

Facultad de Ciencias, Universidad de la República
Laboratorio de Zoología Vertebrados, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

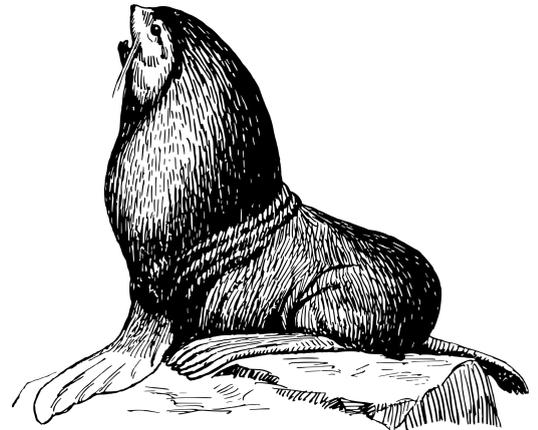
PEDECIBA Biología, Subárea Ecología y Evolución
Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Caracterización de la microbiota intestinal de mamíferos marinos varados en la costa uruguaya

Autor: Lic. Dalma Soñez

Orientadora: Dra. Diana Szteren. Laboratorio de
Zoología Vertebrados, Facultad de Ciencias, Universidad
de la República

Co-orientadora: Dra. Claudia Piccini. Laboratorio de Ecología Microbiana Acuática,
Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente
Estable, Ministerio de Educación y Cultura



Montevideo, Uruguay
2025

Agradecimientos

Agradezco profundamente a mis directoras de tesis, la Dra. Diana Szteren y la Dra. Claudia Piccini, por su acompañamiento constante a lo largo de estos años de maestría, por compartir generosamente su conocimiento y por ayudarme a potenciar y consolidar este proyecto.

A mi familia, que me apoya incondicionalmente desde el primer día en este largo y desafiante camino que es la ciencia. A mis compañeros de vida, Ale y Salva, por impulsarme y potenciarme a seguir creciendo en lo que amo. A mis amigas, gracias por bancar en todo momento; a quienes se fueron antes de tiempo, a las de facultad que siguen caminando a mi lado. A mis colegas y amigos del CURE, que también me acompañaron en este proceso.

A mis compañeros y compañeras de laboratorio, tanto de la Facultad de Ciencias como del IIBCE, por hacer cada jornada más llevadera y por estar siempre dispuestos a colaborar.

A mis colegas Lucía, Rosina, Meica, Diana, Emilia, a las guardaparques de Cabo Polonio Yessica, Sabrina, Clara y Leila, gracias por su apoyo en la asistencia a los varamientos y la toma de muestras.

A los colegas del CICESE, por hacer de mi estancia en México una gran oportunidad de aprendizaje y especialización; en particular, a la Dra. Asunción y la Dra. Gisela por abrirme las puertas de su laboratorio, y al Dr. Mario por compartir su experiencia en bioinformática y ayudarme con el análisis de datos.

Agradezco también a ANII por confiar en esta investigación a través del financiamiento de la beca, y a CSIC por apoyar el desarrollo del estudio mediante el Fondo de Iniciación a la investigación, herramientas fundamentales para seguir construyendo ciencia nacional.

A DINARA y al Ministerio de Ambiente por facilitar los permisos de colecta.

Y una vez más, a la educación pública uruguaya, por permitirme formarme y continuar este camino científico. Porque como leí cada vez que entré al IIBCE durante estos años: *“Con ciencia grande no hay país pequeño.”*



Tabla de contenidos

1. Introducción	5
1.1 Hipótesis	11
1.1.2 Predicciones	11
1.2 Objetivo	12
1.2.1 Objetivos específicos	12
2. Materiales y métodos	12
2.1 Colecta de muestras en campo	12
2.2 Análisis de laboratorio	13
2.2.1 Extracción de ADN y secuenciación del gen para el ARNr 16S	13
2.3 Análisis de datos	14
2.3.1 Análisis bioinformático	14
2.3.2 Análisis de datos	15
3. Resultados	17
3.1 Secuenciación del gen 16S ARNr	19
3.2 Diversidad alfa de la comunidad total	21
3.3 Caracterizaciones y comparaciones entre secciones intestinales	23
3.4 Caracterizaciones y comparaciones intraespecíficas	25
3.4.1 <i>Arctocephalus australis</i>	25
3.4.2 <i>Otaria flavescens</i>	26
3.4.3 <i>Pontoporia blainvillei</i>	27
3.4.4 <i>Tursiops truncatus</i>	27
3.4.5 <i>Phocoena spinipinnis</i>	28
3.4.6 <i>Phocoena dioptrica</i>	28
3.5 Caracterización y comparaciones interespecíficas	31
3.5.1 Caracterización de la estructura microbiana de <i>Arctocephalus australis</i>	31
3.5.2 Caracterización de la estructura microbiana de <i>Otaria flavescens</i>	32
3.5.3 Caracterización de la estructura microbiana de <i>Pontoporia blainvillei</i>	32
3.5.4 Caracterización de la estructura microbiana de <i>Tursiops truncatus</i>	33
3.5.5 Caracterización de la estructura microbiana de <i>Phocoena spinipinnis</i>	34
3.5.6 Caracterización de la estructura microbiana de <i>Phocoena dioptrica</i>	35
3.5.7 Caracterización de la estructura microbiana de <i>Delphinus delphis</i>	36
3.6 Comparación de la estructura microbiana entre las especies	37
3.6.1 Comparaciones entre cetáceos y pinnípedos	40
3.6.2 Comparaciones entre especies con hábitos costeros y pelágicos	41
4. Discusión	44
4.1 Composición y diversidad de la microbiota	44
4.2 Comparaciones intraindividuales	45
4.3 Caracterizaciones y comparaciones intraespecíficas	46
4.3.1 Semejanzas entre especies	46
4.3.2 Diferencias entre especies	48
4.4 Comparaciones interespecíficas	51
5. Conclusiones y perspectivas	53
6. Referencias bibliográficas	55
7. Anexo	63

Resumen

La microbiota, compuesta principalmente por bacterias, cumple un rol clave en la salud de los mamíferos y en procesos fisiológicos como la absorción de nutrientes. Esta estructura puede ser modulada por factores distintos como la dieta, el ambiente y la filogenia. A pesar de la gran importancia de conocer la estructura microbiana, actualmente para mamíferos marinos la información a nivel global es limitada. En Uruguay, varias especies de mamíferos marinos varan en las costas, siendo *Pontoporia blainvillei*, *Otaria flavescens* y *Arctocephalus australis* las más frecuentes. Sin embargo, su composición microbiana aún es desconocida en el país. Este estudio busca caracterizar y comparar las microbiotas intestinales a nivel intraindividual, intraespecífico e interespecífico, aportando datos valiosos para la conservación y salud de estas especies, llenando vacíos de conocimiento regionales sobre microbiotas marinas. Para ello, se colectaron muestras de 3 secciones diferentes del intestino de 21 individuos de 7 especies de mamíferos marinos varados en las costas de Montevideo, Canelones, Maldonado y Rocha. Se realizó la extracción y purificación del ADN para obtener la composición microbiana a través de secuencias correspondientes a la región V3-V4 del gen 16S. Se analizaron los microbiomas mediante los paquetes DADA2 y Phyloseq en R, evaluando calidad, diversidad alfa y beta y la abundancia relativa. Posteriormente se compararon entre especies, secciones intestinales y hábitos alimentarios (costeros y pelágicos). Se aplicaron NMDS, PERMANOVA y DESeq2 para comparar diferencias en la composición y abundancia microbiana. Las comunidades bacterianas estuvieron dominadas por *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteriota* y *Bacteroidota*, presentando diferencias entre especies e individuos. Así como también entre distintos grupos taxonómicos o hábitos tróficos. Además, se detectaron potenciales patógenos que sido asociados previamente a enfermedades en mamíferos marinos y humanos. En algunos casos coincidieron con individuos que presentaron mala condición corporal, sugiriendo una posible relación con su estado de salud. A nivel intraindividual, no se observaron diferencias, a excepción de *A. australis* que presentó una leve diferenciación en la composición de las secciones intestinales. Estos resultados constituyen una línea de base fundamental para futuras investigaciones sobre la salud, ecología y conservación de mamíferos marinos en Uruguay, resaltando la importancia del estudio del microbioma en contextos ambientales y sanitarios.

Palabras clave: *microbiota intestinal; cetáceos; pinnípedos; ARNr 16S; bacterias*

1. Introducción

La microbiota: definición, composición y funciones

La microbiota está formada por diversas bacterias, arqueas, virus, hongos y otros microorganismos que habitan ambientes específicos, tienen un rol fundamental en los individuos y se caracterizan por responder rápidamente a los cambios en el ambiente y a presiones tanto bióticas como abióticas (Sender et al., 2016; Ost y Round, 2018; Sehnal et al. 2021; Paerl et al., 2003). Las bacterias son el componente principal de la microbiota. La alta sensibilidad de estos organismos a las condiciones ambientales las transforma en indicadores ecológicos de la salud de ecosistemas y de huéspedes específicos (Sehnal et al. 2021). En este sentido, la microbiota cumple un rol fundamental como indicativo de la salud de los ecosistemas acuáticos debido a que algunas bacterias pueden encontrarse en temperaturas y salinidades extremas o en sitios contaminados. Por otra parte, el microbioma engloba de manera más integrativa no solo los microorganismos que componen la microbiota, sino también genomas y productos de su metabolismo. De esta manera, el microbioma se define como el conjunto de genes presentes en las células que componen la microbiota (Zunino, 2022).

En los últimos años, ha crecido notablemente el reconocimiento del papel fundamental que cumple la microbiota en la biología, ecología y evolución de todos los seres vivos (Ley et al., 2008; Álvarez Calatayud et al., 2018; Hou et al., 2022). Esta visión ha llevado al surgimiento de conceptos como el de holobionte, que considera al organismo y su comunidad microbiana como una unidad ecológica y evolutiva inseparable (Margulis and Fester, 1991; Guerrero et al., 2013). Se ha encontrado que prácticamente todos los organismos estudiados, incluso algunos microbios, mantienen asociaciones constantes con comunidades microbianas y virales. Estas asociaciones no sólo son fundamentales para realizar funciones clave como la nutrición, la inmunidad o la adaptación al ambiente, sino que además pueden responder colectivamente a perturbaciones ambientales, reorganizando sus componentes o sus proporciones internas (Gordon et al., 2013). Bajo esta perspectiva, la selección natural podría actuar sobre el conjunto del holobionte, y no únicamente sobre el hospedador en forma aislada. Esto ha promovido una

comprensión más integrada y compleja de los sistemas vivos y subraya la importancia de investigar la microbiota en todos los niveles.

Rol de la microbiota en la salud de los mamíferos

La microbiota se puede clasificar en microbiota intestinal, oral, respiratoria y cutánea dependiendo del área del organismo donde se encuentra en un animal (Hou et al., 2022). La microbiota intestinal es la principal contribuyente en la digestión dado que enfermedades y mantenimiento de la salud de los individuos, previniendo infecciones y enfermedades (Bik et al., 2016; Wan et al. 2018; Marón et al. 2019; los microorganismos que allí se encuentran tienen un rol decisivo en muchos procesos fisiológicos, como la absorción de nutrientes, el desarrollo de Abdelrhman et al., 2020; Bai et al., 2021a,b). Estos organismos son cruciales para mantener la homeostasis biológica, tienen un rol importante en el mantenimiento del metabolismo en los mamíferos, en la regulación del sistema inmune del hospedador y la defensa de patógenos. Por lo tanto, su estudio puede servir para revelar la presencia de patógenos y conocer el estado de salud de los animales (Delport et al. 2016). Varios estudios han revelado que comunidades bacterianas en distintos mamíferos como por ejemplo en leones marinos, pueden producir enfermedades zoonóticas, como gastritis (*Helicobacter* spp.), dermatitis bacteriana y conjuntivitis (Hermosilla et al. 2018; Cicala et al. 2022). La comunidad bacteriana intestinal en los mamíferos les provee de una fuente de energía adicional vía fermentación de carbohidratos no digeribles, es una fuente de vitaminas y contribuye al desarrollo del sistema nervioso central luego del nacimiento (Kabouridis et al., 2015). A cambio, el mamífero hospedador ofrece nutrientes y un ambiente estable a la comunidad bacteriana, estableciéndose una relación simbiótica que garantiza la supervivencia del organismo-comunidad (Numberger et al. 2016).

Existen diferentes formas de caracterizar y conocer la comunidad microbiana de los mamíferos: el análisis de tejido intestinal en animales muertos (e.g. Wan et al., 2018; Tian et al., 2020), la recolección de fecas en la naturaleza o los hisopados rectales en animales vivos (e.g. Bai et al., 2021a; Bai et al., 2021b; Watkins et al., 2022). Actualmente, las caracterizaciones microbianas se pueden realizar a través de distintas metodologías, como por ejemplo analizando el gen que codifica la

subunidad 16S ARNr para bacterias y archaeas o la subunidad 18S para eucariotas dependiendo de los objetivos específicos del estudio. Particularmente, las regiones V3 y V4 del gen 16S ARNr son las más utilizadas en los estudios de mamíferos marinos reportados para realizar caracterizaciones taxonómicas (Soñez y Szteren, 2025), sin embargo, también se han utilizado otras regiones alternativas (e.g. V1, V2, V5) (e.g. Cicala et al., 2022; Ramirez-Delgado et al., 2022).

Factores que modulan la estructura de la microbiota en mamíferos

Uno de los factores más importantes que estructuran la microbiota intestinal es la dieta de los individuos, ya que ésta modula la composición y función microbiana. Sin embargo, otros parámetros como el ambiente también pueden influir en la diversidad de la microbiota en diferentes poblaciones de mamíferos marinos (Ley et al., 2008; Abdelrhman et al., 2020), como la localización geográfica. Por ejemplo, se encontró que dos poblaciones geográficamente aisladas de focas de Weddell (*Leptonychotes weddelli*) en la Antártida difieren en la diversidad y composición de su microbiota intestinal. Estas diferencias podrían deberse a la dieta, tamaño corporal y/o tamaño poblacional (Banks et al., 2014; Sehnal et al., 2021). Por otro lado, se han reportado diferencias en la diversidad microbiana de leones marinos australianos (*Neophoca cinerea*) debidas a la presencia de contaminantes en sus tejidos, la proximidad de humanos y colonias de otras especies, la escorrentía de aguas residuales, la zona y composición de la alimentación, la dinámica de la colonia y aspectos comportamentales (Delport et al., 2016, Sehnal et al., 2021).

Además del hábitat y la dieta, se ha reportado que la microbiota intestinal está asociada con el linaje, resultando en fuertes asociaciones filogenéticas (Nishida y Ochman 2017). En la misma línea, las diferencias en la microbiota intestinal de focas de Weddell y elefantes marinos del sur en Antártida, se asociaron a la filogenia de los huéspedes y no a la similitud de su dieta (Kim et al. 2020), apoyando la idea de la coevolución de los microbiomas intestinales en sus huéspedes. Por otro lado, hay estudios que afirman que la microbiota puede variar entre distintas regiones intestinales, en relación con las distintas funciones digestivas. Se conoce muy poco acerca de la composición de la microbiota en distintos segmentos intestinales, por lo que la comparación entre la microbiota de diferentes regiones,

puede aportar información del proceso digestivo y del metabolismo. Por ejemplo, Tian et al. (2020) reportaron diferencias en la microbiota proveniente del ciego, colon y recto con respecto al duodeno y yeyuno en la ballena Minke (*Balaenoptera acutorostrata*) y concluyen que la microbiota era significativamente dependiente de la localización anatómica, observando que las secciones posteriores eran más diversas en bacterias que el intestino interior y que el duodeno y yeyuno estaban enriquecidos por bacterias similares, mientras que el intestino grueso presentaba abundantes *Clostridiales*.

Además, hay estudios que han demostrado que no solo los hábitats a nivel geográfico determinan la microbiota, sino que también puede diferir en animales de la misma especie que se encuentran en estado salvaje y en cautivero, lo que puede deberse además a alteraciones de la dieta natural de los individuos en estado salvaje (Nelson et al., 2013). En particular, la mayoría de los estudios, analizaron estructuras microbianas de animales en estado salvaje, particularmente en colonias de pinnípedos donde colectan heces, lo que permite alcanzar un buen número de muestras. A su vez, el estado de salud de los individuos también puede variar la composición microbiana dentro de un mismo grupo, por lo que tener información sobre proxies de salud y éxito reproductivo como el espesor de la capa de grasa es importante a la hora de analizar el estado externo del animal con su microbiota, teniendo en cuenta que su uso exclusivo puede ofrecer una visión limitada (Deros et al., 2020), por lo que es fundamental observar la presencia de patógenos y otros factores.

La microbiota en mamíferos marinos: un campo en desarrollo

A pesar de la importancia de conocer la microbiota intestinal, aún es poco lo que se sabe en relación a los mamíferos marinos (Bik et al., 2016; Bai et al., 2021; Sehnal et al. 2021), quizás debido a que son elusivos, protegidos, migratorios o demasiado grandes para capturar, lo que dificulta la obtención de muestras (Medeiros et al. 2016). Los mamíferos marinos juegan roles esenciales en los ecosistemas marinos como depredadores tope, consumidores primarios y secundarios y como indicadores de la salud del océano (Estes et al, 2011; Dierauf y Gulland 2018). En relación con la conservación de estos grupos de mamíferos, los análisis de

microbiota constituyen una técnica relativamente nueva, emergente, no invasiva que permite entender mecanismos adaptativos de diferentes dietas y hábitats (Tian et al. 2020). Además, el análisis de las muestras es de alto rendimiento, rápido y no tan costoso en comparación con identificaciones morfológicas (Sehnal et al. 2021).

Los estudios publicados hasta el momento sobre composiciones microbianas en mamíferos marinos, han proporcionado información relevante de diversas especies. En una revisión bibliométrica global de ésta temática de 83 publicaciones entre 1994 y 2023, las especies más estudiadas en este campo han sido *Phoca vitulina* y *Tursiops truncatus* (Soñez y Szteren, 2025). Esta tendencia podría explicarse tanto por su amplia distribución geográfica (Burns, 2009; Leatherwood y Reeves, 1990), como por sus hábitos costeros, que facilitan el acceso a muestras, y la frecuente presencia de estas especies en condiciones de cautiverio en acuarios (Jaric et al., 2015). Además de los vacíos de información para otras especies, se ha observado una ausencia de estudios relacionados al tema en regiones específicas como África y América Central y escasos en América del Sur.

Estado del conocimiento en la región y en Uruguay

Particularmente en Sudamérica son pocos los estudios de microbiota intestinal en mamíferos marinos, así como aquellos enfocados en la detección de patógenos potencialmente asociados a sus causas de muerte. Un ejemplo destacado en éste contexto fue realizado en Argentina, donde se analizaron muestras intestinales de 44 crías de ballena franca austral (*Eubalaena australis*) que se encontraron varadas en un periodo de gran mortandad en Península Valdés (Marón et al., 2019). Solo una bacteria estuvo presente en todos los individuos (*Clostridium perfringens* tipo A) y el 47% de sus aislamientos resultaron positivos para genes de enterotoxina, relacionado directamente con enfermedades gastrointestinales en humanos. A pesar de ello, los autores concluyen que se necesitan más estudios para determinar si la causa de muerte de las crías se debía a esta bacteria.

Por otro lado, en la costa de Rio Grande do Sul, Brasil, se estudió la microbiota intestinal en muestras fecales de 6 *Arctocephalus australis* y 4 *A. tropicalis* varados y se encontró que el orden más abundante de bacterias en las dos especies fue Clostridiales (Medeiros et al., 2016). En la Patagonia Chilena, se estudiaron las

bacterias gastrointestinales en fecas de 28 *Otaria flavescens*, encontrándose la presencia de por lo menos 28 géneros de bacterias. Varias de éstas eran potencialmente zoonóticas, como *Clostridium*, *Escherichia*, *Yersinia* y *Salmonella* (Hermosilla et al. 2018). Por último, en la isla Juan Fernández (Chile), el microbioma de *Arctocephalus philippi* estuvo dominado principalmente por 5 Phylum de bacterias y se reportó una asociación negativa entre los géneros *Peptoclostridium* y *Fusobacterium* (Toro-Valdivieso et al. 2021).

En Uruguay se han citado 39 especies de mamíferos marinos, de las cuales 11 están catalogadas como prioritarias para la conservación (Soutullo et al., 2013). Los varamientos en la costa uruguaya son frecuentes (Del Bene et al., 2006), principalmente el lobo fino sudamericano (*Arctocephalus australis*), el león marino sudamericano (*Otaria flavescens*) y el delfín franciscana (*Pontoporia blainvillei*), dada la cercanía de sus áreas de cría y alimentación, o por su alta mortalidad en redes de pesca artesanal. La franciscana es una especie endémica de la costa sur de Brasil, Uruguay y Argentina, cuya población está decreciendo principalmente por la captura incidental en redes pesqueras (Secchi et al. 2003). Es el odontoceto más amenazado del Atlántico sudoccidental y está catalogado como vulnerable en el libro rojo (IUCN 2022). Por su parte, el león marino sudamericano se considera amenazado en Uruguay; su población evidencia un declive poblacional del 2% anual (Franco-Trecu et al. 2015). Esta especie se alimenta en la zona costera y su dieta incluye especies demersales y pelágicas, mientras que *A. australis* se alimenta principalmente de especies pelágicas, en la zona oceánica (Franco-Trecu et al. 2012, 2014). La ecología trófica de éstas tres especies en Uruguay ha sido bastante estudiada, tanto en relación a su composición de ítems presa (Naya et al. 2000, Naya et al. 2002, Drago et al. 2015), como desde su nicho trófico isotópico (Bergamino et al. 2012, Franco-Trecu et al. 2012, 2014, Artecona et al. 2019, Szteren et al. 2018) y su área de alimentación (Riet-Sapriza et al. 2013, Drago et al. 2015). Sin embargo, se conoce muy poco sobre el estado de salud a nivel microbiano de estas especies. A su vez, dado que estas tres especies de mamíferos marinos se alimentan de varias especies de peces, así como también de cefalópodos y crustáceos, es esperable que la microbiota intestinal esté adaptada a diversas fuentes de alimento. Así mismo, otras especies de cetáceos y pinnípedos

varan anualmente a lo largo de la costa, lo que supone datos valiosos sobre especies menos estudiadas que las mencionadas anteriormente.

Dada la falta de información sobre la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal en mamíferos marinos en general, y específicamente de las especies que varan con mayor frecuencia en Uruguay, este estudio contribuye a comprender la diversidad natural de estos taxones. En este sentido, se pretende caracterizar la microbiota intestinal de distintas especies de cetáceos y pinnípedos varados en Uruguay como línea de base para entender interacciones hospedadores-microbianas y conocer si existen relaciones entre su estructura comunitaria y el estado nutricional de los animales.

1.1 Hipótesis

La estructura comunitaria de la microbiota intestinal de los mamíferos marinos en Uruguay está influenciada por una combinación de factores específicos de cada individuo y de cada especie, en relación con la ecología trófica, el tipo de hábitat y la fisiología individual.

1.1.2 Predicciones

1) Efecto de la ecología trófica y el hábitat

Dado que se ha descrito en otras especies de mamíferos que la microbiota intestinal está muy influida por la dieta de los animales (Ley et al., 2008; Abdelrhman et al., 2020), se predice que la composición y diversidad de la microbiota intestinal diferirá entre especies con hábitos alimentarios pelágicos y especies con hábitos costeros, reflejando las diferencias en el uso del hábitat trófico.

2) Efecto de la filogenia

Dado que la microbiota intestinal suele ser especie-específica (o tiene un componente evolutivo) (Nishida y Ochman 2017, Kim et al. 2020), se predice que la estructura de la microbiota intestinal diferirá entre especies del orden Cetacea y del suborden Pinnipedia.

3) Variación intraespecífica

Dado que la salud, la fisiología y los patógenos difieren entre individuos de una misma especie, la microbiota intestinal presentará diferencias estructurales entre los distintos individuos.

4) Variación por sección intestinal

Debido a que las diferentes secciones del intestino presentan distintas funciones, se predice que la composición de la microbiota variará significativamente entre diferentes secciones del intestino (duodeno, intestino medio, recto).

1.2 Objetivo

Caracterizar la microbiota intestinal de las distintas especies de mamíferos marinos que varan en la costa uruguaya.

1.2.1 Objetivos específicos

1. Caracterizar y comparar la estructura microbiana a tres niveles: interespecífico, intraespecífico e intraindividual en tres secciones diferentes del tracto intestinal.
2. Comparar la estructura microbiana entre especies con distintos hábitos alimentarios y orígenes filogenéticos.
3. Analizar la presencia de bacterias previamente descritas como patógenas para las especies en estudio.

2. Materiales y métodos

2.1 Colecta de muestras en campo

Para llevar a cabo este estudio, se realizó la asistencia a varamientos de mamíferos marinos a través de la costa uruguaya desde marzo de 2022 hasta diciembre de 2024. La concurrencia a los varamientos se realizó en dos condiciones: por aviso de la población con asistencia inmediata y por relevamientos periódicos. Se realizaron monitoreos costeros semanales durante 3 meses desde Punta Negra hasta Solís, en el municipio de Piriápolis (Departamento de Maldonado) y se realizaron

recorridas mensuales durante 3 meses a distintos puntos del Departamento de Maldonado y Rocha (La Paloma y alrededores, Punta del Este, Cabo Polonio, Punta del Diablo y zonas aledañas).

Una vez encontrado cada ejemplar varado, se registraron las coordenadas geográficas, se tomaron fotografías ventrales, dorsales y laterales del animal, haciendo énfasis en posibles lesiones, marcas externas o características particulares. Solo se tomaron muestras intestinales de aquellos individuos que presentaban un estado de conservación 2 (Geraci y Lounsbury, 1993), es decir que el animal debía presentar apariencia normal, con órganos intactos, ojos sin sequedad y piel de apariencia normal, con el objetivo de evitar cualquier alteración bacteriana por descomposición del propio animal. Se sexaron los individuos siempre que fue posible y se registró el largo total y el espesor de la capa de grasa (como proxy de la condición corporal). Este último parámetro es de gran importancia, debido a que gran parte de la microbiota se encuentra regulada por el estado nutricional y la alimentación de cada animal. Posteriormente, se colectaron muestras de tejido intestinal de entre 1- 1,5 cm de ancho en tres secciones del intestino: 1) sección inicial (duodeno), 2) inicio del intestino grueso y 3) final del intestino grueso (recto) (Figura 1). Dichas muestras fueron conservadas en RNAlater y luego congeladas en tubos de 15 mL estériles a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis en el laboratorio.

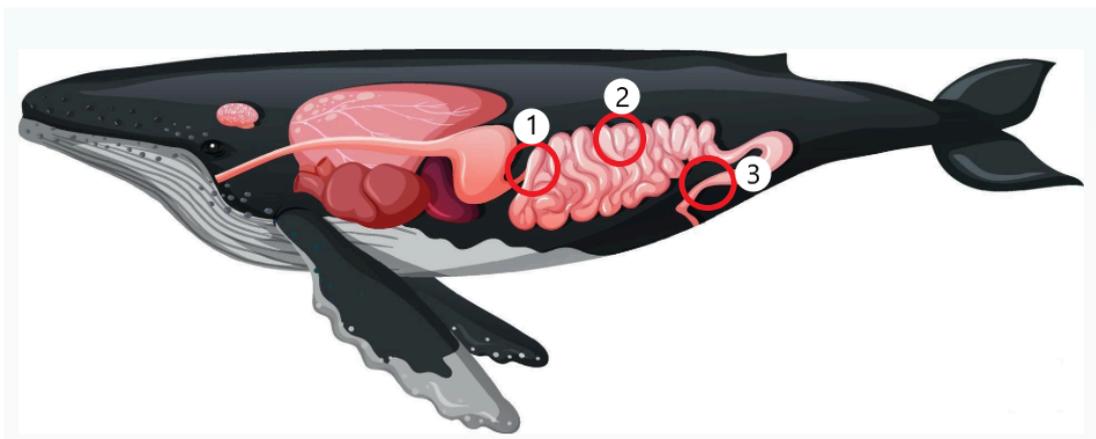


Figura 1. Secciones muestreadas a lo largo del tracto gastrointestinal de los individuos.

2.2 Análisis de laboratorio

2.2.1 Extracción de ADN y secuenciación del gen para el ARNr 16S

Una vez en el laboratorio, las muestras de tejido intestinal se colocaron en tubos de lisis estériles conteniendo 50 mg de microesferas de cerámica y 400 μ L buffer de extracción compuesto por Tris-HCl 100 mM, EDTA 100 mM, fosfato sódico 100 mM (pH 8,0), NaCl 1,5 M y CTAB al 1 %. Se sometieron a lisis mecánica en dos etapas de 60 segundos a una velocidad de 6m/s en el homogenizador FastPrep-24™, posteriormente se centrifugaron durante 3 minutos a 10921 rpm en la microcentrífuga MiniSpin® para remover restos y conservar el sobrenadante. Este sobrenadante se traspasó a tubos eppendorf estériles de 1,5 μ L y finalmente se sometió a una posterior purificación empleando un robot de extracción de ácidos nucleicos (Pure Prep 32, Molgen).

Una vez obtenido el ADN, su concentración y pureza fueron confirmadas espectrofotométricamente a 260, 280 y 230 nm en el espectrofotómetro Nanodrop®. Las muestras de ADN se secuenciaron de forma masiva por el servicio externo Macrogen (South Korea) para obtener secuencias correspondientes a la región V3-V4 del gen ribosomal 16S empleando la plataforma Illumina MiSeq™ y su protocolo de secuenciación. Los primers (Klindworth et al., 2013) recomendados y utilizados en este protocolo debido a su mayor resolución filogenética (especialmente a nivel de género y especie) fueron:

16S Amplicon PCR Forward Primer

5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S Amplicon PCR Reverse Primer

5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

2.3 Análisis de datos

2.3.1 Análisis bioinformático

El análisis bioinformático de los microbiomas se llevó a cabo utilizando el lenguaje de programación R (versión 4.3.0; R Core Team, 2023) a través del entorno de desarrollo RStudio (versión 2023.12.1.402; Posit Team, 2024). empleando herramientas especializadas para el procesamiento y análisis de datos metagenómicos. Una vez proporcionadas las secuencias demultiplexadas por servicios externos en formato fastq, se utilizó el paquete DADA2, el cual permite la inferencia de Variantes de Secuencias de Amplicones (del inglés Amplicon Sequence Variants, ASVs) con una resolución a nivel de un solo nucleótido, proporcionando una identificación precisa de la diversidad microbiana presente en las muestras (Callahan et al., 2016). Para garantizar la calidad de los datos, se evaluaron los perfiles de calidad de las lecturas *forward* y *reverse* siguiendo los parámetros recomendados por este paquete. Posteriormente, aquellas lecturas que superaron los filtros de calidad fueron procesadas a través del pipeline de DADA2 versión 1.16, lo que permitió la generación de variantes de secuencias de amplicones y su posterior asignación taxonómica utilizando la base de datos Silva Database (Quast et al., 2012; Glöckner et al., 2017). Una vez creada la tabla de abundancias de las ASVs para cada una de las muestras, se generó un objeto *phyloseq* (McMurdie y Holmes, 2013), a partir de la combinación de la tabla de abundancias, la tabla de asignaciones taxonómicas, el árbol filogenético generado con las secuencias representativas y la metadata de las muestras. Este procedimiento se realizó mediante las funciones `otu_table()`, `tax_table()`, `phy_tree()` y `sample_data()` del paquete *phyloseq*, que permitieron integrar todos los componentes en una única estructura para los análisis posteriores de diversidad y composición microbiana. Finalmente, utilizando el objeto asociado creado, se analizó la composición microbiana de cada muestra a distintos niveles taxonómicos. Para esto, se realizaron filtrados de ASVs, como por ejemplo: la eliminación de cloroplastos, mitocondrias y las ASVs que no se pudieron asignarse a ningún filo por similitud. Por último, se filtraron según su prevalencia y abundancia, generando así, un objeto *phyloseq* filtrado que se utilizó para los análisis estadísticos posteriores.

2.3.2 Análisis de datos

En primer lugar, se generaron curvas de rarefacción utilizando nuevamente el lenguaje de programación R (versión 4.3.0; R Core Team, 2023) a través del entorno de desarrollo RStudio (versión 2023.12.1.402; Posit Team, 2024) con el objetivo de evaluar si la profundidad de secuenciación fue adecuada para todas las muestras y garantizar un esfuerzo de muestreo equitativo. Esto permite confirmar que un incremento en el número de lecturas no resulta en la detección de nuevas ASVs, indicando que la diversidad microbiana ha sido correctamente capturada en cada muestra. En el caso de saturación en todas las curvas y con el fin de minimizar posibles sesgos derivados de diferencias en la profundidad de secuenciación se procedió a transformar las matrices de abundancia absoluta a abundancia relativa, dividiendo el número de lecturas de cada ASVs por el total de lecturas de su muestra correspondiente. De esta manera, se obtuvo la proporción relativa de cada ASVs dentro de cada muestra, permitiendo estandarizar el esfuerzo de secuenciación y facilitar comparaciones en la composición microbiana entre muestras.

Para evaluar la diversidad microbiana en las muestras analizadas, se realizó un estudio de la diversidad alfa utilizando el paquete *vegan* (Oksanen et al., 2022). Este análisis permitió analizar la diversidad dentro de cada especie, calculando métricas como la riqueza de especies encontradas e índice de Shannon (Shannon y Weaver, 1949; Somarriba, 1999). Este índice se calcula mediante la fórmula:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

donde S representa el número total de especies (u OTUs/ASVs) y p_i es la proporción relativa de la abundancia de la especie i con respecto al total. Valores más altos de H' indican una mayor diversidad, reflejando comunidades con mayor número de especies y/o con una distribución más equitativa de sus abundancias, mientras que valores bajos indican comunidades dominadas por pocas especies.

Posteriormente, se analizó la diversidad beta con el objetivo de comparar la composición y estructura de las comunidades microbianas entre las diferentes muestras. Estas comparaciones se llevaron a cabo a tres niveles:

- 1) Entre las tres secciones de tejido intestinal dentro de un mismo individuo
- 2) Entre individuos de una misma especie
- 3) Entre las distintas especies muestreadas en este estudio

Para ello, se aplicó un análisis de ordenación no métrica por escalamiento multidimensional (NMDS), basado en la distancia de disimilitud de Bray-Curtis (Bray y Curtis, 1957) que cuantifica las diferencias en la composición considerando las abundancias relativas compartidas entre pares de muestras. Además, se llevó a cabo un análisis de PERMANOVA (Anderson, 2017), el cual permitió determinar si las diferencias observadas entre muestras, según la especie, individuo o sección intestinal analizada, eran estadísticamente significativas. Con el propósito de visualizar la variabilidad en la composición microbiana entre fracciones, se calcularon las abundancias relativas de cada taxón identificado, hasta el nivel taxonómico máximo alcanzado, permitiendo así una comparación detallada de la distribución de los microorganismos presentes en cada muestra.

Las especies de mamíferos marinos se asignaron a hábitos alimentarios costeros o pelágicos de acuerdo a trabajos previos en el país o la región. De esta manera se categorizaron como especies costeras: *O. flavescens*, *P. blainvillei*, *T. truncatus* y *P. spinipinnis* y como especies pelágicas, *A. australis*, *D. delphis* y *P. dioptrica*. (Barreto, 2000; Franco-Trecu et al., 2017; Loizaga et al. 2016; Reyes, 2017)

Por último, se realizaron comparaciones entre pares de grupos de especies asociados a su taxonomía: cetáceos y pinnípedos, y a hábitos alimentarios: costeros y pelágicos. Para ello se realizaron análisis de PERMANOVA (Anderson 2017) para evaluar la significancia entre estas composiciones, análisis NMDS basado en la distancia de disimilitud de Bray-Curtis (Bray y Curtis, 1957) para la visualización y pruebas de dispersión (*betadisper*) para analizar la variabilidad en la dispersión de los datos. Por último, para evaluar las diferencias en la abundancia diferencial de

géneros microbianos entre los grupos, se utilizó el paquete *DESeq2* herramienta ampliamente utilizada para el análisis de datos de conteo derivados de secuenciación de alto rendimiento, permitiendo la identificación de diferencias significativas en la abundancia de taxones entre grupos experimentales mediante modelos estadísticos robustos.

3. Resultados

En este estudio, se colectaron muestras de un total de 21 individuos varados de las especies *O. flavescens* (león marino sudamericano), *A. australis* (lobo fino), *P. blainvillei* (delfín francsicana), *P. spinipinnis* (marsopa espinosa), *P. dioptrica* (marsopa de anteojos), *T. truncatus* (tonina) y *D. delphis* (delfín común) en los departamentos de Montevideo, Canelones, Maldonado y Rocha, en Uruguay (Figura 2).

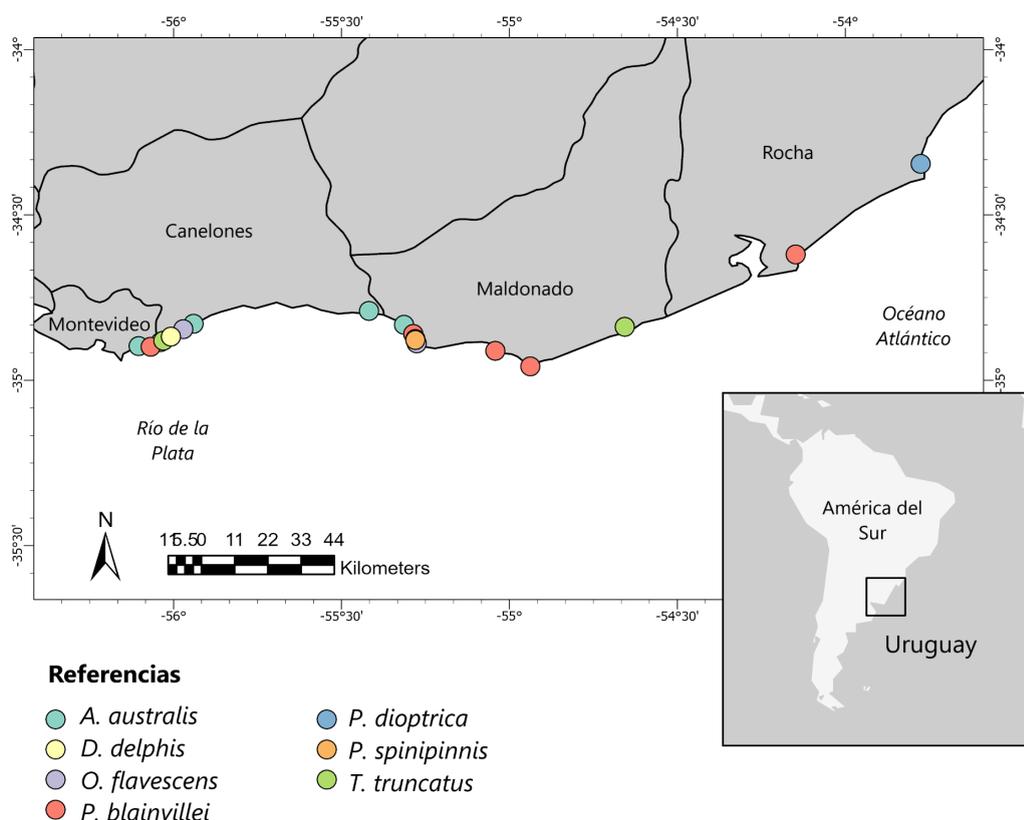


Figura 2. Ubicación geográfica donde colectaron las muestras intestinales, a partir de Individuos varados a lo largo de la costa uruguaya (referidos por especie en las referencias) y ubicación de Uruguay en el continente Sudamericano, a la derecha.

Se analizó la diversidad filogenética microbiana de 4 individuos de lobo fino, 3 de león marino sudamericano, 7 delfín franciscana, 2 marsopa espinosa, 2 marsopa de anteojos, 2 toninas y 1 delfín común (Tabla 1). De estos 21 individuos se muestrearon 10 hembras, 8 machos y 3 de sexo no identificado (NI). Obteniéndose así, un total de 58 muestras: 3 por individuo a excepción de 2 ejemplares de la marsopa de anteojos -de los que uno presenta tejido de la sección 2 y 3, y el otro de la sección 2- y un ejemplar de tonina del cual se obtuvo tejido sólo de la segunda sección intestinal debido a la dificultad de muestreo y/o de contaminación de muestras descartadas.

Tabla 1. Datos obtenidos de los individuos muestreados con su respectiva identificación, especie, coordenadas geográficas, sexo (M: macho, H: hembra, NI: no identificado), largo total y espesor de la capa de grasa.

Individuo	Especie	Latitud	Longitud	Sexo	Largo total (cm)	Espesor capa de grasa (cm)	Número de muestras
A1	<i>A. australis</i>	-34.829572	-55.940128	M	100	0.3	3
A2	<i>A. australis</i>	-34.832131	-55.313589	NI	90	1.5	3
A3	<i>A. australis</i>	-34.790187	-55.417661	NI	87	0.5	3
A4	<i>A. australis</i>	-34.896918	-56.104506	NI	85	0.2	3
O1	<i>O. flavescens</i>	-34.888522	-55.275743	M	170	1.0	3
O2	<i>O. flavescens</i>	-34.846037	-55.971247	M	211	2.8	3
O3	<i>O. flavescens</i>	-34.884049	-56.038538	M	220	3.0	3
P1	<i>P. blainvillei</i>	-34.957989	-54.937258	H	127	2.5	3
P2	<i>P. blainvillei</i>	-34.898892	-56.068316	H	126	2.4	3
P3	<i>P. blainvillei</i>	-34.910588	-55.041869	H	140	1.9	3
P4	<i>P. blainvillei</i>	-34.859402	-55.286102	H	120	2.5	3
P5	<i>P. blainvillei</i>	-34.875704	-55.280202	M	109	0.7	3
P6	<i>P. blainvillei</i>	-34.619925	-54.147829	H	125	2.0	3
P7	<i>P. blainvillei</i>	-34.878088	-55.280186	H	145	2.0	3
PS1	<i>P. spinipinnis</i>	-34.878088	-55.280186	H	152	1.3	3
PS2	<i>P. spinipinnis</i>	-34.878088	-55.280186	M	182	-	3
PD1	<i>P. dioptrica</i>	-34.345602	-53.775300	M	-	-	2
PD2	<i>P. dioptrica</i>	-34.345602	-53.775300	M	-	-	1
TT1	<i>T. truncatus</i>	-34.880212	-56.030660	M	186	-	1
TT2	<i>T. truncatus</i>	-34.838304	-54.656387	H	208	1.7	3
DD1	<i>D. delphis</i>	-34.868471	-56.007864	H	200	0.8	3

3.1 Secuenciación del gen 16S ARNr

De las 58 muestras secuenciadas, tras el control de calidad se obtuvieron un total de 5.384.923 secuencias de la región V3-V4 del gen 16S ARNr . Estas presentaron un mínimo de 48.928 secuencias en la muestra 17_P3S2 , y un máximo de 151.907 en la muestra 34_PD2S2 y se identificaron 7.809 variantes de secuencia de amplicón (ASVs) únicas. Estas ASVs representan las secuencias depuradas y corregidas por errores, proporcionando una mayor resolución en la caracterización de la diversidad microbiana en las muestras analizadas. En las curvas de rarefacción de la figura 3, se observó que la mayoría de las muestras alcanzaron la meseta, lo que indica una adecuada profundidad de secuenciación.

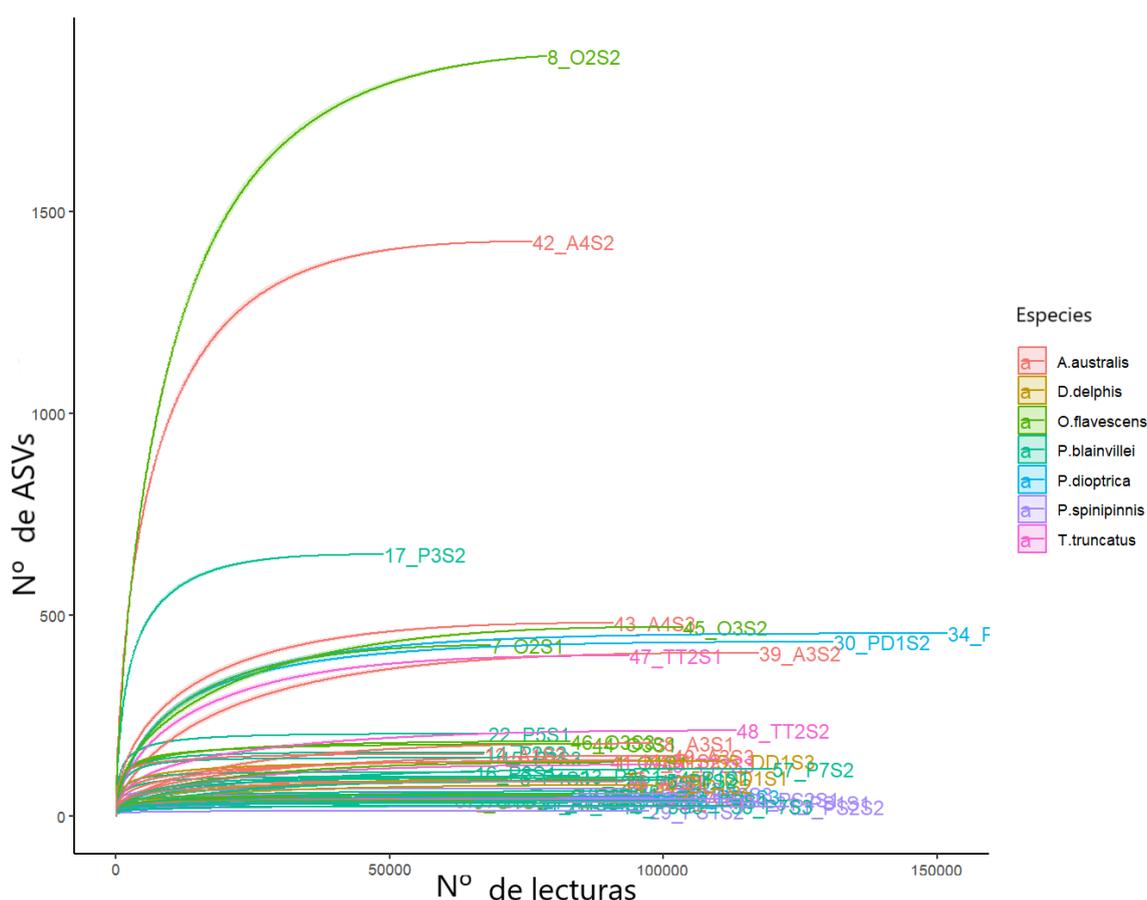


Figura 3. Curvas de rarefacción de las muestras del estudio coloreadas por especies con su respectivo ID, con el eje vertical representando el número de las variantes de secuencia del amplicón (ASVs) y el número de lecturas en el eje horizontal..

De los recuentos totales de ASVs, los filos dominantes en las muestras de tejido intestinal de todos los individuos varados fueron Firmicutes (45,8%), Proteobacterias (30,8%), Fusobacteriota (16,6%) y Bacteroidota (2,30%). Dentro de los 10 filos más abundantes encontrados, los filos Firmicutes y Proteobacterias se presentaron en todas las muestras analizadas, seguido de Fusobacteriota que si bien se ausentaron en muestras puntuales, se encontraron en gran abundancia en otras. Otros filos como Bacteroidota, Deferribacterota, Campylobacterota y Actinobacteriota se encontraron en números más reducidos de muestras (Anexo, Fig. 1).

A nivel de géneros se observaron más variaciones entre muestras. De los 15 géneros más abundantes, *Clostridium sensu stricto* 1 (17,9%), *Paeniclostridium* (12,8%), *Photobacterium* (11,6%) y *Cetobacterium* (11,5%) se encontraron en un gran número de muestras. Además, si bien algunos géneros como *Proteus*, *Shewanella* y *Helicobacter* se encontraron en porcentajes bajos, si dominaron muestras específicas (Anexo, Fig. 2).

3.2 Diversidad alfa de la comunidad total

En cuanto a la diversidad alfa de la comunidad microbiana intestinal total, el león sudamericano (*O. flavescens*) fue la especie con mayor diversidad, presentando una mediana cercana a 3 para el índice de Shannon, con una amplia dispersión lo que indicaría gran variabilidad entre los individuos (Figura 4). En la Figura 5 se observa que particularmente el individuo O2 presenta una gran variación entre la diversidad de sus 3 secciones, siendo la sección 2 la más diversa (4,78) (Anexo, Tabla S1). Por otro lado, el lobo fino (*A. australis*) y el delfín común (*D. delphis*) presentaron medias similares cercanas a 2,00. *A. australis* mostró una amplia dispersión de sus muestras, siendo la sección del intestino medio del individuo A4 la más diversa del total de las 58 muestras, con un índice de Shannon de 5,18 y la sección 1 del individuo A2 la menos diversa del total con 0,42. *P. blainvillei* (delfín franciscana) y *P. spinipinnis* (marsopa espinosa) presentaron diversidades similares (1,91 y 1,71), sin embargo, el delfín franciscana muestra una mayor variabilidad en la diversidad de sus muestras. A nivel intraindividual, individuos como P3 tienen una gran dispersión en el valor de sus índices de Shannon presentando la sección 2 un valor de 4,15 y la tercera sección 1,00, lo que sugiere una diferencia entre la diversidad de los

distintos segmentos intestinales. Por su parte, *P. dioptrica* (marsopa de anteojos) y *T. truncatus* (tonina) presentaron una mayor homogeneidad, con medias de 1,90 y 2,23 respectivamente.

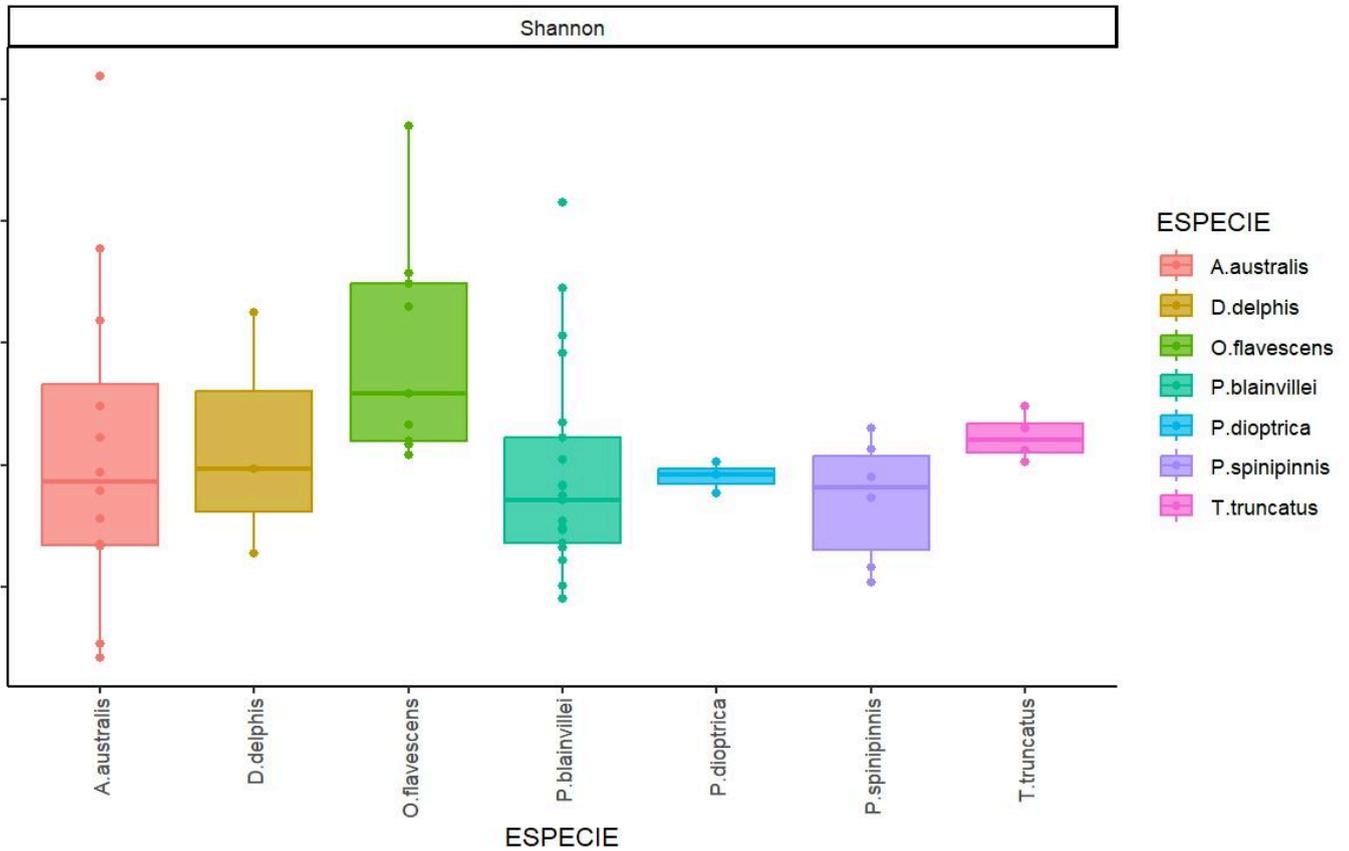


Figura 4. Índices de biodiversidad de Shannon de microbiota intestinal para cada especie de mamífero marino, donde cada punto representa una muestra y los colores identifican a las distintas especies.

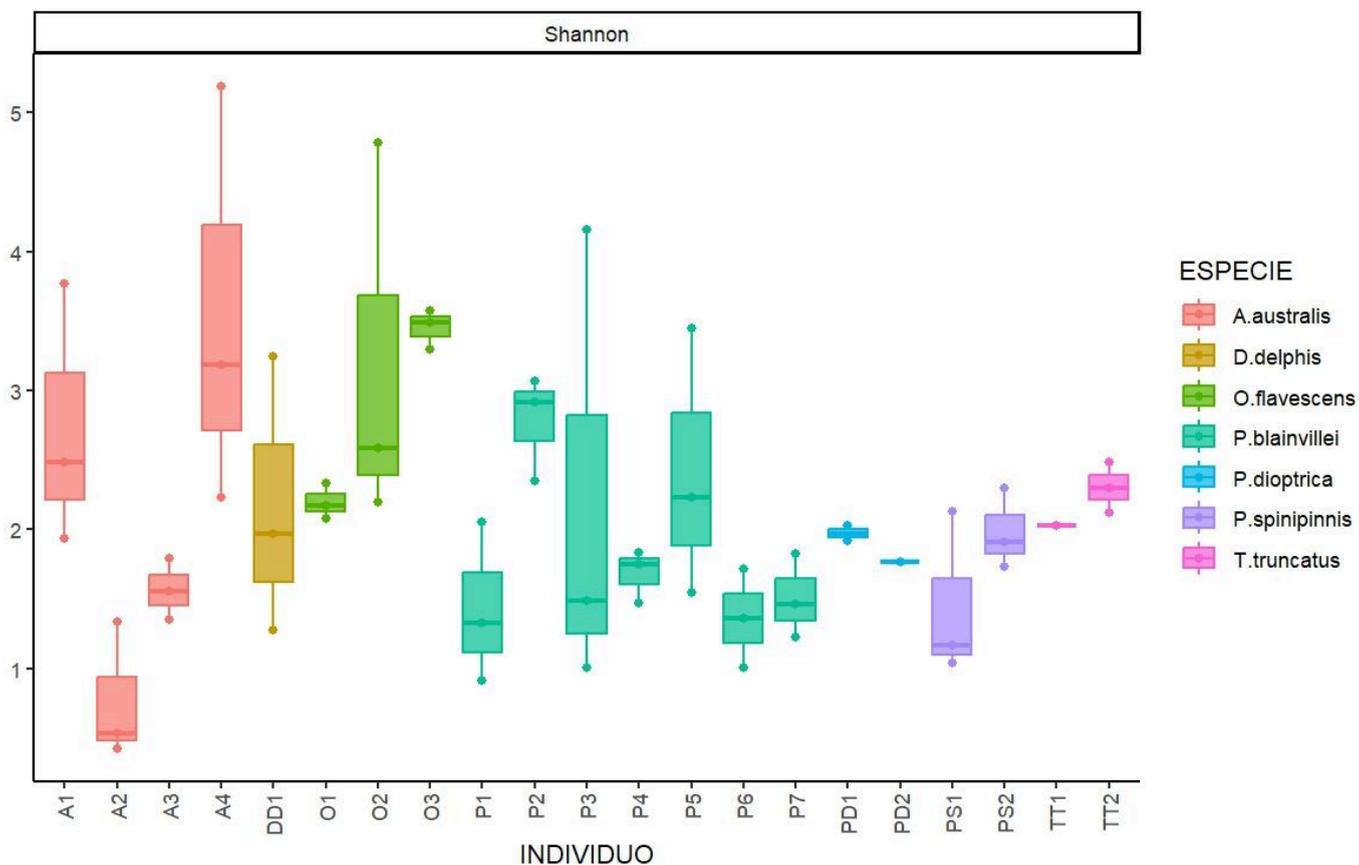


Figura 5. Índices de biodiversidad de Shannon de microbiota intestinal por individuo de 7 especies de mamíferos marinos, donde cada punto representa una sección intestinal y los colores identifican a las distintas especies.

A nivel de especie, el león sudamericano *presentó* mayor riqueza, con una media de 788 especies en el individuo O2 (Figura 6). La muestra 8_O2S2 (sección media del intestino) presenta un valor máximo de 1886 especies (Anexo, Tabla S1), seguido del individuo A4 de lobo fino con 1426 especies también en su sección media intestinal. La marsopa de anteojos obtuvo una riqueza alta a nivel de especie siendo el individuo PD2 el que *presentó* un mayor número (454). Por otro lado, el delfín franciscana, la tonina y el delfín común *presentaron* valores similares y la marsopa espinosa *mostró* la riqueza más baja en la sección media del individuo PS1 (29_PS1S2).

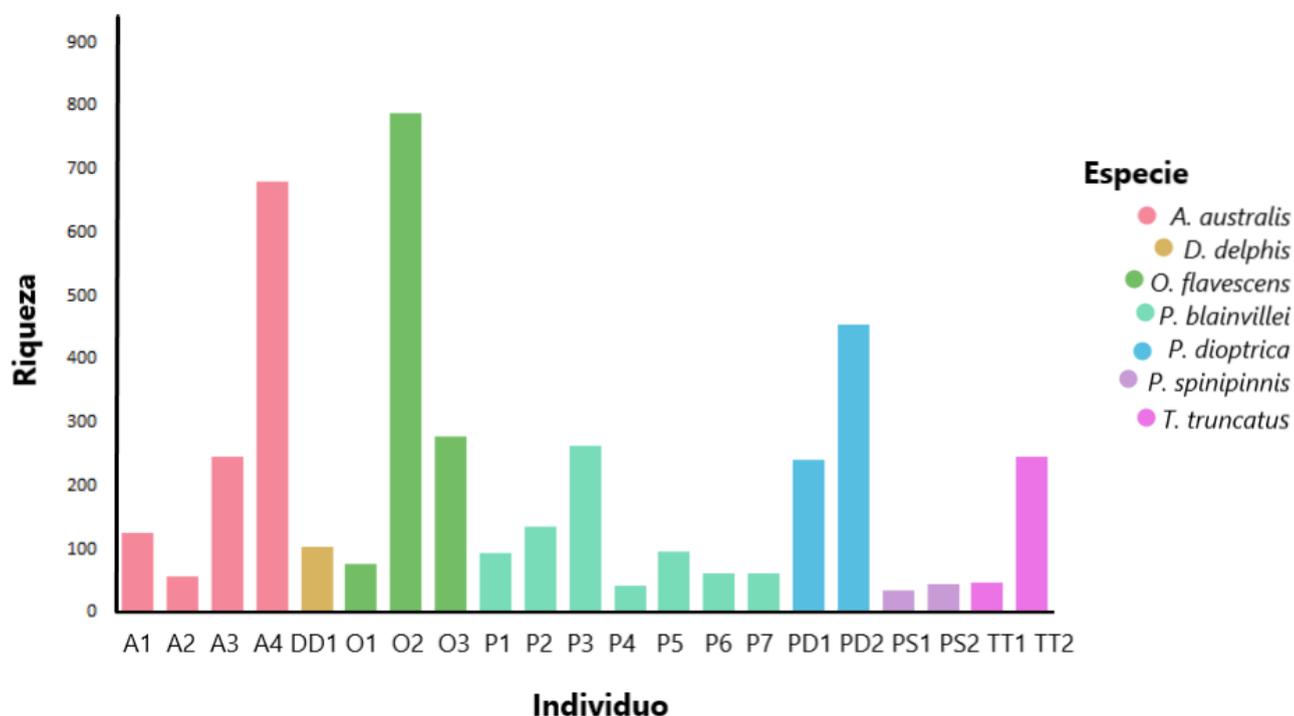


Figura 6. Riqueza de especies de microbiota intestinal halladas en cada individuo de 7 especies de mamíferos marinos. Cada especie se indica con distinto color.

3.3 Caracterizaciones y comparaciones entre secciones intestinales

Para el análisis intraindividual, se obtuvieron secuenciaciones de tres secciones intestinales diferentes de cada uno de los individuos en todas las especies. No se encontraron diferencias significativas a nivel intraindividual en ninguna de las especies a través del análisis PERMANOVA debido al tamaño de la muestra (una sola muestra por sección) lo que determinó un número muy limitado de permutaciones impidiendo una interpretación del p-valor de manera correcta. Por lo que se utilizó un modelo estratificado por individuo que permite una mejor estimación de la significancia (Anexo, Tabla S2). Mediante este análisis tampoco se observaron diferencias entre las secciones intestinales de los individuos, excepto en el lobo fino donde si bien se obtuvo un p-valor de 0,02, el F fue bajo (0.71), por lo que se sugiere que la presencia de diferencias sería muy sutil. A la hora de caracterizar las estructuras de las comunidades microbianas, a nivel de filos, todas

las secciones de cada individuo presentaban estructuras muy similares. Sin embargo, sí se pudo identificar una diversidad a nivel de género en algunos aspectos de las comunidades microbianas a pesar de no presentar significancias estadísticas. Estas variaciones se describen en la caracterización y comparación de cada individuo para cada una de las especies en la sección 3.5.

Para el delfín común (especie de la cual se muestreó sólo un ejemplar) las distintas secciones tampoco se diferenciaron significativamente en su estructura. Sin embargo se observaron particularidades en cada una. Las tres secciones presentaron bacterias del género *Cetobacterium*, identificando la especie *Cetobacterium ceti* en gran abundancia. Además, presentaron *Photobacterium* (reportándose la especie *Photobacterium damsela*). En cuanto a las particularidades de cada sección, se encontró abundancia de *Paraclostridium* y bacterias del género *Romboutsia* particularmente la especie *R. lituseburensis* en la sección 1, así como *Clostridium sensu stricto 1* y *C. butyricum*. Para la sección 2 se reportó particularmente bacterias del género *Vibrio* (identificando la especie *V. parahaemolyticus*), *Actinobacillus*, *Catenococcus* y *Photobacterium damsela*. Por último, la sección 3 además de los géneros que ya mencionados en común para todas las secciones, se identificó gran abundancia de bacterias del género *Clostridium sensu stricto 1*, *Edwardsiella*, *Bacteroides* y especies como *Photobacterium damsela*, *Cetobacterium ceti* y *C. somerae*. Por último, para el único individuo de *D. delphis* muestreado, en la región 1 se identificó la presencia de *Escherichia-Shigella*, *Photobacterium damsela* y *Fusobacterium mortiferum*, bacterias descritas como patógenos.

3.4 Caracterizaciones y comparaciones intraespecíficas

Luego de comparar las diferentes secciones intestinales intraindividuales, se realizó una caracterización de cada uno de los individuos de cada especie de este estudio, para comparar las estructuras de los mismos y evaluar si hay diferencias entre individuos de una misma especie asociados a sus condiciones fisiológicas individuales y su estado de salud. En relación a esto, se identificó la presencia de bacterias descritas anteriormente como posibles patógenos en las estructuras individuales.

La especie *D. delphis* no se incluye en esta sección debido a la presencia de un solo individuo. La caracterización de sus secciones se presenta en la sección 3.5.7.

3.4.1 *Arctocephalus australis*

En cuanto a la estructura de la comunidad microbiana de cada individuo, se encontraron diferencias muy significativas ($F(3,8) = 3,86$, $p = 0,001$) a nivel intraespecífico, a través del análisis NMDS (con un valor de *stress* de 0,102) (Figura 7A). Estas diferencias pueden observarse también en la Figura 8B donde el individuo A1 presentó en su primera sección una gran abundancia de *Cetobacterium*, dentro de las cuales se identificó la especie *Cetobacterium ceti*. Por otro lado, en la tercera sección se encontraron bacterias pertenecientes a la familia Ruminococcaceae (identificada como UCG-005), siendo el único individuo que las presentó. A2 reportó abundancia de *Clostridium sensu stricto* 7 en sus tres secciones, presentando la sección 3 bacterias *Escherichia-Shigella*. A3 compartió su dominancia entre *Clostridium sensu stricto* 2 (donde se identificó la especie *C. frigidicarnis* en mayor abundancia) y *Clostridium sensu stricto* 1, y presentó en su sección 2 y 3 bacterias del género *Moellerella* (identificándose la especie *M. wisconsensis*). Por último, el individuo A4 presentó en sus dos primeras secciones bacterias del género *Romboustia* en gran abundancia (particularmente de la especie *R. sedimentorum*), *Photobacterium* y *Vibrio*, y la última sección se diferenció presentando bacterias del género *Helicobacter*, *Mucispirillum* y *Bacteroides*.

Dentro de los géneros más abundantes encontrados para el lobo fino, se detectó la presencia de bacterias descritas como posibles patógenos en otros estudios de mamíferos marinos. Para el género *Clostridium sensu stricto* 1 la bacteria *Clostridium perfringens* se encontró en baja abundancia en las muestras A1S1 y A3S1. *Escherichia/Shigella* se identificó en gran abundancia en la sección 3 del individuo A2 y en menor cantidad en los individuos A3S1, A3S2 y A4S3. *Moellerella wisconsensis* que ha sido identificado como patógeno esporádicamente en aves y mamíferos, se encontró en gran abundancia en el individuo A3. Además, para este individuo también se identificó la presencia de *Morganella morganii*.

3.4.2 *Otaria flavescens*

El león sudamericano presentó una diferencia significativa intraespecífica ($F(2,6)=4,62$, $p=0,005$) relacionada a la comunidad microbiana individual de cada uno de los individuos, que se refuerza con el análisis NMDS ($stress=0,08$) donde se observa la separación de los individuos. (Figura 7B). El individuo O1 tuvo gran abundancia de bacterias del género *Edwardsiella* (identificándose la especie *Edwardsiella tarda*) y en su sección 3 y bacterias del género *Hathewayia* (con gran abundancia de *Hathewayia limosa*). El individuo O2 presentó *Clostridium sensu stricto 1* en sus tres secciones, pero fue el único individuo que presentó bacterias *Pseudoalteromonas* en su sección media. Por otro lado, el individuo O3 presentó *Peptostreptococcus* en sus 3 secciones, en la primera sección gran abundancia de *Clostridium sensu stricto 4* (particularmente bacterias de la especie *fallax*) y en la sección 1 y 3 *Alloprevotella*, *Helicobacter* y *Eubacterium fissicatena* siendo el único individuo que contuvo esas bacterias en su estructura (Figura 9B).

En cuanto a la identificación de posibles patógenos, en el individuo O1 se observó una gran abundancia de *Edwardsiella tarda* y en la sección media de este individuo, también se encontró abundancia de *Fusobacterium mortiferum*. Por otro lado, en el individuo O2 se encontró *Photobacterium damsela*. En el individuo O3, se determinó la abundancia de *Clostridium perfringens*, particularmente en su sección 2.

3.4.3 *Pontoporia blainvillei*

A nivel global de la especie, los individuos se diferenciaron significativamente en sus composiciones microbianas ($F(6,14)=3,73$, $p=0,001$). El test de pares no reveló diferencias entre individuos puntuales de delfín franciscana (Anexo, Tabla S3) lo cual puede deberse al bajo tamaño de la muestra. Sin embargo, a través del análisis NMDS ($stress=0,130$), se observó cómo los individuos P1, P2, P4 y P6 presentan estructuras únicas, mientras que los individuos P3, P5 y P7 se solapan entre sí compartiendo similitudes en la composición bacteriana (Figura 7C). Particularmente, los individuos P1 y P6 presentaron gran abundancia de *Paeniclostridium* en sus tres secciones, al igual que *Clostridium sensu stricto 1*, el cual también se observó en

mayor o menor abundancia en al menos una sección de todos los individuos (Figura 10B). El individuo P3, mostró una gran abundancia de *Cetobacterium ceti* en su sección 1 y 3 y fue el único individuo en el que se encontró el género *Massilia*. Por otra parte, se registró una gran abundancia de *Photobacterium damsela* en los individuos P7 y P5. P2 fue el único individuo que presentó bacterias del género *Romboutsia* y P5 el único que presentó *Actinobacillus*, dentro de las cuales se identificó *Actinobacillus delphinicola*. P4 en su sección S1 presentó una gran dominancia de bacterias del género *Acinetobacter* donde una de las especies identificadas más abundantes fue *Acinetobacter Iwoffii*. Por último, otros géneros como *Tyzerella* fueron abundantes en muestras particulares como P1S3, o *Shewanella* que presentó gran abundancia en el individuo P4.

En cuanto a las bacterias patógenas, se encontró *Photobacterium damsela* en P3 y *Fusobacterium mortiferum* en P2. En el individuo P5 se encontró abundancia de *Campylobacter insulaenigrae* particularmente en la sección 3 y abundancia de *Actinobacillus delphinicola* en las secciones 1 y 2.

3.4.4 *Tursiops truncatus*

La única muestra del individuo TT1, que pertenece a la sección media del intestino, presentó gran abundancia de bacterias del género *Catenococcus* y *Cetobacterium*. Además, se identificó un porcentaje significativo del género *Vibrio* (particularmente la especie *V. parahaemolyticus*) así como también *Clostridium sensu stricto 1*, *C. perfringens* y *C. somerae* (Figura 11B). Por otro lado, el individuo TT2 mostró abundancia de *Morganella* (identificándose hasta nivel de especie como *M. morgani*) y gran dominancia de *Proteus* en sus 3 secciones. En la sección 2 y 3 además se identificó *Edwardsiella tarda*, *Enterococcus faecium*, *Citrobacter*, y en S1 y S3 bacterias del género *Shewanella*. Sin embargo, no se identificaron diferencias significativas en cuanto a la composición de la estructura microbiana de cada individuo ($F(1,2) = 4,25, p = 0,25$).

En esta especie, se identificaron varias especies que se han reportado como patógenos en diversas ocasiones: *Clostridium perfringens* en el individuo TT1, *Morganella morgani*, *Enterococcus faecium* y *Edwardsiella tarda* en el individuo TT2.

3.4.5 *Phocoena spinipinnis*

A nivel intraespecífico, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la composición de los dos individuos ($F(1,4) = 15,22$, $p = 0,10$). Sin embargo, a nivel de composición el individuo PS1 presentó en sus tres secciones abundancia de *Paeniclostridium* y *Clostridium sensu stricto 1* pero en la sección 3 tuvo particularidades como la presencia de *Photobacterium* (identificándose la especie *Photobacterium damsela*), *Actinobacillus* y gran abundancia de *Shewanella* (Figura 12B). En el individuo PS2, se observó abundancia de *Cetobacterium* (particularmente la especie *Cetobacterium ceti*) y bacterias del género *Photobacterium* (encontrándose en gran abundancia la especie *Photobacterium damsela*) en las tres secciones, así como *Clostridium sensu stricto 1*. La sección 3, presentó además menor abundancia de *Fusobacterium* (reportándose la especie *mortiferum*), *Bacteroides* y *Paraclostridium*. Sobre posibles patógenos, en PS1 se reportó *Actinobacillus delphinicola* y PS2 presentó gran abundancia de *Photobacterium damsela* (al igual que la sección 3 del individuo PS1) y también de *Fusobacterium mortiferum*.

3.4.6 *Phocoena dioptrica*

Para esta especie no se encontraron diferencias significativas entre los dos individuos ($F(1,1) = 0,41$, $p = 0,667$). A pesar de esto, sí se identificaron variaciones en la composición de la estructura de cada individuo (Figura 13B). El individuo PD1, presentó bacterias de los géneros *Clostridium sensu stricto 1* y *Paeniclostridium* en sus dos secciones, pero con mayor porcentaje en la sección 2. En esta sección además, se reportó baja abundancia de bacterias *Sphingobium*. En la sección 3, se identificaron *Actinobacillus*, *Plesiomonas* y gran abundancia de *Photobacterium* (principalmente la especie *Photobacterium damsela*) y *Paraclostridium*. El individuo PD2, presentó géneros más diversos, sin embargo compartió abundancia de *Paeniclostridium*, *Photobacterium*, *Paraclostridium* y *Clostridium sensu stricto 1* con el individuo P1, pero se diferenció de este presentando abundancia de *Streptococcus pseudopneumoniae*.

En PD1 se identificaron bacterias patógenas como *Plesiomonas shigelloides* y *Photobacterium damsela* en gran abundancia en la sección 3, y *Actinobacillus delphinicola* en menor proporción. Para PD2 solo se reportó baja abundancia de *Photobacterium damsela*.

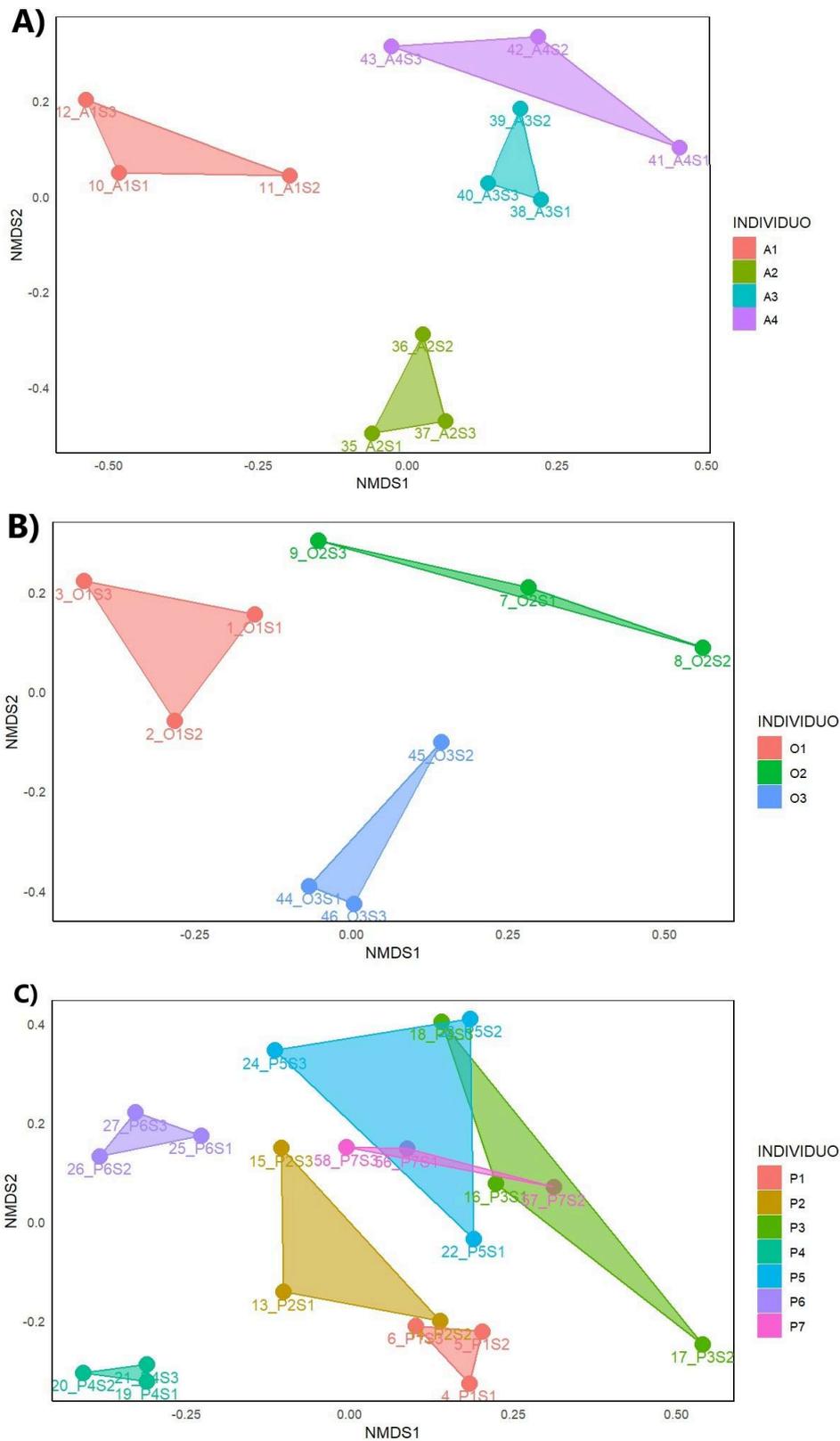


Figura 7. Análisis NMDS de los microbiomas de las especies de mamíferos marinos donde se muestran las distancias y solapamientos de las estructuras de cada individuo. Se incluyen las especies con más de 2 individuos muestreados: **A)** *A. australis*, **B)** *O. flavescens*, **C)** *P. blainvillei*.

3.5 Caracterización y comparaciones interespecíficas

Una vez analizadas las estructuras individuales dentro de cada una de las especies, se caracterizó de forma general cada especie a nivel de filo y género bacteriano con el fin de comparar las composiciones microbianas entre las especies y entre grupos de interés asociados a los hábitats tróficos y los órdenes taxonómicos.

3.5.1 Caracterización de la estructura microbiana de *Arctocephalus australis*

Se analizaron un total de 12 muestras de 4 individuos de lobo fino. En cuanto a los 4 filos más abundantes en el total de las muestras, Firmicutes fue dominante, seguido de Proteobacterias, Fusobacteriota y Campylobacterota (Figura 8A). Todas las muestras presentaron bacterias de los filos Firmicutes y Proteobacterias, mientras que las Fusobacteriota se ausentaron en los individuos A2 y A3, pero estuvieron presentes en las demás muestras. Los individuos A1 y A4 presentaron filos Campylobacterota, u otros que solo se encontraron en abundancia en muestras específicas como Spirochaetota en la muestra A4S3. Para la asignación taxonómica a nivel de géneros, *Clostridium sensu stricto* 7 presentó mayor abundancia con un 22,1%, *Clostridium sensu stricto* 1 (17,6%), *Clostridium sensu stricto* 2 (9,37%), *Photobacterium* (9,28%) y *Cetobacterium* (5,4%), seguido de otros géneros con menor abundancia (Figura 8B).

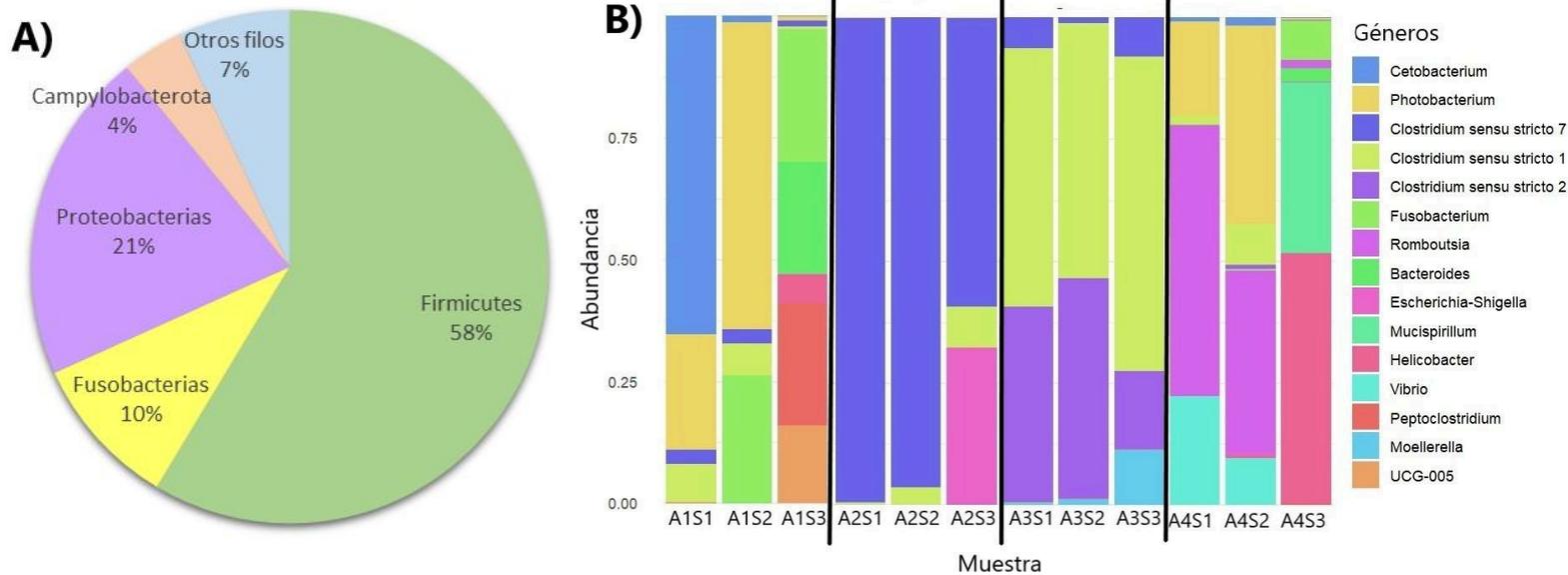


Figura 8. A) Abundancia relativa de filis de microbiota intestinal para *A. australis*. **B)** Abundancia relativa de géneros de microbiota intestinal en cada muestra. Los diferentes individuos de *A. australis* se enumeran precedidos por la letra A y las secciones por la letra S. Las líneas negras delimitan los individuos.

3.5.2 Caracterización de la estructura microbiana de *Otaria flavescens*

A nivel de filis en los tres individuos muestreados del león sudamericano Firmicutes fue el más abundante, seguido de Fusobacteriotas, Proteobacterias y Bacteroidota (Figura 9A). A nivel de géneros (Figura 14), *Fusobacterium* se encontró en un 23,3%, *Clostridium sensu stricto 1* con un 15,7%, *Bacteroides* con 9,58%, seguido de *Cetobacterium* con un 7,18% y *Edwardsiella* con 5,67% (Figura 9B).

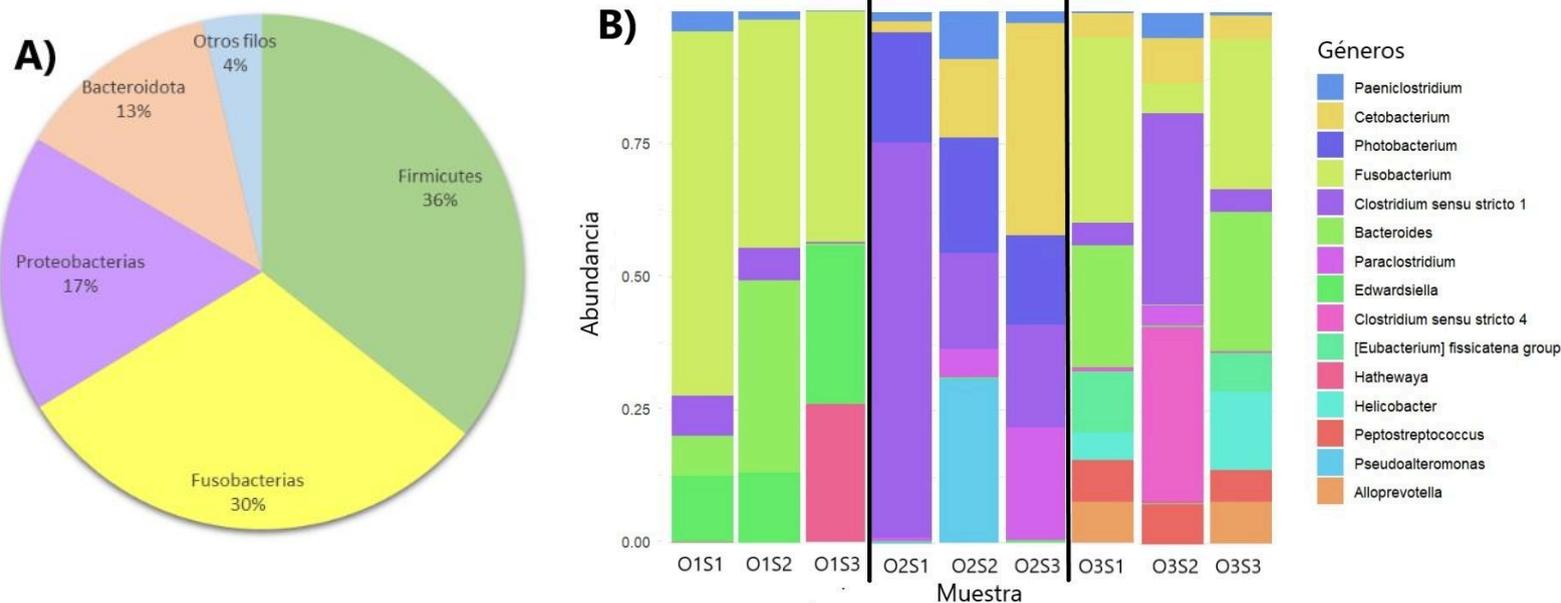
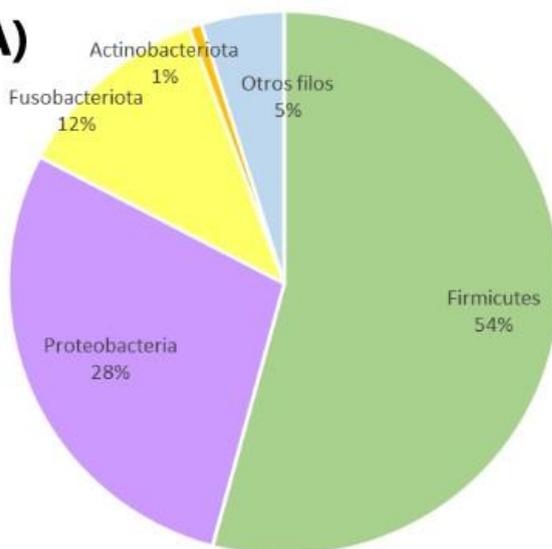


Figura 9. A) Abundancia relativa de filos de microbiota intestinal para *O. flavescens*. **B)** Abundancia relativa de géneros de microbiota intestinal en cada muestra. Los diferentes individuos de *O. flavescens* se enumeran precedidos por la letra O y las secciones por la letra S. Las líneas negras delimitan las tres muestras de cada individuo.

3.5.3 Caracterización de la estructura microbiana de *Pontoporia blainvillei*

Se secuenciaron 21 muestras en total de delfín franciscana correspondientes a 7 individuos. Para los filos taxonómicos se observó una gran dominancia de Firmicutes y la presencia de Proteobacterias en todas las muestras, seguido por la presencia de Fusobacteriota en la mayoría de los individuos. Además, Actinobacteriota se encontró en baja proporción en el individuo P2 y P5, al igual que otros filos de abundancias muy bajas (Figura 10A). A nivel de géneros, las muestras estudiadas para esta especie presentaron una gran diversidad, siendo las principales, *Paeniclostridium* (dominancia del 25%), seguido de *Clostridium sensu stricto 1* 21.8%, *Photobacterium* 18.1% y *Cetobacterium* 10.45% (Figura 10B).

A)



B)

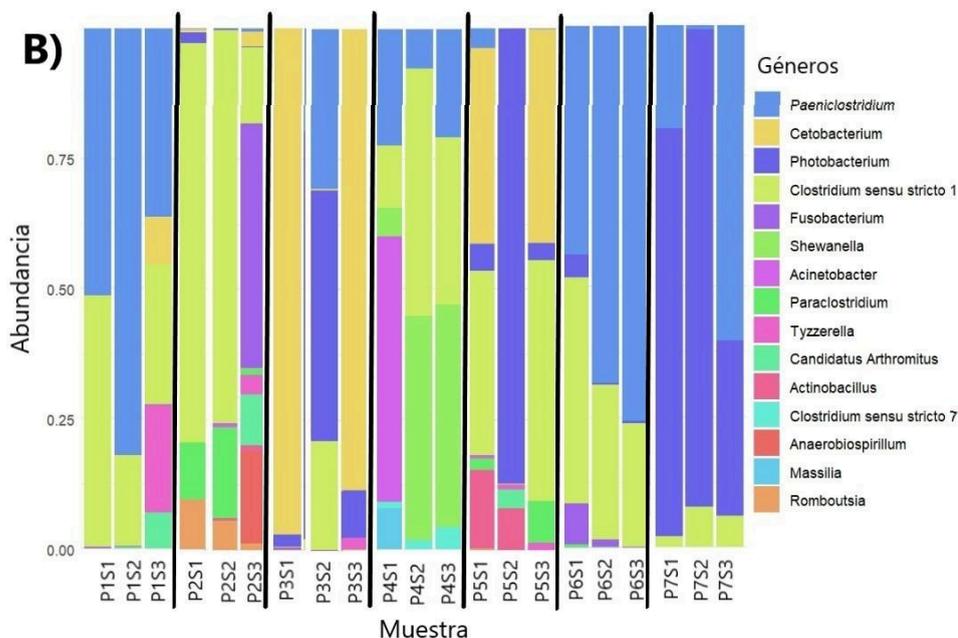


Figura 10. A) Abundancia relativa de filos de microbiota intestinal para *P. blainvillei*. **B)** Abundancia relativa de géneros de microbiota intestinal en cada muestra.. Los diferentes individuos de *P. blainvillei* se enumeran precedidos por la letra P y las secciones por la letra S. Las líneas negras delimitan las tres muestras de cada individuo.

3.5.4 Caracterización de la estructura microbiana de *Tursiops truncatus*

Se secuenciaron muestras de dos individuos de tonina: la sección media del individuo TT1 y las tres secciones del individuo TT2. El filo predominante en las muestras totales fueron las Proteobacterias (70%), seguidas de Fusobacterias, Firmicutes y por último otros filos en porcentajes muy bajos (Figura 11A). En las 4 muestras el filo predominante fue Proteobacteria, y en todas se vió la presencia de los 3 filos mencionados. A nivel de géneros (Figura 11B) el más abundante fue *Proteus* (33,1%), seguido de *Citrobacter* (12,7%), *Cetobacterium* (9,46%) y *Morganella* con el 9,28%, *Catenococcus* (8,80%), *Clostridium sensu stricto 1* (7,50%), *Fusobacterium* (7,17%) seguidos de otros con menor abundancia.

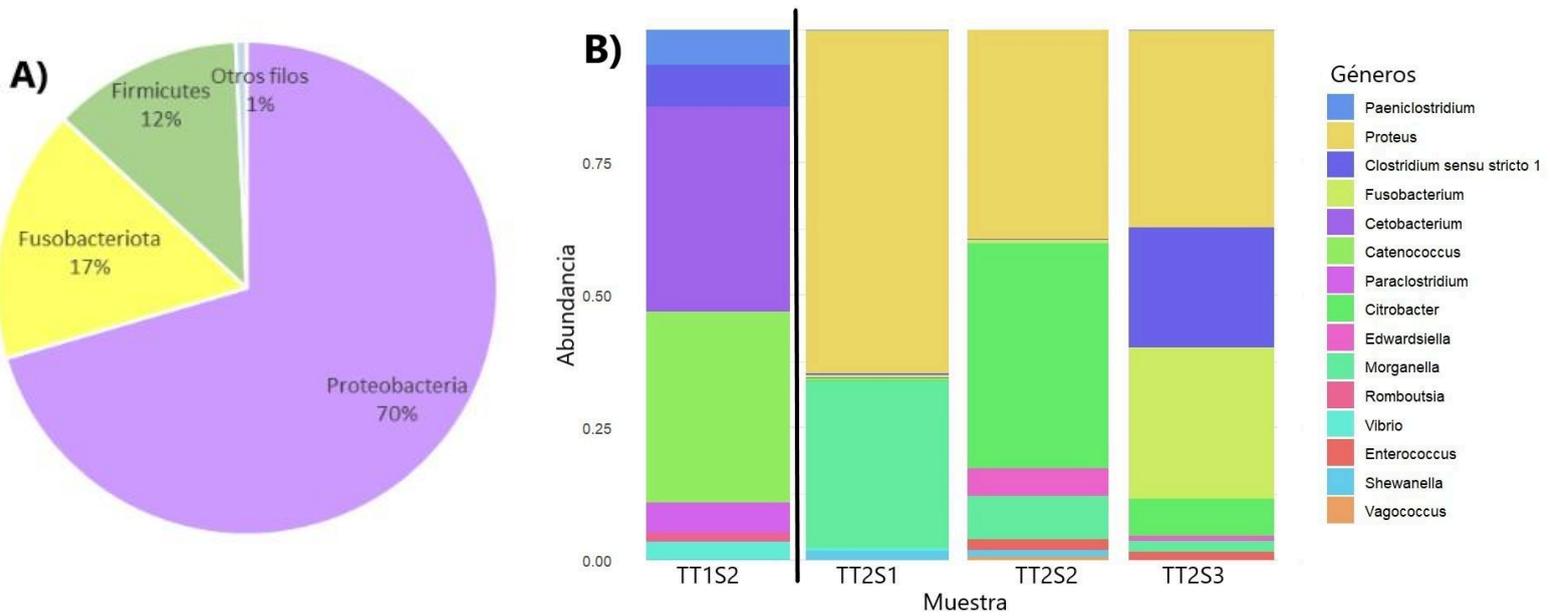


Figura 11. A) Abundancia relativa de filos de microbiota intestinal para *T. truncatus*. B) Abundancia relativa de géneros de microbiota intestinal en cada muestra. Los diferentes individuos de *T. truncatus* se enumeran precedidos por las letras TT y las secciones por la letra S. Las líneas negras delimitan los individuos.

3.5.5 Caracterización de la estructura microbiana de *Phocoena spinipinnis*

Para las 6 muestras de 2 individuos de marsopa espinosa, se encontró gran dominancia de Firmicutes, Proteobacterias y Fusobacteriota y muy baja dominancia de otros filos restantes (entre 0,01% y 0,15%) (Figura 12A). A nivel de géneros, *Clostridium sensu stricto 1* dominó el total de las muestras con un 29,5%, seguido de *Paeniclostridium* con 27,2%, *Cetobacterium* con 19,9%, *Photobacterium* 16,0% y otros géneros en menor abundancia (Figura 12B).

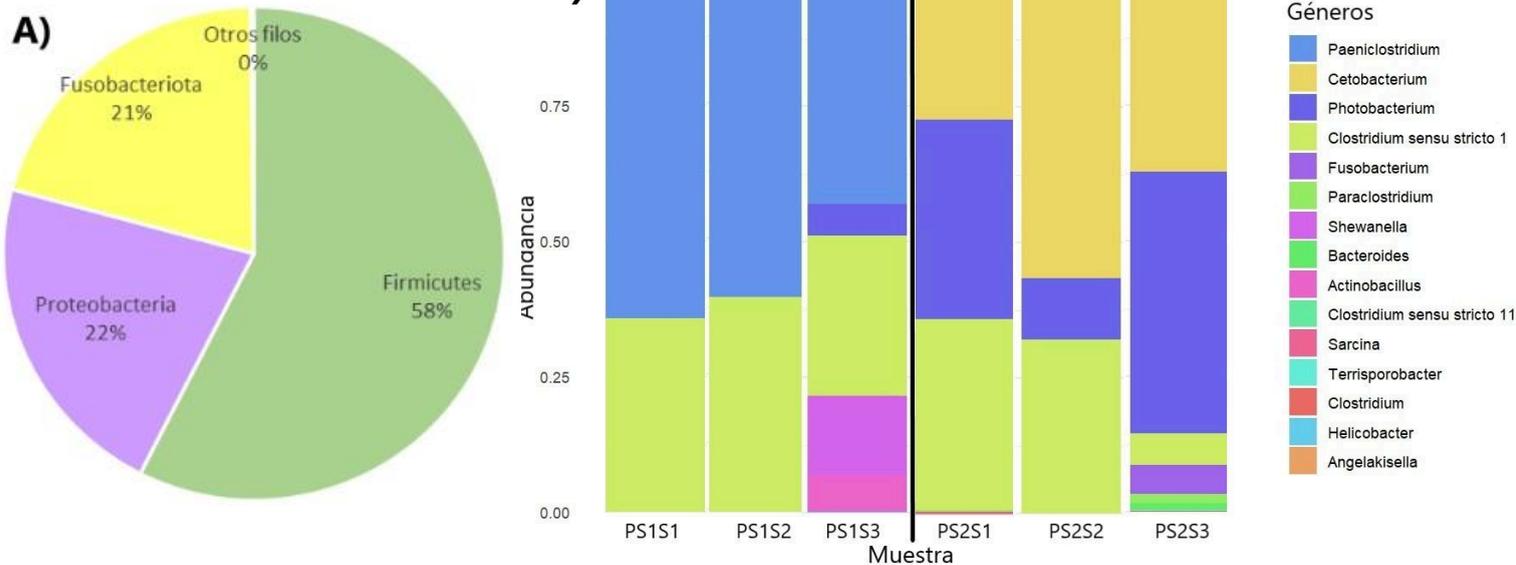


Figura 12. A) Abundancia relativa de filis de microbiota intestinal para *P. spinipinnis*. **B)** Abundancia relativa de géneros de microbiota intestinal en cada muestra. Los diferentes individuos de *P. spinipinnis*. se enumeran precedidos por las letras PS y las secciones por la letra S. Las líneas negras delimitan los individuos.

3.5.6 Caracterización de la estructura microbiana de *Phocoena dioptrica*

Se secuenciaron 3 muestras de marsopa de anteojos, la sección media y final para PD1 y sección media para PD2. Las tres estuvieron dominadas por Proteobacterias (76%), un menor porcentaje de Firmicutes y una abundancia mínima de otros filis en menor proporción (Figura 13A). En cuanto a los géneros, a nivel global hubo un gran porcentaje de lecturas que no pudieron ser asignadas taxonómicamente (NA) (82%), luego se identificaron bacterias del género *Photobacterium* (6,29%), *Paraclostridium* (3,70%), *Paeniclostridium* (3,26%), *Clostridium sensu stricto 1* (1,56 %) entre otros de menor abundancia (Figura 13B).

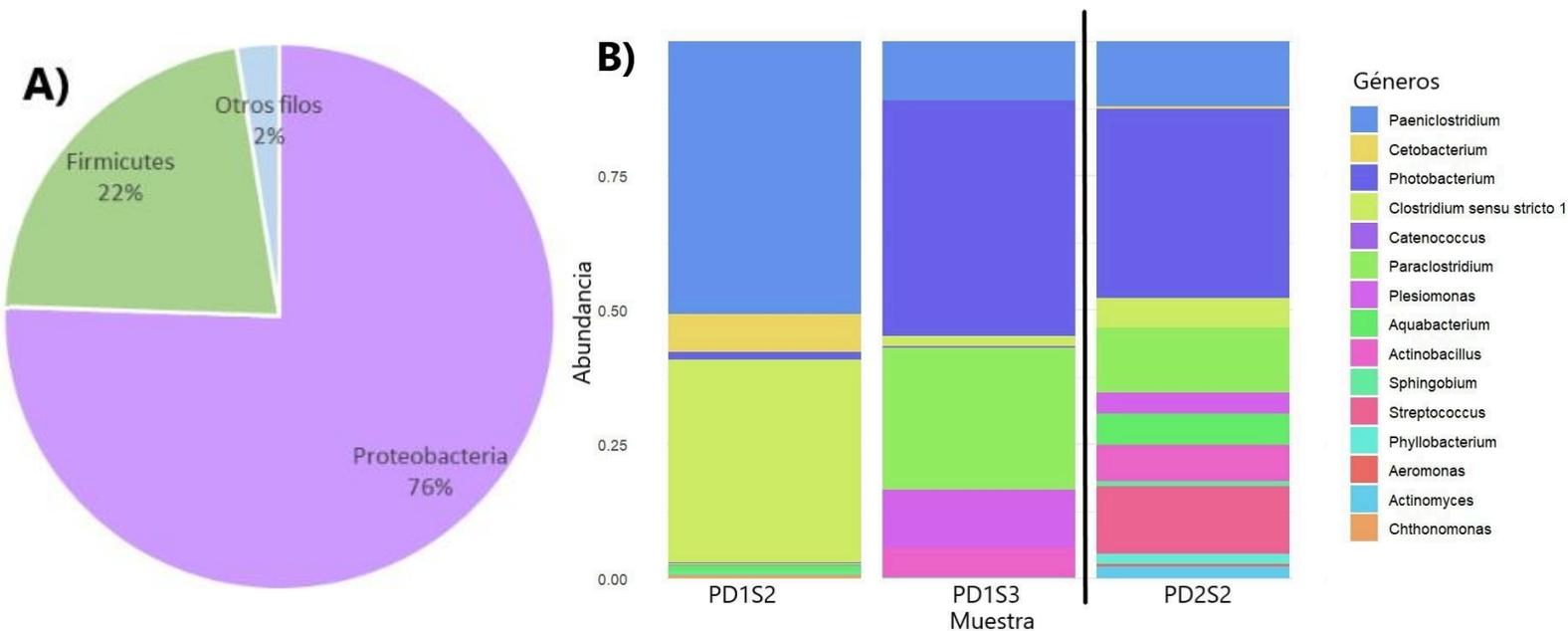


Figura 13. **A)** Abundancia relativa de filos de microbiota intestinal para *P. dioptrica*. **B)** Abundancia relativa de géneros de microbiota intestinal en cada muestra de *P. dioptrica*. Los diferentes individuos de *P. dioptrica*. se enumeran precedidos por las letras PD y las secciones por la letra S. Las líneas negras delimitan los individuos.

3.5.7 Caracterización de la estructura microbiana de *Delphinus delphis*

Para el delfín común se colectaron muestras de un solo individuo debido a que es una especie poco común en los varamientos. Este individuo presentaba una gran dominancia de bacterias del filo Fusobacterias, aunque en menor proporción que las demás especies, seguido de Firmicutes y Proteobacterias, con otros filos en menor proporción (Figura 14A). Las dos primeras secciones presentaron dominancia de estos tres filos principales y la sección 3 presentó abundancia de Bacteroidota. A nivel de género (Figura 14B), *Cetobacterium* (44,0%), *Clostridium sensu stricto 1* (10,9%), *Photobacterium* (10,1%), *Paeniclostridium* (9,48%), *Edwardsiella* (5,52%), *Bacteroides* (3,66%), seguido de *Paraclostridium* (3,43%) y otros géneros en menor porcentaje.

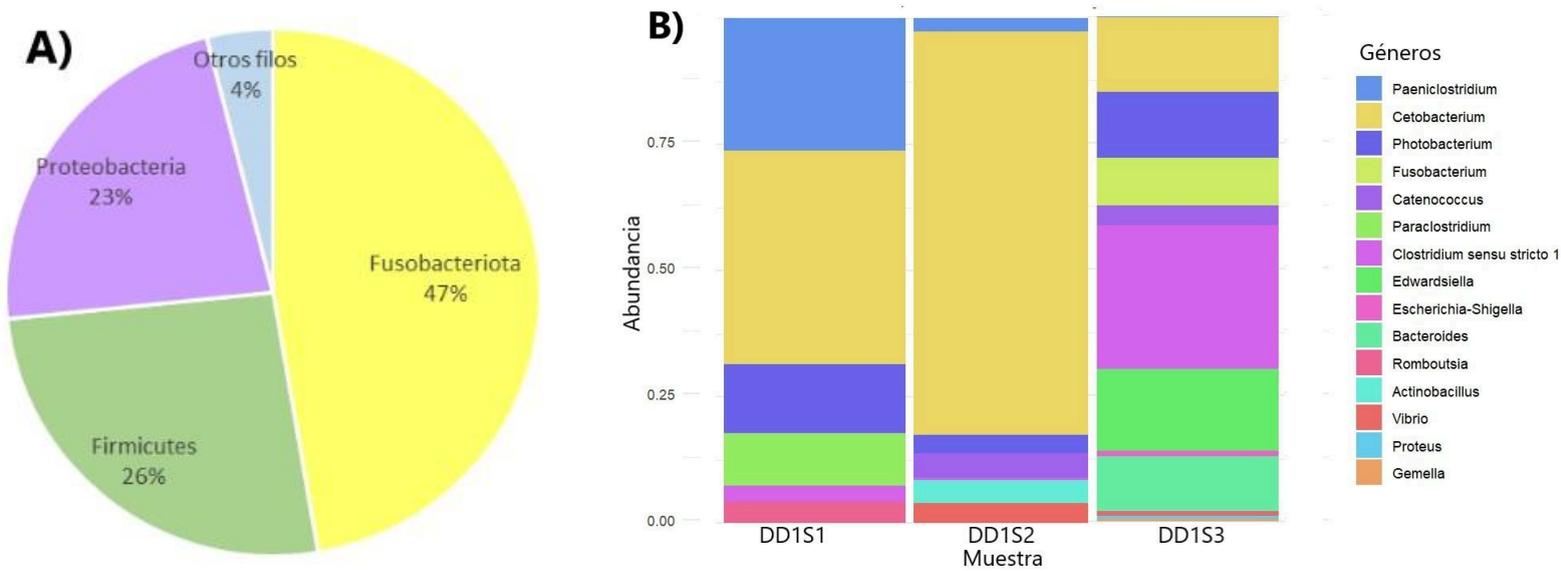


Figura 14. **A)** Abundancia relativa de filios de microbiota intestinal para *D. deplhis*. **B)** Abundancia relativa de géneros de microbiota intestinal en cada muestra de *D. deplhis*. Los diferentes individuos de *D. deplhis*. se enumeran precedidos por las letras DD y las secciones por la letra S. Las líneas negras delimitan los individuos.

3.6 Comparación de la estructura microbiana entre las especies

En términos de filios, si bien los más comunes fueron Firmicutes, Proteobacterias y Fustobacterias, las dominancias y presencias variaron según las especies. En el lobo fino, el león sudamericano y el delfín franciscana fueron dominantes las bacterias del filio Firmicutes, seguidos de Fusobacterias y Proteobacterias, pero la presencia de Bacteroidotas en el león sudamericano diferencia estas estructuras. En cuanto a la tonina, el filio dominante fue Proteobacterias y Firmicutes representó un menor porcentaje. Para las marsopas, la espinosa estuvo dominada por Firmicutes, Proteobacterias y Fusobacterias, pero la marsopa de anteojos. presentó una dominancia total de proteobacterias y un bajo porcentaje de Firmicutes. Por último, el delfín común se diferenció de las demás especies reportando como filio dominante a las Fusobacterias (Anexo, Fig. 1).

A nivel global, se reportaron diferencias significativas entre las especies estudiadas ($F(6,51) = 2,43$, $p = 0,001$). Las comparaciones entre pares permitieron determinar la significancia estadística entre sus composiciones microbianas. Los análisis post hoc pareados revelaron que el delfín franciscana se diferenció significativamente en su composición microbiana respecto a la mayoría de las especies, incluyendo la tonina, el lobo fino, el león sudamericano y la marsopa de anteojos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas con la marsopa espinosa ni con el delfín común sugiriendo composiciones más similares entre estos grupos (Tabla 2).

De forma similar, la tonina presentó diferencias significativas con la marsopa espinosa, el lobo fino y el león marino sudamericano, mientras que las diferencias con la marsopa de anteojos y el delfín común no fueron significativas. Además, la marsopa espinosa mostró composiciones microbianas significativamente distintas respecto a la marsopa de anteojos, al lobo fino y al león sudamericano, mientras que el delfín común sólo se diferenció significativamente del lobo fino.

El NMDS mostró una diferenciación en la composición de la comunidad microbiana intestinal entre las diferentes especies de mamíferos marinos (Figura 15) aunque con un valor de $stress = 0,242$, lo que supone cierta pérdida de detalle. Sin embargo, el análisis PERMANOVA confirmó estas diferencias significativas globales entre las especies y los test por pares brindaron más información sobre cuales son aquellas especies que se solapan (Tabla 2).

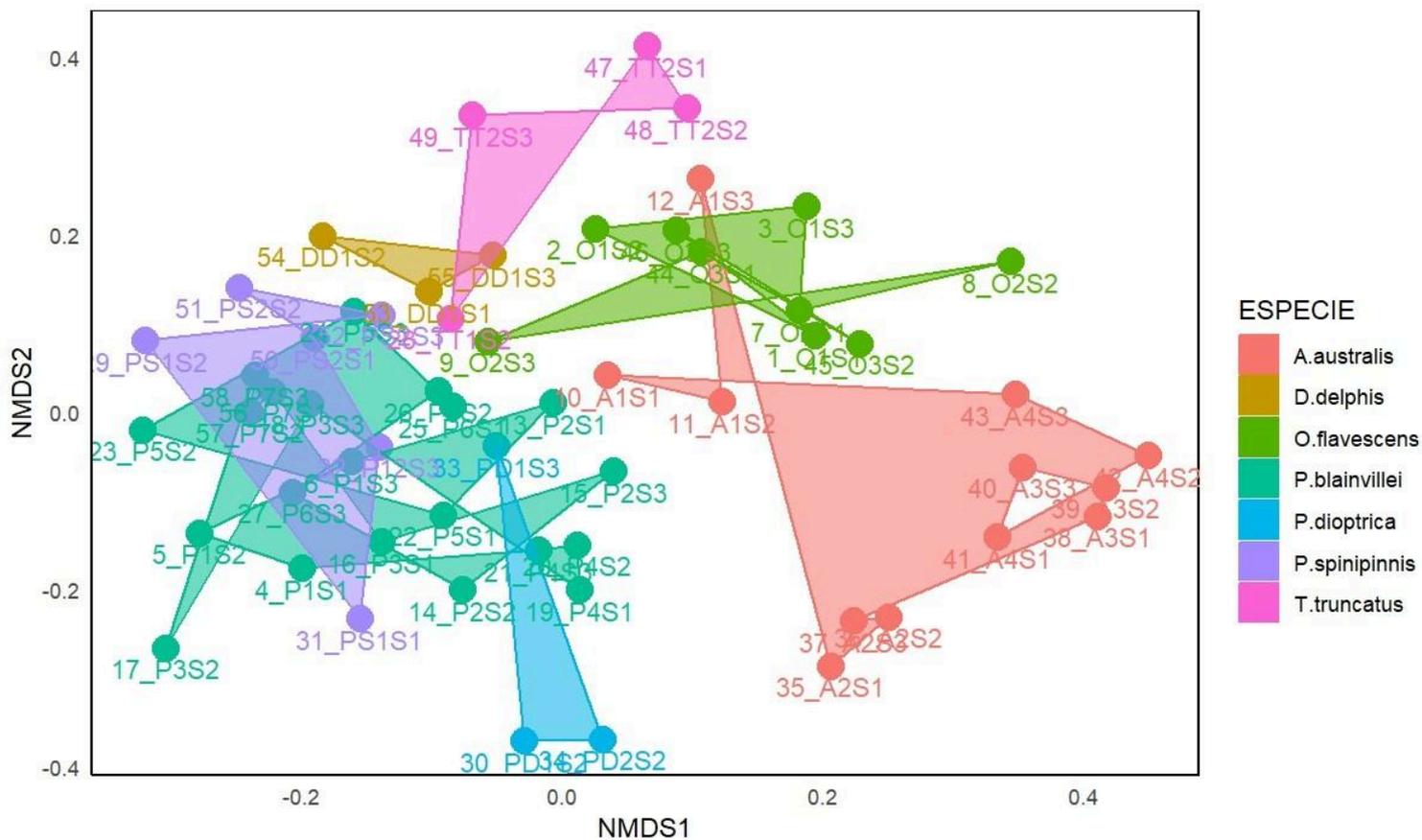


Figura 15. Análisis NMDS entre todos los individuos y especies del estudio, identificadas con el ID de cada muestra y referenciando especies por color.

Tabla 2. Test por pares entre especies de mamíferos marinos muestreadas, con sus respectivos valores de R², F, p-valor y significancia estadística donde “*” representa significancia y “ns” no significativo

Comparación entre especies	R ²	F	p-valor	Significancia
<i>P. blainvillei</i> vs <i>T. truncatus</i>	0,11252	2,9161	0,001	*
<i>P. blainvillei</i> vs <i>P. spinipinnis</i>	0,03527	0,9139	0,457	ns
<i>P. blainvillei</i> vs <i>P. dioptrica</i>	0,08918	2,1541	0,009	*
<i>P. blainvillei</i> vs <i>A. australis</i>	0,09933	3,4187	0,001	*
<i>P. blainvillei</i> vs <i>O. flavescens</i>	0,09724	3,0158	0,001	*
<i>P. blainvillei</i> vs <i>D. delphis</i>	0,06288	1,4763	0,115	ns
<i>T. truncatus</i> vs <i>P. spinipinnis</i>	0,28819	3,239	0,019	*
<i>T. truncatus</i> vs <i>P. dioptrica</i>	0,36139	2,8295	0,067	ns
<i>T. truncatus</i> vs <i>A. australis</i>	0,1589	2,6449	0,001	*
<i>T. truncatus</i> vs <i>O. flavescens</i>	0,18149	2,439	0,009	*
<i>T. truncatus</i> vs <i>D. delphis</i>	0,34555	2,64	0,091	ns
<i>P. spinipinnis</i> vs <i>P. dioptrica</i>	0,27495	2,6545	0,033	*
<i>P. spinipinnis</i> vs <i>O. flavescens</i>	0,17209	2,7022	0,014	*
<i>P. spinipinnis</i> vs <i>A. australis</i>	0,15757	2,9927	0,002	*
<i>P. spinipinnis</i> vs <i>D. delphis</i>	0,14579	1,1947	0,347	ns
<i>P. dioptrica</i> vs <i>A. australis</i>	0,14447	2,1953	0,008	*
<i>P. dioptrica</i> vs <i>O. flavescens</i>	0,18609	2,2864	0,018	*
<i>P. dioptrica</i> vs <i>D. delphis</i>	0,39158	2,5744	0,1	ns
<i>A. australis</i> vs <i>O. flavescens</i>	0,12473	2,7075	0,002	*
<i>A. australis</i> vs <i>D. delphis</i>	0,13692	2,0624	0,015	*
<i>O. flavescens</i> vs <i>D. delphis</i>	0,14695	1,7226	0,067	ns

3.6.1 Comparaciones entre cetáceos y pinnípedos

En cuanto a los dos grandes grupos taxonómicos: cetáceos y pinnípedos, existen diferencias significativas en la composición de su microbioma ($F(1,56) = 3,58$, $p = 0,001$), visibles en el análisis NMDS (Figura 16). Sin embargo, el valor de R^2 del análisis PERMANOVA es relativamente pequeño (6%). Esto sugiere que aunque la diferencia es significativa, solo una pequeña proporción de la variabilidad en la estructura microbiana se puede explicar por la variable de los grupos taxonómicos. El análisis de homogeneidad de la dispersión multivariada mostró que no hubo diferencias significativas en la dispersión interna entre los grupos, con valores promedio de distancia a la mediana de 0,62 y 0,65, respectivamente ($F(1,56) = 2,38$, $p = 0,13$). Por lo tanto, las diferencias detectadas por PERMANOVA no se atribuyen a diferencias en la variabilidad interna de los grupos.

Las bacterias de los géneros *Photobacterium*, *Paeniclostridium*, *Vibrio* y *Shewanella* estuvieron más asociadas a la estructuras microbianas de cetáceos, mientras que los pinnípedos se diferenciaron presentando como géneros más abundantes a *Clostridium sensu stricto 1*, *Romboutsia* y *Epulopiscium*.

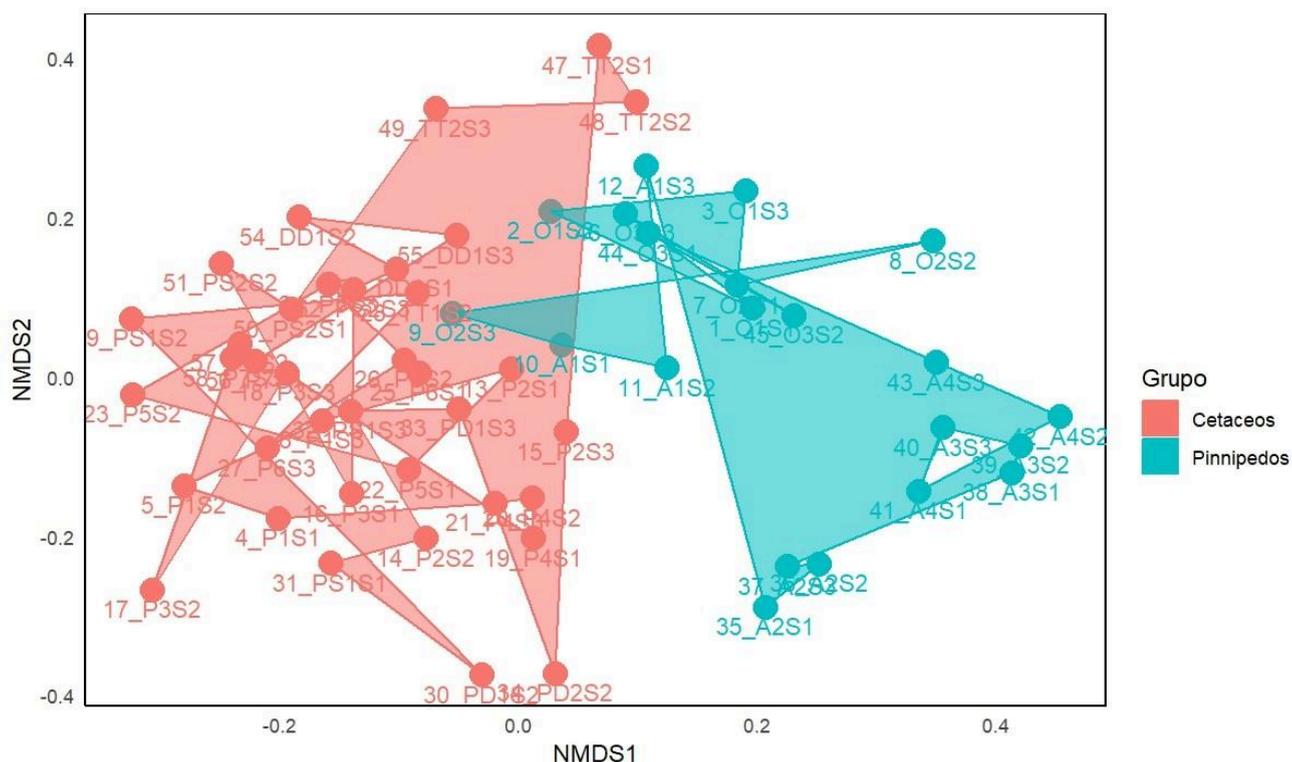


Figura 16. Análisis NMDS de todos los individuos y especies del estudio, identificadas con el ID de cada muestra y referenciando con distinto color ambos grupos taxonómicos (cetáceos y pinnípedos).

3.6.2 Comparaciones entre especies con hábitos costeros y pelágicos

Las especies de hábitos alimentarios costeros difirieron significativamente en la composición microbiana de las especies con alimentación pelágica ($F(1,56)= 2,89$, $p= 0,001$) con un valor de R^2 en el análisis PERMANOVA bajo (0,049). Por otro lado, el test de permutación determinó que no hubo diferencias significativas en la dispersión entre los hábitos ecológicos ($F(1,56)= 0,58$, $p= 0,49$), lo que refuerza la idea de que las diferencias significativas entre los grupos provienen de su composición microbiana y de la dispersión de las muestras.

Ambos grupos de especies si bien tienen zonas de solapamiento, debido a la baja significancia entre las estructuras microbianas de algunas especies, presentan una separación visible sobre todo asociada al lobo fino y la marsopa de anteojos (Figura 17). Las especies costeras están más asociadas a bacterias de los géneros *Clostridium sensu stricto 1*, *Escherichia-Shigella* y *Photobacterium*, mientras que las especies pelágicas se asociaron a *Paeniclostridium*, *Shewanella*, aunque también

presentaron concordancia en la abundancia de *Clostridium sensu stricto* 1 y *Photobacterium*.

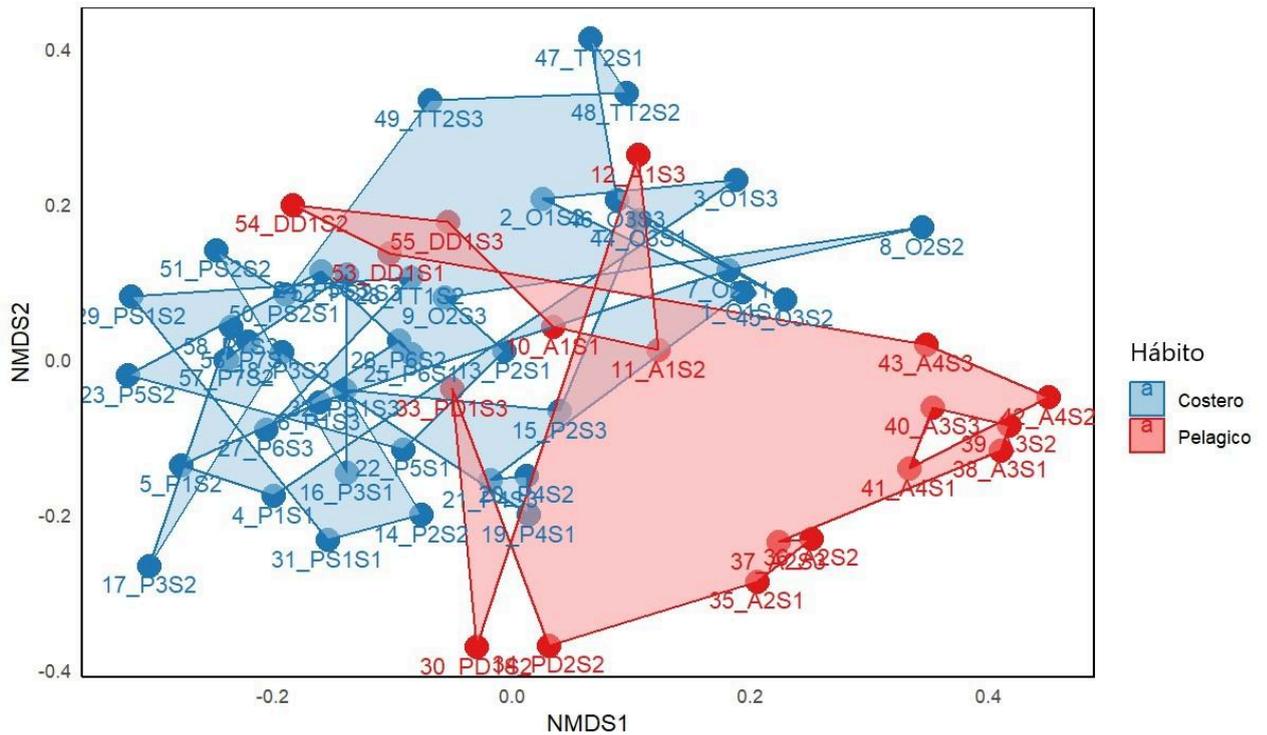


Figura 17. Análisis NMDS de todos los individuos y especies del estudio, identificadas con el ID de cada muestra y referenciando especies por especies costeras (en azul) y pelágicas (en rojo).

Si bien se observó una gran diferencia entre las comunidades microbianas de las 7 especies de este estudio, algunas presentaron un mayor grado de similitud entre sí compartiendo géneros dominantes y la presencia de bacterias identificadas como patógenos. En la Figura 18, se presenta un resumen gráfico de los principales hallazgos por especie.

Especie	Géneros dominantes	Patógenos
 <i>A. australis</i>	<i>Clostridium sensu stricto</i> 7, 1 y 2 <i>Photobacterium</i> <i>Cetobacterium</i>	<i>Moellerella wisconsensis</i>
 <i>O. flavescens</i>	<i>Fusobacterium</i> <i>Clostridium sensu stricto</i> 1 <i>Bacteroides</i>	<i>Edwardsiella tarda</i> <i>Hathewayia limosa</i> <i>Clostridium perfringens</i>
 <i>P. blainvillei</i>	<i>Paeniclostridium</i> <i>Clostridium sensu stricto</i> 1 <i>Photobacterium</i>	<i>Photobacterium damsela</i> <i>Fusobacterium mortiferum</i> <i>Campylobacter insulaenigrae</i> <i>Actinobacillus delphinicola</i>
 <i>T. truncatus</i>	<i>Proteus</i> <i>Citrobacter</i> <i>Cetobacterium</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Edwardsiella tarda</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Enterococcus faecium</i>
 <i>P. spinipinnis</i>	<i>Clostridium sensu stricto</i> 1 <i>Paeniclostridium</i> <i>Cetobacterium</i>	<i>Photobacterium damsela</i> <i>Actinobacillus delphinicola</i>
 <i>P. dioprtica</i>	<i>Photobacterium</i> <i>Paraclostridium</i> <i>Paeniclostridium</i>	<i>Photobacterium damsela</i> <i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>
 <i>D. delphis</i>	<i>Cetobacterium</i> <i>Clostridium sensu stricto</i> 1 <i>Photobacterium</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

Figura 18. Resumen gráfico de los principales resultados por especie de mamífero marino, con los géneros dominantes y los posibles patógenos identificados para cada una.

4. Discusión

En este estudio se caracterizó y analizó por primera vez la microbiota intestinal de siete especies de mamíferos marinos varados en la costa uruguaya. Debido al rol fundamental que cumple la microbiota en la salud de los individuos (Jin et al., 2017; Paruch et al., 2019), estos resultados presentan una gran contribución a un tópico que está en constante crecimiento a nivel mundial. Sin embargo, este tema aún se encuentra poco desarrollado para los mamíferos marinos (Bik et al., 2016). Las caracterizaciones y comparaciones de las comunidades microbianas de este estudio, permitieron establecer una línea de base sobre cómo se componen estas estructuras y la aparición de posibles patógenos en especies relevantes para Uruguay.

Se analizó la estructura microbiana de 21 individuos de las especies *A. australis*, *O. flavescens*, *P. blainvillei*, *P. spinipinnis*, *P. dioptrica*, *T. truncatus* y *D. delphis*. Las primeras tres, son especies que varan con frecuencia en las costas de Uruguay, ya sea por la cercanía de sus colonias reproductivas o por su alta mortalidad debido a capturas incidentales asociadas a la pesca (Secchi et al. 2003; Del Bene et al., 2006; Franco-Trecu et al. 2015). Las demás especies varan con menor frecuencia, a pesar de su distribución en la costa uruguaya, lo que explica el menor número de muestras de estas especies. Si bien el hecho de que los animales estuvieran muertos implica que pudo haber ocurrido algún cambio mínimo en la estructura comunitaria, la imposibilidad de realizar un estudio de esta clase sin recurrir a métodos invasivos y destructivos nos impulsó a emplear esta estrategia para establecer una primera aproximación sobre este tema para las especies de mamíferos marinos en Uruguay.

4.1 Composición y diversidad de la microbiota

La composición microbiana general en este estudio, se vio dominada por Firmicutes, Proteobacterias, Fusobacteriota y Bacteroidota. Estos resultados coinciden con los reportados en otros estudios de otras especies de mamíferos marinos (Nelson et al. 2013, 2015; Cicala et al., 2022; Pacheco-Sandoval et al., 2022). A nivel de géneros se observaron más variaciones entre muestras. Sin embargo, los géneros más abundantes en el conjunto global de las muestras fueron *Clostridium sensu stricto* 1,

Paeniclostridium, *Photobacterium* y *Cetobacterium*, lo que coincide con otros estudios en diferentes especies de focas y delfines, particularmente *Clostridium sensu stricto* (Bai et al., 2021; Fan et al., 2024).

La diversidad alfa de la comunidad muestra una notable variabilidad tanto entre especies como a nivel intraindividual. El león marino sudamericano se presenta como la especie con mayor diversidad microbiana. La amplia dispersión de los valores sugiere una marcada variabilidad entre individuos, lo que podría indicar que existen influencias individuales que podrían estar asociadas a la dieta, el estado de salud o factores ambientales, como ya se ha observado en investigaciones en otras regiones (Banks et al., 2014; Sehnal et al. 2021; Bai et al., 2021). El lobo fino y el delfín común presentaron una diversidad similar, así como el delfín franciscana y la marsopa espinosa. El delfín franciscana presentó gran variabilidad individual en la diversidad alfa, lo que sugiere una respuesta microbiana flexible a condiciones internas del huésped coincidiendo con lo reportado en investigaciones realizadas en delfines nariz de botella y orcas (Chiarello et al., 2017). La marsopa de anteojos y la tonina muestran una mayor homogeneidad en sus índices de diversidad, lo que podría responder a una microbiota intestinal más estable o especializada en estas especies. Sin embargo, estos hallazgos podrían estar relacionados también con la baja cantidad de muestras para estas especies. En términos de riqueza, el león sudamericano y el lobo fino también fueron las especies que presentaron valores de diversidad en su microbiota más altos. Esta mayor diversidad microbiana podría estar asociada a dietas más variadas, estrategias tróficas mixtas, o factores ambientales y/o de salud de los individuos.

4.2 Comparaciones intraindividuales

Hasta el momento, son pocos los reportes que analizan las diferencias entre distintas secciones del intestino en mamíferos marinos. En el presente estudio no se observaron diferencias significativas en la estructura microbiana de las tres secciones intestinales en ninguna de las especies, excepto *A. australis* que mostró una leve diferenciación respecto al resto. Esto sugiere una cierta homogeneidad en la composición bacteriana a lo largo del tracto intestinal en todas las especies, lo que rechaza la cuarta predicción asociada a la hipótesis planteada donde se infería

que las diferentes secciones del intestino, debido a sus distintas funciones, iban a variar significativamente en la composición microbiana. Resultados similares fueron reportados por otros autores quienes no hallaron diferencias significativas entre las secciones proximal y distal del intestino delgado de *Cystophora cristata* en Noruega. Este patrón parece estar relacionado con una dieta basada en peces grasos, cuya digestión ocurre principalmente en el intestino delgado (Acquarone et al., 2018). Según dicho estudio, esta dieta dejaría escaso material no digerido para una degradación microbiana diferencial en las secciones distales, lo que resultaría en una microbiota relativamente uniforme. Además, el predominio de grupos bacterianos asociados a estas funciones contribuiría a la uniformidad observada. Esto podría explicar en cierta manera la alta similitud entre las secciones en el presente estudio, donde si bien se observó diversidad de géneros entre algunas, estos están en muy baja proporción, siendo opacados por géneros dominantes que se comparten entre las 3 secciones. Por otro lado, Tian et al., (2020), encontraron que las secciones posteriores del intestino eran más diversas que el intestino interior y que había mayor similitud entre el duodeno y yeyuno. Lo que evidencia que si bien pueden existir diferencias a lo largo del intestino, hay segmentos que son muy similares.

Los resultados de nuestro análisis sugieren que la microbiota podría estar siendo más influenciada por factores individuales que por la segmentación del intestino. Sin embargo, debido a que este estudio presenta una primera línea de base del tema y el número de muestras por sección de cada individuo es bajo, se espera que futuras investigaciones puedan aportar más información con un mayor número de muestras. Esto permitirá obtener resultados más robustos sobre las diferencias en la composición del microbioma a lo largo del intestino y permitirá encontrar tendencias en los géneros taxonómicos asociados a las distintas funcionalidades de cada segmento.

4.3 Caracterizaciones y comparaciones intraespecíficas

4.3.1 Semejanzas entre especies

El análisis de la microbiota intestinal de las distintas especies estudiadas mostró una clara predominancia del filo Firmicutes, presente en el lobo fino, el león marino

sudamericano, el delfín franciscana y común, y ambas marsopas. Sin embargo en esta última, se encontró en proporciones menores respecto a Proteobacteria, que fue dominante al igual que en la tonina. Esta dominancia de Firmicutes, asociada a la descomposición de polisacáridos y carbohidratos complejos (Medeiros et al., 2016; Sun et al., 2023), refuerza su papel clave en la digestión de los mamíferos marinos. El orden Clostridiales, en particular géneros como *Clostridium sensu stricto*, *Paeniclostridium* y *Paraclostridium*, fueron comunes en pinnípedos y odontocetos y podrían estar relacionados con procesos de fermentación y un papel clave en la digestibilidad de la dieta de los individuos pero también tienen especies reportadas como patógenos responsables de enfermedades (Anderson et al., 2015; Yang et al., 2019; Wang et al., 2021; Dong et al., 2025).

Las bacterias del filo Proteobacteria por su parte, pueden estar relacionadas con interacciones ambientales y dietarias, ya que este filo incluye diversos géneros con funciones potencialmente simbióticas y patógenas (Rizzatti et al., 2017). Asimismo, se registró la presencia de Fusobacteriota, dominante en el delfín común y presente en el león sudamericano, el delfín franciscana, la tonina y ambas marsopas. Esta bacteria estaría probablemente asociada a la descomposición de proteínas y producción de ácidos grasos de cadena corta (Godoy-Vitorino et al., 2017; Li et al., 2022). Otro patrón común fue la aparición de *Cetobacterium*, un género común en ambientes acuáticos, hallado en todas las especies (excepto *A. australis*), sugiriendo una posible relación con la dieta o el ambiente marino (Bik et al., 2016; Ramirez et al., 2018; Bai et al., 2021).

A nivel de género, varios taxones se repiten entre especies. Los géneros *Clostridium* y *Paeniclostridium* y la presencia significativa de *Photobacterium* en especies como el delfín franciscana, marsopa espinosa y de anteojos y delfín común es también relevante, ya que estas bacterias han sido previamente asociadas con ambientes acuáticos y pueden estar relacionadas con la ingesta de presas como peces y cefalópodos que forman parte de la dieta de estas especies (Labella et al., 2018; Li et al., 2022).

Una característica compartida entre todas las especies fue la alta variabilidad individual en la composición microbiana, incluso dentro de la misma especie. Esta

heterogeneidad podría estar influida por factores como la edad, dieta, estado de salud, ubicación geográfica o nivel de estrés (Van Cise et al., 2020). En el lobo fino, el león marino y el delfín franciscana, esta variabilidad fue estadísticamente significativa, aunque los análisis *post hoc* no siempre permitieron identificar diferencias claras entre pares de individuos, probablemente debido al tamaño reducido de muestra. Sin embargo, para las marsopas y la tonina no se detectaron diferencias entre las comunidades microbianas de los individuos en los análisis, lo que no podría atribuirse a una posible similitud entre la composición, sino más bien al bajo número de muestras que imposibilita estadísticas robustas y confiables. En estos casos, el aumento en el tamaño de las muestras de estas especies nos permitiría obtener conclusiones más certeras y profundas sobre sus variabilidades intraespecíficas.

4.3.2 Diferencias entre especies

Las diferencias entre especies e individuos revelaron aspectos únicos: en el lobo fino predominó *Clostridium sensu stricto* (7, 1 y 2), como se ha observado en otros estudios donde bacterias del género *Clostridium* se han reportado como las más abundantes en esta especie Medeiros et al. (2016), y se detectó en un individuo (A3) la bacteria patógena *Moellerella wisconsensis*, registrada en escasos casos en otros mamíferos terrestres ya que está más asociada a enfermedades en humanos (Sandfort et al., 2002).

Para el león marino sudamericano, además de la dominancia de *Fusobacterium*, se registró *Edwardsiella tarda* y *Hathewayia limosa* en O1, asociadas a sepsis (Cools et al., 2013; Fernández et al., 2024), así como *Clostridium perfringens* en O3, previamente reportada en esta especie (Hermosilla et al., 2018) y vinculada a lesiones cutáneas e infecciones sistémicas (Danil et al., 2014; Fernández et al., 2024). Estos resultados evidencian una variabilidad significativa en la microbiota intestinal del león sudamericano, con diferencias intraespecíficas notables que podrían estar ligadas al estado de salud de cada individuo, como se propuso en la tercera predicción de la hipótesis, donde se preveía una variabilidad individual a nivel de género en la microbiota intestinal, influenciada principalmente por el estado de los individuos.

El delfín franciscana presentó alta abundancia de *Photobacterium damsela* en P5 y P7, además de *Fusobacterium mortiferum*, *Campylobacter insulaenigrae* y *Actinobacillus delphinicola*, todas con antecedentes patogénicos (Foster et al., 2004; Li et al., 2022; Mesquita et al., 2024), siendo estos individuos los que también mostraban signos de estrés como enmalles y escasa grasa corporal. P1, P2, P4 y P6 presentaron microbiotas distintivas, lo que sugiere que hay factores individuales como por ejemplo el estado de salud, que estarían determinando estas diferencias. En contraste, individuos como P3, P5 y P7 mostraron un solapamiento en su composición bacteriana, lo que podría reflejar similitudes en la dieta o exposición ambiental, o pertenencia a un mismo grupo social en tiempo y espacio. En su conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis aportan una visión detallada sobre la estructura microbiana intestinal de *P. blainvillei* con un número de individuos relevante (n=7) en comparación con estudios previos. La identificación de posibles patógenos asociados a animales con evidencia de haber vivido situaciones de estrés resalta la necesidad de continuar investigando su impacto en la salud de la especie. Estos hallazgos pueden contribuir a futuras estrategias de conservación y monitoreo de la salud de *P. blainvillei* en su hábitat natural teniendo en cuenta su estatus crítico de conservación (IUCN 2022).

Para la tonina, los géneros presentes incluyeron *Proteus*, *Citrobacter*, *Cetobacterium* y *Morganella* ya reportados anteriormente en delfines y otros mamíferos marinos (Semenov y Terekhov, 2015; Fan et al., 2024); TT1 presentó *Vibrio parahaemolyticus*, un patógeno marino frecuente (Goertz et al., 2013), mientras que TT2 albergó *Edwardsiella tarda*, *Morganella morganii* y *Enterococcus faecium*, también implicadas en infecciones (Cools et al., 2013; Medeiros et al., 2017; Hermosilla et al., 2018; Bai et al., 2021; Fernández et al., 2024), la presencia de estos patógenos en los individuos podría estar asociado a su estado de salud al momento del varamiento y resalta la necesidad de investigar el impacto de estas especies bacterianas en la salud de *T. truncatus*.

En la marsopa espinosa, se identificó *Cetobacterium ceti* en PS2, relacionado con la producción de vitamina B12 (Suzuki et al., 2022), y *Photobacterium damsela* y *Actinobacillus* en PS1, así como *A. delphinicola*, lo que refuerza la posible asociación con condiciones sanitarias desfavorables (Higgins, 2000).

Para la marsopa de anteojos a nivel de género se encontró una alta proporción de secuencias no asignadas taxonómicamente, lo que resalta la necesidad de ampliar bases de datos de referencia para especies marinas. Se reportó una notable abundancia de *Photobacterium* (especialmente *P. damsela*), además de *Streptococcus pseudopneumoniae* en PD2 (Wessels et al., 2012) y *Plesiomonas shigelloides* en PD1, previamente reportado en cetáceos (Pereira et al., 2008). Ambos individuos compartían fecha y lugar de varamiento, lo que podría explicar la similitud estructural observada estando posiblemente asociada a un mismo grupo social o parentesco, compartiendo dieta y hábitat.

Finalmente, el delfín común al ser muestreado sólo un individuo no pudo compararse a niveles intraespecíficos, sin embargo presentó una estructura diversa a lo largo del tracto intestinal por lo que la composición diferencial entre secciones sugiere una especialización microbiana. En la sección 1, la presencia de *Paraclostridium* y *Romboutsia lituseburensis* podría indicar una actividad fermentativa importante en las primeras fases del tracto digestivo y una asociación a la ingesta de ácidos grasos monoinsaturados (Yang et al., 2019; Selma-Royo et al., 2021). La sección 2 se caracterizó por la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* y *Actinobacillus*, microorganismos que pueden estar relacionados con infecciones oportunistas y con el metabolismo de compuestos derivados de la dieta marina (Buck y Spotte, 1986; Bossé et al., 2022). Además, en un estudio realizado en Alaska en varias nutrias marinas del norte (*Enhydra lutris kenyoni*), una marsopa común (*Phocoena phocoena*) y una ballena beluga (*Delphinapterus leucas*), ha reportado a *Vibrio parahaemolyticus* como un patógeno fecal indicador de cambio climático debido a que prolifera a temperaturas mayores a 15 °C (Goertz et al., 2013). El hallazgo de *Escherichia-Shigella* en la sección 1 es relevante debido a que si bien es común sobre todo en crías de mamíferos marinos (Chung et al., 2012), también ha sido asociada a diarreas bacterianas (Khalil et al., 2018). Estos resultados proporcionan una descripción preliminar de la microbiota intestinal de *D. delphis* siendo la primera caracterización microbiana de esta especie en Uruguay. Sin embargo, la interpretación de estos resultados debe realizarse con cautela, dado que se basan en un solo individuo. Estudios futuros con una muestra más amplia podrían ayudar a confirmar estos hallazgos y evaluar variaciones interindividuales,

así como el impacto de factores ambientales y del estado de salud en la microbiota de esta especie.

Se puede concluir que tanto la variabilidad intraespecífica asociada a fisiologías individuales y salud del animal, así como los casos individuales con afecciones visibles o signos de desnutrición, como O1 (*O. flavescens*) y P5 (*P. blainvillei*) que presentaron una mayor abundancia de bacterias potencialmente patógenas, respaldan la tercera predicción de una relación entre el estado de salud del hospedador y su microbiota intestinal.

4.4 Comparaciones interespecíficas

El análisis de la microbiota intestinal de las especies estudiadas reveló diferencias significativas entre ellas, sugiriendo que factores como la filogenia, la ecología y la dieta podrían desempeñar un papel clave en la composición microbiana como ya se ha observado en otros estudios (Banks et al., 2014; Nishida y Ochman 2017; Kim et al. 2020; Sehnal et al., 2021). Globalmente, se hallaron diferencias significativas entre especies, lo que sugiere que la composición microbiana intestinal no es homogénea entre los mamíferos marinos analizados. Sin embargo, los test *post hoc* mostraron que algunas especies presentan microbiotas similares, mientras que otras exhiben diferenciaciones más marcadas.

Uno de los hallazgos más notables fue la composición distintiva del delfín franciscana en comparación con la mayoría de las especies analizadas, particularmente con la toninas, el lobo fino, el león sudamericano y la marsopa de anteojos. Esto podría estar relacionado con su distribución exclusivamente costera y sus hábitos tróficos específicos (Domit et al., 2022), los cuales podrían influir en la selección y permanencia de ciertos taxones microbianos en su sistema digestivo. Además, en cuanto a su diferencia con las especies de pinnípedos, el factor taxonómico podría estar jugando un rol fundamental (Nelson et al., 2015; Bik et al., 2016). En contraste, no se encontraron diferencias significativas entre el delfín francisca, la marsopa espinosa, y el delfín común, lo que sugiere composiciones microbianas más similares entre estos grupos. A pesar de que el delfín común se ha observado más frecuentemente alejado de la costa (Loizaga et al. 2016), la taxonomía estaría evidentemente jugando un papel fundamental.

T. truncatus (tonina), una de las especies más estudiadas en el contexto de la microbiota (Soñez y Szteren, 2025), mostró diferencias significativas con la marsopa espinosa, el lobo fino y el león marino sudamericano. Sin embargo, las diferencias con *P. dioptrica* y *D. delphis* no fueron significativas, lo que podría deberse a solapamientos en la dieta o al intercambio de microorganismos en hábitats compartidos. Estudios comparativos entre toninas y otras especies, como delfines listados (*Stenella coeruleoalba*), ya han reportado altas similitudes en la composición de la microbiota a nivel taxonómico de familias, diferenciándose por la dominancia de Clostridiales en *T. truncatus*. (Abdelrhman et al., 2020).

Desde una perspectiva filogenética, se observaron diferencias significativas entre los dos principales grupos taxonómicos: cetáceos y pinnípedos. Esta diferenciación también se evidenció en el NMDS, donde las muestras de lobo fino y león marino sudamericano se separaron visualmente de las especies de cetáceos. Sin embargo, el bajo valor de R^2 sugiere que aunque la diferencia es estadísticamente significativa, la variable taxonómica explica solo una pequeña proporción de la variabilidad en la microbiota intestinal total, algo muy común en estudios de ecología microbiana en mamíferos (Abraham et al., 2024) debido a que la composición puede depender de muchos factores a la vez. Estos resultados respaldan la segunda predicción establecida en la hipótesis, donde se esperaban similitudes entre especies de los mismos grupos taxonómicos diferenciándose las composiciones microbianas de cetáceos y pinnípedos. Observándose así un rol fundamental de la filogenia que ya ha sido reforzado por otros estudios anteriores (Nishida y Ochman 2017; Kim et al. 2020). Además, géneros específicos como *Photobacterium* y *Paeniclostridium* contribuyeron a las diferencias entre cetáceos y pinnípedos lo que podría estar relacionado con la fisiología digestiva de cada grupo y su exposición a distintas fuentes de alimento y ambientes microbianos.

Otro factor evaluado fue la influencia de los hábitos alimentarios sobre la microbiota intestinal. Las especies costeras (*P. blainvillei*, *O. flavescens*, *P. spinipinnis* y *T. truncatus*) se diferenciaron de las especies con hábitos más pelágicos (*A. australis*, *D. delphis* y *P. dioptrica*), respaldando la primera predicción de la hipótesis. El bajo valor de R^2 estaría indicando que el hábito alimentario influye en la microbiota, pero no es el principal factor determinante al igual que sucedió con el análisis

taxonómico. Si bien se reportó que las especies costeras estaban más asociadas a determinadas bacterias, también hubo géneros que fueron comunes en ambos grupos, lo que indica que ciertos taxones pueden estar presentes en diferentes hábitats pero con variaciones en sus proporciones relativas.

Estos resultados refuerzan la idea de que la composición microbiana intestinal en las especies de mamíferos marinos está influenciada por una combinación de factores filogenéticos, ecológicos y tróficos (Ley et al., 2008; Nishida y Ochman 2017; Banks et al., 2014; Abdelrhman et al., 2020; Sehnal et al., 2021). A pesar de las diferencias encontradas en la microbiota intestinal entre especies y grupos funcionales, la baja variabilidad explicada por las relaciones taxonómicas y ecológicas sugiere que otros factores asociados al propio individuo también desempeñan un papel fundamental en la configuración de la microbiota intestinal de estos organismos. Estos factores podrían incluir el contacto con fuentes contaminantes, el estado corporal, la fisiología digestiva individual y la salud (Delpont et al., 2016), diferenciando incluso individuos dentro de una misma especie. Un estudio reciente en pinnípedos ha reportado que factores como la dieta y la historia de vida de los individuos ejercen más influencia en la estructura microbiana que la propia filogenia (Pacheco-Sandoval et al., 2024). Sin embargo, aún no está claro qué factores modelan de mayor manera la estructura microbiana en los mamíferos marinos, por lo que se espera que este documento sirva como refuerzo a las investigaciones desarrolladas hasta el momento.

5. Conclusiones y perspectivas

Los resultados de esta investigación proporcionan por primera vez una línea de base sobre el estudio de la microbiota intestinal en mamíferos marinos varados en Uruguay.

La variabilidad en la composición de estas estructuras resalta no solo la influencia de factores ecológicos sino también fisiológicos, taxonómicos y ambientales, los cuales ejercen presión sobre las estructuras causando diferencias intraespecíficas e interespecíficas. Esto subraya la importancia de continuar investigando estos aspectos para mejorar la comprensión de la ecología microbiana de estas especies,

así como también aspectos de su salud relacionados a posibles bacterias patógenas y cómo estos pueden modificar la composición microbiana.

Estos resultados podrían contribuir en aspectos relacionados a la conservación de los mamíferos marinos en Uruguay. Desde el diseño de distintas estrategias basadas en indicadores microbianos de salud de las poblaciones hasta evaluar el impacto de factores antrópicos sobre los ecosistemas marinos a través de la identificación de bacterias de importancia. De esta manera, futuras investigaciones podrían integrar estos conocimientos en el monitoreo ambiental y en la gestión de áreas de importancia ecológica para estas especies como lo son las colonias reproductivas de pinnípedos.

Por último, sería de gran importancia seguir con estudios que evalúen la microbiota a lo largo del tiempo en poblaciones específicas para proporcionar información sobre tendencias a largo plazo y la resiliencia microbiana ante factores de estrés. Además, estudiar la ecología trófica a través de estas metodologías, así como también explorar la interacción entre la microbiota y contaminantes para poder comprender su impacto en la salud de los mamíferos marinos y su rol como bioindicadores de la calidad ambiental. Estos esfuerzos sumados a los resultados de este estudio, contribuirían significativamente al entendimiento de la microbiota intestinal en el contexto de la conservación y el manejo de los mamíferos marinos en aguas uruguayas.

6. Referencias bibliográficas

- Abdelrahman, K. F., Ciofini, A., Bacci, G., Mancusi, C., Mengoni, A., & Ugolini, A. (2020). Exploring the resident gut microbiota of stranded odontocetes: high similarities between two dolphin species *Tursiops truncatus* and *Stenella coeruleoalba*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 100(7), 1181-1188.
- Abraham, J. O., Lin, B., Miller, A. E., Henry, L. P., Demmel, M. Y., Warungu, R., Mwangi, M., Lobura, P. M., Pallares, L. F., Ayroles, J. F., Pringle, R. M., & Rubenstein, D. I. (2024). Determinants of microbiome composition: Insights from free-ranging hybrid zebras (*Equus quagga* × *grevyi*). *Molecular Ecology*, 33, e17370. <https://doi.org/10.1111/mec.17370>
- Acquarone, M., Salgado-Flores, A., & Sundset, M. A. (2020). The bacterial microbiome in the small intestine of hooded seals (*Cystophora cristata*). *Microorganisms*, 8(11), 1664.
- Álvarez Calatayud, G., Guarner, F., Requena, T., Marcos, A., Álvarez Calatayud, G., Guarner, F., Requena, T., & Marcos, A. (2018). Dieta y microbiota. Impacto en la salud. *Nutrición Hospitalaria*, 35(SPE6), 11-15.
- Anderson, C. E., Haulena, M., Zabek, E., Habing, G., & Raverty, S. (2015). Clinical and epidemiologic considerations of *Clostridium difficile* in harbor seals (*Phoca vitulina*) at a marine mammal rehabilitation center. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 46(2), 191-197.
- Anderson, M.J., 2017. Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). In: Kenett RS, Longford NT, Piegorsch WW, Ruggeri F, editors. *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* [Internet]. 1st ed. Wiley; 2017 [cited 2025 Mar 26]. p. 1–15. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118445112.stat07841>.
- Artecona, F., De María, M., Bergamino, L., & Szteren, D. (2019). A historical perspective of niche differentiation between two top predators in the Uruguayan coastal area. *Wildlife Research*, 46(2), 136-144.
- Bai, S., Zhang, P., Lin, M., Lin, W., Yang, Z., & Li, S. (2021a). Microbial diversity and structure in the gastrointestinal tracts of two stranded short-finned pilot whales (*Globicephala macrorhynchus*) and a pygmy sperm whale (*Kogia breviceps*). *Integrative Zoology*, 16(3), 324-335.
- Bai, S., Zhang, P., Zhang, C., Du, J., Du, X., Zhu, C., Liu, J., Xie, P., & Li, S. (2021b). Comparative study of the gut microbiota among four different marine mammals in an aquarium. *Frontiers in Microbiology*, 3100.
- Banks JC, Cary SC and Hogg ID (2014) Isolated faecal bacterial communities found for Weddell seals, *Leptonychotes weddellii*, at White Island, McMurdo Sound, Antarctica. *Polar Biology* 37, 1857–1864.
- Barreto AS (2000) Variação craniana e genética de *Tursiops truncatus* (Delphinidae, Cetacea) na costa Atlântica da América do Sul. Doctoral thesis, Universidade do Rio Grande, Brazil
- Bergamino, L., Szteren, D., & Lercari, D. (2012). Trophic impacts of marine mammals and seabirds in the Río de la Plata estuary and the nearshore oceanic ecosystem. *Estuaries and Coasts*, 35, 1571-1582.

- Bik, E. M., Costello, E. K., Switzer, A. D., Callahan, B. J., Holmes, S. P., Wells, R. S., & Relman, D. A. (2016). Marine mammals harbor unique microbiotas shaped by and yet distinct from the sea. *Nature communications*, 7(1), 10516.
- Bossé, J. T., Bujold, A. R., & Li, L. (2022). Actinobacillus. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 262-289.
- Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4), 325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
- Buck, J. D., & Spotte, S. (1986). The occurrence of potentially pathogenic vibrios in marine mammals. *Marine Mammal Science*, 2(4), 319-324.
- Burns JJ (2009) Harbor Seal and Spotted Seal: *Phoca vitulina* and *P. largha*. In Perrin William F., Würsig Bernd and Thewissen J. G. M. (eds.) *Encyclopedia of Marine Mammals (Second Edition)*, pp. 533–542. London: Academic Press.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581-583.
- Chiarello, M., Villéger, S., Bouvier, C., Auguet, J. C., & Bouvier, T. (2017). Captive bottlenose dolphins and killer whales harbor a species-specific skin microbiota that varies among individuals. *Scientific Reports*, 7(1), 15269
- Chung, H., Pamp, S. J., Hill, J. A., Surana, N. K., Edelman, S. M., Troy, E. B., Reading, N. C., Villablanca, E. J., Wang, S., Mora, J. R., Umesaki, Y., Mathis, D., Benoist, C., Relman, D. A., & Kasper, D. L. (2012). Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell*, 149(7), 1578–1593.
- Cicala, F., Ramírez-Delgado, D., Gómez-Reyes, R., Martínez-Porchas, M., Rojas-Vargas, J., Pardo-López, L. & A. Licea-Navarro, F. (2022). Detection of human pathogenic bacteria in rectal DNA samples from *Zalophus californianus* in the Gulf of California, Mexico. *Scientific Reports*, 12:14859
- Cools, P., Haelters, J., Lopes dos Santos Santiago, G., Claeys, G., Boelens, J., Leroux-Roels, I., Vaneechoutte, M., & Deschaght, P. (2013). *Edwardsiella tarda* sepsis in a live-stranded sperm whale (*Physeter macrocephalus*). *Veterinary Microbiology*, 166(1-2), 311-315.
- Danil, K., Leger, J. A. S., Dennison, S., de Quirós, Y. B., Scadeng, M., Nilson, E., & Beaulieu, N. (2014). *Clostridium perfringens* septicemia in a long-beaked common dolphin *Delphinus capensis*: an etiology of gas bubble accumulation in cetaceans. *Diseases of Aquatic Organisms*, 111(3), 183-190.
- Del Bene, D., Little, V., Rossi, R., & Le Bas, A. (2006). Revisión preliminar de registros de varamientos de cetáceos en la costa uruguaya de 1934 a 2005. *Bases para la Conservación y el Manejo de la Costa Uruguay*. *Vida Silvestre, Uruguay*, 297-303.
- Delport, T. C., Power, M. L., Harcourt, R. G., Webster, K. N., & Tetu, S. G. (2016). Colony location and captivity influence the gut microbial community composition of the Australian sea lion (*Neophoca cinerea*). *Applied and Environmental Microbiology*, 82(12), 3440-3449.
- Derous D, ten Doeschate M, Brownlow AC, Davison NJ and Lusseau D (2020) Toward New Ecologically Relevant Markers of Health for Cetaceans. *Front. Mar. Sci.* 7:367. doi: 10.3389/fmars.2020.00367

- Domit, C., Trevizani, T. H., Farro, A. P. C., Silva, A. Z., Van Belleghem, T., Herbst, D. F., Tardin, R. H., Bisi, T. L., Laporta, P., Vidal, L. G., Chupil, H., Marcondes, D. S., Fonseca, G. F. da, Valle, R. del R. do, Berninsone, L. G., Barbosa, C. B., Cremer, M. J., & Broadhurst, M. K. (2022). Coastal development and habitat loss: Understanding and resolving associated threats to the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. En P. C. Simões-lobes & M. J. Cremer (Eds.), *The Franciscana Dolphin* (pp. 265-302). Academic Press.
- Dong, Y., Sun, Y., Xu, Q., Zang, Y., Yang, Z., Yu, G., & Zhang, X. (2025). Distinct Fecal Microbiome Communities and Functional Predictions in Spotted Seals: Age-Dependent and Dietary Transformations. *Marine Mammal Science*, e70008.
- Drago, M., Franco-Trecu, V., Zenteno, L., Szteren, D., Crespo, E. A., Sapriza, F. R., de Oliveira, L., Machado, R., Inchausti, P. & Cardona, L. (2015). Sexual foraging segregation in South American sea lions increases during the pre-breeding period in the Río de la Plata plume. *Marine Ecology Progress Series*, 525, 261-272.
- Estes, J. A., Terborgh, J., Brashares, J. S., Power, M. E., Berger, J., Bond, W. J., Carpenter, S., Essington, T., Holt, R., Jackson, J., Marquis, R., Oksanen, L., Paine, R. & Wardle, D. A. (2011). Trophic downgrading of planet Earth. *Science*, 333(6040), 301-306.
- Fan, J., Kang, H., Lv, M., Zhai, Y., Jia, Y., Yang, Z., Shi, C., Zhou, C., Diao, L., Li, J., Jin, X., Liu, S., Kristiansen, K., Zhang, P., Chen, J., & Li, S. (2024). Taxonomic composition and functional potentials of gastrointestinal microbiota in 12 wild-stranded cetaceans. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1394745.
- Fernández, A., Suárez-Santana, C., Alonso-Almorox, P., Consoli, F. A., Suárez González, Z., Molpeceres-Diego, I. & Sierra, E. (2024). Case Report: *Ambergris coprolite* and septicemia in a male sperm whale stranded in La Palma (Canary Islands). *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1388276.
- Foster, G., Holmes, B., Steigerwalt, A. G., Lawson, P. A., Thorne, P., Byrer, D. E., ... & Collins, M. D. (2004). *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2369-2373.
- Franco-Trecu, V., Auriolles-Gamboa, D., & Inchausti, P. (2014). Individual trophic specialisation and niche segregation explain the contrasting population trends of two sympatric otariids. *Marine Biology*, 161, 609-618.
- Franco-Trecu, V., Auriolles-Gamboa, D., Arim, M., & Lima, M. (2012). Prepartum and postpartum trophic segregation between sympatrically breeding female *Arctocephalus australis* and *Otaria flavescens*. *Journal of Mammalogy*, 93(2), 514-521.
- Franco-Trecu, V., Drago, M., Baladán, C., García-Olazábal, M. D., Crespo, E. A., Cardona, L., & Inchausti, P. (2015). Postharvesting population dynamics of the South American sea lion (*Otaria byronia*) in the southwestern Atlantic. *Marine Mammal Science*, 31(3), 963-978.
- Franco-Trecu, V., Drago, M., Costa, P., Dimitriadis, C., & Passadore, C. (2017). Trophic relationships in apex predators in an estuary system: a multiple-method approximation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 486, 230-236.
- Geraci J.R. & Lounsbury V.J. (1993) *Marine mammals ashore: a field guide for strandings*. Texas A&M Sea Grant Publications, Galveston.

- Glöckner, F. O., Yilmaz, P., Quast, C., Gerken, J., Beccati, A., Ciuprina, A., Bruns, G., Yarza, P., Peplies, J., Westram, R. & Ludwig, W. (2017). 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of Biotechnology*, 261, 169-176.
- Godoy-Vitorino, F., Rodriguez-Hilario, A., Alves, A. L., Gonçalves, F., Cabrera-Colon, B., Mesquita, C. S., Soares-Castro, P., Ferreira, M., Marçalo, A., Vingada, J., Eira, C., & Santos, P. M. (2017). The microbiome of a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) stranded in Portugal. *Research in microbiology*, 168(1), 85-93.
- Goertz, C. E. C., Walton, R., Rouse, N., Belovarac, J., Burek-Huntington, K., Gill, V., Hobbs, R., Xavier, C., Garrett, N., & Tuomi, P. (2013). *Vibrio parahaemolyticus*, a climate change indicator in Alaska marine mammals. *Responses of Arctic marine ecosystems to climate change*, 41-52.
- Gordon, J., Knowlton, N., Relman, D. A., Rohwer, F., & Youle, M. (2013). Superorganisms and holobionts. *Microbe*, 8(4), 152-153.
- Guerrero, R., Margulis, L. and Berlanga, M. (2013) Symbiogenesis: the holobiont as a unit of evolution. *Int. Microbiol.*, 16(3): 133–143.
- Gulland, F. M., Dierauf, L. A., & Whitman, K. L. (Eds.). (2018). *CRC handbook of marine mammal medicine*. CRC Press.
- Hermosilla, C., Hirzmann, J., Silva, L.M.R., Scheufen, S., Prenger-Berninghoff, E., Ewers, C., Häussermann, V., Försterra, G., Poppert, S. & Taubert, A. (2018). Gastrointestinal parasites and bacteria in free-living South American sea lions (*Otaria flavescens*) in Chilean Comau Fjord and new host record of a *Diphyllobothrium scoticum*-like cestode. *Frontiers in Marine Science* 5, 1–13.
- Higgins, R. (2000). Bacteria and fungi of marine mammals: a review. *The Canadian veterinary journal*, 41(2), 105.
- Hou, K., Wu, Z. X., Chen, X. Y., Wang, J. Q., Zhang, D., Xiao, C., ... & Chen, Z. S. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 135.
- IUCN (2022). The IUCN red list of threatened species. Version 2022.1. Disponible desde: www.iucnredlist.org [Acceso 20 de agosto 2023].
- Jarić I, Knežević-Jarić J and Gessner J (2015). Global effort allocation in marine mammal research indicates geographical, taxonomic and extinction risk-related biases. *Mammal Review* 45, 54–62.
- Jin, Y., Wu, S., Zeng, Z., & Fu, Z. (2017). Effects of environmental pollutants on gut microbiota. *Environmental Pollution*, 222, 1-9.
- Kabouridis, P. S., & Pachnis, V. (2015). Emerging roles of gut microbiota and the immune system in the development of the enteric nervous system. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(3), 956-964.
- Khalil, I. A., Troeger, C., Blacker, B. F., Rao, P. C., Brown, A., Atherly, D. E., Brewer, T. G., Engmann, C. M., Houghton, E. R., Kang, G., Kotloff, K. L., Levine, M. M., Luby, S. P., MacLennan, C. A., Pan, W. K., Pavlinac, P. B., Platts-Mills, J. A., Qadri, F., Riddle, M. S., ... Reiner, R. C., Jr. (2018). Morbidity and mortality due to shigella and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: The Global Burden of Disease Study 1990–2016. *The Lancet*, 18(11), 1229–1240.
- Kim, M., Cho, H., & Lee, W. Y. (2020). Distinct gut microbiotas between southern elephant seals and

Weddell seals of Antarctica. *Journal of Microbiology*, 58, 1018-1026.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1).

Labella, A. M., Castro, M. D., Manchado, M., Lucena, T., Arahal, D. R., & Borrego, J. J. (2018). *Photobacterium malacitanum* sp. Nov., and *Photobacterium andalusiense* sp. Nov., two new bacteria isolated from diseased farmed fish in Southern Spain. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(5), 444-451.

Leatherwood, S and Reeves RR (1990) *The Bottlenose Dolphin*. Academic Press, San Diego..

Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., Schlegel, M. L., Tucker, T. A., Schrenzel, M. D., Knight, R., & Gordon, J. I. (2008). Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science*, 320(5883), 1647-1651.

Li, C., Xie, H., Sun, Y., Zeng, Y., Tian, Z., Chen, X., Sanganyado, E., Lin, J., Yang, L., Li, P., Liang, B., & Liu, W. (2022). Insights on gut and skin wound microbiome in stranded Indo-Pacific finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides*). *Microorganisms*, 10(7), 1295.

Liu, Z., Li, A., Wang, Y., Iqbal, M., Zheng, A., Zhao, M., Li, Z., Wang, N., Wu, C., & Yu, D. (2020). Comparative analysis of microbial community structure between healthy and *Aeromonas veronii*-infected Yangtze finless porpoise. *Microbial cell factories*, 19, 1-12.

Loizaga de Castro, R., Saporiti, F., Vales, D. G., García, N. A., Cardona, L., & Crespo, E. A. (2016). What are you eating? A stable isotope insight into the trophic ecology of short-beaked common dolphins in the Southwestern Atlantic Ocean. *Mammalian Biology*, 81(6), 571-578

Guerrero, R., Margulis, L. and Berlanga, M. (2013) Symbiogenesis: the holobiont as a unit of evolution. *Int. Microbiol.*, 16(3): 133–143.

Margulis, L., & Fester, R. (1991). *Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis*. MIT Press.

Marón C.F., Kohl K.D., Chirife A., Di Martino M., Fons M.P., Navarro M.A. & Uhart M. (2019). Symbiotic microbes and potential pathogens in the intestine of dead southern right whale (*Eubalaena australis*) calves. *Anaerobe*, 57, 107-114.

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*, 8(4), e61217.

Medeiros, A. W., Giongo, A., Valdez, F. P., Blaes de Amorin, D., Tavares, M., d'Azevedo, P. A., Franco, A.C., Frazzon, J. & Frazzon, A. P. (2016). Characterization of the faecal bacterial community of wild young South American (*Arctocephalus australis*) and Subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*). *FEMS Microbiology Ecology*, 92(3), fiw029.

Mesquita, C. S., Soares-Castro, P., Ferreira, M., Sequeira, M., Eira, C., & Santos, P. M. (2024). First insights into the microbiota within the oral cavity of the pygmy sperm whale (*Kogia breviceps*). Preprint disponible en: <https://doi.org/10.20944/preprints202410.0297.v1>

Naya, D. E., Vargas, R., & Arim, M. (2000). Análisis preliminar de la dieta del león marino del sur (*Otaria*



flavescens) en Isla de Lobos, Uruguay. Bol. Soc. Zool. Uruguay 2a época, 12, 14-21.

Naya, E.E., Arim, M. & Vargas, R. (2002). Diet of South American fur seals (*Arctocephalus australis*) in Isla de Lobos, Uruguay. Marine Mammal Science, 18(3): 734-745

Nelson TM, Rogers TL, Carlini AR and Brown MV (2013) Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic seals: a comparison of wild and captive animals. Environmental Microbiology 15, 1132–1145.

Nelson, T. M., Apprill, A., Mann, J., Rogers, T. L., & Brown, M. V. (2015). The marine mammal microbiome: current knowledge and future directions. Microbiology Australia, 36(1), 8-13.

Nishida AH and Ochman H (2018) Rates of gut microbiome divergence in mammals. Molecular Ecology 27, 1884–1897.

Numberger, D. et al (2016). Comparative analysis of the fecal bacterial community of five harbor seals (*Phoca vitulina*). Microbiology Open, 5(5), 782–792).

Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, R., Solymos, P., Stevens, M., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., De Caceres, M., Durand, S., Evangelista, H., FitzJohn, R., Friendly, M., Furneaux, B., Hannigan, G., Hill, M., Lahti, L., McGlinn, D., Ouellette, M., Ribeiro Cunha, E., Smith, T., Stier, A., Ter Braak, C. & Weedon, J. (2022). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-2. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Ost KS and Round JL (2018) Communication Between the Microbiota and Mammalian Immunity. Annual Review of Microbiology 72, 399–422.

Pacheco-Sandoval, A., Lago-Lestón, A., Abadía-Cardoso, A., Solana-Arellano, E., & Schramm, Y. (2022). Age as a primary driver of the gut microbial composition and function in wild harbor seals. Scientific Reports, 12(1), 14641.

Pacheco-Sandoval, A., Schramm, Y., Heckel, G., Giffard-Mena, I., & Lago-Lestón, A. (2024). Unraveling the gut microbiota of Mexican pinnipeds: the dominance of life histories over phylogeny. Applied and Environmental Microbiology, 90(6), e02030-23.

Paerl, HW, Dyble, J., Moisaner, PH, Noble, RT, Piehler, MF, Pinckney, JL, y Valdes, LM (2003). Indicadores microbianos del cambio en los ecosistemas acuáticos: aplicaciones actuales a los estudios de eutrofización. FEMS Microbiology Ecology , 46 (3), 233-246.

Paruch, L., Paruch, AM, Eiken, HG y Sørheim, R. (2019). Faecal pollution affects abundance and diversity of aquatic microbial community in anthropo-zoogenically influenced lotic ecosystems. Scientific reports , 9 (1), 19469.

Pereira, C. S., Amorim, S. D., Santos, A. F. D. M., Siciliano, S., Moreno, I. B., Ott, P. H., & Rodrigues, D. D. P. (2008). *Plesiomonasshigelloides* and *Aeromonadaceae* family pathogens isolated from marine mammals of Southern and Southeastern Brazilian coast. Brazilian Journal of Microbiology, 39, 749-755.

Posit team (2024). RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA. URL <http://www.posit.co/>.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. & Glöckner, F. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596.

R Core Team (2023). *_R: A Language and Environment for Statistical Computing_*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
<<https://www.R-project.org/>>.

Ramírez, C., Coronado, J., Silva, A., & Romero, J. (2018). *Cetobacterium* is a major component of the microbiome of giant Amazonian fish (*Arapaima gigas*) in Ecuador. *Animals*, 8(11), 189.

Ramirez-Delgado D, Cicala F, Gonzalez-Sanchez R A, Avalos-Tellez R, Solana-Arellano E, and Licea-Navarro A. (2022). Multi-locus evaluation of gastrointestinal bacterial communities from *Zalophus californianus* pups in the Gulf of California, México. *PeerJ*, 10, e13235.

Reyes, J. C. (2017). *Phocoena spinipinnis* Burmeister, 1865. *Encyclopedia of Marine Mammals*, 146.

Riet-Sapriz, F. G., Costa, D. P., Franco-Trecu, V., Marín, Y., Chocca, J., González, B., Beathyate, G., Chilvers, B. & Hückstadt, L. A. (2013). Foraging behavior of lactating South American sea lions (*Otaria flavescens*) and spatial-temporal resource overlap with the Uruguayan fisheries. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 88, 106-119.

Rizzatti, G., Lopetuso, L. R., Gibiino, G., Binda, C., & Gasbarrini, A. J. B. R. I. (2017). Proteobacteria: a common factor in human diseases. *BioMed research international*, 2017(1), 9351507.

Sandfort, R. F., Murray, W., & Janda, J. M. (2002). *Moellerella wisconsensis* isolated from the oral cavity of a wild raccoon (*Procyon lotor*). *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 2(3), 197-199.

Secchi, E. R., Ott, P. H., & Danilewicz, D. (2003). Effects of fishing by-catch and conservation status of the franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*. *Marine mammals: Fisheries, tourism and management issues*, 174-191.

Sehnal, L., Brammer-Robbins, E., Wormington, A. M., Blaha, L., Bisesi, J., Larkin, I., & Adamovsky, O. (2021). Microbiome composition and function in aquatic vertebrates: small organisms making big impacts on aquatic animal health. *Frontiers in microbiology*, 12, 567408.

Selma-Royo, M., García-Mantrana, I., Calatayud, M., Parra-Llorca, A., Martínez-Costa, C., & Collado, M. C. (2021). Maternal diet during pregnancy and intestinal markers are associated with early gut microbiota. *European journal of nutrition*, 60, 1429-1442.

Semenov, V. A., & Terekhov, V. I. (2015). Correction of intestinal microbiocenosis of Black Sea bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus ponticus*) with probiotic remedies. *Aquatic Veterinarian*, 9(2).

Sender R, Fuchs S and Milo R (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology* 14 (8), e1002533

Shannon, C.E. and Weber, W. (1949). *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana, Illinois, USA.

Somarriba, E. (1999). Diversidad Shannon. *Agroforestería en las Américas*, 6(23).

Soñez, D., & Szteren, D. (2025). Navigating the microbial seas: A global analysis of gut microbiota in

marine mammals. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 105, e66, 1–12.
<https://doi.org/10.1017/S0025315425100258>

- Soutullo A, Clavijo C & Martínez-Lanfranco JA (2013). Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. SNAP/DINAMA/MVOTMA y DICYT/ MEC, Montevideo. 222 pp.
- Sun, Y., Zhang ,Shanshan, Nie ,Qixing, He ,Huijun, Tan ,Huizi, Geng ,Fang, Ji ,Haihua, Hu ,Jielun, & Nie, S. (2023). Gut firmicutes: Relationship with dietary fiber and role in host homeostasis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(33), 12073-12088.
- Suzuki, A., Shirakata, C., Anzai, H., Sumiyama, D., & Suzuki, M. (2022). Vitamin B12 biosynthesis of *Cetobacterium ceti* isolated from the intestinal content of captive common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Microbiology*, 168(9), 001244.
- Szteren D, Aurióles-Gamboa D, Labrada-Martagón V, Hernández-Camacho C & M De María (2018). Historical age-class diet changes in South American fur seals and sea lions in Uruguay. *Marine Biology* 165(59), 58.
- Tian, J., Du, J., Lu, Z., Han, J., Wang, Z., Li, D., Guan, X. & Wang, Z. (2020). Distribution of microbiota across different intestinal tract segments of a stranded dwarf minke whale, *Balaenoptera acutorostrata*. *Microbiology Open*, 9(10), e1108.
- Toro-Valdivieso, C., Toro, F., Stubbs, S., Castro-Nallar, E., & Blacklaws, B. (2021). Patterns of the fecal microbiota in the Juan Fernández fur seal (*Arctocephalus philippii*). *MicrobiologyOpen*, 10(4), e1215.
- Van Cise, A. M., Wade, P. R., Goertz, C. E. C., Burek-Huntington, K., Parsons, K. M., Clauss, T., Hobbs, R. C., & Apprill, A. (2020). Skin microbiome of beluga whales: Spatial, temporal, and health-related dynamics. *Animal Microbiome*, 2(1), 39.
- Wan X, McLaughlin RW, Zheng J, Hao Y-J, Fan F, Tian R-M & Wang D (2018). Microbial communities in different regions of the gastrointestinal tract in East Asian finless porpoises (*Neophocaena asiaeorientalis sunameri*). *Scientific Reports* 8, 14142.
- Wang, J., & Yin, Y. (2021). *Clostridium* species for fermentative hydrogen production: an overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(70), 34599-34625.
- Watkins, C. A., Gaines, T., Strathdee, F., Baily, J. L., Watson, E., Hall, A. J., Free, A. & Dagleish, M. P. (2022). A comparative study of the fecal microbiota of gray seal pups and yearlings-a marine mammal sentinel species. *MicrobiologyOpen*, 11(3), e1281.
- Wessels, E., Schelfaut, J. J., Bernards, A. T., & Claas, E. C. (2012). Evaluation of several biochemical and molecular techniques for identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pseudopneumoniae* and their detection in respiratory samples. *Journal of clinical microbiology*, 50(4), 1171-1177.
- Yang, G., & Wang, J. (2019). Changes in microbial community structure during dark fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(47), 25542-25550.
- Zunino, P. (2022). Native microbiomes in danger: Could One Health help to cope with this threat to global health? *International Journal of One Health*, 178-184.

7. Anexo

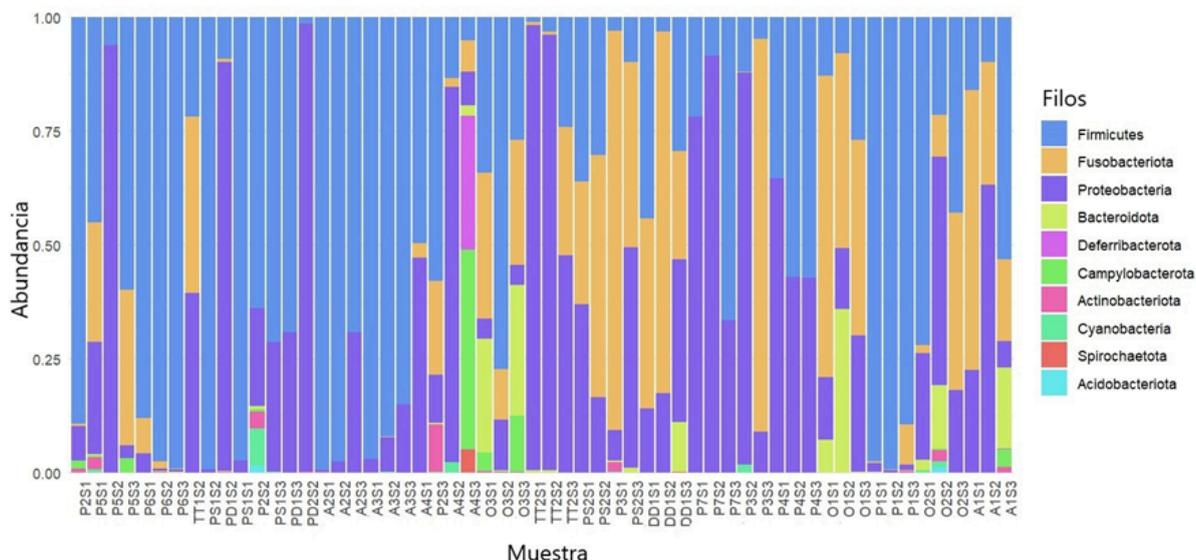


Fig. 1. Abundancia relativa de filios taxonómicos de todas las muestras totales del estudio identificadas con sus respectivos ID.

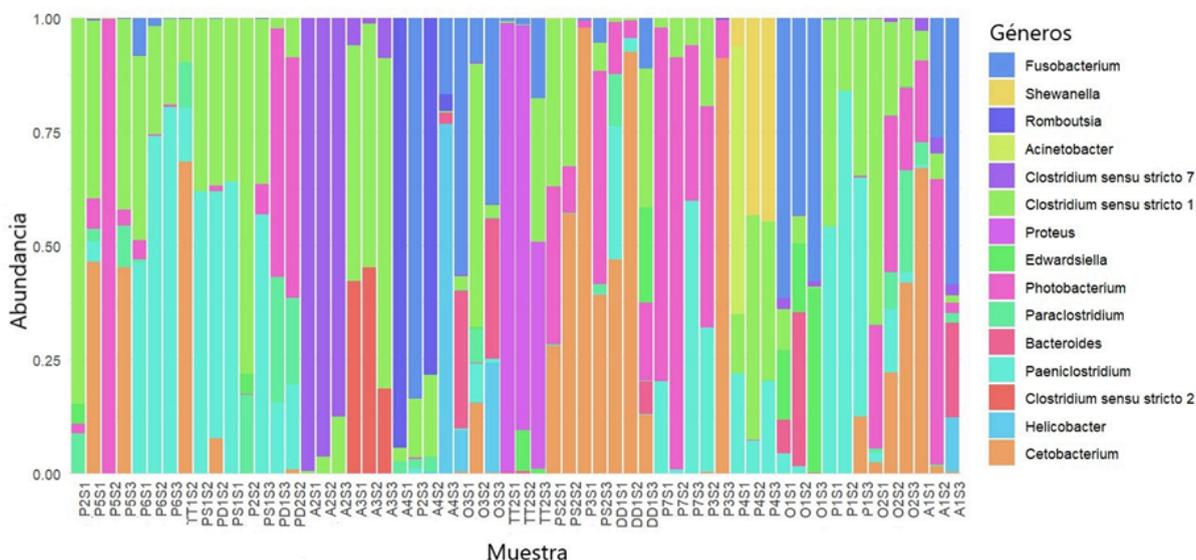


Fig. 2. Abundancia relativa de géneros taxonómicos de todas las muestras totales del estudio identificadas con sus respectivos ID.

Tabla S1. Índices de diversidad de Shannon y riqueza de las muestras del estudio con sus respectivos ID, nombre del individuo, especie y sección intestinal.

Individuo	ID Muestra	Sección	Especie	Shannon	Riqueza
A1	10_A1S1	1	<i>A.australis</i>	1.93	87
A1	11_A1S2	2	<i>A.australis</i>	2.48	139
A1	12_A1S3	3	<i>A.australis</i>	3.77	155
A2	35_A2S1	1	<i>A.australis</i>	0.42	44
A2	36_A2S2	2	<i>A.australis</i>	0.53	88
A2	37_A2S3	3	<i>A.australis</i>	1.33	41
A3	38_A3S1	1	<i>A.australis</i>	1.35	181
A3	39_A3S2	2	<i>A.australis</i>	1.55	406
A3	40_A3S3	3	<i>A.australis</i>	1.78	151
A4	41_A4S1	1	<i>A.australis</i>	2.22	137
A4	42_A4S2	2	<i>A.australis</i>	5.18	1426
A4	43_A4S3	3	<i>A.australis</i>	3.18	480
DD1	53_DD1S1	1	<i>D.delphis</i>	1.97	96
DD1	54_DD1S2	2	<i>D.delphis</i>	1.27	78
DD1	55_DD1S3	3	<i>D.delphis</i>	3.24	137
O1	1_O1S1	1	<i>O.flavescens</i>	2.33	134
O1	2_O1S2	2	<i>O.flavescens</i>	2.17	54
O1	3_O1S3	3	<i>O.flavescens</i>	2.08	40
O2	7_O2S1	1	<i>O.flavescens</i>	2.58	425
O2	8_O2S2	2	<i>O.flavescens</i>	4.78	1886
O2	9_O2S3	3	<i>O.flavescens</i>	2.20	52
O3	44_O3S1	1	<i>O.flavescens</i>	3.57	180
O3	45_O3S2	2	<i>O.flavescens</i>	3.29	470
O3	46_O3S3	3	<i>O.flavescens</i>	3.48	186
P1	4_P1S1	1	<i>P.blainvillei</i>	1.32	96



P1	5_P1S2	2	<i>P.blainvillei</i>	0.91	90
P1	6_P1S3	3	<i>P.blainvillei</i>	2.04	97
P2	13_P2S1	1	<i>P.blainvillei</i>	2.35	100
P2	14_P2S2	2	<i>P.blainvillei</i>	3.06	159
P2	15_P2S3	3	<i>P.blainvillei</i>	2.91	145
P3	16_P3S1	1	<i>P.blainvillei</i>	1.48	110
P3	17_P3S2	2	<i>P.blainvillei</i>	4.15	650
P3	18_P3S3	3	<i>P.blainvillei</i>	1.00	27
P4	19_P4S1	1	<i>P.blainvillei</i>	1.74	56
P4	20_P4S2	2	<i>P.blainvillei</i>	1.46	33
P4	21_P4S3	3	<i>P.blainvillei</i>	1.83	36
P5	22_P5S1	1	<i>P.blainvillei</i>	3.44	205
P5	23_P5S2	2	<i>P.blainvillei</i>	1.54	46
P5	24_P5S3	3	<i>P.blainvillei</i>	2.23	40
P6	25_P6S1	1	<i>P.blainvillei</i>	1.71	62
P6	26_P6S2	2	<i>P.blainvillei</i>	1.36	87
P6	27_P6S3	3	<i>P.blainvillei</i>	1.01	39
P7	56_P7S1	1	<i>P.blainvillei</i>	1.46	39
P7	57_P7S2	2	<i>P.blainvillei</i>	1.82	118
P7	58_P7S3	3	<i>P.blainvillei</i>	1.22	27
PD1	30_PD1S2	2	<i>P.dioptrica</i>	2.02	433
PD1	33_PD1S3	3	<i>P.dioptrica</i>	1.91	49
PD2	34_PD2S2	2	<i>P.dioptrica</i>	1.76	454
PS1	29_PS1S2	2	<i>P.spinipinnis</i>	1.03	14
PS1	31_PS1S1	1	<i>P.spinipinnis</i>	1.16	34
PS1	32_PS1S3	3	<i>P.spinipinnis</i>	2.13	56
PS2	50_PS2S1	1	<i>P.spinipinnis</i>	1.90	43
PS2	51_PS2S2	2	<i>P.spinipinnis</i>	1.73	25

PS2	52_PS2S3	3	<i>P.spinipinnis</i>	2.30	69
TT1	28_TT1S2	2	<i>T.truncatus</i>	2.02	47
TT2	47_TT2S1	1	<i>T.truncatus</i>	2.12	399
TT2	48_TT2S2	2	<i>T.truncatus</i>	2.48	213
TT2	49_TT2S3	3	<i>T.truncatus</i>	2.29	128

Tabla S2. Resultados de los análisis PERMANOVA estratificado para las secciones intestinales individuales, excepto para *P. dioptrica* debido a la ausencia de las tres secciones intestinales para los individuos muestreados.

Especie	F	P-valor
<i>A. australis</i>	0.71	0.02
<i>P. blainvillei</i>	0.52	0.51
<i>O. flavescens</i>	0.03	0.82
<i>T. truncatus</i>	0.47	0.33
<i>P. spinipinnis</i>	0.03	0.11
<i>D. delphis</i>	1.49	0.66

Tabla S3. Resultados de los análisis por pares post hoc de *P. blainvillei*.

Comparación	F	Pr(>F)
P2 vs P1	3.9286	0.1
P2 vs P3	1.8465	0.2
P2 vs P4	3.3713	0.1
P2 vs P5	1.5229	0.2
P2 vs P6	3.4344	0.1
P2 vs P7	3.5738	0.1
P3 vs P1	4.708	0.1
P3 vs P4	4.222	0.1
P3 vs P5	1.1399	0.4
P3 vs P6	5.254	0.1
P3 vs P7	4.1677	0.1
P4 vs P1	6.1669	0.1
P4 vs P5	3.851	0.1
P4 vs P6	6.9979	0.1
P4 vs P7	6.710	0.1
P5 vs P1	4.3606	0.1
P5 vs P6	4.627	0.1
P5 vs P7	2.1495	0.3
P6 vs P1	3.5207	0.1
P6 vs P7	6.4554	0.1