cm ³	Centímetro cúbico
cm	Centímetro
g	Gramos
kg	Kilogramo
Km	Kilómetros
mM	Masa Molar del soluto
seg	Segundos
v	Versión
μl	Microlitro
°C	Grados Celsius
%	Porcentaje
<	Menor que
>	Mayor que

Abreviaturas

Abreviatura	Término
-------------	---------

CITES	Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre
-------	--

Abreviatura Término

EBTRF	Estación de Biología Tropical Roberto Franco
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAS	Salmonelosis Asociada a Reptiles
RDP	Ribosomal database project
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
S	Unidad de Svedberg
TGI	Tracto Gastrointestinal
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

Introducción

Se han observado relaciones imprescindibles entre los organismos pluricelulares (hospederos) y los microorganismos que viven en ellos (huéspedes), las cuales pueden ser beneficiosas, neutrales o patógenas para el hospedero (Keenan & Elsey, 2015; West et al., 2020). Los primeros ofrecen nichos a un sinnúmero de microorganismos para que sus poblaciones puedan mantenerse, crecer y reproducirse; y los microorganismos a su vez proveen metabolitos necesarios para el hospedero, actúan como “barrera de protección” contra patógenos, degradan moléculas complejas en sus versiones más simples/asimilables o simplemente interactúan entre ellos. A esta población microbiana, incluyendo a todos sus metabolitos y a sus respectivos genomas, se le denomina “microbioma” (Shade & Handelsman, 2012; West et al., 2020; Zilber-Rosenberg & Rosenberg et al., 2008).

Este descubrimiento permitió reconocer la resonancia que las poblaciones microscópicas pueden tener en la salud, el desarrollo y la evolución de un organismo multicelular, ya sea planta o animal (Keenan & Elsey, 2015; Zilber-Rosenberg & Rosenberg et al., 2008). Cuando la relativa estabilidad de estas poblaciones microbianas se altera debido al ingreso de microorganismos patógenos o al cambio en las comunidades mutualistas (disbiosis), se presenta un efecto indeseado en la salud del hospedero (Keenan & Elsey, 2015).

De todos los posibles hospedadores el más estudiado es el ser humano. Gracias a los métodos moleculares independientes de cultivo, fundamentalmente aquellos basados en la identificación del gen 16S rRNA, se descubrió que el microbioma humano consiste entre 10 y 100 trillones de microorganismos simbióticos por cada persona, principalmente en el intestino (Albersten et al., 2013; Ursell et al., 2012). Estas investigaciones que ha sentado las bases para la exploración en otras especies como huéspedes, concluyendo que todos los animales potencialmente ofrecen nichos para el crecimiento de microorganismos (West et al., 2018; Zilber-Rosenberg & Rosenberg et al., 2008).

Se ha observado además que los cambios en este nicho pueden intervenir en la función óptima del hospedero e incluso la plasticidad de respuesta necesaria ante las condiciones cambiantes del entorno (West et al., 2018).

Entre estos trabajos, el grupo menos estudiado ha sido el de los reptiles (Keenan et al., 2013; Kohl et al., 2017; Pawlak et al., 2020; Schmidt et al., 2014), a pesar de ser reservorios y vectores de bacterias zoonóticas, ser portadores de bacterias de importancia médica como *Clostridium difficile* (Willson et al., 2021) y generar en los humanos enfermedades como la Salmonelosis Asociada a Reptiles (RAS), siendo estos animales una fuente de contacto con el humano en vida libre, cautiverio, e inclusive de manera indirecta por medio de ambientes contaminados (Carvajal-Restrepo et al., 2016; Pawlak et al., 2020; Schmidt et al., 2014).

Caracterizar la microbiota gastrointestinal de reptiles altamente amenazados y a los cuales se les ha estudiado poco, como el Cocodrilo del Orinoco (*Crocodylus intermedius*), cobra cada vez mayor relevancia ante la posibilidad de aportar como estrategia de conservación (West et al., 2018), mejorar su manejo clínico (Keenan & Elsey, 2015; West et al., 2018), explorar la relación microbioma-hospedador en la evolución (Zilber-Rosenberg & Rosenberg et al., 2008), prevenir enfermedades zoonóticas de interés epidemiológico (Pawlak et al., 2020) y obtener información valiosa de una especie endémica de la región.

Este estudio tuvo como objetivo caracterizar la microbiota bacteriana presente en las heces de individuos de Cocodrilo del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) mantenidos en la mayor población *ex-situ* colombiana (ubicada en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco, EBTRF) y comparar las poblaciones bacterianas entre cocodrilos juveniles y adultos clasificados según su tamaño.

1. Marco teórico

1.1 El Cocodrilo del Orinoco

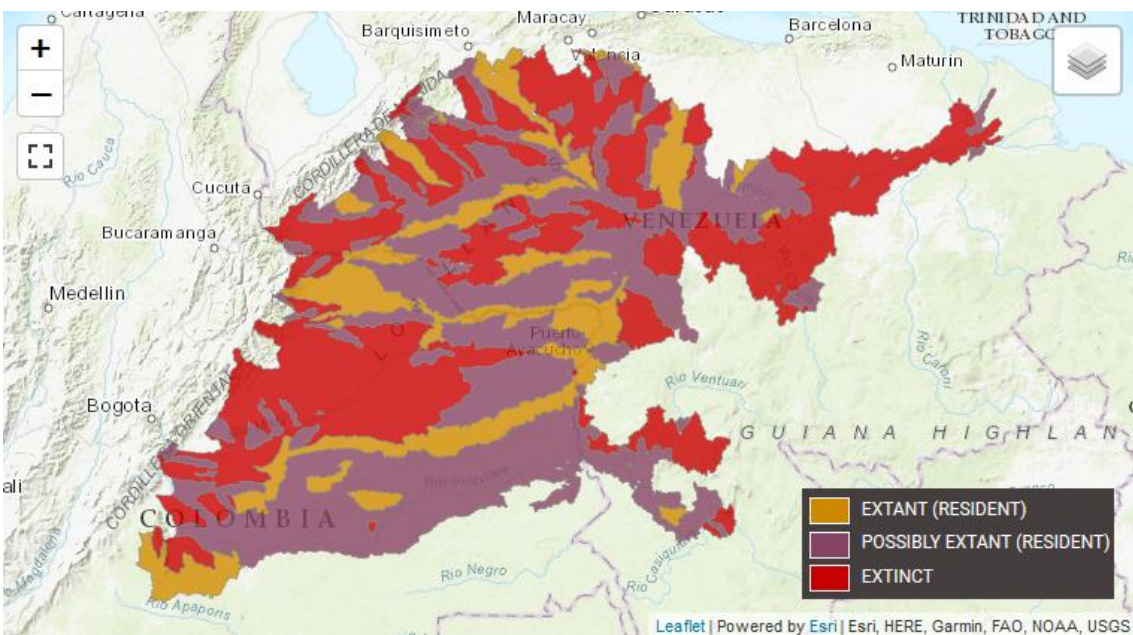
El Cocodrilo del Orinoco (*Crocodylus intermedius*, Orden Crocodylia, Familia Crocodylidae), también conocido como Caimán del Orinoco, Caimán Llanero o Caimán Mariposo, es una de las especies más grandes de cocodrilos en el mundo (Figura 1).

Figura 1. Cocodrilo del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) hembra adulta en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF) en Villavicencio, Meta, Colombia. Fotografía: Mario Vargas Ramírez (2021).



El Cocodrilo del Orinoco es un reptil acuático de gran tamaño (aproximadamente 3 metros), con un máximo reportado en machos de 6,8 m (Morales-Betancourt et al., 2015), caracterizado por su hocico alargado y delgado, su cuarto diente mandibular descubierto y su coloración grisácea en juveniles y amarillento o gris oscuro en adultos (Morales-Betancourt et al., 2013). Es endémico de las zonas bajas de la cuenca del río Orinoco, presente en Colombia y Venezuela, encontrándose entre los 0 y los 350 m.s.n.m., con registros históricos de la especie en regiones como ríos tropicales, bosques subtropicales y el piedemonte de la cordillera de los Andes (Figura 2) (Balaguera-Reina et al., 2018).

Figura 2. Rango geográfico y estado de conservación de *Cocodylus intermedius* en Colombia y Venezuela. Regiones naranja: presente; morada: posiblemente presente; roja: extinto. Tomado de Balaguera-Reina et al., (2018).



En Colombia se encuentra en la cuenca del Orinoco y en las subcuencas de Arauca, Ariari, Ariporo, Bitá, Casanare, Cinaruco, Cravo Norte, Cravo Sur; Cuiloto, Cunimía, Cusiana, Duda, Ele, Elvita, Guachiría, Guarrojo, Guaviare, Guayabero, Güejar, Inírida, Lipa, Lozada, Manacacías, Meta, Muco, Orinoco (cauce principal), Planas, Pauto, Tomo, Tuparro, Uva, y Vichada (Humboldt, 2013).

El Cocodrilo del Orinoco es una especie carnívora, que ocasionalmente pueden llegar a consumir carroña (Morales-Betancourt et al., 2015). Obtienen sus presas mediante la estrategia de espera o cacería al acecho, especialmente dentro del agua, consumiendo una amplia variedad de vertebrados como aves, tortugas, mamíferos y peces (Humboldt, 2013). Posee una expectativa media de vida aproximada de 25 años, se considera una especie de baja movilidad puesto que no tiende a recorrer largas distancias y presenta dimorfismo sexual (los machos alcanzan un tamaño mayor al de las hembras en la edad adulta) (Morales-Betancourt et al., 2015).

Al igual que otros reptiles, la madurez sexual es determinada por el tamaño (longitud del hocico a la cola) y el índice de condición corporal, más no por la edad. Esta característica está sujeta en gran medida a la disponibilidad de alimento en su ambiente, alcanzando la madurez de manera más temprana en cautiverio que en vida silvestre (Bjorndal et al., 2013; Morales-Betancourt et al., 2015). Las hembras de *C. intermedius* alcanzan la madurez sexual a los 2-2,5 m y ponen entre 32 y 44 huevos en nidos construidos en las playas y los bancos de arena a la orilla del río de aproximadamente 60 cm de profundidad, presentando la ovoposición en los inicios de la temporada seca (enero-febrero). El periodo de incubación dura aproximadamente tres meses, por lo cual los neonatos normalmente nacen al inicio de la temporada de lluvias (Balaguera-Reina et al., 2018; Morales-Batencourt et al., 2015).

Actualmente la especie se cataloga como en peligro crítico (*Critically Endangered*; CR) por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza IUCN (por sus siglas en inglés para *International Union for Conservation of Nature*) y por el Libro Rojo de Reptiles en Colombia, y se encuentra en el apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre CITES (por sus siglas en inglés para *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*), el cual incluye especies en peligro de extinción con comercio de individuos solamente en circunstancias excepcionales (Balaguera-Reina et al., 2018; Morales-Betancourt et al., 2015). Esta clasificación se debe al escaso número de individuos capaces de reproducirse y a la tendencia de la población a desaparecer. La sobreexplotación y caza furtiva por el comercio de su piel desde 1920 hasta 1960 llevó a la especie cerca de la extinción, se estima que entre 1920 y 1950 se exportaron un mínimo de 254.000 pieles de animales adultos (Balaguera-Reina et al., 2018), aunque esta cifra muy probablemente está subestimada.

Para la década de 1980, el censo de la población de *C. intermedius* adultos en Colombia fue de solo 280: 180 individuos en el departamento de Arauca, 49 individuos en Casanare, 14 individuos en Meta y 37 individuos en Vichada; estimando aproximadamente 780 individuos en la zona colombiana de la Orinoquía (Balaguera-Reina et al., 2018; Humboldt, 2013). Actualmente no se ha encontrado evidencia de una tendencia al aumento de la población, por lo cual se estima que su situación es peor en comparación al siglo pasado (Morales-Betancourt et al., 2015).

En la actualidad la especie presenta amenazas como como la fragmentación y destrucción de su hábitat, uso de implementos de pesca inadecuados donde quedan atrapados y la caza por temor y por consumo de su carne y huevos. Estas amenazas ocasionan una disminución de la disponibilidad del uso del recurso biológico por parte de la especie y aún siguen afectando las pocas poblaciones existentes y a los individuos relictuales a lo largo de su rango de distribución (Balaguera-Reina et al., 2018; Morales-Betancourt et al., 2015).

La Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF) de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, cuenta con aproximadamente 600 individuos de la especie los cuales hacen parte de un programa de conservación iniciado en la década de los años setenta por parte del profesor Federico Medem y cuyo objetivo general ha sido recuperar las poblaciones de la especie en el medio. Estos individuos conforman la mayor población *ex-situ* para la especie en el mundo y el único reservorio de potencial evolutivo de la especie en Colombia (Saldarriaga-Gómez et. al., 2023). Desde el inicio de este proyecto de conservación, las acciones de conservación y manejo de la especie han estado basados en investigaciones científicas en diferentes áreas del conocimiento como ecología, fisiología, genética de poblaciones, educación ambiental, entre otras. Con esta investigación se abre una nueva área de conocimiento enfocada en la caracterización de microbiomas asociados con la especie, la cual brindara herramientas para desarrollar acciones de conservación y manejo más objetivas y eficaces.

Los cocodrilos de la EBTRF son mantenidos es recintos adecuados para su manejo, separados por grupos etarios sin distinción de sexo y alimentados con una mezcla de pescado de origen comercial y vísceras.

1.1.1 El sistema digestivo de los cocodrilos

Al igual que en los demás reptiles, los cocodrilos no poseen diafragma, por lo cual los órganos que normalmente se encuentran en las cavidades torácica y abdominal en mamíferos en ellos están contenidos en la cavidad celómica (Vitt & Caldwell, 2013).

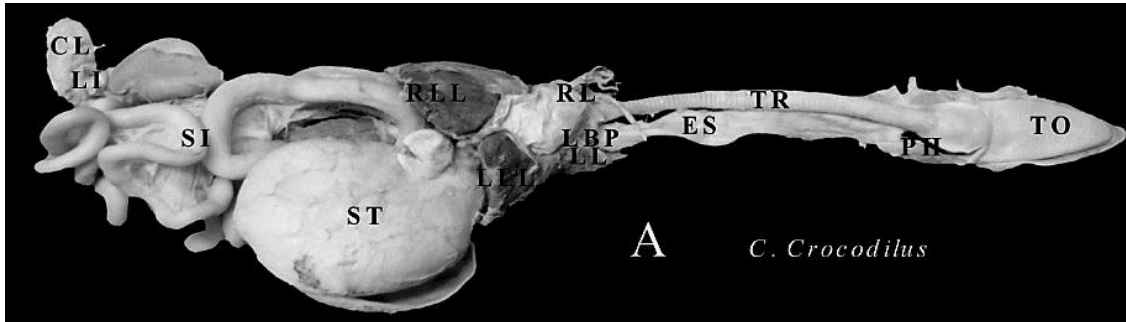
La boca abre directamente a la cavidad bucal y no tienen labios. La lengua es triangular, plana y no posee un movimiento en particular, por lo cual no tiene función en la ingestión de alimento. Los cocodrilos poseen un segundo paladar que crea un pasaje respiratorio separado desde la cavidad nasal hasta la faringe, lo que les permite respirar mientras tienen comida en la boca. El esófago es recto, tubular y muscular, terminando a nivel craneal del estómago sobre la línea alba (Romão et al., 2011; Vitt & Caldwell, 2013).

El estómago es un tubo distensible y muscular el cual posee cuatro regiones distintas: el cardíaco, a nivel craneal; el *fundus*, a la izquierda de la región cardíaca donde forma una curvatura; el *corpus*, región con el mayor diámetro y longitud; y la cámara pilórica, porción caudal del estómago que posee el esfínter pilórico (una válvula pilórica muscular que controla el paso del bolo alimenticio del estómago hacia el intestino delgado) (Romão et al., 2011; Vitt & Caldwell, 2013).

El intestino delgado es un tubo largo que se extiende por los segmentos medial y caudal de la cavidad celómica, terminando en el intestino grueso. Este órgano está dividido en tres porciones, el duodeno, yeyuno e íleon, los cuales no tienen diferenciación macroscópica. La pared del intestino delgado es considerablemente más delgada en el duodeno y presenta abundantes vellosidades en su lumen, lo cual puede indicar una mayor capacidad de absorción. Las vellosidades disminuyen progresivamente hasta la región caudal del íleon. El intestino grueso posee un diámetro tres veces mayor al del intestino delgado y está separado de este por un esfínter (Romão et al., 2011).

El tracto gastrointestinal desemboca en la cloaca a través del esfínter anal. La cloaca es una estructura anatómica que integra los sistemas digestivo (*coprodaeum*), urinario y reproductor (*urodaeum*) (Romão et al., 2011; Vitt & Caldwell, 2013).

Figura 3. Sistema digestivo del *Caiman crocodilus*, vista ventral. TO, lengua; PH, faringe; TR, tráquea; ES, esófago; RL, pulmón derecho; LL, pulmón izquierdo; LPB, bronquio primario izquierdo; RLL, lóbulo hepático derecho; LLL, lóbulo hepático izquierdo; ST, estómago; SI, intestino delgado; LI, intestino grueso; CL, cloaca. Tomado y modificado de Romão et al., (2011).



El hígado es bilobulado, de forma cónica y está localizado a nivel craneal en la cavidad celómica. La región medial-dorsal y caudal del lóbulo derecho contiene el hilio hepático y la vesícula biliar, la cual es piriforme, recibe el ducto hepático y envía un ducto al páncreas. El páncreas es glandular y pequeño, se encuentra entre el intestino delgado y secreta sus fluidos al intestino delgado por medio del ducto pancreático (Romão et al., 2011; Vitt & Caldwell, 2013).

Los reptiles carnívoros tienen tractos digestivos cortos y simples, adaptados principalmente para la digestión hidrolítica en el intestino delgado. Sus fuentes de energía son la proteína (4 kcal/g) y la grasa (9 kcal/g). Los reptiles carnívoros sanos consumen altas cantidades de proteína y grasa: su energía metabolizable proviene aproximadamente del 25% al 60% de la proteína y del 30% al 60% de la grasa. La ingesta de carbohidratos es mínima y se limita a lo que se encuentra en el contenido digestivo de sus presas. La ingesta de fibra es insignificante en los reptiles carnívoros como los cocodrilos (Donoghue, 1999).

Metabólicamente, los reptiles carnívoros están adaptados a dietas bajas en carbohidratos y altas en grasas y proteínas. Es probable que la tasa de gluconeogénesis se mantenga relativamente alta en estas especies (Donoghue, 1999). La absorción de aminoácidos (en comparación con la glucosa) es extremadamente alta en reptiles estrictamente carnívoros, como los cocodrilos (Donoghue, 1999).

1.2 El Microbioma

Bajo el enfoque tradicional de la bacteriología, los microorganismos se han visto como patógenos, comensales o simbioses, sin embargo los nuevos hallazgos indican que es necesario ampliar el conocimiento de las relaciones con su hospedador (Hansen et al., 2014). Comunidades diversas e intrincadas de microorganismos conviven con todas las especies de vertebrados, debido a que estos ofrecen múltiples nichos para su crecimiento (Scheelings et al., 2020).

Recientes investigaciones han demostrado que la presencia del microbioma es crítico para la evolución y el mantenimiento de la homeostasis de un vertebrado, la cual puede generar efectos directos, como los observados en el tracto gastrointestinal (TGI) por sus comunidades microscópicas, o sistémicos, como los metabolitos producidos por las bacterias que son absorbidos y tienen efectos en órganos distantes (Abdelrhman et al., 2017; Scheelings et al., 2020). A esta diversidad de microorganismos y sus genes se les denomina microbioma, y desde el descubrimiento de las relaciones complejas entre hospedador y microbiota, estos se consideran un metaorganismo (Abdelrhman et al., 2017; West et al., 2018).

El conocimiento del microbioma en animales no humanos se ha venido expandiendo en los últimos años, pero el entendimiento de la complejidad de la relación hospedador-microbiota, incluyendo sus posibles implicaciones para la conservación de animales silvestres aún es limitado (Abdelrhman et al., 2017; Scheelings et al., 2020; West et al., 2018).

El estudio de la microbiota gastrointestinal ha cobrado gran relevancia recientemente debido al descubrimiento de nuevos efectos sistémicos de la relación hospedador-huésped, como los observados en seres humanos (Abdelrhman et al., 2017; Shafquat et al., 2014; West et al., 2018). Los microorganismos juegan un rol vital en la salud de los animales, tal y como se ha comprobado en los sistemas neurológico e inmune, la nutrición intestinal y la defensa ante patógenos (West et al., 2018).

Cuando se encuentran en el intestino, las bacterias se alimentan de los nutrientes que consume el hospedador, lo cual les permite propagarse, mientras que el organismo huésped se beneficia de los productos microbianos que no tendría disponibles de otra

manera (Hansen et al., 2014). Si el hospedador se encuentra saludable, los microorganismos intestinales incrementan su potencial metabólico generando energía y nutrientes de partículas complejas, como aquellas de origen vegetal (Abdelrhman et al., 2017), pero esto puede cambiar debido a factores externos como la dieta y la medicación, generando lo que se conoce como disbiosis, frecuentemente asociada con enfermedad (Keenan & Elsey, 2015; West et al., 2018).

A pesar de que el concepto de microbioma no se incluye actualmente dentro de las estrategias de conservación de animales silvestres, su conocimiento y manejo puede promover la buena salud de los hospedadores y por en tanto, una mayor probabilidad de sobrevivida en libertad (Abdelrhman et al., 2016; Shade & Handelsman, 2012; West et al., 2018). Incluso en muchos casos, el costo de manejar el microbioma es relativamente pequeño en comparación con el tratamiento que puede derivarse del desequilibrio de este (West et al., 2018).

1.3 La complejidad del microbioma intestinal

La asociación de los microorganismos y el hospedador puede tomar muchas formas. Algunas pueden ser transitorias, mientras otras pueden llevar a interrelaciones duraderas como la que se observa en el rumen bovino (Henderson et al., 2015). Dentro de estos dos extremos se encuentra el espectro de interacciones, incluyendo las patógenas (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008).

El estudio de estas interacciones puede ser complejo debido a que la mayoría de los microorganismos asociados no son cultivables (debido a diferentes necesidades de sustrato y condiciones ambientales), y que en involucran relaciones de más de un microorganismo a la vez con su hospedador (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). Para manipular eficazmente la microbiota es necesario conocer el perfil de la comunidad microbiana sana del hospedador.

Las comunidades microbianas varían entre individuos en respuesta a factores internos y externos como la genética, la edad, la dieta, el clima y las interacciones sociales como el parto, amamantamiento en mamíferos o el contacto con otras especies (Costa & Weese,

2018; Coyte et al., 2021; Jiménez & Sommer, 2017; West et al., 2018). A pesar de estas variaciones, existe un “*microbioma core*” presente en aproximadamente 90% de los individuos de una especie (Arumugam et al., 2011; Lee et al., 2023). Por lo tanto, a pesar de que las comunidades microbianas puedan variar entre los meta-organismo, los microhábitats o los nichos ambientales, la función que ejercen las poblaciones (en especial las bacterianas) tiende a mantenerse estable (Arumugam et al., 2011; Ainsworth et al., 2015; West., 2018). Esta “redundancia funcional” describe la capacidad de diferentes especies microbianas de llevar a cabo funciones metabólicas similares, lo que permite que la relación hospedador-huésped tenga tan pocas alteraciones como sean posibles (Ainsworth et al., 2015; Arumugam et al., 2011; Lee et al., 2023).

La identificación del *microbioma core* permite la diferenciación de sus vías y sus funciones metabólicas generadas por la relación huésped-hospedador (Ainsworth et al., 2015). Es por lo anterior que identificar el *core* es el primer paso para definir una comunidad “saludable y balanceada” y por lo tanto predecir su respuesta ante perturbaciones (Shade & Handelsman, 2012).

1.4 La composición del microbioma intestinal en reptiles

La mayoría de los estudios en microbiomas se han centrado en mamíferos (humanos, ratones, vacas, caballos y perros) (Choi et al., 2022; Henderson et al., 2015; Lee et al., 2023; Li et al., 2022; Mshelia et al., 2018). En ellos se ha encontrado que el microbioma gastrointestinal promueve la digestión, facilita la toma de nutrientes por parte del hospedador y previene el establecimiento de microorganismos patógenos (Keenan & Elsey, 2015). Se han estudiado además (aunque en menor medida) aves (gallinas, avestruces y pavos) y peces (Pez Zebra, *Danio rerio*), solo recientemente se han conducido los primeros estudios en reptiles como en la Pitón Birmana (*Python bivittatus*), la Iguana Marina (*Amblyrhynchus cristatus*), la Tortuga Verde (*Caretta caretta*) o el Caimán Americano (*Alligator mississippiensis*) (Abderlrhman et al., 2016; Costello et al., 2010; Hong et al., 2011; Keenan, 2013).

Sin embargo, debido a diferencias anatómicas y fisiológicas, resultaría riesgoso extrapolar esta información hacia otros grupos como los reptiles, los cuales han sido menos explorados, en especial aquellos que poseen una dieta estrictamente carnívora como los cocodrilos.

1.4.1 Reptiles herbívoros

Las comunidades microbianas que habitan los intestinos de los reptiles herbívoros se caracterizan por degradar eficientemente polisacáridos consumidos por el huésped en la dieta, generando así una relación simbiótica huésped-hospedador con los productos del metabolismo (Hong et al., 2011). Para conocer la composición del microbioma de reptiles herbívoros, Hong et al. (2011) evaluaron muestras fecales de iguanas marinas de los Galápagos consumidoras de algas (*Amblyrhynchus cristatus*), y de iguanas terrestres (del género *Conolophus*), consumidoras de vegetación terrestre. Encontraron que las comunidades estaban compuestas por Firmicutes (69.5±7.9%) y Bacteroidetes (6.2±2.8%), así como por bacterias no clasificadas (20.6±8.6%) (Hong et al., 2011).

Otros investigadores como MacDermid et al. (2020) estudiaron la microbiota gastrointestinal de Tortugas Verdes Hawaianas (*Chelonia mydas*), las cuales al ser adultas tienen una dieta herbívora. En este estudio se tomaron biopsias postmortem, debido a que los animales tuvieron que ser eutanasiados por otras causas. Este estudio encontró que los nichos de este sistema estaban predominantemente poblados por poblaciones bacterianas de los Phylum Proteobacteria, Bacteroidetes (Orden Bacteroidales; Familias Porphyromonadaceae y Bacteroidaceae), y Firmicutes (Orden Clostridiales; Familias Clostridiaceae, Ruminococcaceae y Lachnospiraceae), siendo más abundante en este último. Estos resultados fueron consistentes con los encontrados en otros herbívoros marinos, como peces, iguanas marinas y manatíes (McDermid et al., 2020).

1.4.2 Reptiles omnívoros

Los investigadores Kohl et al., (2017) compararon la microbiota intestinal de tres especies de lagartos vivíparos con diferentes dietas: dos especies omnívoras generalistas (que puede hacer uso de una amplia variedad de recursos) (*Liolaemus parvus* y *Liolaemus ruibali*) y una herbívora (*Phymaturus williamsi*). Encontraron cuatro hallazgos: 1) las especies de lagartos estudiadas (en cautiverio) albergan una microbiota intestinal distinguible; 2) la cautividad altera la composición de las comunidades bacterianas, pero conserva las especies huésped-específicas; 3) en muestras de materia fecal se encontró alta representatividad de las comunidades bacterianas y 4) lagartos nacidos en cautiverio, pero separados 24 horas después de nacer, comparten el 34.3% del microbioma intestinal con sus madres; esto indica que existe una transmisión ambiental y maternal (Kohl et al., 2017).

Por otro lado, la primera caracterización del microbioma de la tortuga marina Cagüama (*Caretta caretta*), del orden Testudines y de dieta omnívora, fue realizada en individuos hospitalizados o fallecidos (Abdelrhman et al., 2016) (Figura 4). Los investigadores encontraron una composición taxonómica similar en las heces (H) y en las biopsias intestinales (I): Firmicutes (H: 66%; I: 87%), Proteobacteria (H: 23%; I: 4.2%), Bacteroidetes (H: 6.2%; I: 3.4%), siendo la clase Clostridia la más abundante dentro del Phylum Firmicutes (H: 63.2%; I: 43%), seguido en muestras intestinales por Bacilli (42.5%). Además, observaron que las muestras fueron bastante similares entre sí (Tabla 1) (Abdelrhman et al., 2016).

Figura 4. “Composición taxonómica de la microbiota del intestino y las heces de *C. caretta* a diferentes niveles taxonómicos”. A) Filo; B) Clase. Tomado de Abdelrhman et al., (2016).

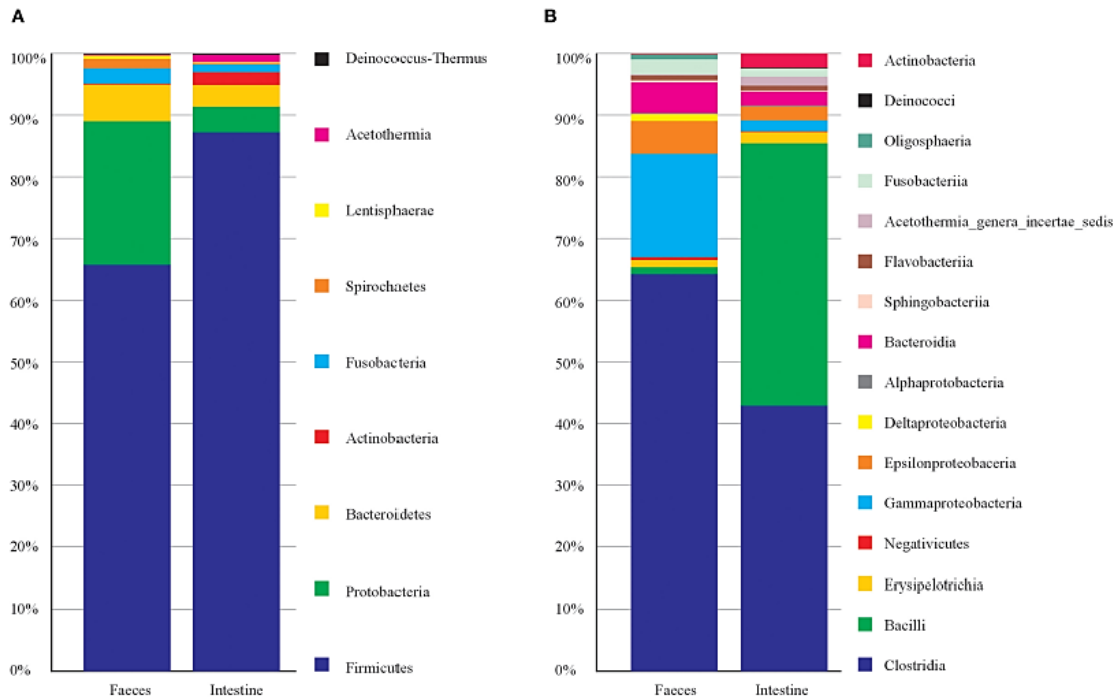


Tabla 1. Clasificación taxonómica de la caracterización de la microbiota bacteriana de la tortuga marina Caguama (*C. caretta*), de los OTUs más abundantes. Tomado y adaptado de Abdelrhman et al., (2016).

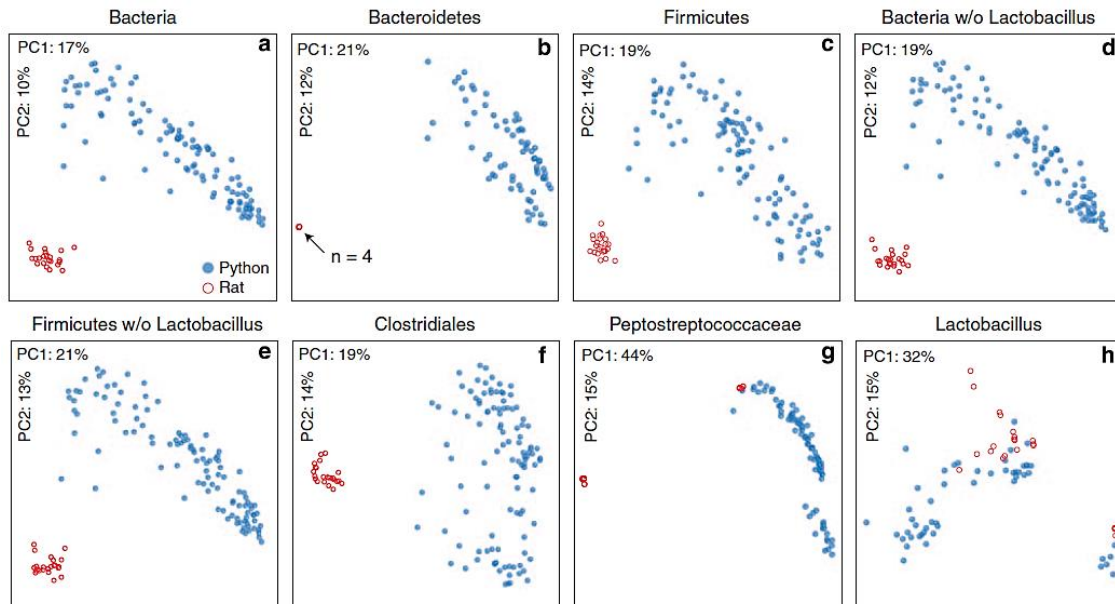
Taxón	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
OTU_1	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Vagococcus</i>
OTU_2	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	<i>Robinsoniella</i>
OTU_3	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	<i>Clostridium XI</i>
OTU_4	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	<i>Clostridium XI</i>
OTU_5	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae 1	<i>Clostridium sensu stricto</i>
OTU_6	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Defluviitaleaceae	<i>Defluviitalea</i>

1.4.3 Reptiles carnívoros

En un estudio reportado por Costello et al. (2010) realizaron la caracterización del microbioma del TGI postprandial en Pitones Birmana (*Python molurus*), serpientes carnívoras en cautiverio, y encontraron que la mayoría de las bacterias secuenciadas fueron clasificadas Firmicutes (61.8%) o Bacteroidetes (20.6%), encontrando también Proteobacterias (10.1%) y Deferribacteres (3.9%) (Costello et al., 2010). Dentro de estos Phylum se encontraron bacterias pertenecientes a la clase Clostridiales (Firmicutes, 4.2%); de las familias Clostridiaceae y Peptostreptococcaceae (Firmicutes, 19.0 y 18.5%, respectivamente) y de los géneros *Bacteroides* y *Rikenella* (Bacteroidetes, 7.0 y 5.6%, respectivamente), *Lactobacillus* (Firmicutes, 5.6%) y *Synergistes* (Deferribacteres, 3.9%) (Costello et al., 2010).

Además, compararon el microbioma de los animales presa (ratas, base de la dieta en cautiverio) y del intestino de la serpiente (Figura 5), encontrado diferencias marcadas en las poblaciones bacterianas y demostrando así que el roedor no era la fuente de la mayoría de la microbiota (Costello et al., 2010).

Figura 5. Bacterias presentes en el intestino de la Pitón Birmana (*Python bivittatus*) (puntos azules) y el roedor (puntos rojos) dado como alimento (rata entera). Las comunidades bacterianas aparentan tener grandes diferencias en su conformación. Tomado de Costello et al., (2010).



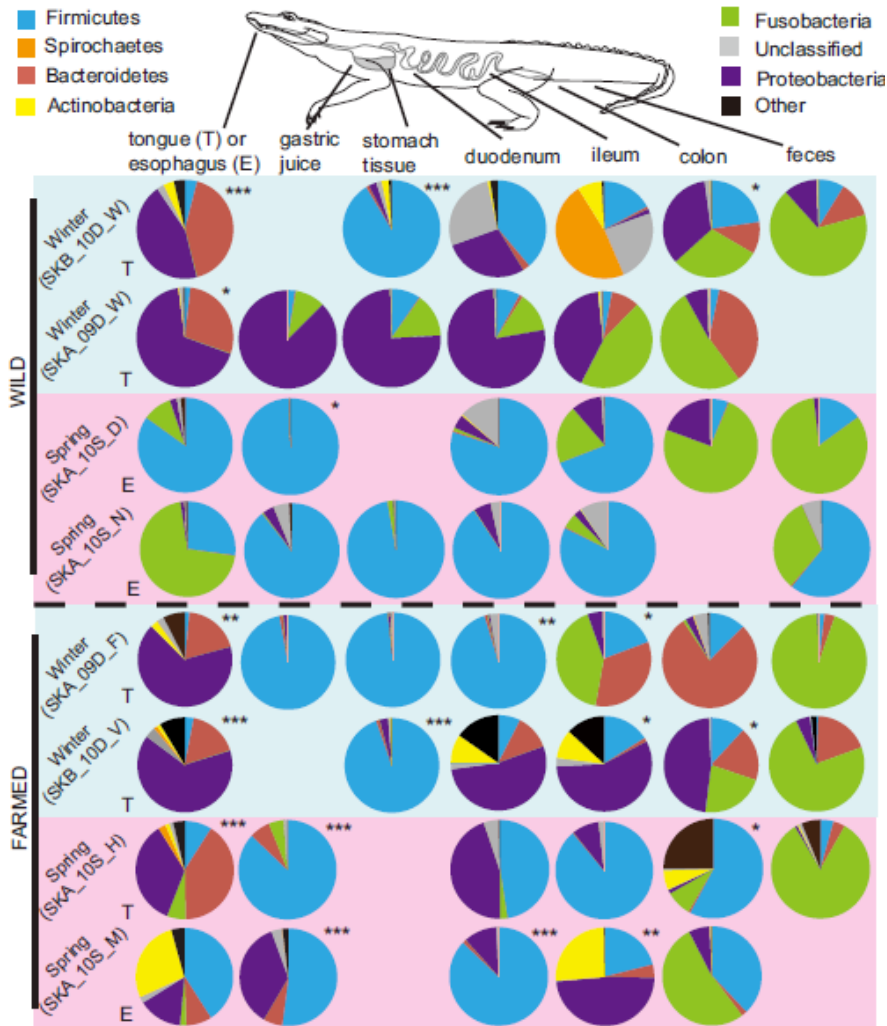
Tras la caracterización del microbioma gastrointestinal del vertebrado carnívoro Caimán Americano (*Alligator mississippiensis*) en estado silvestre (Figura 6), se reveló que se conforma de microbiomas heterogéneos que se correlacionan específicamente con cada órgano del TGI, a pesar del patrón alimenticio del caimán, ya sea silvestre o de granja y la época del año (Keenan et al., 2013). El TGI superior (estómago y duodeno) presentó la menor diversidad y riqueza de microbiota debido a su bajo pH (2.1-3.0), mientras que el TGI bajo (colon y heces) tuvo la mayor variedad.

Keenan et al. (2013) encontraron que el microbioma del colon estaba predominada por Fusobacterias del género *Fusobacteriaceae*, Bacteroidetes del género *Bacteroidales* y Gamaproteobacterias del género *Enterobacteriales*; mientras el microbioma de las heces se caracterizó por la presencia de Firmicutes de los géneros Clostridiales, Clostridia y Clostridiaceae, Bacteroidetes del género *Bacteroidales*, Gamaproteobacterias del género *Enterobacteriales* y bacterias no identificadas; parámetros que no se vieron afectados por

el sexo, el tamaño de los individuos, el estado de cautividad o la estación del año (Keenan et al., 2013).

En cocodrilos se ha descrito la microbiota intestinal del Cocodrilo de Agua Salada (*Crocodylus porosus*) especie evolutivamente cercana al *C. intermedius*. En un estudio realizado por Willson et al., 2019 con *C. porosus* criados con fines zootécnicos la composición de la microbiota fue similar a la encontrada en el *A. mississippiensis*, con los principales Phylum representados por Firmicutes, principalmente Clostridia, y Fusobacteria, lo que parece ser distinto de los mamíferos, peces y otros reptiles que generalmente están dominados por Firmicutes y Bacteroidetes. La alta abundancia de bacterias consideradas como patógenas en otras especies sin aparentes consecuencias para la salud de los cocodrilos es de gran interés y amerita una investigación más detallada (Willson et al., 2019).

Figura 6. Representación de las comunidades bacterianas gastrointestinales a nivel de filo, de individuos de *A. mississippiensis* silvestres y criados en cautiverio, tomadas en invierno y primavera. Tomado de Keenan et al., (2013).



Es por lo anterior que se puede concluir que la microbiota en los reptiles si bien está asociada a su dieta, también se ve fuertemente influenciada por la edad y factores evolutivos y que a pesar de cambios en el ambiente, situaciones de cautiverio o modificaciones en la dieta, la microbiota puede permanecer estable.

2. Pregunta de Investigación

¿Cuál es la composición del microbioma bacteriano de la materia fecal de individuos jóvenes y adultos de Cocodrilo del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) presentes en la población *ex situ* de la Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF)?

3. Justificación

Más de un siglo de investigación biológica ha demostrado la importancia de los microorganismos en sus hospedadores, por lo cual identificar la composición del microbioma permite entender los componentes estables a través de las diferentes comunidades estudiadas y las relaciones simbióticas que puedan presentarse con el hospedador (Shade & Handelsman, 2012; Zilber-Rosenberg & Rosenberg et al., 2008).

De los estudios realizados sobre la microbiota intestinal, menos del 10% se han llevado a cabo en hospederos no mamíferos, y de estos, los reptiles han sido el grupo menos estudiado (Keenan et al., 2013; Kohl et al., 2017; Pawlak et al., 2020; Schmidt et al., 2014). Investigar la ecología microbiana presente en los reptiles es imperativo para empezar a entender patrones generalizados del microbioma dentro de los vertebrados (Kohl et al., 2017).

Como resultado de la poca información se ha generado una limitante en áreas como la evolución de especies bajo la teoría del hologenoma (Zilber-Rosenberg & Rosenberg et al., 2008), el tratamiento clínico y la medicina preventiva en reptiles de cautiverio (Keenan & Elsey, 2015), la conservación, la identificación y la transmisión de bacterias zoonóticas de interés en salud pública.

Esta investigación se enfoca en la microbiota intestinal del Cocodrilo del Orincoco (*Crocodylus intermedius*), especie carnívora, endémica de Colombia y Venezuela, en estado crítico de conservación debido a prácticas humanas y la de la cual con frecuencia se ha pasado por alto en las investigaciones (Morales-Betancourt et al., 2015).

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Caracterizar el microbioma bacteriano presente en las heces de Cocodrilos del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) jóvenes y adultos de la población *ex situ* en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF) de la Universidad Nacional de Colombia.

4.2 Objetivos específicos

- Describir la microbiota bacteriana de las heces de ejemplares jóvenes y adultos de Cocodrilo del Orinoco, mantenidos en cautiverio en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF).
- Comparar y analizar la composición bacteriana del microbioma de las heces de los *C. intermedius* jóvenes estudiados versus la de los adultos.
- Evaluar la influencia del grupo etario (jóvenes y adultos) sobre la composición de la microbiota bacteriana presente en las heces de *C. intermedius*.

5. Metodología

5.1 Elección de los individuos y toma de las muestras

Se tomaron 84 muestras fecales de individuos de *C. intermedius* mantenidos en cautiverio en a la Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF) de la Universidad Nacional de Colombia, ubicada en la ciudad de Villavicencio (467 m.s.n.m.), departamento del Meta. Los animales se encontraban en recintos cerrados con área seca y húmeda, en compañía de otros individuos de su mismo rango etario.

Figura 7. Recinto de *C. Intermedius* adultos en Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF) de la Universidad Nacional de Colombia, Villavicencio (Meta). Los recintos de los cocodrilos poseen una zona seca (playa) y una zona húmeda (estanque). Fotografía: María Camila Polanco Rodríguez (2021).



Para la selección de los animales se tuvo en cuenta su talla, no se hizo distinción de sexo puesto que para los cocodrilos este no representa una diferencia significativa en los rangos etarios seleccionados (Bolton, 19872; Jeffree et al., 2005), y solo se incluyeron animales clínicamente sanos según la evaluación médico-veterinaria. Las muestras pertenecen a individuos jóvenes de 121-200 cm e individuos adultos de 201-250 cm.

Los animales se encontraban en recintos con múltiples individuos, con las características descritas en la Tabla 2:

Tabla 2. Características de los individuos mantenidos en cautiverio en a la Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF) de la Universidad Nacional de Colombia.

Característica/ Grupo etario	Jóvenes	Adultos
Total de muestras	15	9
Individuos/Recinto	7,33	16,77
Peso promedio (kg)	7,48	58,33
Largo promedio (cm)	189,5	214,5

Las muestras fueron tomadas de manera directa del sustrato del recinto (zona seca, 16 muestras) y del estaque (zona húmeda, 8 muestras). Una vez obtenidas fueron almacenadas en bolsas estériles a -20 °C hasta su posterior análisis (Keenan et al., 2013).

5.2 Procesamiento de las muestras

El DNA bacteriano presente en las muestras fecales congeladas fue extraído utilizando el kit E.Z.N.A Stool DNA Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La región V4 del gen rRNA 16S fue amplificada vía PCR (Kuczynski et al., 2012; Shade & Handelsman, 2012), utilizando los *primers* 515-F y 806-R modificados (Gomez et al., 2022).

Para la amplificación se realizaron dos PCRs: para la primera se utilizó 2 µl del DNA extraído mezclado con 0.5 µl de los *primers forward* (515F) y *reverse* (806R), 12.5 µL de

KAPA HiFi HotStart Ready Mix (Kapa Biosystems Inc., Roche; Mississauga, ON, Canada) y 9.5 μL de agua estéril. Para la segunda PCR se utilizaron las siguientes condiciones: desnaturación inicial a 95 °C por 3 min seguida de 30 ciclos a 95 °C por 45 segundos, seguido de 60 seg a 52°C y una extensión de 72 °C por 60 seg. Se realizó una extensión final a 72 °C por 10 minutos. La calidad del DNA extraído fue analizada en gel de agarosa por medio de electroforesis antes de su purificación. Un control negativo de la PCR fue utilizado en cada amplificación para hacer un control sobre posibles contaminantes de los reactivos. El resultado fue descartado y el proceso repetido si el DNA amplificado de la muestra mostraba una banda en la electroforesis de gel de agarosa para el control negativo.

Después de la amplificación, los productos de las PCR fueron purificados utilizando una mezcla de 25 μL de amplicón con 25 μL de Mag-Bind (Mag-Bind RXNPurePlus, Omega Bio-Tek Inc.; Norcross, GA, USA) en un plato de 96 pozos, incubado por 5 minutos a temperatura ambiente, y después separado y lavado dos veces con etanol al 80%, seguido de 32 μL de 10 mM Tris pH 8.5 de solución *buffer*. Utilizando el kit Nextera XT Index kit (Illumina; San Diego, CA, USA), se acoplaron *dual índices* y adaptadores de *Illumina sequencing* durante una segunda PCR.

Para cada muestra se mezclaron 25 μL de KAPA HiFi HotStart Ready Mix (Kapa Biosystems Inc., Roche) con 4 μL de Nextera XT Index 1, 4 μL de Nextera XT Index 2, 12 μL de agua estéril y 5 μL del producto de la PCR purificado. Durante esta segunda PCR se mantuvieron las siguientes condiciones: 95°C por 3 minutos seguidos por ocho ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s y 72°C por 30 min. Finalmente, la extensión fue realizada a 72°C por 5 min. La purificación del resultante de este PCR fue realizada igual que la primera con los siguientes ajustes: 50 μL de producto de la PCR fue mezclado con 60 μL Mag-Bind (Mag-Bind RXNPurePlus) en un plato de 96 pozos, junto a 35 μL de 10 mM Tris pH 8.5 de solución *buffer* en vez de 32 μL .

Posterior a la purificación de estos amplicones, se realizó una cuantificación de las muestras utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop, Thermo Scientific). Las secuencias que contenían una concentración mayor a 15 ng/ μL fueron secuenciadas. Un segundo gel de agarosa para electroforesis fue corrido para asegurar la calidad de las muestras, posteriormente los productos fueron almacenados a -20 °C. Se realizó una normalización de la concentración a 2 nM de las muestras y una posterior secuenciación

del gen 16S rRNA utilizando un equipo Illumina MiSeq con una longitud de lectura de 2 × 250 (Gomez et al., 2022).

5.3 Análisis bioinformático y estadístico

Se utilizó el programa Mothur (v1.42.3) para realizar el análisis bioinformático (Kozich et al., 2013; Schloss et al., 2009). Las secuencias *forward* y *reverse* fueron unidas y reensambladas por medio de un proceso estándar de limpieza y control de calidad. Se removieron las secuencias que tenían >264 y <250 pares de bases, y los duplicados fueron fusionados de acuerdo con la referencia de alineamiento basada en SILVA rRNA database Project (Quast et al., 2012). Las secuencias que contenían homopolímeros de más de >8 bp fueron consideradas con pobre alineamiento y fueron removidas.

Para asegurar que las secuencias se alinearan únicamente de acuerdo con las coordenadas establecidas, se removieron las bp que no alineadas y las secuencias redundantes creadas en este paso también fueron removidas. Se realizó un paso de *pre-clustering* donde se fusionaron las secuencias que diferían en menos de 3 bp. Se identificaron y removieron quimeras utilizando Vsearch (v2.13.3).3 (Rognes et al., 2016), y se identificaron y removieron fragmentos de genes de Cloroplastos y Archaeas utilizando de referencia el set de entrenamiento Ribosomal Database Project (v16) (Cole et al., 2014).

Las secuencias fueron asignadas a *Operational Taxonomic Units* (OTUs) y clasificadas usando el clasificador Ribosomal Database Project (RDP v16) (Cole et al., 2014) basada en un cálculo de distancias de las secuencias con el DNA alineado, con un 97% de similitud. Las secuencias pertenecientes a dominios no bacterianos fueron removidas.

Para normalizar el número de secuencias por muestra se realizó un *subsampling* basado en el número de secuencias que contenía la muestra con la menor cantidad de secuencias, verificando la buena cobertura después de este usando Good's coverage index.

Debido a que la diversidad es un concepto importante que se refiere no solo al número de especies (riqueza), sino también al número de individuos dentro de cada especie presente en un ambiente (*evenness*), la cual proporciona información importante sobre la estructura

de esa comunidad (rareza y frecuencia de las especies), se calculó el índice de Simpson's invertido (Simpson, 1949), teniendo en cuenta el número de unidades taxonómicas operativas observadas (OTUs), el número de individuos en cada OTU y el número total de individuos en la comunidad, por lo tanto, la abundancia relativa en cada comunidad. Adicionalmente se calculó el índice de Chao-1 (riqueza), el cual cuenta el número observado de especies, el número de especies con solo una secuencia y el número de especies con solo dos secuencias (Chao, 1984); el índice de Shannon (*evenness*) (Shannon, 1948), el cual predice la siguiente especie de una comunidad si estas estuvieran ordenadas en fila y por lo tanto la uniformidad de la comunidad. Los tres índices que evalúan la riqueza, igualdad (*evenness*) y la diversidad se compararon entre *C. intermedius* juveniles y adultos usando la prueba no paramétrica de Wilcoxon.

La Beta diversidad fue evaluada calculando el índice de Jaccard (*bacterial membership*) (Jaccard, 1908) y el índice de Yue & Clayton (*bacterial structure*) (Yue & Clayton, 2005). Se realizó un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) para evaluar las diferencias entre los grupos etarios (juveniles y adultos).

La comparación entre poblaciones bacterianas puede lograrse mediante medidas matemáticas que comparan la disimilitud entre diferentes poblaciones, y los resultados pueden utilizarse para generar árboles filogenéticos que agrupen estructuras de población más similares. Para este propósito se utilizó el índice Jaccard Clásico para abordar la pertenencia a la comunidad (riqueza) y el índice de Yue y Clayton para la estructura de la población.

El índice de Jaccard tiene en cuenta la relación entre el número de especies compartidas y el número de especies distintas totales entre las comunidades estudiadas (Schneider, 2005), por lo tanto, se considera la relación entre el tamaño de la intersección y la unión de especies en dos comunidades. Si bien es una buena medida para la estimación de la pertenencia no considera la abundancia relativa de cada especie, lo cual esencial para la comparación de las poblaciones. Esto genera, por ejemplo, que no detecte diferencias en una situación donde haya un crecimiento marcado de algunas especies de la microbiota, pero ninguna adición o eliminación de sus miembros, una situación que podría ser altamente relevante desde el punto de vista clínico (Yue y Clayton, 2005).

Es por lo anterior que se calculó también el índice de Yue y Clayton, el cual determina la similitud entre la estructura de dos comunidades teniendo en cuenta el número total de

especies y la abundancia relativa de cada OTU en cada comunidad (Yue y Clayton, 2005). Así, los cambios tanto en los miembros de la microbiota como en su abundancia relativa pudieron ser detectados.

Se generaron diagramas de Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) para determinar la presencia de *clústeres* de los diferentes grupos basados en la similitud de las comunidades bacterianas, según los índices de Beta diversidad (Costa & Weese, 2019).

Se calcularon las abundancias relativas a nivel de Phylum, Clase, Orden, Familia y Género para ser posteriormente comparadas utilizando el test no-paramétrico de Wilcoxon, los valores de P fueron ajustados por comparaciones múltiples usando la aproximación de Benjamini-Hochberg (R! Core Team, 2013, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Para evaluar la presencia/ausencia de biomarcadores taxonómicos en los diferentes grupos (cocodrilos juveniles y Adultos) se utilizó la prueba *Linear Discriminant Analysis Effect Size* (LEfSe), utilizando un valor de $P < 0.05$ y un valor LDA > 2.5 (Segata et al., 2011). La prueba LEfSe se basa en el análisis de discriminación lineal y busca identificar características microbianas (como taxones, genes o funciones) que están significativamente enriquecidas en un grupo de muestras en comparación con otros (Chang et al., 2022).

La evaluación del número de las diferentes meta-comunidades en la que las muestras se pudieron agrupar fue realizada utilizando el método Dirichlet Multinomial Mixtures (DMM), utilizando el valor mínimo de Laplace para el K para determinar en cuántas metacomunidades las muestras se dividían (Quince et al., 2012).

6. Resultados

De las 84 muestras de materia fecal de *C. intermedius* recolectadas, 24 fueron incluidas en el estudio con base al grupo etario del que provenían, el tiempo transcurrido entre la deposición y la colecta, la cantidad y calidad del DNA bacteriano extraídos. Las muestras resultantes que cumplieron con los requisitos descritos fueron divididas en dos grupos: Jóvenes (n= 15) y Adultos (n= 9).

Por razones de seguridad y por protocolo de la Estación de Biología Tropical Roberto Franco, las muestras fueron tomadas únicamente con asistencia del personal técnico de manera directa del sustrato del recinto de la zona seca (Juveniles n= 9, Adultos n= 7) o del fondo estanque en la zona húmeda después del vaciado completo de este (Juveniles n= 6, Adultos n= 2). No se manipularon los animales durante la recolección de estas.

Figuras 8 y 9. Materia fecal de *C. intermedius* adulto recolectada de manera directa en el sustrato. Para el procesamiento de las muestras se utilizó la zona central del bolo fecal, el cual no tuvo contacto directo con el sustrato para evitar la contaminación ambiental de la muestra. Fotografías: María Camila Polanco Rodríguez (2021).



6.1 Análisis de las secuencias de la microbiota fecal

En total 4,867,391 secuencias resultaron aptas para ser analizadas después de los procesos de filtrado y limpieza. La mediana de la profundidad de las secuencias fue 95,714 reads, con un rango de 56,071 a 179,158; una media de 100,584 y una desviación estándar

(SD) 34,171. Se realizó un *subsampling* de 54,000 secuencias por muestra. La cobertura fue considerada excelente basada en una mediana del índice de *Good Coverage* del 99.6% (rango de 99.4% a 99.8%).

6.2 Mediciones de Alfa diversidad

Los índices de Chao (riqueza), Shannon's Evenness (*evenness*), y la diversidad inversa de Simpson (diversidad) no tuvieron una diferencia estadísticamente significativa entre los cocodrilos Juveniles y Adultos (Tabla 3 y Figuras 10, 11 y 12), aunque una tendencia fue observada con respecto a la riqueza, la cual fue numéricamente mayor en animales adultos que en juveniles ($P = 0.061$).

Tabla 3. Índices de alfa diversidad de la microbiota fecal de *C. intermedius* juveniles y adultos.

Índice	Juveniles	Adultos	P – Value*
Chao-1	643 [382 - 763]	738 [468 - 1087]	0.061
Shannon's Evenness	0.47 [0.30 – 0.53]	0.48 [0.37 - 054]	0.558
Diversidad de Simpson's	8.4 [2.2 – 18.1]	10.7 [3.5 -15]	0.412

**P-values* obtenidos utilizando la prueba de Wilcoxon.

Figura 10. Índice de Chao-1 (riqueza) de las muestras estudiadas de individuos juveniles y adultos de *C. intermedius* representados en diagramas de Cajas y Bigotes.

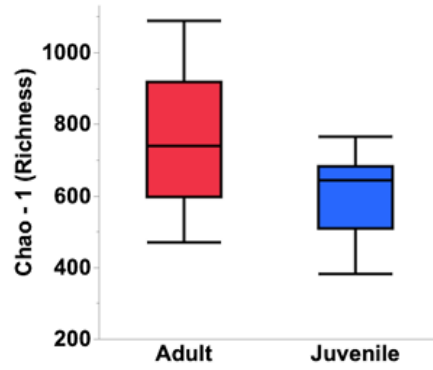


Figura 11. Índice de Shannon (*evenness*) de las muestras estudiadas de individuos juveniles y adultos de *C. intermedius* representados en diagramas de Cajas y Bigotes.

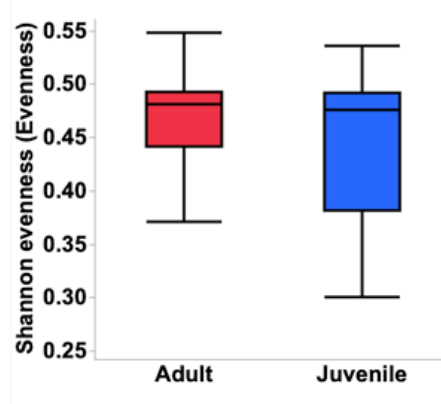
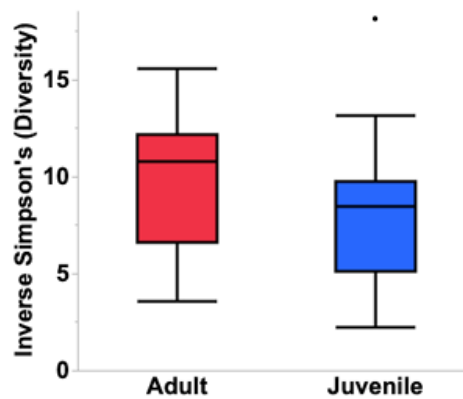


Figura 12. Índice de inverso de Simpson's (diversidad) de las muestras estudiadas de individuos juveniles y adultos de *C. intermedius* representados en diagramas de Cajas y Bigotes.



6.3 Mediciones de Beta diversidad

El *membership* de las poblaciones bacterianas difirió significativamente entre las muestras de heces de los grupos de cocodrilos Juveniles y Adultos (AMOVA, $P < 0.0001$ and $P < 0.001$, respectivamente). La estructura bacteriana no fue estadísticamente diferente entre los dos grupos comparados (AMOVA, $P < 0.106$).

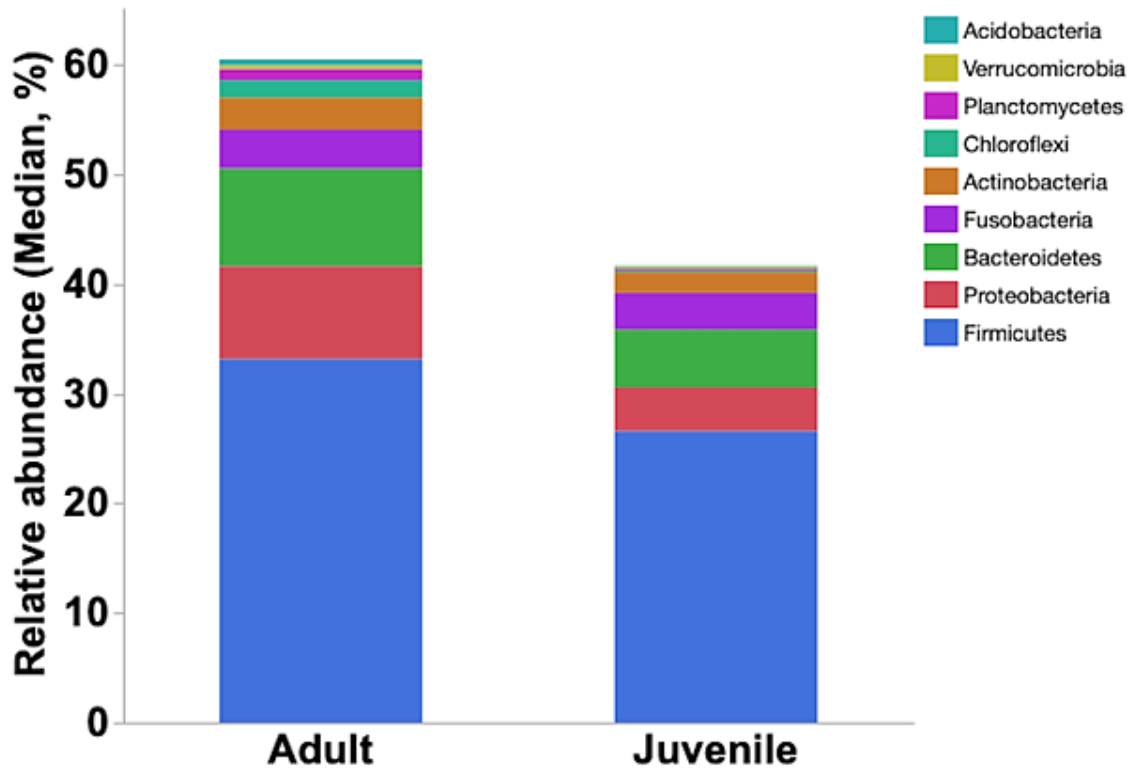
6.3.1 Abundancia relativa y análisis LefSe

En total se identificaron 31 Phylum, 82 clases, 157 órdenes, 317 familias y 648 géneros en las muestras analizadas.

6.3.2 Phylum

A nivel de Phylum se encontraron con mayor frecuencia bacterias pertenecientes a Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Fusobacterium, Actinobacterium, Chloroflexi, Planctomycetales, Verrumicrobia y Actinobacteria (Figura 13).

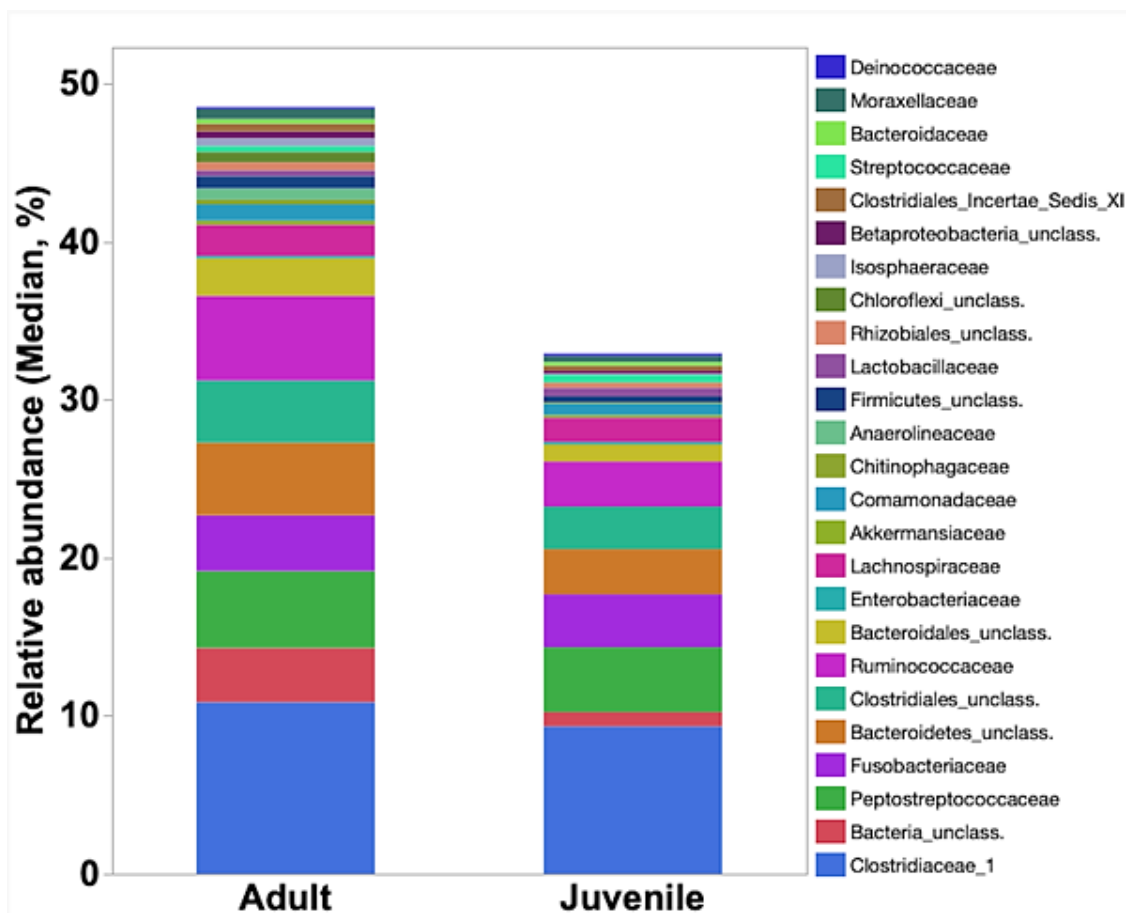
Figura 13. Abundancia relativa (promedio) de bacterias a nivel Phylum, encontradas en las muestras fecales estudiadas de individuos juveniles y adultos de *C. intermedius*. En ambos grupos las muestras se vieron predominantemente caracterizadas por Firmicutes, seguido de Bacteroidetes, Proteobacterias, Fusobacteria y Actinobacteria.



6.3.3 Familia

Las familias más detectadas en las muestras de Juveniles y Adultos fueron Clostridaceae *unclassified*, Cetobacterium, Bacteroidetes *unclassified*, Clostridiales *unclassified*, Clostridium *censo stricto*, bacteroidales, Rumminococcaceae *unclassified*, Rombustia, Peptostreptococaceae *unclassified*, Terrisporobacter y Enterobacteriaceae (Figura 14).

Figura 14. Abundancia relativa (promedio) de bacterias a nivel familia, encontradas en las muestras fecales estudiadas de individuos juveniles y adultos de *C. intermedius*. En ambos grupos las muestras predominaron las familias Clostridiaceae, Peptostreptococcaceae, Fusobacteriaceae, Bacteroidetes, Clostridiales y Lachnospiraceae.

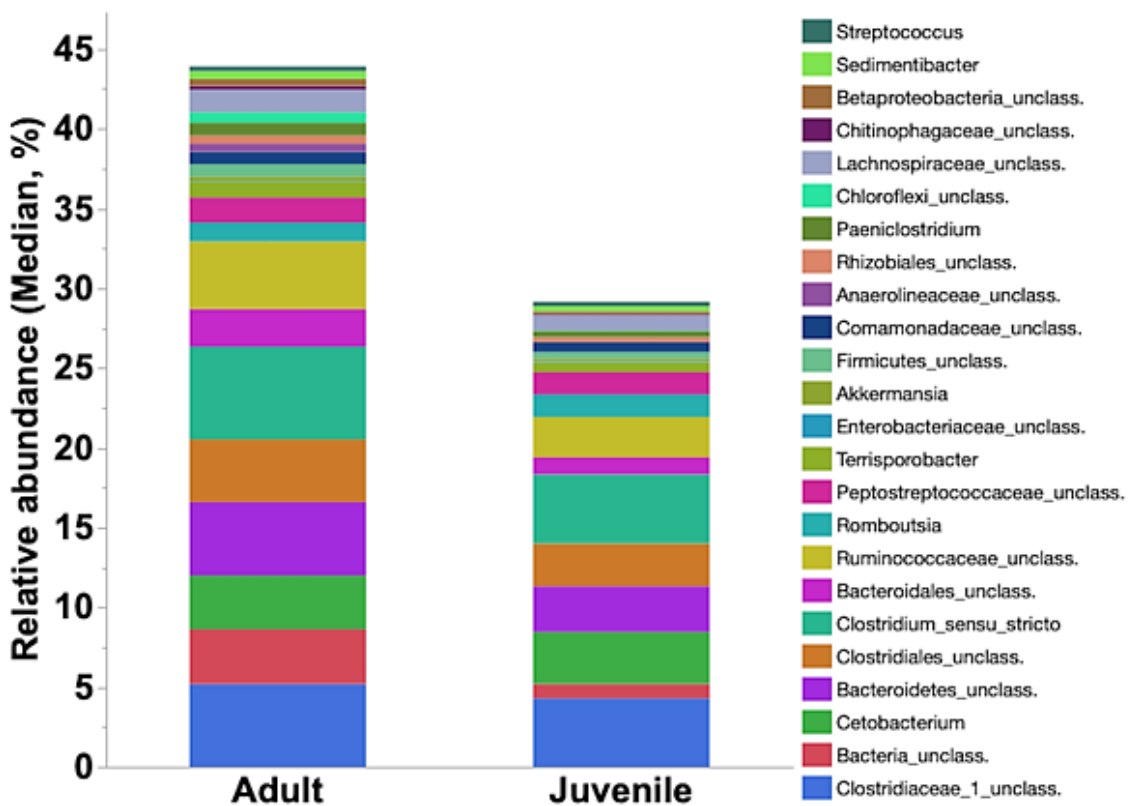


6.3.4 Género

A nivel de género, los más detectados en los animales Juveniles y Adultos estudiados fueron *Clostridiaceae 1 unclassified*, *Cetobacterium*, *Bacteroidetes unclassified*, *Clostridiales unclassified*, *Clostridium sensu stricto*, *Bacteroidales unclassified*, *Ruminococcaceae unclassified*, *Romboutsia*, *Peptostreptococcaceae unclassified*, *Terrisporobacter*, *Enterobacteriaceae unclassified*, *Akkermansia*, *Firmicutes unclassified*, *Comamonadaceae unclassified*, *Anaerolineaceae unclassified*, *Rhizobiales unclassified*, *Paeniclostridium*, *Chloroflexi unclassified*, *Lachnospiraceae unclassified*,

Chitinophagaceae unclassified, *Betaproteobacteria unclassified*, *Sedimentibacter*, *Streptococcus*, *Isosphaeraceae unclassified*, *Deinococcus*, *Candidatus Saccharibacteria unclassified* y *Pirellulales unclassified* (Figura 15).

Figura 15. Abundancia relativa (promedio) de bacterias a nivel género, encontradas en las muestras fecales estudiadas de individuos juveniles y adultos de *C. intermedius*. En ambos grupos las muestras predominaron los géneros *Clostridiaceae*, *Cetobacterium*, *Clostridiales* y *Clostridium*.



El análisis LEfSe (Tabla Suplementaria 1) mostró 26 taxones enriquecidos ($LDA > 2.5$ y $P < 0.05$) en cocodrilos adultos ($n=21$) y juveniles ($n=4$). La mayoría de los taxones en adultos pertenecen al Phylum Firmicutes ($n=17$), pero los taxones Bacteroidetes ($n=3$) y Protobacteria ($n=1$) también estuvieron presentes. En cocodrilos juveniles los taxones más

representados fueron los Phylum Proteobacteria (n=2), Firmicutes (n=1) and Fusobacteria (n=1).

LEfSe reveló cuatro géneros enriquecidos para *C. intermedius* jóvenes: *Comamonadaceae* (Phylum Proteobacteria, Familia Comamonadaceae), *Latilactobacillus* (Phylum Firmicutes, Familia Lactobacillaceae), *Cetobacterium* (Phylum Fusobacteria, Familia Fusobacteriaceae) y *Edwardsiella* (Phylum Proteobacteria, Familia Hafniaceae).

En los cocodrilos adultos se encontraron los siguientes taxones enriquecidos: los géneros encontrados fueron *Paeniclostridium* (Phylum Firmicutes, Familia Peptostreptococcaceae), *Clostridium_sensu_stricto* (Phylum Firmicutes, Familia Clostridiaceae, 4 OTUs), *Clostridiaceae_1_unclassified* (Phylum Firmicutes, Familia Clostridiaceae, 2 OTUs), *Sedimentibacter* (Phylum Firmicutes, Familia Clostridiales, 2 OTUS), *Odoribacter* (Phylum Bacteroidetes, Familia Odoribacteraceae), *Comamonas* (Phylum Proteobacteria, Familia Comamonadaceae) y *Acinetobacter* (Familia Moraxellaceae, Phylum Proteobacteria). A nivel de familia se identificaron OTUs correspondientes a las familias Sporomusaceae (Phylum Firmicutes), Ruminococcaceae (Phylum Firmicutes), Erysipelotrichaceae (Phylum Firmicutes), Lachnospiraceae (Phylum Firmicutes), Bacillaceae (Phylum Firmicutes), Bacteroidales (Phylum Bacteroidetes), Xanthomonadaceae (Phylum Proteobacteria), Sporomusaceae (Phylum Firmicutes). Y a nivel de Phylum se observaron 2 OTUS, una correspondiente a Firmicutes y otra a Bacteroidetes.

6.3.5 Metacomunidades

El análisis de Dirichlet multinomial mixtures (DMM) (Holmes et al., 2012) reveló que las muestras se agrupan en un solo enterotipo.

6.3.6 Análisis PCoA

Para los dos grupos objetos de estudio, si bien la estructura composicional bacteriana fue similar entre cocodrilos jóvenes y adultos, la *membership* de las poblaciones bacterianas sí tuvo una diferencia significativa entre los dos grupos.

Figura 16. Análisis de PCoA de la estructura bacteriana de la microbiota fecal presente en muestras de *C. intermedius* jóvenes (azul) y adultos (rojo). La comparación entre los dos grupos etarios reveló que no hay diferencia significativa entre ellos (AMOVA, $P < 0.106$).

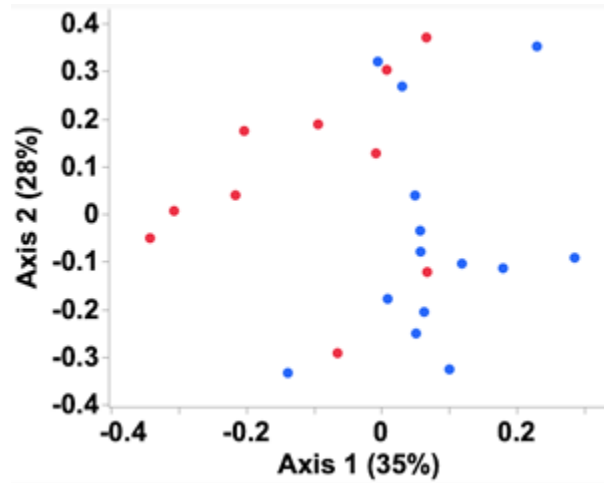
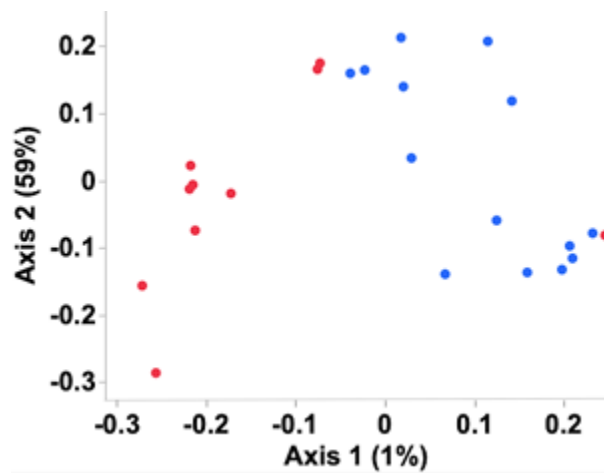


Figura 17. Análisis de PCoA de la distribución de las poblaciones bacterianas de la microbiota fecal presente en muestras de *C. intermedius* jóvenes (azul) y adultos (rojo). La comparación entre los dos grupos etarios reveló una diferencia significativa en la distribución de las poblaciones (AMOVA, $P < 0.0001$ y $P < 0.001$ respectivamente).



7. Discusión

Se analizaron 24 muestras fecales de *C. intermedius* Juveniles (n= 15) y Adultos (n= 9). La variación de la composición bacteriana de la microbiota fecal en los individuos no tuvo diferencia estadísticamente significativa en cuanto a indicadores de alfa diversidad como diversidad y riqueza entre los grupos estudiados, pero sí difiere de manera significativa en las mediciones de beta diversidad, mostrando una distribución diversa de las poblaciones bacterianas conforme los cocodrilos pasan de estado juvenil a adulto, pero manteniendo una estructura similar de un solo enterotipo.

7.1 Diferencias en la Alfa diversidad

La diversidad Alfa se refiere a la riqueza de especies de una comunidad determinada. De acuerdo con los resultados obtenidos, las muestras no presentaron diferencias significativas entre las poblaciones de *C. intermedius* jóvenes y adultos en cuanto a índices de riqueza, sugiriendo que la cantidad de especies bacterianas y su abundancia relativa fue similar entre los individuos de cada grupo. Estos resultados son congruentes con los reportados por Willson et al., 2019 para el tracto digestivo posterior del *Crocodylus porosus* y Keenan et al., 2013 para *Alligator mississippiensis*, ambos en condición *ex-situ*. En

ambos casos se observó un predominio por el Phylum Firmicutes, en particular por la familia Clostridaceae.

Con base en la evidencia presente, se puede presentar la hipótesis de que la diversidad bacteriana de las heces del orden Crocodylia en cautiverio posee un nivel reducido. Esta disminución posiblemente se atribuye a la uniformidad del hábitat y la dieta en cautiverio, en contraste con las condiciones variables que experimentan los animales en su entorno natural.

En ambos grupos se observó un marcado predominio de Firmicutes y Bacteroidetes. Los Firmicutes se asocian con en el metabolismo de carbohidratos, mientras que Bacteroidetes muestran actividad en diversas funciones como la producción y conversión de energía, así como el transporte y metabolismo de aminoácidos, además del metabolismo de carbohidratos (Ottman et al., 2012). Al igual que otros cocodrilianos, los Firmicutes predominaron en el microbioma fecal del *C. intermedius*, probablemente a características asociadas a la dieta de cría en cautiverio de las presas usadas como alimento para los animales (Keenan et al, 2013). En otros animales en estado *ex situ* como el *C. porosus*, los Firmicutes solo predominaron en el microbioma intestinal durante la época de alimentación estacional. En los reptiles carnívoros en cautiverio esto se puede deber a la permanente disponibilidad de alimento alto en carbohidratos y grasas saturadas y la pobre actividad física (Bolton, 1982; Keenan et al, 2013; Sha et al., 2016; Vicino et al., 2022).

Debido a limitaciones de la técnica de secuenciación del gen bacteriano rRNA 16S, la identificación de las bacterias solo permite identificar hasta género, por lo tanto, no es posible asegurar la presencia de especies patógenas en las heces del *C. intermedus*. Sin embargo, en otras especies de reptiles ya se ha reportado el cultivo y aislamiento de bacterias patógenas para los humanos, pero comensales para su hospedador como *Aeromonas hydrophila*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella* spp (Pawlak et al., 2020).

En una investigación del 2015, Keenan et al., propusieron que los cocodrilianos pueden habitar ambientes con un alto nivel de patógenos debido a que han desarrollado una cercana coevolución con su microbioma que les permite tener un sistema inmune altamente adaptado a estas condiciones. Aunque queda mucho por descubrir sobre el sistema inmunológico de los cocodrilos, existen evidencias comparativas que indican la presencia de una vía alterna del sistema del complemento (parte del sistema inmune

innato) en el suero sanguíneo de cocodrilos de agua salada (*C. porosus*) y de agua dulce (*C. johnstoni*) (Merchant & Britton, 2006; Siddiqui et al., 2022). Además, se plantea la posibilidad de que esta vía también esté presente en otros cocodrilianos como los caimanes, sin embargo se sugiere que las proteínas que tienen la capacidad de activar esta cascada podrían provenir de diferentes microorganismos, o que las proteínas poseen diferentes características que corresponden al tipo de composición de las membranas microbianas (Merchant & Britton, 2006). También han sugerido la capacidad antimicrobiana, amebicida y antiviral del suero de los cocodrilianos, lo cual puede estar relacionado con su eventual dieta carroñera o con la adaptación de poblaciones de *C. intermedius* a habitar lugares contaminados (Merchant & Britton, 2006; Shahrabany, 1999; Siddiqui et al., 2022).

Los reptiles poseen un sistema inmunológico altamente robusto y un microbioma intestinal único, lo que probablemente contribuye a su capacidad para producir péptidos antimicrobianos y manifestar una aparente resistencia a infecciones, cáncer y senescencia. Los reptiles son conocidos por su éxito evolutivo y grupos diversos, y su microbioma intestinal representa un recurso valioso e innovador para obtener moléculas bioactivas con potencial terapéutico. Los mecanismos subyacentes entre el microbioma intestinal y el sistema inmunitario podrían ofrecer pistas para desarrollar nuevas terapias para la salud en general, y potencialmente explotar los sistemas de defensa ancestrales de los reptiles en beneficio de los seres humanos (Siddiqui et al., 2022).

7.2 Diferencias en la Beta diversidad

En contraste, la diversidad beta se refiere al cambio o diferencia de las especies entre los diferentes grupos etarios. De acuerdo con el análisis PCoA, la cantidad relativa de las diferentes poblaciones bacterianas en ambos grupos fue similar, pero hay especies bacterianas raras que solo están presentes en jóvenes, pero no adultos (Costa & Weese, 2018).

Para ambos casos los taxones dominantes fueron pertenecen al Phylum Firmicutes, la familia Clostridaceae y el género *Clostridiaceae spp.*, sin embargo, en los animales jóvenes

existe un claro predominio de los Firmicutes alcanzando más del 66% de las especies reportadas en comparación del 55% reportada para los adultos, caso similar para los demás Phylum Proteobacteria, Bacteroidetes, fusobacterium, Actinobacterium. A nivel de familia y género se observaron comportamientos parecidos para Clostridiaceae, Cetobacterium, Bacteroidetes, Clostridiales y Clostridium, y *Clostridiaceae spp*, *Cetobacterium spp*, *Bacteroidetes spp*, *Clostridiales spp*, *Clostridium spp.*, *Bacteroidales spp* respectivamente.

El análisis LEfSe reveló que en los jóvenes hay 4 familias enriquecidas con respecto a los adultos: Proteobacteria, Lactobacillaceae, Fusobacteriaceae y Hafniaceae. De estas dos OTUs corresponden a los géneros *Cetobacterium* y *Edwardsiella*, comúnmente reportados en peces (Zhang et al., 2023; Zhao et al., 2023), probablemente relacionados con la dieta. En adultos las familias con mayor cantidad de OTUs identificados fueron Clostridiaceae y Clostridiales, al igual que lo reportado a nivel de abundancia relativa e índices de diversidad.

Tradicionalmente se ha asociado los cambios en la microbiota intestinal a factores externos como el hábitat y la alimentación (Costello et al., 2010; Keenan et al., 2013), pero en el caso de estudio los *C. intermedius*, tanto jóvenes como adultos comparten hábitats similares, ambos grupos están en condición *ex-situ* y su alimentación se compone de los mismos elementos, variando únicamente en la cantidad suministrada con relación a su tamaño.

Este resultado en los índices de beta diversidad entre juveniles y adultos también fue reportado previamente por Choi et al., 2022 para el microbioma intestinal de perros, atribuido a las necesidades específicas de la etapa de crecimiento (con necesidad anabólica aumentada) comparado con la adultez. Así mismo, Castañeda-Monsalve et al., 2019 concluyó que este hallazgo en peces Cachama (*Piaractus brachypomus*) de criadero se podía deber a necesidades nutricionales específicas del desarrollo, como la necesidad de generar vitamina B12.

En especies evolutivamente distantes como los caballos se ha reportado un comportamiento similar: según Mshelia et al. (2018), los potros nacen con una población microbiana intestinal sorprendentemente compleja predominada por el filo Firmicutes; la cual continúa desarrollándose hasta que el caballo alcanza la edad adulta. Al envejecer, la composición microbiana se mantiene relativamente estable a lo largo del tiempo, siempre

y cuando no haya interrupciones como enfermedades o el uso de antibióticos. La reducción en la diversidad puede atribuirse a cambios fisiológicos asociados al envejecimiento, como un aumento en el tiempo de tránsito de la digestión y una menor necesidad de energía proveniente de la dieta (Mshelia et al., 2018)

Por el contrario, resultados opuestos han sido publicados por Dill-McFarland et al., (2017) para vacas de producción de leche desde las 2 semanas hasta los 2 años de edad: Dill-McFarland et al., (2017) argumentan que debido al cambio en la dieta (consumo exclusivo de leche a consumo principalmente de plantas y alimento balanceado rico en carbohidratos), la necesidad de mantener una población microbiana rica en su tracto gastrointestinal puede favorecer la degradación de fibras vegetales para obtener ácidos grasos volátiles como fuente energética, proveniente del metabolismo de sus microorganismos entéricos. Debido a esto y a diferencia de estudios realizados en reptiles, en las vacas se encontró una diversidad beta mayor en jóvenes, la cual se invirtió con respecto a la diversidad alfa cuando alcanzaron la adultez y entraron producción.

El envejecimiento también se ha asociado a una menor diversidad del microbioma intestinal, en particular al ratio Firmicutes-Bacteroidetes, así como a el aumento en poblaciones bacterianas oportunistas (Siddiqui et al., 2021).

En el caso del *C. intermedius* la razón por la cual los índices de Beta diversidad en los animales jóvenes es diferente a los adultos aún no está clara. Si bien durante su etapa neonatal y juvenil existe un aumento de la demanda de ciertos nutrientes como el calcio (Oonincx & Van Leeuwen, 2017), debido a que la especie no necesita una transición en la dieta a lo largo de su vida y que su fuente de energía proviene en su gran mayoría de la proteína y grasa animal (Donoghue & McKeown, 1999), es probable que factores como la disminución del requerimiento de energía metabolizable y la ralentización del metabolismo (Scheelings, 2020) puedan estar involucrados en el cambio de su microbiota fecal. Durante su crecimiento, los cocodrilos necesitan una gran cantidad de energía metabolizable que les permita no solo mantener sus funciones vitales sino crear nuevos tejidos involucrados en su crecimiento, además de energía disponible que les permita una rápida movilización para escapar de posibles depredadores. Esto hace que su consumo de alimento sea mayor y más frecuente que en los adultos (en comparación a su peso corporal), tal y como se ha registrado para *C. porosus* y *C. novaeguineae* (Bolton, 1982).

Al igual que en otras especies, el aumento en el tiempo de digestión y una menor necesidad de energía proveniente de la dieta podría generar que una distribución de la composición bacteriana diferente entre *C. intermedius* jóvenes y adultos, a pesar de que compartan las mismas condiciones medioambientales y la misma dieta.

7.3 Impacto de la microbiota bacteriana en la conservación del Cocodrilo del Orinoco

La obesidad y el exceso de tejido adiposo ha sido previamente relacionada el cambio en la microbiota intestinal en humanos, ratones y otros mamíferos (Singh et al., 2023). Esta posible asociación entre cocodrilos obesos y otros vertebrados con gran cantidad de depósitos grasos con una predominancia de Firmicutes en el microbioma intestinal/fecal encontrada en cocodrilos en estado *ex-situ*, sugiere que la dieta tiene el potencial de modificar el microbioma intestinal cuando el nicho ecológico ocupado por la contraparte silvestre cambia (Keenan et al., 2013; Lance et al., 2001; Willson et al., 2019). Este cambio podría disminuir la plasticidad de individuos que se encuentren en estado de cautiverio y sean posteriormente liberados a su medio natural (West et al., 2018), e incluso puede generar enfermedades relacionadas con el metabolismo de las grasas, deficiencias de vitaminas A y E y desórdenes endocrinos relacionados con las hormonas esteroideas (Lance et al., 2001).

El manejo responsable de los antibióticos debe ser parte de los planes de conservación. Debido a las características de la microbiota fecal del *C. intermedius*, se puede sugerir que el uso de ciertos antibióticos puede generar efectos negativos en la salud del animal debido a que están fabricados para afectar bacterias que en otras especies se consideran “patógenas”, como algunas bacterias Gram-Negativas, pudiendo facilitar la aparición de disbiosis, ser reservorio de bacterias con genes de resistencia a antimicrobianos y hacer una transmisión horizontal/local de estas (Keenan et al., 2013; Laborda et al., 2022; Ramey & Ahlstrom, 2020).

La inclusión de un manejo moderno e integral de los planes de conservación considerando el mantenimiento de un microbioma gastrointestinal saludable del Cocodrilo del Orinoco puede apoyar los planes de reproducción exitosos y al óptimo cuidado de animales en

cautiverio en todos los grupos etarios, beneficiándose del efecto de este microbioma en los sistemas neurológico e inmunológico, la nutrición intestinal y la defensa contra patógenos (Keenan et al., 2015; West et al., 2018).

8. Conclusiones y recomendaciones

8.1 Conclusiones

El objetivo de este estudio fue caracterizar la microbiota fecal del *C. intermedius* y comparar su composición entre animales jóvenes y adultos, siendo la primera investigación sobre la microbiota fecal del Cocodrilo del Orinoco. Si bien no se encontró una diferencia significativa entre las muestras de jóvenes y adultos para índices de alfa diversidad, los resultados de beta diversidad revelaron distribución de las poblaciones bacterianas distinta para ambos grupos, la cual puede estar relacionada con la disminución del requerimiento de energía metabolizable y la ralentización del metabolismo a medida que los cocodrilos se aproximan a su etapa adulta.

La composición de la microbiota fecal de ambos grupos estuvo fuertemente predominada por los Phylum Firmicutes y Bacteroidetes, distribución que se han relacionado con enfermedades como la obesidad y desórdenes endocrinos en otros vertebrados carnívoros (Bolton, 1982; Keenan et al, 2013; Lance et al., 2001; Willson et al., 2019). Para evitar complicaciones futuras de salud en los *C. intermedius ex situ* y en los que son liberados vida silvestre, es importante que los cocodrilos cuenten con instalaciones que les permitan moverse ampliamente y es necesaria la implementación de estrategias como la modificación de la dieta y el suministro de presas vivas, que estimule el desplazamiento y el ejercicio. Al igual que en otras especies, estos cambios pueden evitar la disbiosis, disminuir los costos asociados con manejo veterinario y aumentar la probabilidad de éxito de individuos liberados al medio natural (Sha et al., 2016; Vicino et al., 2022).

Durante el manejo médico-veterinario, la administración de antimicrobianos en *C. intermedius* debe tener en cuenta que puede afectar las poblaciones bacterianas comensales de la microbiota, contribuyendo a la disbiosis, la resistencia antimicrobiana y a la transmisión de bacterias con genes de resistencia (Laborda et al., 2022; Ramey &

Ahlstrom, 2020). Por lo anterior la terapia antimicrobiana debe ser cuidadosa, administrándose únicamente cuando es necesario.

Se considera que es necesario realizar más estudios que comparen microbiomas por grupos etarios en los vertebrados para establecer los posibles cambios que se presenten con la edad, puesto que la mayoría de las referencias bibliográficas analizadas se centran únicamente en individuos adultos.

Los reptiles tienen un fuerte sistema inmunológico y un microbioma intestinal único, lo que podría llegar a conferir una mayor resistencia a infecciones, cáncer y senescencia en comparación de otros grupos. Su microbioma es una valiosa fuente de moléculas bioactivas con potencial terapéutico, el cual potencialmente posee mecanismos entre el microbioma y el sistema inmunológico que pueden guiar nuevas terapias para la salud humana (Siddiqui et al., 2022).

8.2 Recomendaciones

La inclusión de un plan de manejo moderno e integral que incluya programas para el mantenimiento de un microbioma saludable puede mejorar el mantenimiento, reproducción y liberación a la vida silvestre de los Cocodrilos del Orinoco mantenidos en condición *ex situ*. Para realizar un análisis complementario y determinar la microbiota saludable de esta especie, es necesario realizar la caracterización del microbioma fecal de los Cocodrilos del Orinoco de vida silvestre, lo cual propondrá nuevos modelos que reforzarán esfuerzos de conservación para esta especie, contribuyendo a su buen mantenimiento, reproducción, liberación y adaptación nuevamente al medio natural.

9. Anexos

9.1 Tabla Suplementaria 1

Biomarcadores taxonómicos identificados por medio del análisis *Linear Discriminant Analysis Effect Size* (LEfSe) de la microbiota fecal de los *C. intermedius* jóvenes y adultos. Se utilizó un valor de $P < 0.05$ y un valor LDA > 2.5 .

OTU	logMax Mean	Grupo	LDA	pValue	Taxonomía
Otu0008	462.662	Adulto	400.418	0.0457711	Bacteria(100);Firmicutes(100);Clostridia(100);Clostridiales(100);Peptostreptococcaceae(100);Paeniclostridium(100);
Otu0010	473.569	Adulto	42.708	0.00115274	Bacteria(100);Firmicutes(100);Clostridia(100);Clostridiales(100);Clostridiaceae_1(100);Clostridium_sensu_stricto(100);
Otu0011	406.695	Adulto	367.878	0.0457711	Bacteria(100);Firmicutes(100);Clostridia(100);Clostridiales(100);Clostridiaceae_1(100);Clostridium_sensu_stricto(96);
Otu0013	444.732	Adulto	363.457	0.0342937	Bacteria(100);Firmicutes(100);Clostridia(100);Clostridiales(100);Clostridiaceae_1(100);Clostridium_sensu_stricto(99);
Otu0015	447.724	Adulto	395.309	0.039692	Bacteria(100);Firmicutes(100);Clostridia(100);Clostridiales(100);Clostridiaceae_1(100);Clostridiaceae_1_unclassified(99);
Otu0018	406.741	Adulto	371.106	0.00665722	Bacteria(100);Firmicutes(100);Clostridia(100);Clostridiales(100);Clostridiales_Incertae_Sedis_XI(100);Sedimentibacter(100);
Otu0026	375.928	Adulto	318.441	0.00258025	Bacteria(100);Firmicutes(100);Firmicutes_unclassified(100);Firmicutes_unclassified(100);Firmicutes_unclassified(100);Firmicutes_unclassified(100);
Otu0038	315.784	Juvenil	267.955	0.029467	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonadaceae(100);Comamonadaceae_unclassified(97);
Otu0041	313.801	Juvenil	294.753	0.0245519	Bacteria(100);Firmicutes(100);Bacilli(100);Lactobacillales(100);Lactobacillaceae(100);Lactilactobacillus(100);
Otu0043	346.135	Adulto	311.687	0.000476336	Bacteria(100);Firmicutes(100);Negativicutes(100);Selenomonadales(100);Sporomusaceae(100);Sporomusaceae_unclassified(100);
Otu0045	328.371	Adulto	27.283	0.00795729	Bacteria(100);Firmicutes(100);Clostridia(100);Clostridiales(100);Clostridiales_Incertae_Sedis_XI(98);Sedimentibacter(98);
Otu0050	328.557	Adulto	28.418	0.0025691	Bacteria(100);Firmicutes(100);Clostridia(100);Clostridiales(100);Clostridiaceae_1(100);Clostridium_sensu_stricto(87);
Otu0051	316.767	Adulto	2.825	0.00237348	Bacteria(100);Firmicutes(100);Clostridia(100);Clostridiales(100);Ruminococcaceae(100);Ruminococcaceae_unclassified(100);
Otu0052	334.477	Adulto	299.921	0.0394771	Bacteria(100);Bacteroidetes(100);Bacteroidia(100);Bacteroidales(100);Odoribacteraceae(100);Odoribacter(100);
Otu0058	31.743	Adulto	270.372	0.00362575	Bacteria(100);Firmicutes(100);Erysipelotrichia(100);Erysipelotrichales(100);Erysipelotrichaceae(100);Erysipelotrichaceae_unclassified(100);
Otu0060	302.008	Adulto	238.125	0.0456768	Bacteria(100);Firmicutes(100);Clostridia(100);Clostridiales(100);Clostridiales_unclassified(100);Clostridiales_unclassified(100);
Otu0061	317.178	Juvenil	275.709	0.0367365	Bacteria(100);Fusobacteria(100);Fusobacteriia(100);Fusobacteriales(100);Fusobacteriaceae(100);Cetobacterium(84);

Otu0064	318.083	Adulto	255.374	0.0185124	Bacteria(100);Bacteroidetes(100);Bacteroidetes_unclassified(100);Bacteroidetes_unclassified(100);Bacteroidetes_unclassified(100);Bacteroidetes_unclassified(100);
Otu0065	326.275	Adulto	29.619	0.0358634	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonadaceae(100);Comamonas(99);
Otu0068	303.846	Juvenil	266.158	0.0196413	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Hafniaceae(100);Edwardsiella(100);
Otu0071	311.201	Adulto	272.311	0.00172592	Bacteria(100);Firmicutes(100);Clostridia(100);Clostridiales(100);Lachnospiraceae(100);Lachnospiraceae_unclassified(100);
Otu0074	344.498	Adulto	317.423	0.0136976	Bacteria(100);Firmicutes(100);Bacilli(100);Bacillales(100);Bacillaceae_1(98);Bacillaceae_1_unclassified(98);
Otu0093	297.423	Adulto	26.367	0.000268272	Bacteria(100);Bacteroidetes(100);Bacteroidia(100);Bacteroidales(100);Bacteroidales_unclassified(100);Bacteroidales_unclassified(100);
Otu0158	234.679	Adulto	205.459	0.00164045	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Xanthomonadaceae(100);Xanthomonadaceae_unclassified(100);
Otu0169	253.608	Adulto	22.963	0.00142991	Bacteria(100);Firmicutes(100);Negativicutes(100);Selenomonadales(100);Sporomusaceae(98);Sporomusaceae_unclassified(98);
Otu0191	254.889	Adulto	228.308	0.012861	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Moraxellaceae(100);Acinetobacter(100);

10. Bibliografía

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., ... Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174-180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>

Abdelrhman, K. F. A., Bacci, G., Mancusi, C., Mengoni, A., Serena, F., & Ugolini, A. (2016). A First Insight Into the Gut Microbiota of the Sea Turtle *Caretta caretta*. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01060>

Ainsworth, T. D., Krause, L., Bridge, T., Torda, G., Raina, J.-B., Zakrzewski, M., Gates, R. D., Padilla-Gamiño, J. L., Spalding, H. L., Smith, C., Woolsey, E. S., Bourne, D. G., Bongaerts, P., Hoegh-Guldberg, O., & Leggat, W. (2015). The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts. *The ISME Journal*, 9(10), 2261-2274. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.39>

Alduina, R., Gambino, D., Presentato, A., Gentile, A., Sucato, A., Savoca, D., Filippello, S., Visconti, G., Caracappa, G., Vicari, D., & Arculeo, M. (2020). Is *Caretta caretta* a carrier of antibiotic resistance in the Mediterranean Sea? *Antibiotics*, 9(3), 116. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030116>

Balaguera-Reina, S.A., Espinosa-Blanco, A., Antelo, R., Morales-Betancourt, M. & Seijas, A. (2018). *Crocodylus intermedius*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T5661A3044743. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-1.RLTS.T5661A3044743.en>. Downloaded on 10 November 2020.

Bjorndal, K. A., Parsons, J., Mustin, W., & Bolten, A. B. (2013). Threshold to maturity in a long-lived reptile: Interactions of age, size, and growth. *Marine Biology*, 160(3), 607-616. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-2116-1>

Bolton, M. (1982). CROCODILES AS FARM ANIMALS. Assistance to the Crocodile Skin Industry; FAO. <https://www.fao.org/3/T0226E/t0226e00.htm#cont>

Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335-336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>

Carvajal-Restrepo, H., Sánchez-Jiménez, M. M., Diaz-Rodríguez, S., & Cardona-Castro, N. (2017). Detection of *Salmonella* human carriers in Colombian outbreak areas. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 11(03), 228–233. <https://doi.org/10.3855/jidc.8023>

Castañeda-Monsalve, V. A., Junca, H., García-Bonilla, E., Montoya-Campuzano, O. I., & Moreno-Herrera, C. X. (2019). Characterization of the gastrointestinal bacterial microbiome of farmed juvenile and adult white Cachama (*Piaractus brachypomus*). *Aquaculture*, 512, 734325. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734325>

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2008). Multistate outbreak of human salmonella infections associated with exposure to turtles—United states, 2007-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 299(16), 1892. <https://doi.org/10.1001/jama.299.16.1892>

Chang, F., He, S., & Dang, C. (2022). Assisted selection of biomarkers by linear discriminant analysis effect size (Lefse) in microbiome data. *Journal of Visualized Experiments*, 183, 61715. <https://doi.org/10.3791/61715>

Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.* 11, 265–270.

Choi, S.-Y., Choi, B.-H., Cha, J.-H., Lim, Y.-J., Sheet, S., Song, M.-J., Ko, M.-J., Kim, N.-Y., Kim, J.-S., Lee, S.-J., Oh, S.-I., & Park, W.-C. (2022). Insight into the fecal microbiota signature associated with growth specificity in korean jindo using 16s rna sequencing. *Animals*, 12(19), 2499. <https://doi.org/10.3390/ani12192499>

Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R., & Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, *42*(Database issue), D633-D642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>

Costa, M. C., & Weese, J. S. (2018). Understanding the intestinal microbiome in health and disease. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, *34*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2017.11.005>

Costa, M., & Weese, J. S. (2019). Methods and basic concepts for microbiota assessment. *The Veterinary Journal*, *249*, 10-15. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.05.005>

Costello, E. K., Gordon, J. I., Secor, S. M., & Knight, R. (2010). Postprandial remodeling of the gut microbiota in Burmese pythons. *The ISME Journal*, *4*(11), 1375–1385. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.71>

Coyte, K. Z., Rao, C., Rakoff-Nahoum, S., & Foster, K. R. (2021). Ecological rules for the assembly of microbiome communities. *PLOS Biology*, *19*(2), e3001116. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001116>

Donoghue, S., & McKeown, S. (1999). Nutrition of captive reptiles. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, *2*(1), 69-91. [https://doi.org/10.1016/S1094-9194\(17\)30140-8](https://doi.org/10.1016/S1094-9194(17)30140-8)

Gomez DE, Li L, Goetz H, MacNicol J, Gamsjaeger L, Renaud DL. Calf diarrhea is associated with a shift from obligated to facultative anaerobes and expansion of lactate-producing bacteria. *Front Vet Sci*. 2022;9:846383

Hansen, A. K., Hansen, C. H. F., Krych, L., & Nielsen, D. S. (2014). Impact of the gut microbiota on rodent models of human disease. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(47), 17727–17736. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i47.17727>

Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., Global Rumen Census Collaborators, Abecia, L., Angarita, E., Aravena, P., Nora Arenas, G., Ariza, C., Attwood, G. T., Mauricio Avila, J., Avila-Stagno, J., Bannink, A., Barahona, R., Batistotti, M., Bertelsen, M. F., Brown-Kav, A., ... Janssen, P. H. (2015). Rumen microbial community

composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports*, 5(1), 14567. <https://doi.org/10.1038/srep14567>

Hoelzer, K., Moreno Switt, A., & Wiedmann, M. (2011). Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Veterinary Research*, 42(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-34>

Holmes I, Harris K, Quince C (2012) Dirichlet Multinomial Mixtures: Generative Models for Microbial Metagenomics. *PLoS ONE* 7(2): e30126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030126>

Hong, P.-Y., Wheeler, E., Cann, I. K. O., & Mackie, R. I. (2011). Phylogenetic analysis of the fecal microbial community in herbivorous land and marine iguanas of the Galápagos Islands using 16S rRNA-based pyrosequencing. *The ISME Journal*, 5(9), 1461-1470. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.33>

Jaccard P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Nature*. 1908;44:223–70.

Jeffree, R. A., Markich, S. J., & Tucker, A. D. (2005). Patterns of metal accumulation in osteoderms of the Australian freshwater crocodile, *Crocodylus johnstoni*. *Science of The Total Environment*, 336(1-3), 71-80. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.05.021>

Jiménez, R. R., & Sommer, S. (2017). The amphibian microbiome: Natural range of variation, pathogenic dysbiosis, and role in conservation. *Biodiversity and Conservation*, 26(4), 763-786. <https://doi.org/10.1007/s10531-016-1272-x>

Kapa hifi hotstart readymix. (s. f.). Roche Sequencing Store. Recuperado 17 de julio de 2023, de <https://rochesequencingstore.com/catalog/kapa-hifi-hotstart-readymix/>

Keenan, S. W., & Elsey, R. M. (2015). The good, the bad, and the unknown: Microbial symbioses of the American Alligator. *Integrative and Comparative Biology*, 55(6), 972–985. <https://doi.org/10.1093/icb/icv006>

Keenan, S. W., Engel, A. S., & Elsey, R. M. (2013). The alligator gut microbiome and implications for archosaur symbioses. *Scientific Reports*, 3(1), 2877. <https://doi.org/10.1038/srep02877>

Kohl, K. D., Brun, A., Magallanes, M., Brinkerhoff, J., Laspiur, A., Acosta, J. C., Caviedes-Vidal, E., & Bordenstein, S. R. (2017). Gut microbial ecology of lizards: Insights into

diversity in the wild, effects of captivity, variation across gut regions and transmission. *Molecular Ecology*, 26(4), 1175–1189. <https://doi.org/10.1111/mec.13921>

Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(17):5112–20.

Kuczynski, J., Lauber, C. L., Walters, W. A., Parfrey, L. W., Clemente, J. C., Gevers, D., & Knight, R. (2012). Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nature Reviews Genetics*, 13(1), 47-58. <https://doi.org/10.1038/nrg3129>

Laborda, P., Sanz-García, F., Ochoa-Sánchez, L. E., Gil-Gil, T., Hernando-Amado, S., & Martínez, J. L. (2022). Wildlife and antibiotic resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 873989. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.873989>

Lance, V. A., Morici, L. A., Elsey, R. M., Lund, E. D., & Place, A. R. (2001). Hyperlipidemia and reproductive failure in captive-reared alligators: Vitamin E, vitamin A, plasma lipids, fatty acids, and steroid hormones. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 128(2), 285-294. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(00\)00321-3](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(00)00321-3)

Lee, S. H., Lee, H., You, H. S., Sung, H., & Hyun, S. H. (2023). Metabolic pathway prediction of core microbiome based on enterotype and orotype. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2023.1173085>

Li, P., Ma, X., Liu, D., Wei, Y., Li, P., Hou, H., Yao, J., Chen, A., Liang, Y., Zhou, Z., & Wang, P. (2022). A microbiome abundant environment remodels the intestinal microbiota and improves resistance to obesity induced by chlorpyrifos in mice. *Environmental Pollution*, 315, 120415. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120415>

Mag-bind® rxnpure plus | Omega Bio-Tek. (s. f.). Recuperado 17 de julio de 2023, de <https://www.omegabiotek.com/product/mag-bind-rxnpure-plus/>

Merchant, M., & Britton, A. (2006). Characterization of serum complement activity of saltwater (*Crocodylus porosus*) and freshwater (*Crocodylus johnstoni*) crocodiles.

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 143(4), 488-493. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.01.009>

McDermid, K. J., Kittle, R. P., Veillet, A., Plouviez, S., Muehlstein, L., & Balazs, G. H. (2020). Identification of Gastrointestinal Microbiota in Hawaiian Green Turtles (*Chelonia mydas*). *Evolutionary Bioinformatics*, 16, 117693432091460. <https://doi.org/10.1177/1176934320914603>

Mshelia, E. S., Adamu, L., Wakil, Y., Turaki, U. A., Gulani, I. A., & Musa, J. (2018). The association between gut microbiome, sex, age and body condition scores of horses in Maiduguri and its environs. *Microbial Pathogenesis*, 118, 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.018>

Morales-Betancourt, M. A., Lasso, C. A., Páez, V. P., & Bock, B. C. (2015). Libro rojo de reptiles de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt.

Morales-Betancourt, M. A., C., Lasso A., J. De La Ossa V. & Fajardo-Patiño A. (Editores). (2013). VIII. Biología y conservación de los Crocodylia de Colombia. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, D. C., Colombia, 336 pp

NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers. (s. f.). Recuperado 17 de julio de 2023, de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-2000C>

Oonincx, D., & Van Leeuwen, J. (2017). Evidence-based reptile housing and nutrition. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 20(3), 885-898. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2017.04.004>

Ottman, N., Smidt, H., De Vos, W. M., & Belzer, C. (2012). The function of our microbiota: Who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00104>

Pawlak, A., Morka, K., Bury, S., Antoniewicz, Z., Wzorek, A., Cieniuch, G., Korzeniowska-Kowal, A., Cichoń, M., & Bugla-Płoskońska, G. (2020). Cloacal gram-negative microbiota in free-living grass snake *Natrix natrix* from Poland. *Current Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02021-3>

Qiagen (2020) *DNeasy Blood and Tissue Kit*. <https://www.qiagen.com/us/shop/pcr/dneasy-blood-and-tissue-kit/#orderinginformation>

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

Ramey, A. M., & Ahlstrom, C. A. (2020). Antibiotic resistant bacteria in wildlife: Perspectives on trends, acquisition and dissemination, data gaps, and future directions. *Journal of Wildlife Diseases*, 56(1), 1. <https://doi.org/10.7589/2019-04-099>

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>

Romão, M. F., Santos, A. L. Q., Lima, F. C., De Simone, S. S., Silva, J. M. M., Hirano, L. Q., Vieira, L. G., & Pinto, J. G. S. (2011). Anatomical and topographical description of the digestive system of *Caiman crocodilus* (Linnaeus 1758), *Melanosuchus niger* (Spix 1825) and *Paleosuchus palpebrosus* (Cuvier 1807). *International Journal of Morphology*, 29(1), 94-99. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022011000100016>

Ruzauskas, M., Misyte, S., Vaskeviciute, L., Mikniene, Z., Siugzdiniene, R., Klimiene, I., Pikuniene, A., & Kucinskiene, J. (2016). Gut microbiota isolated from the European pond turtle (*Emys orbicularis*) and its antimicrobial resistance. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(4), 723–730. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0091>

Saldarriaga-Gómez, A. M., Ardila-Robayo, M. C., Medem, F., & Vargas-Ramírez, M. (2023). Hope is the last thing lost: Colombian captive-bred population of the critically endangered Orinoco crocodile (*Crocodylus intermedius*) is a genetic reservoir that could help to save the species from extinction. *Nature Conservation*, 53, 85-103. <https://doi.org/10.3897/natureconservation.53.104000>

Schneider, G. (2005). Dictionary of bioinformatics and computational biology. Edited by John M. Hancock and Marketa J. Zvelebil. *ChemBioChem*, 6(7), 1287-1287. <https://doi.org/10.1002/cbic.200500190>

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>

Scheelings, T. F. (2020). Geriatric reptiles and amphibians. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 23(3), 485-502. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2020.05.004>

Scheelings, T. F., Moore, R. J., Van, T. T. H., Klaassen, M., & Reina, R. D. (2020). No correlation between microbiota composition and blood parameters in nesting Flatback turtles (*Natator depressus*). *Scientific Reports*, 10(1), 8333. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65321-5>

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537-7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>

Schmidt, V., Mock, R., Burgkhardt, E., Junghanns, A., Ortlieb, F., Szabo, I., Marschang, R., Blindow, I., & Krautwald-Junghanns, M.-E. (2014). Cloacal aerobic bacterial flora and absence of viruses in free-living slow worms (*Anguis fragilis*), grass snakes (*Natrix natrix*) and european adders (*Vipera berus*) from Germany. *EcoHealth*, 11(4), 571–580. <https://doi.org/10.1007/s10393-014-0947-6>

Sha, J. C. M., Ismail, R., Marlana, D., & Lee, J. L. (2016). Environmental complexity and feeding enrichment can mitigate effects of space constraints in captive callitrichids. *Laboratory Animals*, 50(2), 137-144. <https://doi.org/10.1177/0023677215589258>

Shaharabany, M. (1999). Naturally occurring antibacterial activities of avian and crocodile tissues. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44(3), 416-418. <https://doi.org/10.1093/jac/44.3.416>

Shannon, C.E. (1948) A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal*, 27, 379-423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>

- Shade, A., & Handelsman, J. (2012). Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome: The hunt for a core microbiome. *Environmental Microbiology*, 14(1), 4-12. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x>
- Shafquat, A., Joice, R., Simmons, S. L., & Huttenhower, C. (2014). Functional and phylogenetic assembly of microbial communities in the human microbiome. *Trends in Microbiology*, 22(5), 261-266. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.011>
- Siddiqui, R., Maciver, S. K., & Khan, N. A. (2022). Gut microbiome-immune system interaction in reptiles. *Journal of Applied Microbiology*, 132(4), 2558-2571. <https://doi.org/10.1111/jam.15438>
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *Nature*, 163(4148), 688-688. <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Singh, S., Sharma, P., Sarma, D. K., Kumawat, M., Tiwari, R., Verma, V., Nagpal, R., & Kumar, M. (2023). Implication of obesity and gut microbiome dysbiosis in the etiology of colorectal cancer. *Cancers*, 15(6), 1913. <https://doi.org/10.3390/cancers15061913>
- Van Meervenne, E., Botteldoorn, N., Lokietek, S., Vatlet, M., Cupa, A., Naranjo, M., Dierick, K., & Bertrand, S. (2009). Turtle-associated *Salmonella* septicaemia and meningitis in a 2-month-old baby. *Journal of Medical Microbiology*, 58(10), 1379–1381. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.012146-0>
- Vicino, G. A., Sheftel, J. J., & Radosevich, L. M. (2022). Enrichment is simple, that's the problem: Using outcome-based husbandry to shift from enrichment to experience. *Animals*, 12(10), 1293. <https://doi.org/10.3390/ani12101293>
- Vitt, L. J., & Caldwell, J. P. (2013). *Herpetology: An introductory biology of amphibians and reptiles* (Fourth edition). Elsevier, AP, Academic Press is an imprint of Elsevier.
- West, A. G., Waite, D. W., Deines, P., Bourne, D. G., Digby, A., McKenzie, V. J., & Taylor, M. W. (2019). The microbiome in threatened species conservation. *Biological Conservation*, 229, 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.11.016>
- Yue JC, Clayton MK. A Similarity Measure Based on Species Proportions. *Commun Stat Methods*. 2005;34(11):2123–31.

Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: The hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5), 723–735. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x>

Zhang, Y., Qi, X., Zhang, Z., Jin, Z., Wang, G., & Ling, F. (2023). Effects of dietary *Cetobacterium somerae* on the intestinal health, immune parameters and resistance against *Nocardia seriolae* of largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 135, 108693. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108693>

Zhao, Y., Li, S., Lessing, D. J., Guo, L., & Chu, W. (2023). Characterization of *Cetobacterium somerae* CPU-CS01 isolated from the intestine of healthy crucian carp (*Carassius auratus*) as potential probiotics against *Aeromonas hydrophila* infection. *Microbial Pathogenesis*, 180, 106148. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106148>