



**ESTUDIO METAGENÓMICO DE LA DIVERSIDAD EUCARIOTA DEL  
ECOSISTEMA DEL MANGLAR DE LA BAHÍA DE CISPATÁ, SAN ANTERO,  
CÓRDOBA**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C.  
2019**



**ESTUDIO METAGENÓMICO DE LA DIVERSIDAD EUCARIOTA DEL  
ECOSISTEMA DEL MANGLAR DE LA BAHÍA DE CISPATÁ, SAN ANTERO,  
CÓRDOBA**

**Nelson Adrián Casas Velásquez  
Lina Vanessa Hurtado Pulido**

**Asesora**

**Martha Lucía Posada Buitrago, Ph.D.  
Docente Facultad Ciencias de la Salud**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C.  
2019**

## DEDICATORIA

*A todas las personas que no solo me apoyaron en el transcurso de mi carrera sino que estuvieron ahí para mi cuando los necesitaba, especialmente a mi familia, que me apoyo en absolutamente todo y me enseñaron a nunca rendirme, a mi mamá Ynes que es mi inspiración y mi motivo a seguir, a mi padre Nelson que me apoyo en mis estudios, a mis hermanas Yasmin y Laura que me han apoyado en todas las decisiones de mi vida.*

*También a mis amigos, que me han demostrado que también se puede tener una segunda familia, en las buenas y en las malas.*

*A mis maestros, que me han enseñado a no solo ser un buen estudiante y futuro profesional, sino también a ser una persona con buenos valores.*

*Adrián*

*Las palabras no me alcanzan para dedicar este trabajo, primordialmente a mi familia, por ser mi pilar y son más dueños de esto que yo, gracias por enseñarme que lo importante no es caer si no permanecer en el camino, un camino lleno de vicisitudes, pero colmado de enseñanzas de todo tipo; A mi compañero de tesis que se convirtió en mi amigo y cómplice, a la profesora Martha Lucía por ser una guía y amiga en este proceso y al resto de mis amigos que dieron muchas batallas a mi lado y me honra tenerlos en mi vida.*

*Lina Vanessa*

## **AGRADECIMIENTOS**

Primordialmente a nuestras familias, que son el pilar de nuestras vidas, son los que nos motivan cada día a ser mejores personas y a luchar por nuestros sueños, a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, que nos dio la oportunidad de estudiar allí y convertirnos en buenos profesionales, a nuestros amigos y compañeros, que nos enseñaron tanto cosas buenas como malas.

A la profesora Martha Lucía Posada, que nos brindó su confianza y apoyo en este proyecto, por estar en los momentos que la necesitábamos y por ser una excelente persona y profesional.

# TABLA DE CONTENIDO

Pág

<b>Lista de tablas</b>	
<b>Lista de Gráficos</b>	
<b>Lista de figuras</b>	
<b>Lista de anexos</b>	
<b>Resumen</b>	
<b>Introducción</b> -----	<b>1</b>
<b>1. Objetivos</b> -----	<b>2</b>
<b>2. Antecedentes</b> -----	<b>2</b>
<b>3. Marco Teórico</b> -----	<b>9</b>
<b>3.1 Historia del manglar de la Bahía de Cispatá</b> -----	<b>9</b>
<b>3.2 Generalidades de los Manglares</b> -----	<b>9</b>
<b>3.3 Diversidad eucariota</b> -----	<b>11</b>
<b>4. Marco jurídico</b> -----	<b>14</b>
<b>5. Metagenómica</b> -----	<b>14</b>
<b>6. Herramientas moleculares y bioinformática</b> -----	<b>16</b>
<b>6.1 BLAST</b> -----	<b>16</b>
<b>6.2 QIIME</b> -----	<b>16</b>
<b>6.3 DADA2</b> -----	<b>17</b>
<b>6.4 Plataforma Illumina</b> -----	<b>17</b>
<b>7. Bioprospección</b> -----	<b>18</b>
<b>8. Aproximación al diseño metodológico</b> -----	<b>20</b>
<b>9. Diseño metodológico</b> -----	<b>20</b>
<b>9.1 Tipo de investigación</b> -----	<b>20</b>
<b>9.2 Universo, población y muestra</b> -----	<b>20</b>
<b>9.2.1 Universo</b> -----	<b>20</b>
<b>9.2.2 Población</b> -----	<b>20</b>
<b>9.2.3 Muestra</b> -----	<b>20</b>
<b>9.3 Variables e indicadores</b> -----	<b>20</b>
<b>9.3.1 Variable independiente</b> -----	<b>20</b>

9.3.2 Variable Dependiente-----	20
9.4 Hipotesis-----	22
<b>10. Técnicas y procedimientos -----</b>	<b>22</b>
10.1 Ubicación de la zona de muestreo-----	22
10.2 Fase 1 Muestreo de agua y sedimentos de la Bahía de Cispatá San AnteroCórdoba-----	23
10.2.1 Conservación y transporte de las muestras -----	25
10.2.2 Análisis Físico-Químico de metales pesados-----	25
10.3 Fase 2. Filtración por membrana de las muestras de agua---	25
10.4 Fase 3. Extracción de ADN-----	25
10.5 PCR y electroforesis-----	26
10.6 Secuenciación-----	27
<b>11. Resultados-----</b>	<b>27</b>
11.1 Extracción ADN y PCR-----	27
11.1.1 Cuantificación-----	28
11.1.2 Electroforesis-----	28
11.2 Resultados análisis metagenómico-----	29
11.2.1 Secuenciación-----	29
11.2.2 Identificación Eucariota a nivel Filo-----	30
11.2.3 Identificación Eucariota a nivel orden-----	33
11.2.4 Diversidad Alfa del análisis metagenómico del ARNr 18s-----	37
11.2.5 Diversidad Beta del análisis metagenómico del ARNr 18s-----	38
11.3 Análisis físico-químico del agua-----	39
11.4 Análisis Metales Pesados en Aguas-----	41
<b>12. Discusión-----</b>	<b>42</b>
<b>13. Conclusiones-----</b>	<b>52</b>
<b>14. Referencias Bibliográficas-----</b>	<b>53</b>
<b>15. Anexos-----</b>	<b>64</b>

**Lista de tablas.**

<b>Tabla 1.</b> Diversidad de organismos eucariotas en el manglar-----	<b>12</b>
--	-----------

<b>Tabla 2.</b> Indicadores-----	<b>21</b>
<b>Tabla 3.</b> Recolección de muestras de agua y suelo de manglar-----	<b>23</b>
<b>Tabla 4:</b> Cálculos para la Master Mix-----	<b>26</b>
<b>Tabla 5:</b> Condiciones para la PCR-----	<b>26</b>
<b>Tabla 6:</b> Cebadores (Primers) usados en la PCR-----	<b>27</b>
<b>Tabla 7.</b> Cuantificación de ADN por el equipo Nanodrop 2000/2000c UV-Vis (ThermoFisher Scientific)-----	<b>28</b>
<b>Tabla 8.</b> Secuencias obtenidas durante el procesamiento metagenómico del ARNr 18S, producidas por la plataforma Illumina MiSeq y editadas por Dada2 y QIIME v1.9.1-----	<b>29</b>
<b>Tabla 9.</b> Identificación Eucariota a nivel Filo-----	<b>31</b>
<b>Tabla 10.</b> Identificación Eucariota a nivel orden-----	<b>34</b>
<b>Tabla 11.</b> Resultados análisis físico químico de las muestras de agua-----	<b>40</b>
<b>Tabla 12.</b> Resultados análisis- físico químico de muestras de sedimento-----	<b>40</b>
<b>Tabla 13.</b> Resultados Análisis Metales Pesados Aguas-----	<b>41</b>

#### **Lista de Gráficos.**

<b>Gráfico 1:</b> Gráfica de composición a nivel de filo-----	<b>31</b>
<b>Gráfico 2:</b> Gráfica de Identificación Eucariota a nivel orden-----	<b>33</b>
<b>Gráfico 3.</b> Curva de rarefacción de la diversidad alfa de la región ARNr 18S-----	<b>38</b>
<b>Gráfico 4.</b> Diversidad Beta-----	<b>39</b>

#### **Lista de figuras.**

<b>Figura 1:</b> Mapa de la ubicación del Departamento de Córdoba.-----	<b>22</b>
<b>Figura 2.</b> Mapa de zonificación de manglar - Zona de muestreo-----	<b>23</b>
<b>Figura 3.</b> Electroforesis de la región ITS1-ITS4 del ARNr de muestras de agua y sedimento de manglar de la Bahía de Cispatá-----	<b>29</b>
<b>Figura 4.</b> Mapa de calor composición a nivel Filo-----	<b>32</b>
<b>Figura 5.</b> Mapa de calor composición a nivel orden-----	<b>37</b>

#### **Lista de anexos.**

<b>Anexo 1.</b> Extracción de ADN usando kit ZymoBIOMICSTM	
--	--

DNA Mini Kit (ZymoResearch, USA)-----	64
<b>Anexo 2. Gráfica 1.</b> Composición microbiana según clase-----	65
<b>Anexo 3. Tabla 1.</b> Composición microbiana según clase.-----	65
<b>Anexo 4. Gráfica 2.</b> Composición microbiana según familia.-----	66
<b>Anexo 5. Tabla 2.</b> Composición microbiana según familia.-----	66
<b>Anexo 6. Gráfica 3.</b> Composición microbiana según género-----	70
<b>Anexo 7. Tabla 3.</b> Composición microbiana según género-----	70
<b>Anexo 8. Gráfica 4.</b> Composición microbiana según especies.-----	74
<b>Anexo 9. AnexoTabla 4.</b> Composición microbiana según especies---	75



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**ESTUDIO METAGENÓMICO DE LA DIVERSIDAD EUCARIOTA DEL  
ECOSISTEMA DE MANGLAR DE LA BAHÍA DE CISPATÁ, SAN ANTERO,  
CÓRDOBA, COLOMBIA.**

**RESUMEN**

La importancia biológica de los manglares consiste en proteger a un sin fin de organismos en sus raíces, troncos, lodo y agua, donde se encuentran organismos como bacterias y hongos que hacen parte de la descomposición de materiales orgánicos y pueden transformar materiales tóxicos, limpiando el agua que desemboca allí. La metagenómica, es una de las denominadas ciencias ómicas, que compara e intenta reconstruir el metabolismo de un ecosistema completo o el de un microorganismo en específico. La metagenómica resulta óptima a la hora de evaluar todos los aspectos relacionados con los microorganismos que no pueden ser cultivados, es por ello que este estudio busca identificar todas las poblaciones eucariontes que lo habitan, destacando características importantes que se dan por la conformación filogenética de los mismos y que resultan en grandes aportes dentro del ciclo biológico del ecosistema. Se obtuvieron muestras de sedimento y de agua, en cuatro zonas específicas del manglar de la Bahía de Cispatá: zona nativa, zona reforestada hace 10 años, zona reforestada hace dos años e intervenida; la región 18S del ADNr fue secuenciado en la plataforma Illumina MiSeq (ZymoResearch, USA), y se obtuvieron 1.302.526 secuencias crudas y finalmente 3.323 Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU), donde el filo predominante identificado es *Archaeplastida*, clasificación donde se encuentran todas las algas verdes, rojas entre otras

**PALABRAS CLAVES:** Manglar, metagenómica, diversidad eucariota, ciclo biogeoquímico, metabolismo.

### **ABSTRACT**

Metagenomics, one of the so-called omic sciences, reconstruct the metabolism of a complete ecosystem or specific microorganisms, as in the case of the mangrove swamp of Cispatá Bay. Mangroves biological importance relies on protecting to an endless number of organisms in their roots, trunks, mud and water, where organisms such as bacteria and fungi co-exists. Those organisms are fundamental for decomposition of organic materials, and clearance of toxic materials. Metagenomics is optimal for evaluating all aspects related to microorganisms that can not be cultivated. Hence, this study seeks to identify all the eukaryotic populations that inhabit it, highlighting important characteristics that are given by the phylogenetic conformation and that result in large contributions within the biological cycle of the ecosystem. Samples of sediment and water were obtained in four specific zones of the mangrove: native zone, area reforested 10 years ago, area reforested 2 years ago and intervened. The 18S region of the rDNA was sequenced on the Illumina MiSeq platform (ZymoResearch, USA), 1,302,526 raw sequences were obtained and 3,323 Operational Taxonomic Units (OTU) were determined, where the predominant Phylum identified was Archaeplastida, which contains all the green and red algae, among other taxa.

**KEYWORDS:** Mangrove, biogeochemical cycle, metabolism, metagenomics, eukaryotic diversity.

**ESTUDIANTES:** Nelson Adrián Casas Velásquez , Lina Vanessa Hurtado Pulido.

**DOCENTE:** Martha Lucia Posada Buitrago, Ph.D.

**INSTITUCIONES:** Universidad Colegio mayor de Cundinamarca y ASOCAIMAN



## INTRODUCCIÓN

Los manglares son considerados como una de las cinco estructuras biológicas más importantes y productivas en el mundo<sup>1</sup>, son el hábitat de miles de especies tanto procariotas como eucariotas. alberga hongos, bacterias y demás microorganismos que contribuyen a la descomposición de materia orgánica e incluso ayudan a la eliminación y/o bioacumulación de metales pesados, consiguiendo de esta manera purificar las aguas que son el sustento de actividades como la pesca, la extracción de moluscos y crustáceos, beneficiando así aproximadamente a 600 familias de la región. El ecosistema del manglar de la Bahía de Cispatá limita al norte con el mar caribe, protege a las comunidades de San Antero y otros municipios de Córdoba, de las dinámicas fluviales que se puedan dar, así como también la zona ganadera y agrícola de la cuenca baja del Río Sinú.

La variación de la salinidad del agua y los sedimentos que son inundados por la misma, propician la distribución diferencial de las especies, las cuales no han sido estudiadas por completo debido a las adversidades que trae el cultivo *in vitro*, se utilizaron herramientas Bioinformáticas, orientadas hacia la biología molecular, tales como la metagenómica, donde se estudiaron características filogenéticas, además del comportamiento metabólico de las especies eucariotas que cohabitan el manglar y los diferentes beneficios que aportan dentro de este ecosistema.

El estudio de la región 18S del rDNA de estos microorganismos, sugiere la historia evolutiva de estos y reconstruye los ciclos biogeoquímicos en los que participa cada uno de ellos dentro del manglar.

## **OBJETIVOS**

### **1. Objetivo General**

Contribuir al conocimiento de la diversidad eucariota del ecosistema del manglar de la bahía de Cispatá, San Antero, Córdoba, Colombia.

### **Objetivos específicos**

- Determinar la diversidad microbiana eucariota asociada a sedimentos del ecosistema de manglar de la Bahía de Cispatá, mediante análisis metagenómico, en cinco zonas de diferente uso: Caño Salado, Caño Dago, Caño Navío, Caño Muerto, Desembocadura río Sinú-Brazo Tinajones.
- Determinar la diversidad microbiana eucariota asociada a aguas del ecosistema de manglar de la Bahía de Cispatá en cinco zonas de diferente uso, mediante análisis metagenómico.
- Comparar la diversidad de las comunidades microbianas eucariotas encontrada en las cinco zonas del manglar con diferente uso.

### **2. Antecedentes**

En 2010, Santos et al, revelaron en su estudio de la región 18S del rDNA de microeucariotas la presencia de hidrocarburos en los sedimentos del manglar de Restinga da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil<sup>1</sup>. El estudio se basó en los microorganismos microeucariotas, los cuales son un indicador efectivo de la presencia de contaminantes ambientales. Existe un sin fin de microeucariotas, y por lo tanto, la distribución, el papel ecológico y las respuestas a los efectos antropogénicos de estos, son bastante desconocidos. La mayoría del petróleo procedente de derrames de petróleo oceánico, desembocan en ecosistemas costeros como los manglares, que están amenazados mundialmente con la desaparición, destacando la necesidad de herramientas eficientes para indicar la presencia de hidrocarburos en estos ambientes.

Estos microorganismos, son un subconjunto del plancton conocido como microplancton, del cual son miembros las diatomeas, los dinoflagelados, los

cocolitofóridos y una gran cantidad de protozoos; son de vital importancia para los ecosistemas marinos como lo son los manglares, porque representan la base de la red alimentaria pelágica en el océano y los cambios en la composición y estructura de esta red pueden conducir a cambios profundos en todos los niveles tróficos.

Santos et al. demostraron una disminución tanto en la diversidad como en la riqueza de especies después de la contaminación. El grupo filogenético que mostró la mayor sensibilidad al petróleo fue el Nematoda. Se detectó un aumento marcado en los grupos Bacillariophyta (diatomeas) y Biosoecida después de la contaminación. Las muestras contaminadas con petróleo en su mayoría presentaban organismos relacionados con *Bacillariophyta sp.* y *Cafeteria minima*, lo que indica que estos grupos serían objetivos posibles para biomonitorizar el petróleo en los manglares.

Andreote et al, en 2012, en su artículo sobre los manglares brasileños y la composición de sus sedimentos, hacen referencia a la identificación de los microorganismos que habitaban los sedimentos de los manglares brasileños, y establecen la importancia del manglar como un ecosistema que constituye una porción del 60-70 % de las líneas costeras, que alberga un elevado número de microorganismos, además de mantener en equilibrio los biomas marinos y asegurar la supervivencia del mismo<sup>2</sup>. Los autores resaltan características especiales que posee este ecosistema, como los niveles de salinidad, cantidades de oxígeno variables (por las intermitencias en la frecuencia de las mareas), potencial Redox, gracias a la característica anteriormente mencionada, por todo ello la proliferación de la microbiota se hace abundante, cuando ésta no se ve afectada por ninguna de las actividades humanas, y se crea un consorcio microorganismo-manglar, donde los microbios dotan de todas las características necesarias al manglar, asegurando la correcta ejecución de todos los ciclos biogeoquímicos, y el segundo contribuye a la nutrición, crecimiento, viabilidad favorable de todos y cada uno de los microorganismos que lo habitan.

Además, dentro de las herramientas que concede el manglar para la conservación de las especies microbianas, está el proveer un elevado número de sustratos orgánicos

e inorgánicos hallados en el sedimento de estos ecosistemas, diversas propiedades ecológicas, antropogénicas, entre otras.

En 2012, Ghizelini, Hagler y Macrae<sup>3</sup>, hicieron una revisión bibliográfica sobre la diversidad microbiana de los manglares brasileños, donde establecieron las proporciones que ocupan los manglares dentro del planeta tierra, 25 % de vegetación en las costas de la tierra y 75% de las costas tropicales; también revisaron la capacidad de estos de sobrevivir en ambientes con fluctuaciones salinas, cambios de temperatura y barros con características anóxicas; también reportaron que dentro de la masa total de detritus los manglares exportan 1,2% de biomasa compuesta por bacterias y hongos (91%), algas 7% y protozoos 2%. Los autores reportaron los hongos ascomicetos, hongos mitospóricos, basidiomicetos, chitridiomicetos, mixomicetes, oomicetos, taustocitridos y zigomicetos en los manglares, y que los manglares brasileños cuentan con tres especies diferentes de árboles de mangle *Avicennia*, *Laguncularia* y *Rhizophora*.

Thompson et al (2013) estudiaron el potencial celulolítico que poseen los microorganismos que habitan dos importantes manglares de Brasil<sup>4</sup>, procariotas y eucariotas, aislados de muestras de manglar de Río de Janeiro y Bahía Porto Seguro. En total se aislaron 296 microorganismos, 179 (60.5%) y 117 (39.5%) respectivamente, por lo cual relacionaron esta diferencia con el estado de conservación del manglar, el de Río de Janeiro significativamente mayor que el de Bahía Porto Seguro, aunque en este último se evidenciaban más características catalíticas por parte de los microorganismos, donde encontraron enzimas como celulasas, hemicelulasas, dominios de unión a carbohidratos, dockerinas y cohesinas.

En el artículo publicado por la Universidad Nacional de Colombia en el 2013, llamado Grupos funcionales de microorganismos asociados al manglar del Caribe Colombiano<sup>5</sup>, se mencionaba que en el mundo aproximadamente existen 100 especies de hongos registradas en los manglares, donde muchos de ellos poseen enzimas para degradar lignina, celulosa y otros componentes vegetales. La descomposición de la madera de mangle originada por hongos marinos se delimita a las capas exteriores y se da de manera inmediata, ya que estos requieren de niveles

altos de oxígeno. Los estudios realizados resaltan que las úlceras producidas por *Cylindrocarpon* en *Rhizophora* spp., han sido registradas en manglares de la isla de San Andrés, de Urabá, de la bahía de Cispatá y en la península de Azuero, Panamá, en incidencias de 20-60% con posibles consecuencias para la estructura o integridad de los bosques afectados<sup>5</sup>.

La investigación realizada en el año 2014 por Samper y Silva<sup>6</sup>, acerca de la conformación estructural de los manglares de Playa Blanca, Escondido y Rincón de Osa, Golfo Dulce, Costa Rica, mencionó las especies más importantes de mangle que se encuentran en dichos ecosistemas, como lo son, *Rhizophora racemosa* y *Conocarpus erectus*. En este estudio se hicieron mediciones de salinidad en el agua intersticial de los árboles, la distribución de los mismos, y su capacidad de sobrevivir en zonas de fuerte oleaje, se concluyó que estas especies no se encontraban relacionadas entre sí pero presentaban adaptaciones especiales, que ayudaban a evitar la erosión y generaban sumideros de carbono.

En un estudio sobre hongos realizado por Simões et al<sup>7</sup>, en el año 2015, se analizaron metagenómicamente la rizósfera de mangle gris y muestras de suelo a granel que fueron tomadas en la costa del mangle rojo (*Avicennia marina*), y los resultados obtenidos revelaron que Ascomycota era el filo dominante (76% -85%), mientras que Basidiomycota fue menos abundante (14% -24%), sin embargo, su abundancia fue mayor a la que usualmente es reportada para tales ambientes. También se demostró que las comunidades fúngicas fueron más estables dentro de la rizosfera que dentro del suelo a granel, tanto a nivel de clase como a nivel de género.

Pachiadaki, en el 2016, analizó la actividad fúngica y procariota de la biosfera subsuperficial marina, en Perú y en la cuenca de Canterbury, deducidas de análisis basados en ARN y microscopía<sup>8</sup>. El principal enfoque de esta investigación, consistió en el análisis de las zonas intermedias de las fuentes acuíferas de Perú y Canterbury, además de compararlas entre sí con respecto a la diversidad de cada uno de los ecosistemas y las características propias de cada microorganismo estudiado, agregando que se realizaron cotejos con estudios previos en donde las muestras eran tomadas de sedimentos, donde la microbiota resulta mayor que la de zonas intermedias, los estudios metatranscriptómicos aportaron información acerca del

metabolismo de estos microorganismos, en los cuales se evidenciaron el uso de aminoácidos, lípidos y carbohidratos por cada uno de ellos, agregando que contaban con genes asociados a transportadores de metales, resistencia y producción de antibióticos.

Loganathachetti, Poosakkannu, Muthuraman (2017) realizaron un estudio en referencia a los conjuntos de comunidades fúngicas presentes en los diferentes compartimentos del suelo en un ecosistema de manglar<sup>9</sup>; clasificaron y caracterizaron las secuencias genómicas de las comunidades fúngicas que cohabitaban en este nicho, específicamente las que se encontraron asociadas con las raíces de *Avicennia marina*, una especie de manglar característica de la costa este de África. Realizaron varios comparativos de dos partes del suelo que conomita con la planta, la rizósfera y el suelo neumatóforo (modificaciones especializadas de la raíz o raíces aéreas), observaron una correlación significativa entre los cambios en la composición de la comunidad fúngica y la disponibilidad de carbono o nitrógeno de los diferentes compartimentos del suelo, determinaron que los suelos que conomitan con la planta presentaban una riqueza más alta en especies fúngicas que los suelos pertenecientes a rizosfera y neumatóforos.

Un estudio realizado por Gnavi et al<sup>10</sup>, en el año 2017, analizó e identificó la microbiota del alga verde *Flabellia petiolata* del mediterráneo; realizó el aislamiento de hongos, principalmente pertenecientes a la división Ascomycota (61 taxones), y tan solo se encontraron tres hongos de la división Basidiomycota. La posición filogenética de los micelios estériles y los taxones crípticos, inferida sobre la base de la región parcial LSU, reveló la presencia de nuevos linajes filogenéticos putativos dentro de Dothideomycetes y Sordariomycetes.

Continuando con esta línea de investigación se consultó un artículo del año 2018 por Mendes y Sai, donde se compararon tres tipos de suelo, de bosques, suelos de descanso y manglar del sureste de Brasil, para determinar la composición taxonómica y funcional<sup>11</sup>. Se evaluaron por medio de metagenómica y secuenciación shotgun, el suelo de manglar presentó mayor diversidad taxonómica, funcional y presenta un gran número de secuencias relacionadas con replicación microbiana y la supervivencia

(ADN, ARN y metabolismo de proteínas, división celular y ciclo celular), motilidad y quimiotaxis, señalización celular, entre otros.

Otro estudio con un enfoque similar, realizado por Hannula et al en 2018<sup>12</sup>, acerca de la biodiversidad fúngica y su relación con la salud en los suelos donde habitan, mediante análisis metagenómico teniendo en cuenta las secuencias ITS (secuencias del espaciador del transcrito interno); clasificaron los grupos fúngicos en reguladores del ecosistema y controladores biológicos, los primeros se encargan de formar la estructura del suelo, es decir, la conformación y la modificación de hábitats para otros microorganismos y los segundos regulan enfermedades, pestes e incluso el crecimiento de otros microorganismos; además, determinaron la diversidad alfa y beta de los grupos fúngicos identificados.

Imchen M, et al (2017)<sup>13</sup> tomaron cuatro muestras en diferentes puntos del manglar situado en Kerala, India, y realizaron un estudio metagenómico, compararon los datos obtenidos con otros datos de muestras de manglares conocidos, selva tropical y sedimentos oceánicos. Los resultados de este estudio revelaron que en menos del 2% del total de lecturas se encontraron microorganismos eukaryota, la mayoría pertenecen al phylum *Streptophyta* en las muestras de India y Brasil. La clase dominante en la muestra de la selva tropical fue *Ascomycota*, y *Streptophyta* fue importante en las lecturas eucarióticas del océano, sin embargo, *Bacillariophyta*, el cual contiene diatomeas, fue el filo dominante.

Bahram et al (2018), analizaron el genoma y el microbioma de *Inocybaceae* (Agaricales, Basidiomycota), el cual forma asociaciones simbióticas con una amplia variedad de especies de plantas. Realizaron la secuenciación metagenómica de los tejidos de fructificación del cuerpo de *Inocybe terrigena* (Ku) Kuyper, para clasificar las secuencias genómicas de hongos y bacterias, como resultado se obtuvo un genoma fúngico casi completo que contiene el 93% de los genes eucarióticos principales. Este estudio demuestra la utilidad que tiene el análisis metagenómico directo de los tejidos del cuerpo fructífero para caracterizar genomas y el microbioma de los hongos<sup>14</sup>.

El artículo titulado “La competencia de interferencias como determinante clave para la distribución espacial de los cangrejos de manglar” por Cannicci et al (2018), indica que la zonación de los árboles y factores abióticos como la temperatura del suelo y la granulometría del suelo, se ven relacionadas con la distribución espacial de los cangrejos de manglar<sup>15</sup>. El estudio se realizó sobre conjuntos de fauna en dos zonas de un manglar de Sri Lanka, un nivel intermareal superior artificial y uno natural eulitoral, en la costa. El resultado de este estudio dio a conocer que ambos cinturones intermareales difieren tanto en la composición floral como en las especies de cangrejos. La zona en la cual predominaba la especie *Neosarmatium smithi* era la zona eulitoral, mientras que dentro de la franja litoral elevada se distribuyeron de manera más uniforme cuatro sesármidos (*N. smithi* , *N. asiaticum* , *N. malabaricum* y *Muradium tetragonum*).

### **3.Marco teórico**

#### **3.1 Historia del Manglar de la Bahía de Cispatá**

San Antero Córdoba, en su inicio como civilización, fue poblado por un grupo de indígenas Finzenu, los cuales pertenecían a la cultura Zenú y de igual manera, a la familia lingüística de los Caribes. Este grupo habitó el territorio que hasta el día de hoy, conforma el casco urbano del municipio, la bahía de Cispatá, las riberas y desembocaduras del río Sinú<sup>16</sup>.

La primera persona europea que llegó a este territorio fue Alonso de Ojeda en 1499, procedente de Cartagena de Indias, así mismo, Rodrigo de Bastidas también ingreso al territorio Cordobense en 1501, el cual llevaba en mando una expedición que tenía planeado determinar las características de la zona, descubriendo en esta, la desembocadura del río Sinú<sup>16</sup>.

Ya en 1647, Diego de Cervella, originario de España, con la intención de colonizar pueblos para la explotación agrícola y ganadera, se situó en la orilla del arroyo que lleva su nombre, y así fundó San Antero<sup>17</sup>.

El manglar de la bahía de Cispatá, en el municipio de San Antero, Córdoba, está conformado por una extensión de 4.622 hectáreas y con una zona de manglar que abarca cerca de 459 hectáreas protegidas, que hacen parte del 9,9% del total de la bahía, de la totalidad del manglar se destinaron 4.163 hectáreas para aprovechamiento forestal<sup>18</sup>.

### **3.2 Generalidades de los manglares**

Los manglares se describen, según el Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible (MADS) de Colombia<sup>19</sup>, como ecosistemas marino-costeros que están situados en los trópicos y subtropicos del planeta, en el cual la especie fundamental es el mangle.

Los manglares constituyen un ecosistema muy grande e importante, albergan a una increíble biodiversidad por lo que se los considera una de las cinco unidades ecológicas más productivas del mundo, con niveles de productividad primaria que superan la de muchos sistemas agrícolas<sup>19</sup>.

Existe gran variedad de especies de mangle, pero las registradas en Colombia son: *Rhizophora mangle* (mangle rojo), *Avicennia germinans* (mangle negro), *Laguncularia racemosa* (mangle blanco), *Conocarpus erectus* (mangle zaragoza), y *Pelliciera rhizophorae* (mangle piñuelo), siendo el mangle rojo y el mangle negro las especies más abundantes y de mayor uso. Sin embargo, el mangle piñuelo (*P. rhizophorae*), una especie de mangle originaria del Pacífico ha observado en la Bahía de Cispatá (Córdoba)<sup>19</sup>.

Los manglares pueden ser agrupados según sus características y ubicación dentro de la zona. Se les llama ribereños a los manglares que crecen en las orillas de los ríos y en las zonas donde hay influencia de las mareas y el agua salada o salobre; el sustrato allí es variable, debido al suelo que está constantemente en contacto con el agua de río y de mar; sin embargo, reciben gran cantidad de nutrientes arrastrados

por los ríos, lo que les permite un enorme desarrollo que forma bosques densos. Los manglares que crecen en las orillas de las costas que están protegidas, en bahías o lagunas arrecifales o rodeando islas, son llamados borde, y son aquellos que soportan el continuo golpe de las olas al frente, y más hacia adentro están los sectores más altos y protegidos con menor influencia mareal. Los manglares que crecen detrás de los ribereños y de los de borde, son llamados manglares de cuenca, se ubican donde hay suelos estables, donde el cambio del agua es lenta, hay poco oxígeno y alta salinidad. Por último, los manglares especiales, estos son bosques poco desarrollados y pequeños debido a que crecen en condiciones de alta salinidad, baja disponibilidad de nutrientes y temperaturas extremas<sup>19</sup>.

### **3.3 Diversidad eucariota**

Los manglares son bosques que se encuentran en los límites del continente y las aguas oceánicas<sup>20</sup>, en los cuales se encuentra una gran variedad de fauna y flora, de igual manera, estos organismos funcionan como fuente de alimento (peces, crustáceos, etc), como recursos forestales (madera para leña, construcción, postes y carbón), y también pueden llegar a servir como biorremediadores de la contaminación marina<sup>20</sup> o como ingenieros del ecosistema, un ejemplo de estos, serían los cangrejos, ya que intervienen en los flujos de energía del manglar, mediante la retención de materia, el consumo de hojas y propágulos, o el efecto que provocan sus agujeros en la química de los sedimentos y en la productividad del bosque (mejora aireación del suelo y reduce niveles de salinidad)<sup>21</sup>.

Los moluscos, organismos invertebrados, son de importancia en el manglar, ya que contribuyen a la dinámica de nutrientes, ayudan a la retención de producción primaria en el sistema, consumiendo las hojas que se encuentran en el suelo y fango (hojas en descomposición)<sup>21</sup>, los moluscos se alimentan del detritus de estas zonas y los bivalvos ( mejillones, almejas) se encuentran en el bentos y son filtradores, y son utilizados generalmente para generar ingresos a las familias de la región, por medio de la venta de los mismos. Los moluscos planctónicos se encuentran generalmente en forma larval.

La variedad de artrópodos que se encuentran dentro del manglar de la Bahía de Cispatá juegan un rol importante dentro del mantenimiento del equilibrio ambiental, trabajan como fragmentadores de hojarasca, insectos, reptiles, entre otros elementos que fomentan el proceso de reciclaje para la mineralización de la materia orgánica.

La ictiofauna en el manglar, abarca un gran componente biológico del medio acuático, la distribución de esta, depende de las oscilaciones de salinidad hídrica relacionadas con las mareas y los periodos de lluvia o sequía<sup>21</sup>, algunos peces como la mojarra perteneciente a la familia *Diapterus*, otro organismo que se convierte en el sustento de las familias de la región.

Las aves migratorias que se encuentran en los manglares, usan este ecosistema tanto para abrigo como refugio, y de igual manera, por la disponibilidad de nutrientes<sup>21</sup>.

**Tabla 1.** Diversidad de organismos eucariotas en el manglar

Diversidad de organismos eucariotas en el manglar						
Moluscos	Artrópodos	Ictiofauna	Avifauna	Hongos	Algas	Protozoos

<i>Anomalocardia brasiliiana</i>	<i>Callinectes affinis</i>	<i>Diapterus sp.</i>	<i>Aramides mangle</i>	<i>Deuteromycetes</i>	<i>Bryopsis sp</i>	<i>Chromulina pascheri</i>
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	<i>Callinectes bocurte</i>	<i>Eucinostomus sp.</i>	<i>Conirostrumbicolor</i>	<i>Zygomycetes</i>	<i>Caulerpa sertularioides</i>	<i>Protochrysis sp.</i>
<i>Donax striatus</i>	<i>Callinectes danae</i>	<i>Mugil curema</i>	<i>Rallus nigricans</i>	<i>Ascomycetes</i>	<i>Ulva flexuosa</i>	<i>Prorocentrum sp.</i>
<i>Neritina virginea</i>	<i>Cardisoma guanhumí</i>	<i>Mugil lisa</i>		<i>Oomycetes</i>	<i>Chaetomorpha gracilis</i>	<i>Gyrodinium sp.</i>
<i>Phacoides pectinatus</i>	<i>Euritium limosum</i>	<i>Mugil spp.</i>		<i>Basidiomycetes</i>	<i>Hypnea spinella</i>	<i>Scytomonas pusilla</i>
<i>Tagelus plebeius</i>	<i>Goneopsis cruentata</i>	<i>Tachysurus sp.</i>			<i>Polysiphonia sp</i>	<i>Ceratium dens</i>
	<i>Macrobachium sp.</i>				<i>Acantophora muscoides</i>	<i>Euglena sp.</i>
	<i>Macrobrachium acanthurus</i>				<i>Caloglossa leprieurii</i>	<i>Phacus sp.</i>
	<i>Paneopeus sp.</i>				<i>Heterosiphonia crispella</i>	<i>Heteronema acus</i>
	<i>Pennaeus schmittii</i>				<i>Dictyota crenulata</i>	<i>Peranema trichophorum</i>
	<i>Sesarma rectum</i>				<i>Padina gymnospora</i>	<i>Volvox aureus</i>
	<i>Uca lepactila</i>				<i>Sargassum fluitans</i>	<i>Chlamydomonas sp.</i>
	<i>Uca maracoani</i>					<i>Oikomonas sp.</i>
	<i>Uca rapax</i>					
	<i>Uca thayeri</i>					
	<i>Ucides cordatus</i>					

Tomada de: Peña E, El complejo *Bostrychietum*: la flora de algas asociadas a las raíces del manglar en la costa pacífica colombiana, *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.* 41(160):338-348, julio-septiembre de 2017 y Chávez-Villavicencio et al, (2012). Riqueza de protozoarios de los Manglares San Pedro de Vice (Sechura – Perú). *Aporte Santiaguino.* 5. 68-74.

#### **4. Marco jurídico**

Para proteger a los manglares del mal uso, el MADS trabajó junto con actores estratégicos para formular el Programa nacional para el uso sostenible, manejo y conservación de los ecosistemas de manglar (PNM) en el año 2002<sup>22</sup>, que prioriza el uso sostenible del ecosistema con la ayuda de las comunidades, en la protección, conservación y aprovechamiento del manglar y sus recursos naturales.

Para asegurar que se conservara el ecosistema, se expidieron la resolución número 1602 de 1995 y la resolución 020 de 1996, las cuales ordenan los estudios sobre el estado de los manglares y establecen restricciones de uso, con la resolución No. 924 de 1997 este ministerio fijó los términos de referencia para la realización de los estudios, y la resolución 257 de 1997 en la cual se establece un sistema de monitoreo y control de la calidad de las aguas, flora, fauna y suelos de los ecosistemas de manglar en Colombia<sup>22</sup>.

De igual manera, el 20 de septiembre del año 2007 se publicó el decreto 3600, con el cual se reglamentan las disposiciones de las Leyes 99 de 1993 y 388 de 1997, relativas a las determinantes de ordenamiento del suelo rural, y al desarrollo de actuaciones urbanísticas de parcelación y edificación en este tipo de suelo<sup>22</sup>.

#### **5. Metagenómica**

La metagenómica es el estudio de los genomas y otras secuencias de ácido desoxirribonucleico, las cuales son purificadas de una muestra ambiental o de un ser vivo o muerto, sin necesidad del aislamiento del o los organismos que lo presentan por métodos de laboratorio o su cultivo<sup>23</sup>. Meta viene del griego ‘más allá de’ entendiéndolo como ir más allá del genoma<sup>24</sup>.

Comúnmente, los estudios metagenómicos tienen cinco etapas: en la primera, se realiza una purificación ADN genómico de una muestra, ya bien sea del medio

ambiente o de algún órgano o fluido de un organismo pluricelular. En la segunda etapa se amplifica el genoma, gen o segmento genómico por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la secuenciación directa o por métodos de secuenciación de nueva generación, por microarreglos o hibridación. Tercero, se construye una librería con los amplicones o con los segmentos de metagenoma al ser cortado con enzimas de restricción los cuales pueden ser clonados en: plásmidos, fagos, cósmidos. El cuarto paso es la secuenciación de los clones de la librería, o de los amplicones purificados. El quinto paso corresponde al análisis bioinformático de cada secuencia<sup>24</sup>. En otros casos los amplicones son separados por medio de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) para posteriormente ser purificados del gel<sup>25</sup>.

Para verificar el estado del genoma extraído, se realiza PCR y electroforesis en gel de agarosa. Para realizar estudios de diversidad se amplifica y secuencia el gen de ARN ribosomal 16S (utilizado como marcador taxonómico universal en arqueas y bacterias) y el 18S para eucariontes. La principal razón del uso de las regiones 16S y 18S del ADN<sub>r</sub>, es que estos tienen regiones hipervariables y regiones comunes para la mayoría de las especies procariotas y eucariotas, respectivamente<sup>26</sup>.

Los *primers* más usados en organismos fúngicos son ITS-1 e ITS-4, debido a que estos amplifican secuencias altamente variables, rodean la secuencia de codificación 5.8S, y se ubican entre la codificación de subunidades pequeñas del ribosoma (SSU), y la secuencia de codificación de subunidad grande (LSU) del operón ribosómico, estos primers amplifican una gran cantidad de dianas fúngicas y son excelentes para analizar el ADN aislado de organismos individuales<sup>27</sup>.

## **6. Herramientas moleculares y bioinformática**

El Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) define a la bioinformática como la investigación, desarrollo o aplicación de herramientas computacionales con el fin de difundir el uso de datos biológicos, médicos, conductuales o de salud, incluyendo aquellas herramientas utilizadas para adquirir, almacenar, organizar, archivar,

analizar y visualizar dicha información<sup>28</sup>. Actualmente los científicos están generando grandes y variados conjuntos de datos que incluyen la secuenciación de próxima generación (NGS; genómica, metagenómica, transcriptómica y metatranscriptómica), datos proteómicos, metabolómicos y otros datos<sup>28</sup>, por esta razón, se han creado gran variedad de herramientas bioinformáticas para analizar datos de secuencia metagenómica y de amplicón, entre otros. Servidores web tales como MG-RAST, IMG / M, EBI Metagenomics y SILVAngs, y *pipelines* como MEGAN, QIIME y Mothur<sup>29</sup>.

### **6.1 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)**

Es un algoritmo de búsqueda de similitud mediante alineamiento de secuencias (nucleotídicas o peptídicas) con secuencias presentes en las bases de datos biológicos como el GenBank <sup>30</sup>, y arroja resultados sobre las secuencias más parecidas, el gen o la proteína a la que corresponden con función en caso de ser conocida y al organismo al que pertenecen.

### **6.2 QIIME**

Canal de bioinformática que permite analizar microbiomas a partir de datos de ADN. Genera diversas facilidades, ya que elabora gráficos estadísticos de calidad, genera comparaciones dentro de una base interna con referencias taxonómicas, para luego agrupar los datos obtenidos, en OTUS (unidades taxonómicas operacionales), también arroja datos como la diversidad alfa y beta, especificación de rarefacción, reconstrucción filogenética entre otras<sup>31</sup>.

### **6.3 DADA2**

Es un software encargado de perfeccionar y corregir los errores generados por illumina, dados por la secuenciación de amplicones; la tasa de error sobre la cual trabaja este programa, es cercana a cero y puede detectar diferencias de tan solo un nucleótido, suele usarse como herramienta adicional, además añade precisión a la lectura de los filtrados que se generan<sup>32</sup>.

## 6.4 Plataforma Illumina

Es una tecnología basada en la modificación del terminador de didesoxinucleótido utilizado en el método de secuenciación de Sanger. En la secuenciación, cada dNTP modificado se une a una base específica de fluoróforo que se vuelve fluorescente cuando se incorpora al fragmento de ADN. La emisión es registrada por una cámara de alta resolución. Este proceso se repite en cada ciclo a medida que ocurre la incorporación de un dNTP marcado seguido de tomar una imagen fluorescente y quitar el terminador.

En esta técnica, los fragmentos se amplifican mediante PCR de puente, que es la amplificación en un puente construido entre fragmentos. Los fragmentos se hibridan con un conjunto de cebadores inmovilizados hacia adelante y hacia atrás en el sustrato correspondiente a los adaptadores utilizados para preparar la biblioteca. Se pueden acumular varios millones de grupos en cada uno de los canales independientes establecidos en la celda de flujo, donde se producen las reacciones de secuenciación<sup>33</sup>. Esta técnica se divide en 4 etapas:

1. **Preparación de la genoteca:** allí se encuentran muestras de fragmentos aleatorios de DNA o de cDNA, seguidos de adaptadores (linkers) 5' y 3'. Simultáneamente, el marcaje combina reacciones de fragmentación y unión en un solo paso, aumentando la eficiencia del proceso de preparación de la genoteca. Posterior a esto, los fragmentos unidos con los adaptadores son amplificados y purificados.
2. **Generación de cluster:** Los moldes para la secuenciación se fijan en unas celdillas que contienen el DNA accesible para las enzimas, cada fragmento se amplifica y crea hasta 1.000 copias idénticas de cada molde de moléculas. Esta amplificación es realizada por PCR de puente (los fragmentos se amplifican a partir de unos cebadores unidos a una superficie sólida). En la secuenciación de cadenas sencillas, se añade un cebador, mientras que para DNA de doble cadena se elimina la cadena original, así simplemente queda la cadena complementaria como molde para la segunda secuenciación.

- 3. Secuenciación por síntesis (SBS):** Se agregan los dNTPs, cada uno posee un fluoróforo de color particular (G - Amarillo, C – Azul, A – Rojo, T - Verde) Los cuatro terminadores reversibles se encuentran ligados a los nucleótidos y bloquean la polimerización, por lo que la enzima polimerasa sólo puede añadir una base a cada cadena de DNA que se está sintetizando. Posteriormente se excita con un láser y se captura una imagen.
- 4. Análisis de los datos:** Cada lectura de base tiene una puntuación asignada según la calidad, el software de Illumina puede hacer diferencias y generar puntuaciones seguras. Se pondera la contribución de cada base a la secuencia y se detecta las variantes de las secuencias. Hay muchas variantes del análisis posibles como el polimorfismo de nucleótido único (SNP), la identificación de inserciones o deleciones, los recuentos de lecturas para los métodos RNA, los análisis filogenéticos o metagenómicos, y más. El software es capaz de recoger los datos, procesarlos y analizarlos para que haya una mínima intervención del usuario<sup>34</sup>.

## 7. BIOPROSPECCIÓN

La necesidad de encontrar nuevos productos naturales que puedan tener el mismo efecto de los productos químicos ha orientado diferentes investigaciones hacia ecosistemas especiales como los manglares, donde la diversidad biológica es alta. Los hongos son conocidos por producir metabolitos secundarios químicamente diversos como nuevos antiinflamatorios, antioxidantes y compuestos anti cáncer, como por ejemplo la deshidroherbarina, que se aísla de una especie de hongo, *Corynespora* sp., que se encuentra en el líquen *Usnea cavernosa*; este compuesto inhibe significativamente la migración de células cancerígenas metastásicas de mama y próstata, (MDA-MB-231 y PC-3M, respectivamente)<sup>35</sup>. También se han descrito características para aplicación medicinal como citotoxicidad, actividad antibacteriana y antifúngica, inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa, tirosina, fosfatasa B y propiedades antivirales, entre otros <sup>36</sup>.

Los microorganismos marinos y de manglar presentan gran diversidad de actividades enzimáticas, las cuales han demostrado ser más estables y activas que las de enzimas provenientes de plantas y animales. Por lo tanto, los microorganismos

halofílicos poseen enzimas capaces de funcionar en condiciones que conducen a la precipitación o desnaturalización de la mayoría de las enzimas, lo cual los hace ideales en la búsqueda de nuevas enzimas.<sup>37</sup>

Microorganismos eucariotas como los hongos, cada vez se relacionan más como ayudantes biológicos para reducir la contaminación; otra aplicación con un amplio campo de investigación, la biorremediación, ya que se han realizado estudios donde un conjunto de especies de *Aspergillus* (*Aspergillus terreus* y *Aspergillus sydowii*) son capaces de descomponer el polietileno, uno de los plásticos más utilizados y con un elevado número de desechos contaminantes, que resultan afectando fuentes hídricas y suelos por la complejidad de su degradación<sup>38</sup>.

Por otra parte, la búsqueda de alternativas para el tratamiento con antibióticos abre nuevas fronteras; como se mencionaba anteriormente, muchos eucariontes proveen metabolitos que pueden reemplazar ciertos antibióticos, incluso para *Mycobacterium tuberculosis*, de esta última se conoce la hepatotoxicidad y la resistencia, que suelen presentar los tratamientos para esta infección; sería de gran ayuda encontrar nuevas opciones, que no generen reacciones adversas como las mencionadas previamente y esta alternativa, se encuentra en los hongos extraídos de ecosistemas como los manglares<sup>39</sup>.

## **8. Aproximación al diseño metodológico**

La naturaleza de esta investigación tiene un enfoque cuantitativo, donde se buscó determinar la diversidad eucariota con la que cuenta el manglar de la Bahía de Cispatá en San Antero Cordoba Colombia, con base en estudios metagenómicos de muestras del manglar de agua y sedimento en las zonas Caño Salado, Caño Dago, Caño Navío, Caño Muerto y Desembocadura río Sinú-Brazo Tinajones.

## **9. Diseño metodológico**

### **9.1 Tipo de investigación**

Este proyecto se basa en una investigación mixta con enfoque exploratorio de tipo descriptivo.

## 9.2 Universo, población y muestra

### 9.2.1 Universo

Agua y sedimento de manglar del departamento de Córdoba.

### 9.2.2 Población

Agua y sedimento de San Antero.

### 9.2.3 Muestra

Muestra de agua y sedimento de las 4 zonas del manglar de la bahía de Cispata, San Antero, Córdoba

## 9.3 Variables e indicadores

**9.3.1 Variable independiente:** Muestra de agua y suelo de las cuatro zonas del manglar de la bahía de Cispata ubicada en San Antero en el departamento de Córdoba.

**9.3.2 Variable Dependiente:** Microorganismos identificados en el agua y suelo de las 4 zonas del manglar de la bahía de Cispata ubicada en San Antero en el departamento de Córdoba.

**Tabla 2.** Indicadores

Objetivo	Indicador	Resultado
Determinar la diversidad microbiana eucariota asociada a sedimentos del ecosistema de manglar de la Bahía de Cispata, mediante análisis metagenómico, en cinco zonas de diferente uso: Caño Salado, Caño Dago, Caño Navío, Caño Muerto, Desembocadura río Sinú-BrazoTinajones	Microorganismos identificados mediante análisis metagenómico de las secuencias 18S obtenidas a partir de los Sedimentos del manglar en las cinco zonas específicas	Identificación de microorganismos eucariontes presentes en los sedimentos de cinco zonas específicas del manglar de Cispata, Caño Salado, Caño Dago, Caño Navío, Caño Muerto, Desembocadura río Sinú-BrazoTinajones

Determinar la diversidad microbiana eucariota asociada a aguas del ecosistema de manglar de la Bahía de Cispatá en cinco zonas de diferente uso, mediante análisis metagenómico.	Microorganismos identificados mediante análisis metagenómico de las secuencias 18S obtenidas a partir de los del manglar en las cinco zonas específicas	Presencia de diferentes microorganismos eucariontes en las muestras de agua provenientes del manglar
Comparar la diversidad de las comunidades microbianas eucariotas encontrada en las cinco zonas del manglar con diferente uso.	Identificación metagenómica de las especies eucariotas encontrados tanto de sedimento como de agua	Demostración de la importancia de las especies eucariotas que cohabitan el manglar
Demostrar el potencial metabólico de las especies eucariotas que cohabitan el manglar.	Identificación metagenómica de las especies eucariotas y la actividad metabólica de estos mismos.	Demostrar el potencial metabólico de las especies eucariotas que habitan el manglar

## 9.4 Hipótesis

Los ecosistemas de manglar son altamente diversos, sin embargo, la diversidad de los microorganismos eucariotas. La determinación de dicha diversidad en diferentes reinos, filos, clases, órdenes, familias, géneros y especies, permitirá definir su importancia en el ecosistema y sus usos potenciales en biotecnología.

## 10. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

### 10.1 Ubicación de la zona de muestreo

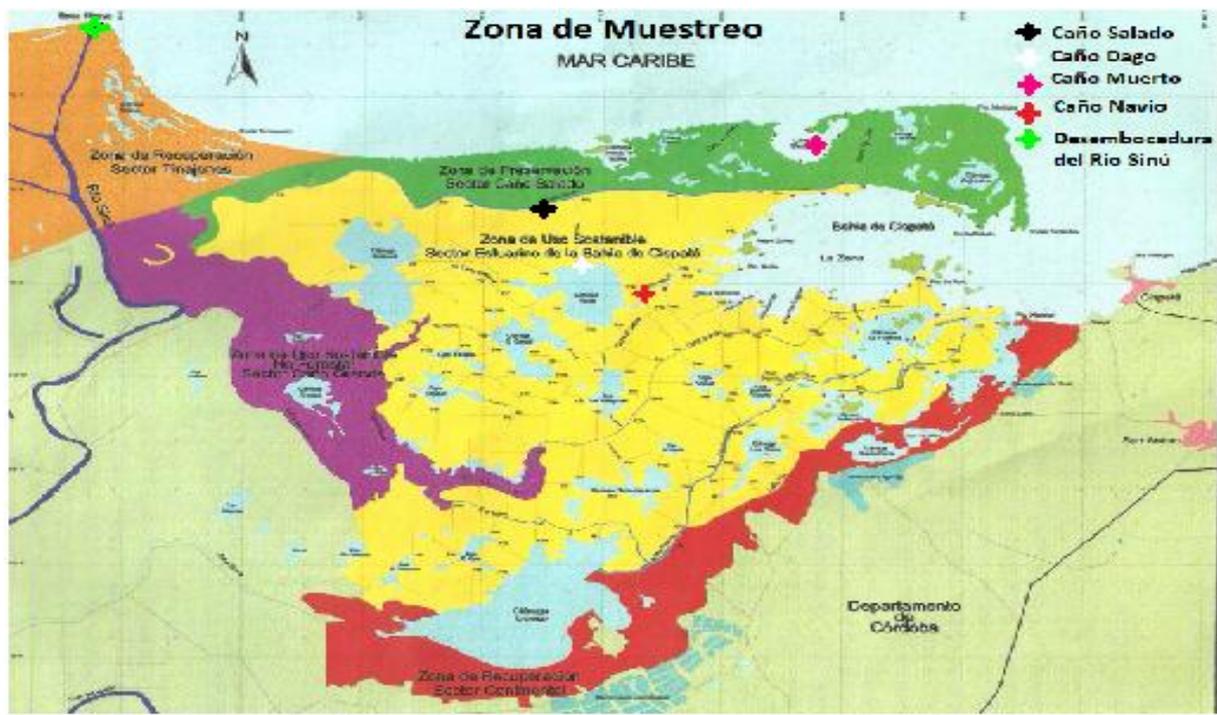
Las muestras de agua y sedimento de manglar fueron recolectadas en la bahía de Cispatá situada en el departamento de Córdoba, en el Municipio de San Antero, en el antiguo delta del río Sinú, latitud 9.4 longitud - 75.825. (Figura 1, figura 2 y tabla 3)

**Figura 1:** Mapa de la ubicación del Departamento de Córdoba.



Milenioscuro, 14 de diciembre de 2015, Subregiones Departamento de Córdoba, mapa, <https://www.todacolombia.com/departamentos-de-colombia/cordoba/subregiones.html>

**Figura 2.** Mapa de zonificación de manglar - Zona de muestreo



Tomado de Abril Flórez A.L, Alfonso Moyano L.D, Arango López D.R, Bermúdez Macías M.Y, Estudio metagenómico de la diversidad procarionta del ecosistema de manglar de la bahía de Cispatá, San Antero, Córdoba, Colombia. UCMC; 2018<sup>69</sup>.

## 10.2 Fase 1 Muestreo de agua y sedimentos de la Bahía de Cispatá San Antero Córdoba

**Tabla 3.** Recolección de muestras de agua y suelo de manglar

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE AGUA Y SUELO DE MANGLAR

	ZONA	VOLUMEN DE AGUA TOMADA EN RECIPIENTE ESTÉRIL	CANTIDAD DE SEDIMENTO RECOLECTADO	MANGLES VISUALIZADOS
ZONA DE PRESERVACIÓN	CAÑO SALADO PLATAFORMA	1 L, a 30 cm de distancia de la plataforma de desovamiento.	1200 gr, por el método de profundidad a 15, 30 y 60 cm de la plataforma de desovamiento.	<i>R. mangle</i> junto al caño Salado, con altura aproximada de 15m. Cerca de estos aparecen juveniles de <i>Pelliciera rhizophorae</i> y luego <i>latizales</i> y fustales de <i>Laguncularia racemosa</i> y <i>Avicennia germinans</i> .
	CAÑO NAVÍO	1 L, a 80 cm de distancia de la orilla.	200 gr, por el método de profundidad a 15, 30 y 60 cm a 87 cm de distancia de la orilla.	<i>R. mangle</i> , <i>L. racemosa</i> y <i>A. germinans</i> , ésta última a veces formando bosques monoespecíficos.
	CAÑO DAGO PLATAFORMA	1 L, a 60 cm de la plataforma de desovamiento.	2 tubos falcón de 30 gr de fango y 1200 gr de sedimento por el método de profundidad a 15,30 y 60 cm.	<i>R. mangle</i> en el interior; en zonas más estables, <i>L. racemosa</i> y <i>A. germinans</i> .

ZONA DE USO SOSTENIBLE	CAÑO MUERTO	1 L, a 400 cm de distancia de la orilla.	200 gr, por el método de profundidad a 15, 30 y 60 cm a 75 cm de distancia de la orilla.	<i>R. mangle</i> ; en menor cantidad <i>L. racemosa</i> y <i>A. germinans</i> .
	DESEMBOCADURA RÍO SINÚ	1 L, a 400 cm de distancia de la orilla.	200 gr, por el método de profundidad a 15, 30 y 60 cm.	<i>R. mangle</i>

Las mediciones de pH y temperatura se realizaron *in situ* en cada una de las zonas muestreadas.

### 10.2.1 Conservación y transporte de las muestras

En primer lugar, las muestras de agua y sedimento se transportaron en botellas plásticas estériles y bolsas resellables, respectivamente; las muestras de agua fueron filtradas en membranas de nitrocelulosa de 0.45µm y posteriormente fueron refrigeradas a 4°C, junto con las de sedimento, esto con el fin de hacer las correspondientes extracciones de ADN genómico. Para el análisis de metales pesados se recolectaron 500 mL de agua en recipientes estériles y con 1mL de ácido nítrico pH<2 y refrigeradas a la misma temperatura que el resto de las muestras.

### 10.2.2 Análisis Físico-Químico y de metales pesados.

Se midieron el pH y la temperatura en los sitios de recolección de las muestras. El análisis de metales pesados (mercurio, plomo, cadmio y zinc) presentes en las aguas del manglar se llevó a cabo en el laboratorio Hidrolab (Cota, Cundinamarca) donde fueron enviados los 500 mL de cada muestra recolectados para este fin.

### 10.3 Fase 2. Filtración por membrana de las muestras de agua.

Se utilizó el equipo Sartorius de filtración por membrana al vacío, con membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm, las cuales fueron conservadas a 4°C, y fueron transportadas a los laboratorios de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca para la respectiva extracción de ADN.

#### 10.4 Fase 3. Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN de las muestras, tanto de agua como de sedimento, se utilizó el kit ZymoBIOMICS DNA Mini Kit (ZymoResearch, USA) siguiendo las instrucciones de la casa comercial (ver anexo 1).

#### 10.5 PCR y electroforesis

Para verificar la calidad del ADN genómico obtenido, se empleó la técnica de PCR convencional con *primers* universales para hongos (ITS-1 e ITS-4), utilizando el termociclador Labnet “Multigene Optimax”. Las características de la preparación de la master mix se encuentran en la siguiente tabla:

**Tabla 4:** Cálculos para la Master Mix

<b>Cálculos para la Master Mix (PCR con 0.6 µL de ADN)</b>				
<b>Reactivo</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen total para 1 muestra</b>	<b>Volumen total para 13 muestras</b>
<b>GoTaq® Green Master Mix PROMEGA CORPORATION.</b>	2X	1X	7.5 µL	97.5 µL
<b>Primer ITS 1</b>	10 µM	0.1 µM	0.3 µL	3.9 µL
<b>Primer ITS 4</b>	10 µM	0.1 µM	0.3 µL	3.9 µL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	----	----	6.3 µL	81.9 µL

<b>ADN</b>	----	----	0.6 µL	7.8 µL
<b>VOLUMEN FINAL</b>			15 µL	195 µL

**Tabla 5:** Condiciones para la PCR

<b>1</b>	Desnaturalización inicial: 94°C durante 10 minutos
<b>2</b>	35 ciclos con desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 50°C por 1:30 minutos y extensión a 72°C por 2 minutos.
<b>3</b>	Extensión final a 72°C por 15 min

**Tabla 6:** Cebadores (*primers*) usados en la PCR

<b>PRIMER</b>	<b>DIRECCIÓN</b>	<b>SECUENCIA (5' - 3')</b>	<b>SITIO DE UNIÓN DEL OPERÓN DE ARNr</b>
<b>ITS-1</b>	Sentido	<i>CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA</i> A	Subunidad pequeña
<b>ITS-4</b>	Antisentido	<i>TCCTCCGCTTATTGATATGC</i>	Subunidad grande

Tabla tomada de Op De Beeck, Michiel et al. "Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies." PloS one vol. 9,6 e97629. 16 Jun. 2014<sup>27</sup>

## 10.6 Secuenciación

La secuenciación del ADN genómico de las comunidades eucariotas presentes en el manglar se llevó a cabo en la plataforma Illumina MiSeq en la empresa ZymoResearch (USA). Primero, para cada muestra se construyó una genoteca de secuenciación del gen de ARN ribosómico 18S utilizando el kit de preparación de genotecas *NGS Quick-*

18S (Zymo Research, Irvine, CA). Los primers utilizados amplificaron la región variable V4-V5 del gen ARNr 18S (F-566 y R-1200), descritos por Hadziavdic et al. en 2014<sup>40</sup>. La genoteca de secuenciación se preparó realizando ensayos de PCR en tiempo real para controlar ciclos y, por lo tanto, evitar la formación de quimeras de PCR. Los productos finales de PCR fueron cuantificados con lecturas de fluorescencia (qPCR). La agrupación de la genoteca final se realizó con el *Select-a-Size DNA Clean & Amp Concentrator* (Zymo Research, Irvine, CA), luego se cuantificó con un *Agilent 2200 TapeStation nucleic acids system* (Agilent, USA) y un *Invitrogen Qubit 4 Fluorometer* (ThermoFisher Scientific, USA).

## 11. RESULTADOS

### 11.1 Extracción ADN y PCR

#### 11.1.1 Cuantificación

La cuantificación se realizó por espectrofotometría con el NanoDrop 2000/2000c UV-Vis (ThermoFisher Scientific) en la Universidad del Bosque. En la tabla 7 se observan las concentraciones obtenidas del ADN genómico de las muestras recolectadas (agua y sedimento).

**Tabla 7.** Cuantificación de ADN por el equipo Nanodrop 2000/2000c UV-Vis (ThermoFisher Scientific)

Muestra	Concentración ng/μl	260/280	260/230
S2	36	1,51	0,81
S4	46,1	4,28	1,03
S6	19,2	1,6	1,36
S9	32,5	1,43	1,15
A1	103,7	1,44	0,66
A2	65,1	1,45	0,72
A3	98,6	1,55	1,01
A4	56,7	1,59	0,58
A9	118,9	1,5	0,58

Abril Flórez A.L, Alfonso Moyano L.D, Arango López D.R, Bermúdez Macías M.Y, Estudio metagenómico de la diversidad procariota del ecosistema de manglar de la bahía de Cispatá, San Antero, Córdoba, Colombia. UCMC; 2018<sup>69</sup>. (trabajo realizado en conjunto con este proyecto)

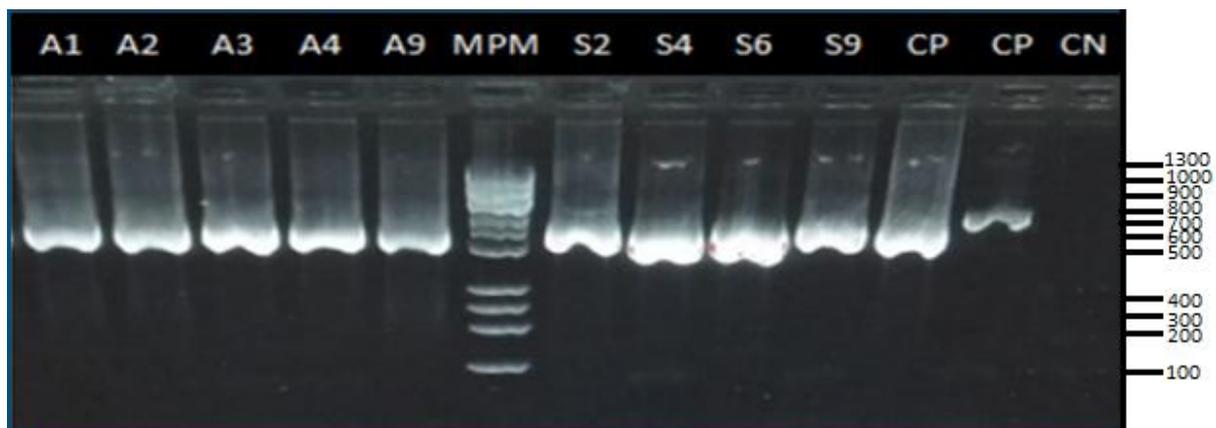
Las concentraciones obtenidas de ADN genómico permiten realizar la construcción de genotecas de secuenciación. Teniendo en cuenta que la relación 260/280 no es la

ideal, ya que la relación debería ser inferior a 1.8 o superior a 2.2; estos valores podrían deberse a la presencia de contaminantes fenólicos residuales de las muestras ambientales, muy comunes en los sedimentos y aguas de manglar.

### 11.1.2 Electroforesis

En la figura 3 se observan los fragmentos de amplificación de la PCR con los *primers* ITS1-ITS4 de aproximadamente 500 a 700 pb, correspondiendo al tamaño esperado.

**Figura 3.** Electroforesis de la región ITS1-ITS4 del ARNr de muestras de agua y sedimento de manglar de la Bahía de Cispatá.



**Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con GelGreen® Nucleic Acid Gel Stain y corrido en buffer TAE 1X. A: Muestra de agua. A1: Caño Salado, A2: Caño Dago, A3: Caño Navío, A4: Caño Muerto, A9: Desembocadura río Sinú-Brazo Tinajones, MPM: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Step Ladder), S: Muestra de sedimento. S2: Caño Dago, S4: Caño Salado, S6: Caño Muerto, S9: Fondo Desembocadura río Sinú-Tinajones, CP: Control positivo (*Paecilomyces* y *Mucor*), CN: Control negativo ( $H_2O$  destilada). (Voltaje 110V, Tiempo 30 minutos).**

## 11.2 Resultados análisis metagenómico

### 11.2.1 Secuenciación

La secuenciación del ADN genómico de las muestras de agua y de sedimento produjo un total de 1'302.526 secuencias crudas, y posterior al análisis bioinformático con dada2 y Qiime, se obtuvieron 3.323 secuencias únicas que fueron tomadas como OTUs (Unidades taxonómicas operacionales), y estas mismas fueron clasificadas a ciertos taxones según su homología.

**Tabla 8.** Secuencias obtenidas durante el procesamiento metagenómico del ARNr 18S, producidas por la plataforma Illumina MiSeq y editadas por Dada2 y QIIME v1.9.1.

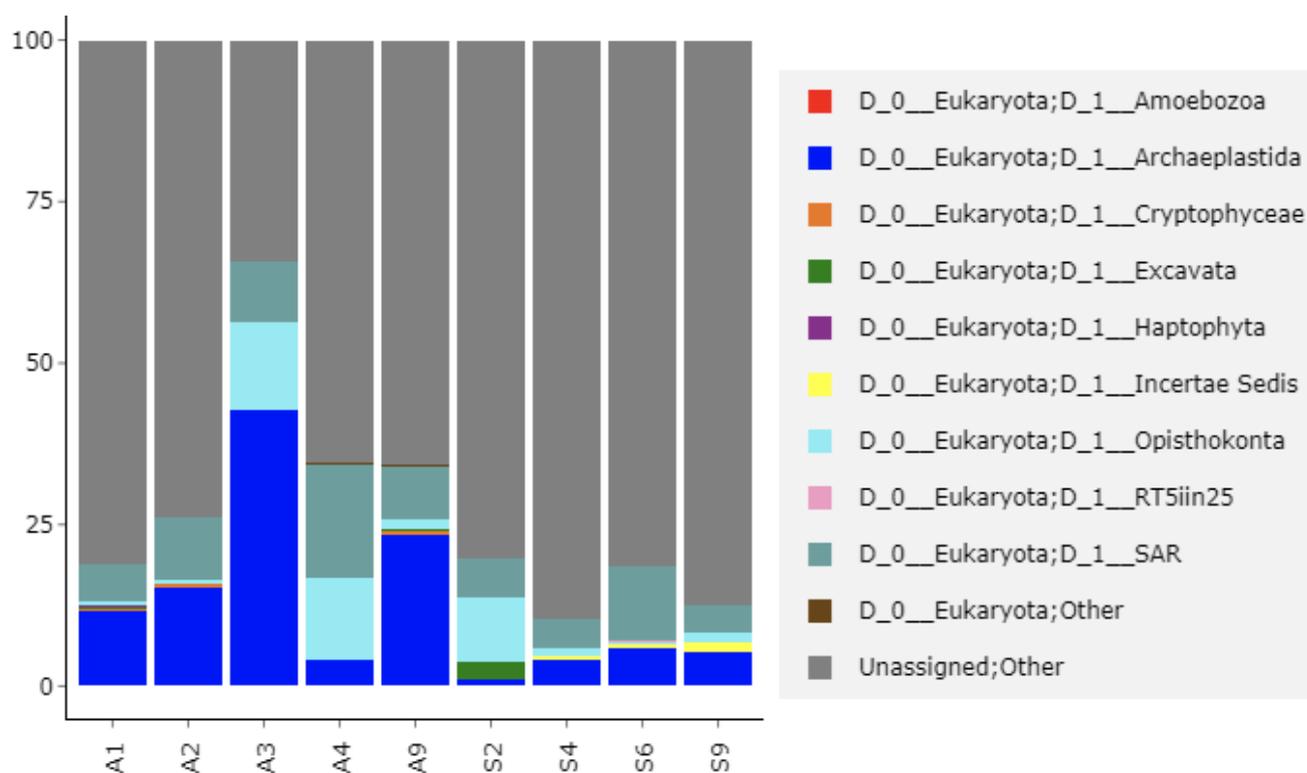
<b>Muestra</b>	<b>Secuencias crudas</b>	<b>Secuencias recortadas</b>	<b>Análisis DADA2</b>	<b>Secuencias quiméricas</b>	<b>Secuencias libres de secuencias quiméricas</b>	<b>Secuencias después de la filtración de tamaño</b>	<b>Secuencias únicas</b>	<b>OTUs</b>
<b>A1</b>	<b>110688</b>	<b>110114</b>	<b>53853</b>	<b>613</b>	<b>53240</b>	<b>51766</b>	<b>473</b>	<b>235</b>
<b>A2</b>	<b>89866</b>	<b>89388</b>	<b>43954</b>	<b>250</b>	<b>43704</b>	<b>43006</b>	<b>267</b>	<b>140</b>
<b>A3</b>	<b>122134</b>	<b>121442</b>	<b>59910</b>	<b>88</b>	<b>59822</b>	<b>58961</b>	<b>355</b>	<b>194</b>
<b>A4</b>	<b>139102</b>	<b>138376</b>	<b>67585</b>	<b>170</b>	<b>67415</b>	<b>66051</b>	<b>527</b>	<b>285</b>
<b>A9</b>	<b>135524</b>	<b>134834</b>	<b>66233</b>	<b>623</b>	<b>65610</b>	<b>64283</b>	<b>501</b>	<b>282</b>
<b>S2</b>	<b>256362</b>	<b>255016</b>	<b>125489</b>	<b>622</b>	<b>124867</b>	<b>122360</b>	<b>777</b>	<b>464</b>
<b>S4</b>	<b>163138</b>	<b>162178</b>	<b>78460</b>	<b>2974</b>	<b>75486</b>	<b>70236</b>	<b>888</b>	<b>585</b>
<b>S6</b>	<b>155338</b>	<b>154508</b>	<b>74459</b>	<b>3189</b>	<b>71270</b>	<b>68050</b>	<b>899</b>	<b>591</b>
<b>S9</b>	<b>130374</b>	<b>129672</b>	<b>61109</b>	<b>4411</b>	<b>56698</b>	<b>54169</b>	<b>824</b>	<b>547</b>
<b>TOTAL</b>	<b>1302526</b>	<b>1295528</b>	<b>631052</b>	<b>12940</b>	<b>618112</b>	<b>598882</b>	<b>5511</b>	<b>3323</b>

**A: Muestra de agua. A1:**Caño Salado, **A2:** Caño Dago, **A3:** Caño Navío, **A4:** Caño Muerto, **A9:** Desembocadura río Sinú-BrazoTinajones, **S: Muestra de sedimento. S2:** Caño Dago, **S4:** Caño Salado, **S6:** Caño Muerto, **S9:** Fondo Desembocadura río Sinú-Tinajones.

### 11.2.2 Identificación Eucariota a nivel Filo

La caracterización metagenómica de la región 18S del gen ARNr indicó predominancia de secuencias pertenecientes a uno o varios filios aún no clasificados (73.2%), ni encontrados dentro del GenBank; en segunda instancia, el filo más predominante corresponde al *Archaeplastida* (12.6%), la mayor abundancia de este fue encontrada en la muestra A3 correspondiente a caño Navío (42.6%); por otra parte, el filo *SAR* (8.6%), fue el tercero con más abundancia, presentando la mayor en la muestra A4 (17.7%) que corresponde a Caño Muerto y, en cuarto lugar, el filo *Opisthokonta* (4.7%), encontrando más abundancia de este en la muestra A3: Caño Navío (13.8%). (Ver en tabla 9)

**Gráfico 1:** Gráfica de composición a nivel de filo



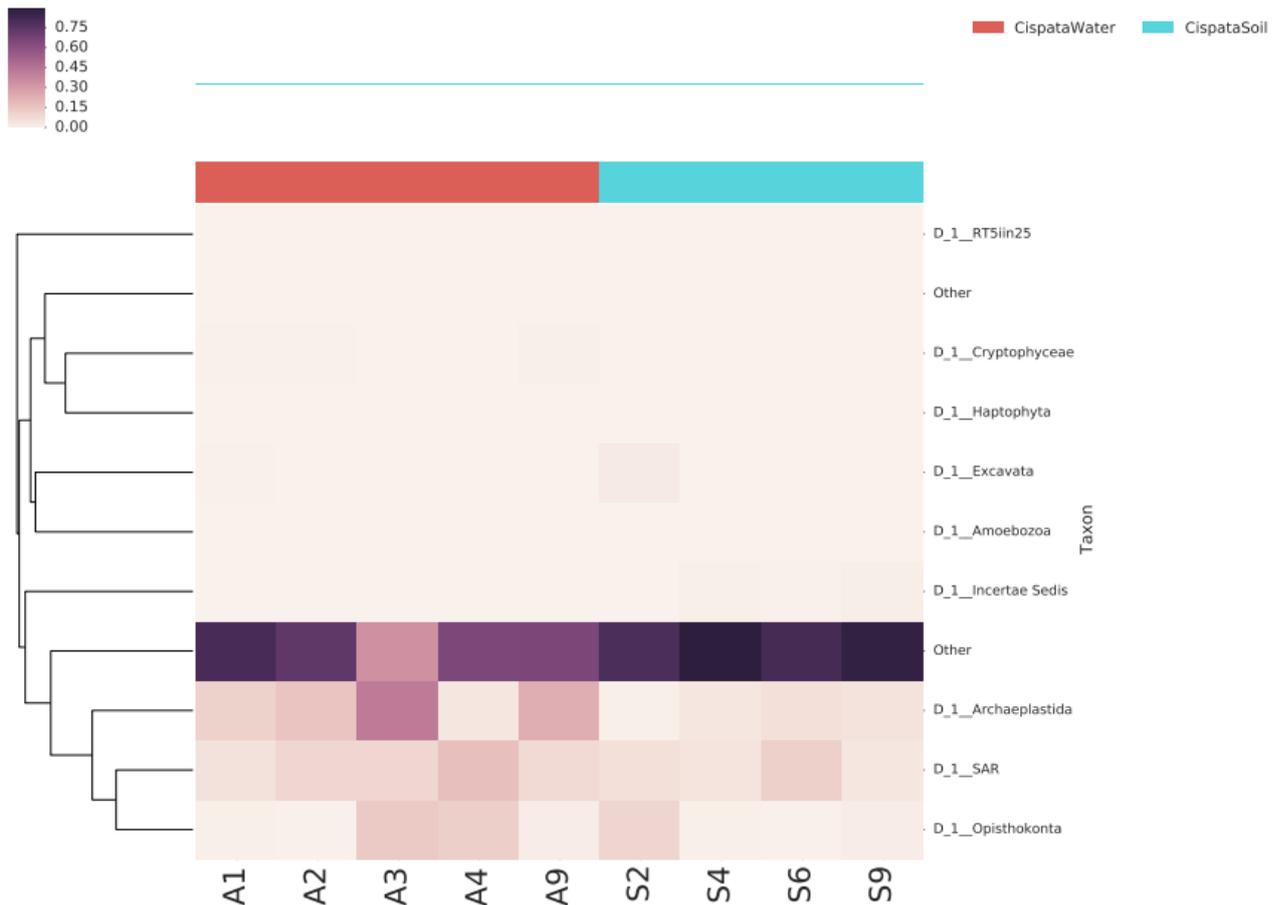
**Gráfico de colores, composición a nivel de Filo:** A1:Caño Salado, A2: Caño Dago, A3: Caño Navío, A4: Caño Muerto, A9: Desembocadura río Sinú-BrazoTinajones, S2: Caño Dago, S4: Caño Salado, S6: Caño Muerto, S9: Fondo Desembocadura río Sinú-Tinajones.

**Tabla 9.** Identificación Eucariota a nivel Filo.

		Total	A1	A2	A3	A4	A9	S2	S4	S6	S9
<b>Legend</b>	<b>Taxonomía</b>	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	Amoebozoa	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.1%	0.0%	0.0%
	Archaeplastida	12.6%	11.5%	15.4%	42.6%	4.2%	23.4%	0.9%	4.0%	6.0%	5.3%
	Cryptophyceae	0.2%	0.4%	0.4%	0.0%	0.0%	0.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Excavata	0.4%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	2.8%	0.0%	0.0%	0.0%
	Haptophyta	0.0%	0.1%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Incertae Sedis	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.7%	0.5%	1.4%
	Opisthokonta	4.7%	0.8%	0.4%	13.8%	12.4%	1.7%	9.9%	1.0%	0.5%	1.6%
	RT5iin25	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	SAR	8.6%	5.8%	9.7%	9.4%	17.7%	8.2%	6.1%	4.7%	11.7%	4.1%
	Other Eukaryotes	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Other (sin asignar)	73.2%	81.1%	73.9%	34.1%	65.5%	65.8%	80.1%	89.4%	81.3%	87.5%

Tabla de colores, composición a nivel de Filo: **A: Muestra de agua**. **A1:** Caño Salado, **A2:** Caño Dago, **A3:** Caño Navío, **A4:** Caño Muerto, **A9:** Desembocadura río Sinú-Brazo Tinajones, **S: Muestra de sedimento**. **S2:** Caño Dago, **S4:** Caño Salado, **S6:** Caño Muerto, **S9:** Fondo Desembocadura río Sinú-Tinajones.

**Figura 4.** Mapa de calor composición a nivel Filo.



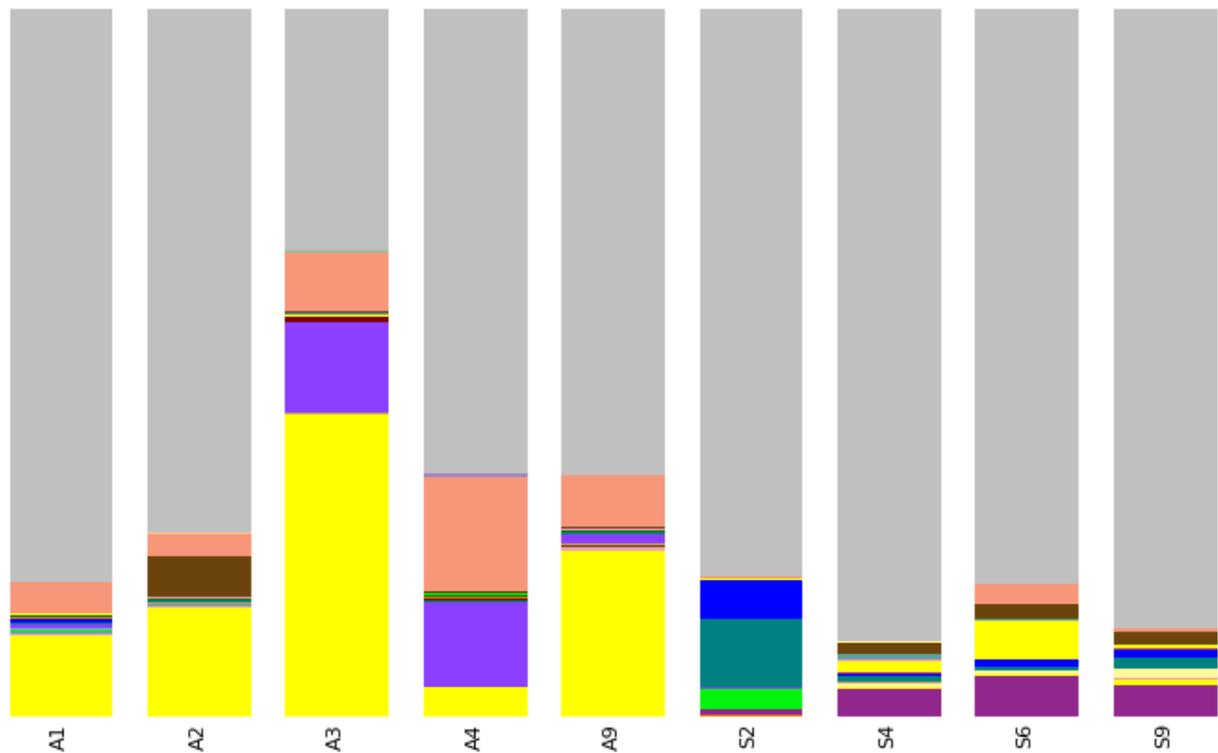
**Mapa de calor, composición a nivel de Filo:** A1:Caño Salado, A2: Caño Dago, A3: Caño Navío, A4: Caño Muerto, A9: Desembocadura río Sinú-BrazoTinajones, S2: Caño Dago, S4: Caño Salado, S6: Caño Muerto, S9: Fondo Desembocadura río Sinú-Tinajones.

### 11.2.3 Identificación Eucariota a nivel orden.

El gráfico 2, la tabla 10 y la figura 5, muestran la mayor abundancia en órdenes que aún no han sido investigadas y que no se encuentran en el GenBank (73.2%), en segunda instancia el orden *Chlorophyta* (10.9%), es la que denota mayor proporción dentro de las muestras A1, A2, A3 y A9 correspondientes a las muestras de agua de Caño Salado, Caño Dago, Caño Navío, y Desembocadura del Río Sinú-Tinajones (11.5%, 15.4%, 42.6% y 23.4%) respectivamente; por otra parte *Ochrophyta* (4.8%) cuenta con cifras significativas dentro de las muestras mencionadas anteriormente, además de evidenciarse la presencia de este orden en todas las muestra A1:Caño Salado, A2: Caño Dago, A3: Caño Navío, A4: Caño Muerto, A9: Desembocadura río Sinú-BrazoTinajones, S2: Caño Dago, S4: Caño Salado, S6: Caño Muerto y S9: Fondo Desembocadura río Sinú-Tinajones. (4.2%, 3.1%, 8.5%, 16.2%, 7.3%, 0.3%, 0.2%, 2.8% y 0.5%) respectivamente, por otra parte, el orden *Metazoa* (3.0%), se

halla en las muestras A3: Caño Navío y A4: Caño Muerto (12.7%, 11.8%) en cifras significativas a comparación con las demás muestras (tabla 10).

**Gráfico 2:** Gráfica de Identificación Eucariota a nivel orden.



**Gráfico de colores, composición a nivel de clase:** A1:Caño Salado, A2: Caño Dago, A3: Caño Navío, A4: Caño Muerto, A9: Desembocadura río Sinú-BrazoTinajones, S2: Caño Dago, S4: Caño Salado, S6: Caño Muerto, S9: Fondo Desembocadura río Sinú-Tinajones.

**Tabla 10.** Identificación Eucariota a nivel orden.

		To tal	A1	A2	A3	A4	A9	S2	S4	S6	S9
<b>Le ge nd</b>	<b>Taxonomía</b>	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	D_0__Eukaryota;D_1__Amoebozoa;D_2__Discosea;D_3__Flabellinia	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.0%	0.0 %
	D_0__Eukaryota;D_1__Amoebozoa;D_2__Discosea;D_3__Longamoebia	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0%	0.0 %
	D_0__Eukaryota;D_1__Amoebozoa;D_2__Schizoplasmodiida;D_3__uncultured eukaryote	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.0%	0.0 %

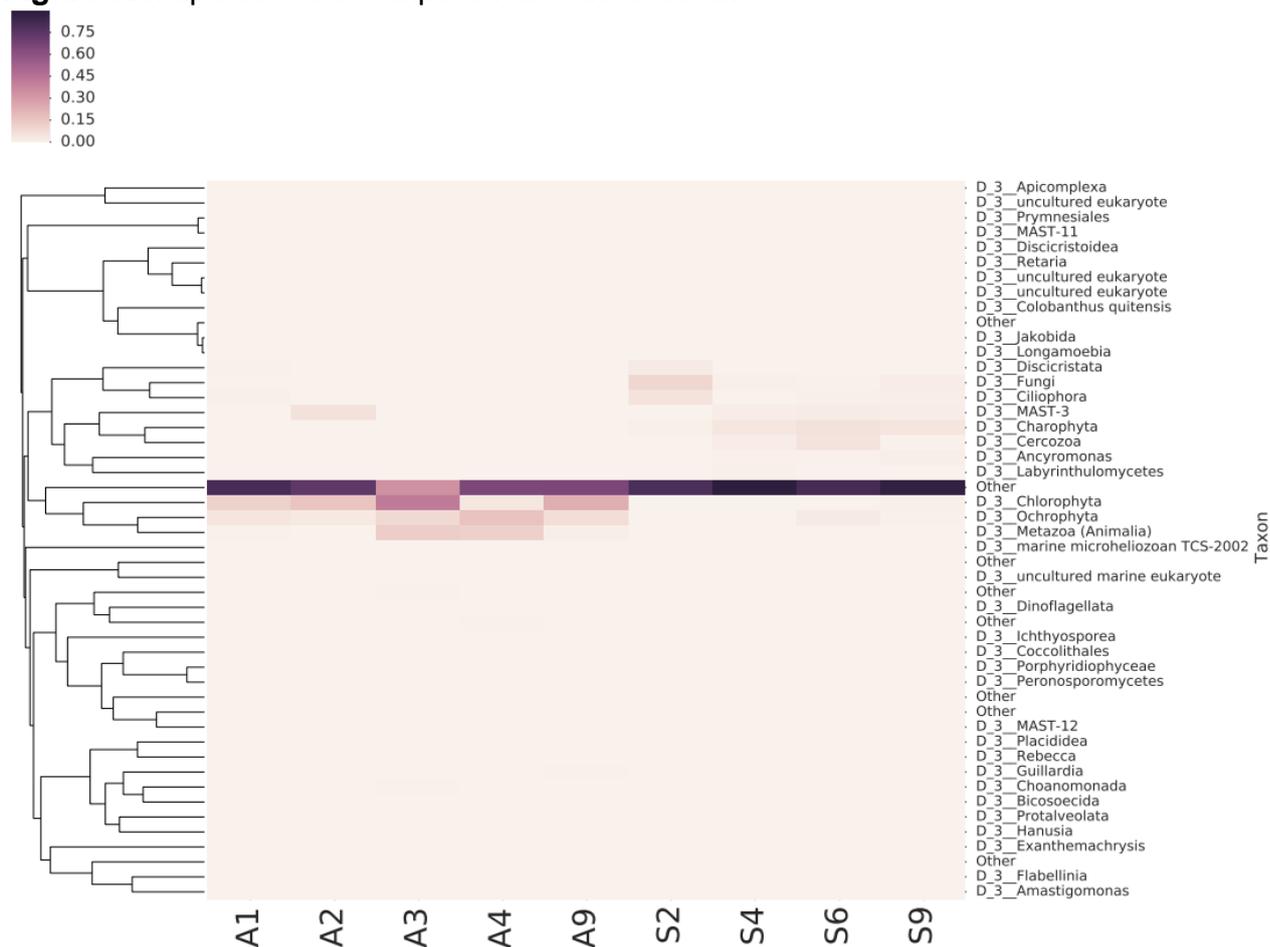
D_0__Eukaryota;D_1__Amoebozoa;D_2__Schizoplasmodiida;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0__Eukaryota;D_1__Archaeplastida;D_2__Chloroplastida;D_3__Charophyta	1.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.9%	3.9%	5.9%	4.4%
D_0__Eukaryota;D_1__Archaeplastida;D_2__Chloroplastida;D_3__Chlorophyta	10.9%	11.5%	15.4%	42.6%	4.1%	23.4%	0.0%	0.1%	0.1%	0.9%
D_0__Eukaryota;D_1__Archaeplastida;D_2__Rhodophyceae;D_3__Porphyridiophyceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0__Eukaryota;D_1__Cryptophyceae;D_2__Cryptomonadales;D_3__Guillardia	0.1%	0.3%	0.3%	0.0%	0.0%	0.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0__Eukaryota;D_1__Cryptophyceae;D_2__Cryptomonadales;D_3__Hanusia	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0__Eukaryota;D_1__Cryptophyceae;D_2__Cryptomonadales;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0__Eukaryota;D_1__Cryptophyceae;D_2__P1-31;D_3__uncultured marine eukaryote	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0__Eukaryota;D_1__Excavata;D_2__Discoba;D_3__Discicristata	0.4%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	2.8%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0__Eukaryota;D_1__Excavata;D_2__Discoba;D_3__Jakobida	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0__Eukaryota;D_1__Haptophyta;D_2__Pavlovophyceae;D_3__Exanthemachrysis	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0__Eukaryota;D_1__Haptophyta;D_2__Pavlovophyceae;D_3__Rebecca	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0__Eukaryota;D_1__Haptophyta;D_2__Prymnesiophyceae;D_3__Coccolithales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0__Eukaryota;D_1__Haptophyta;D_2__Prymnesiophyceae;D_3__Prymnesiales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0__Eukaryota;D_1__Incertae Sedis;D_2__Ancyromonadida;D_3__Ancyromonas	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.7%	0.5%	1.4%
D_0__Eukaryota;D_1__Incertae Sedis;D_2__Apusomonadidae;D_3__Amastigomonas	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0__Eukaryota;D_1__Incertae Sedis;D_2__Palpitomonas;D_3__marine microheliozoan TCS-2002	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Freshwater Opisthokonta;D_3__uncultured eukaryote	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Holozoa;D_3__Choanomonada	0.1%	0.0%	0.2%	0.4%	0.0%	0.3%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%
D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Holozoa;D_3__Ichthyosporea	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Holozoa;D_3__Metazoa (Animalia)	3.0%	0.5%	0.0%	12.7%	11.8%	1.2%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%

	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nucleomycea;D_3_Discicristoidea	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nucleomycea;D_3_Fungi	1.5%	0.2%	0.1%	0.0%	0.2%	0.2%	9.6%	0.8%	0.4%	1.5%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;Other;Other	0.1%	0.0%	0.0%	0.6%	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_RT5iin25;D_2_Colobanthus quitensis;D_3_Colobanthus quitensis	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_RT5iin25;D_2_uncultured eukaryote;D_3_uncultured eukaryote	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata;D_3_Apicomplexa	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata;D_3_Ciliophora	1.0%	0.7%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	5.6%	0.3%	1.0%	1.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata;D_3_Dinoflagellata	0.1%	0.3%	0.1%	0.0%	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata;D_3_Protalveolata	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Rhizaria;D_3_Cercozoa	1.0%	0.2%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.1%	1.7%	5.6%	0.7%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Rhizaria;D_3_Retaria	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Bicosoecida	0.1%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.3%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Labyrinthulomycetes	0.1%	0.1%	0.0%	0.2%	0.1%	0.0%	0.0%	0.8%	0.1%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_MAST-11	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_MAST-12	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_MAST-3	1.3%	0.0%	5.8%	0.2%	0.3%	0.1%	0.0%	1.5%	2.2%	1.8%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta	4.8%	4.2%	3.1%	8.5%	16.2%	7.3%	0.3%	0.2%	2.8%	0.5%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Peronosporomycetes	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Placididea	0.0%	0.0%	0.3%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

D_0__Eukaryota;D_1__SAR;Other;Other	0.1 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.4 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.0% %	0.0 %
D_0__Eukaryota;Other;Other;Other	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0% %	0.0 %
Unassigned;Other;Other;Other	73. 2%	81. 1%	73. 9%	34. 1%	65. 5%	65.8 %	80. 1%	89. 4%	81.3 %	87.5 %

**Tabla de colores, composición a nivel de clase: A: Muestra de agua. A1:Caño Salado, A2: Caño Dago, A3: Caño Navío, A4: Caño Muerto, A9: Desembocadura río Sinú-Brazo Tinajones, S: Muestra de sedimento. S2: Caño Dago, S4: Caño Salado, S6: Caño Muerto, S9: Fondo Desembocadura río Sinú-Tinajones.**

**Figura 5.** Mapa de calor composición a nivel orden.

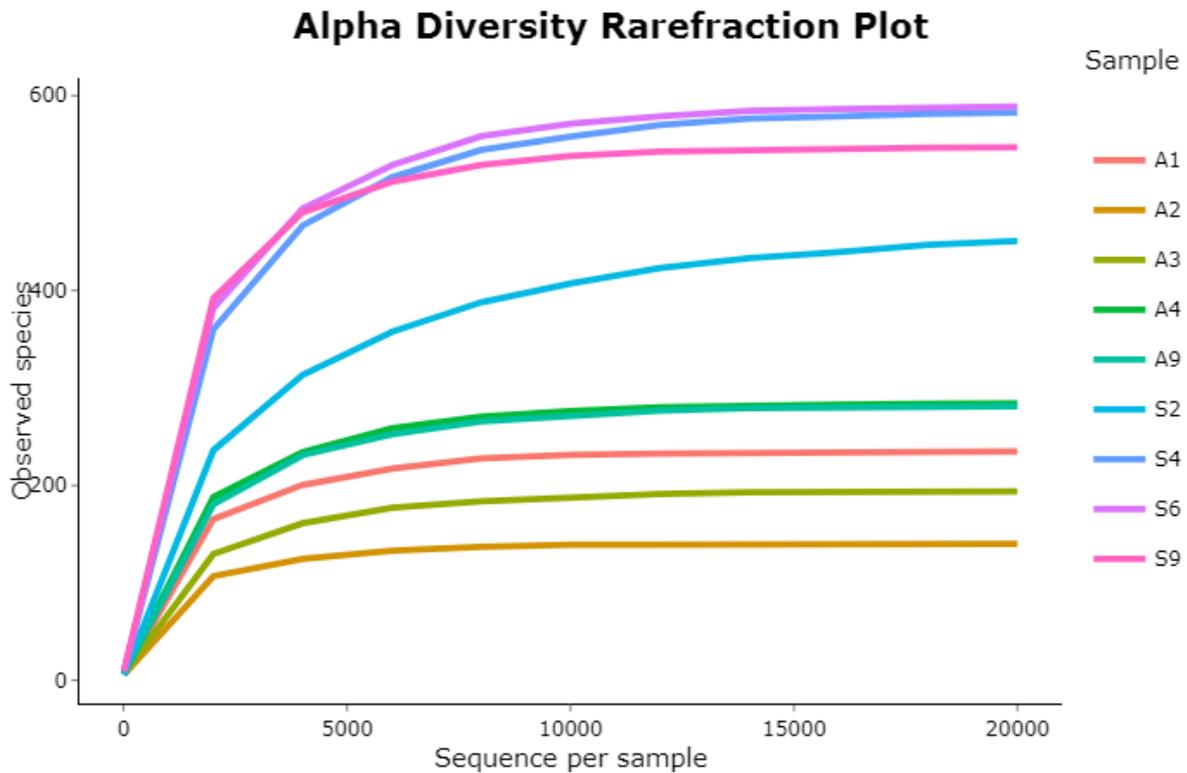


#### 11.2.4 Diversidad Alfa del análisis metagenómico del ARNr 18s.

En principio la diversidad alfa se entiende como el número de especies que habitan dentro de una región, área o ecosistema específico, es decir, que a mayor número de especies dentro de una zona mayor será el índice de riqueza de la misma, está denota la biodiversidad.

A continuación se observa una curva de rarefacción de la diversidad alfa, en esta gráfica el eje Y denota la cantidad de especies encontradas por cada nivel de muestreo, en el eje X se visualiza el número de secuencias por muestra.

**Gráfico 3.** Curva de rarefacción de la diversidad alfa de la región ARNr 18S



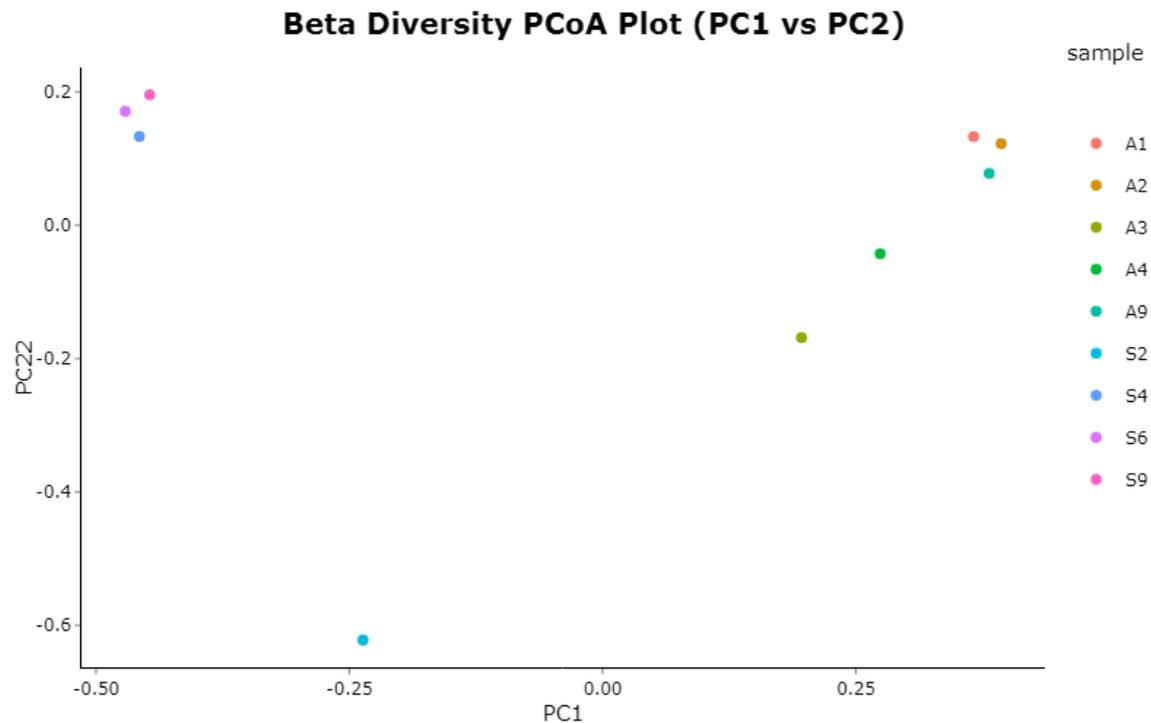
**A: Muestra de agua.** **A1:** Caño Salado, **A2:** Caño Dago, **A3:** Caño Navío, **A4:** Caño Muerto, **A9:** Desembocadura río Sinú-Brazo Tinajones, **S: Muestra de sedimento.** **Un S2:** Caño Dago, **S4:** Caño Salado, **S6:** Caño Muerto, **S9:** Fondo Desembocadura río Sinú-Tinajones.

En esta curva se puede evidenciar como la muestra S6, correspondiente a sedimento del Caño Muerto, cuenta con el mayor índice de diversidad en cuanto a especies, en segunda instancia se observa la muestra S4, correspondiente a Caño Salado, siguiendo S9 Fondo de la Desembocadura del Río Sinú- Tinajones como la tercera más abundante; cabe destacar la diferencia estadísticamente significativa que se encuentra entre la diversidad de especies para agua y para sedimentos, siendo estas últimas las más abundantes.

### 11.2.5 Diversidad Beta del análisis metagenómico del ARNr 18s.

La diversidad beta es la encargada de mostrar la tasa de cambios que pueden generarse dentro de las especies, estas alteraciones pueden darse por diferentes factores ambientales que llevarán a la diversificación dentro de las mismas y suele ser independiente de la diversidad alfa.

**Gráfico 4.** Diversidad Beta.



**A: Muestra de agua.** **A1:** Caño Salado, **A2:** Caño Dago, **A3:** Caño Navío, **A4:** Caño Muerto, **A9:** Desembocadura río Sinú-Brazo Tinajones, **S: Muestra de sedimento.** **S2:** Caño Dago, **S4:** Caño Salado, **S6:** Caño Muerto, **S9:** Fondo Desembocadura río Sinú-Tinajones.

En esta figura se utiliza un gráfico tipo Biplots, donde se busca evidenciar todas las variables encontradas sin discriminar a ninguna de ellas, cada punto se interpola a Cero y se busca la formación de ángulos de 90° y 180°, así como su cercanía a cero; los puntos que se encuentran más cerca entre sí y forman ángulos pequeños (S9, S6 y S4), muestran una correlación positiva de estos datos, es decir, las muestras que más han sufrido cambios dentro de sus especies, corresponden a los sedimentos de Fondo Desembocadura Río Sinú- Tinajones, Caño Muerto y Caño Salado; por otra parte, se encuentran estrechamente relacionadas las muestras de agua (A1, A2 y A9) correspondientes a Caño Salado, Caño Dago y Desembocadura Río Sinú- Tinajones.

### 11.3 Analisis fisico-quimico del agua

Se realizó un análisis físico-químico de las muestras de agua, se estudió pH y temperatura en los sitios de muestreo directamente, presentando el pH más bajo el Caño Dago.

**Tabla 11.** Resultados análisis físico químico de las muestras de agua.

<b>ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE LAS MUESTRAS DE AGUA</b>					
<b>Muestra</b>	<b>Caño Salado (A1)</b>	<b>Caño Dago (A2)</b>	<b>Caño Navío (A3)</b>	<b>Caño Muerto (A4)</b>	<b>Desembocadura río Sinú-Tinajones (A9)</b>
<b>Temperatura</b>	28°C	30°C	30°C	30°C	28°C
<b>pH</b>	6	4	7	6	6

Autores: Abril Flórez A.L, Alfonso Moyano L.D, Arango López D.R, Bermúdez Macías M.Y, Estudio metagenómico de la diversidad procariota del ecosistema de manglar de la bahía de Cispatá, San Antero, Córdoba, Colombia. UCMC; 2018<sup>69</sup>. (proyecto elaborado en conjunto con este)

Por otra parte se enviaron a estudio las muestras de sedimento en los laboratorios de la universidad del Bosque, se presenta similitud al análisis anterior ya que se evidencia un pH más ácido (4) en las muestras del caño Dago.

**Tabla 12.** Resultados análisis- físico químico de muestras de sedimento

<b>ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE LAS MUESTRAS DE SEDIMENTO</b>					
<b>Muestra</b>	<b>Caño Salado (S4)</b>	<b>Caño Dago (S2)</b>	<b>Caño Navío</b>	<b>Caño Muerto (S6)</b>	<b>Desembocadura río Sinú-Tinajones (S9)</b>
<b>Temperatura</b>	28°C	30°C	30°C	30°C	28°C

<b>PH</b>	6	4	7	6	6
-----------	---	---	---	---	---

Autores: Abril Flórez A.L, Alfonso Moyano L.D, Arango López D.R, Bermúdez Macías M.Y, Estudio metagenómico de la diversidad procariota del ecosistema de manglar de la bahía de Cispatá, San Antero, Córdoba, Colombia. UCMC; 2018<sup>69</sup>. (proyecto elaborado en conjunto con este)

#### 11.4 Análisis Metales Pesados en Aguas

Las muestras de agua fueron analizadas para determinar la presencia y concentración de metales pesados, esto con el fin de observar el impacto de las actividades antropogénicas que podrían estar generando este tipo de contaminación; se enviaron a un laboratorio especializado en análisis de aguas (HidroLab); los resultados no arrojaron niveles significativos y/o de importancia.

**Tabla 13.** Resultados Análisis Metales Pesados Aguas.

<b>ANÁLISIS DE METALES PESADOS AGUAS</b>					
<b>Metal</b>	<b>Unidad</b>	<b>Caño Salado</b>	<b>Caño Dago</b>	<b>Caño Navío</b>	<b>Caño muerto</b>
<b>Cadmio</b>	mg/L Cd	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
<b>Cromo</b>	mg/L Cr	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
<b>Mercurio</b>	mg/L Hg	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<b>Plomo</b>	mg/L Pb	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<b>Zinc</b>	mg/L Zn	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050

Autores: Abril Flórez A.L, Alfonso Moyano L.D, Arango López D.R, Bermúdez Macías M.Y, Estudio metagenómico de la diversidad procariota del ecosistema de manglar de la bahía de Cispatá, San Antero, Córdoba, Colombia. UCMC; 2018<sup>69</sup>. (proyecto elaborado en conjunto con este)

## 12. Discusión.

Colombia es uno de los países que ocupan los primeros lugares en cuanto a biodiversidad, los manglares cumplen su función biológica con el mantenimiento de hábitats costero-marinos, además de brindar refugio y alimento a un sin fin de organismos a diferentes niveles tróficos<sup>41</sup>, es por esto que el cuidado y la protección de estas zonas es fundamental, ya que además juega un papel esencial en mantener la calidad del agua, y la estabilidad de la línea costera, permitiendo controlar la distribución de nutrientes y sedimentos en aguas estuarinas.

Los estudios metagenómicos revolucionaron las ciencias biológicas, dando paso a una nueva ecología, con preguntas y metodologías distintas, dando a conocer variedades de organismos y microorganismos, ya que permite el análisis simultáneo de la caracterización taxonómica de las especies contenidas en la comunidad y las funciones que pueden desempeñar<sup>42</sup>, y este proyecto aprovecha las ventajas de la metagenómica para determinar la diversidad eucariota de los manglares.

Cabe mencionar que una de las muestras de suelo no se pudo analizar (Caño navío), ya que el ADN extraído se perdió en la aduana de USA, no se contaba con más ADN de esta muestra, por ende no se pudo enviar mas para ser analizado.

Los resultados del estudio metagenómico revelan que la gran mayoría de OTU encontradas (73.2%), fueron catalogadas como desconocidas (sin asignar), la causa de esto podría ser que las secuencias encontradas en el estudio pertenezcan a especies aún no descritas (ver tabla 9).

En el estudio, el supergrupo con más abundancia fue *Archaeplastida* (12.6%) (Tabla 9), uno de los grupos principales de Eukarya, puesto que en él se encuentran las plantas terrestres (*Embryophyta*), las algas verdes (*Chlorophyta* y *Charophyta*), las

algas rojas (*Rhodophyta*) y un grupo poco común de algas unicelulares denominado *Glaucophyta*<sup>43</sup>.

La clase más abundante encontrada entre *Archaeplastida* fue *Trebouxiophyceae* (5.7%) (ver anexo, tabla 3), la cual es rica en especies de algas verdes con una notable diversidad morfológica y ecológica<sup>44</sup>. La *Trebouxiophyceae* es una clase rica en especies de *Chlorophyta* que incluye simbiontes (líquenes), así como algas verdes de vida libre, también algunas especies de esta clase se encuentran como simbiontes fotosintéticos en ciliados, metazoos y plantas<sup>45</sup>. Estas algas se pueden encontrar en ambientes acuáticos, terrestres y aeroterrestres. En este estudio, *Trebouxiophyceae* fue encontrada en mayor abundancia en zonas acuáticas, en Caño Navío 20.9% (A3), Desembocadura río Sinú-Brazo Tinajones 13.9% (A9), Caño Dago 9.7% (A2), sin embargo, en sedimento se observó su casi nula presencia, ya que estas algas sólo se encontraron en un 0.5% en el sedimento Fondo Desembocadura río Sinú-Tinajones (S9), y en un 0.1% en Caño Muerto (S6), demostrando que su estilo de vida en el ecosistema del manglar de la Bahía de Cispata, es mayoritariamente acuático.

Las algas *Trebouxiophyceae* han llamado la atención por su potencial utilidad en una variedad de aplicaciones biotecnológicas como la producción de biocombustibles, el secuestro biológico de CO<sub>2</sub>, tratamiento de aguas residuales, y como aditivo alimentario y para acuicultura<sup>45</sup>.

La tabla 3 (ver anexo), muestra que el 4.5% de las OTU del filo *Archaeplastida* pertenecen a las algas verdes *Chlorophyta*, pero se desconoce la clasificación taxonómica de estas, ya que quedaron como secuencias sin clasificar, pero se confirma que esta variedad de algas se encuentran en su mayoría en las zonas acuáticas ya que en las muestras A1:Caño Salado (3.5%), A2: Caño Dago (5.4%), A3: Caño Navío (21.3%), A4: Caño Muerto (1.6%), A9: Desembocadura río Sinú-Brazo Tinajones (8.7%) se encontraron en abundancia.

El tercer organismo eucarionte más abundante encontrado dentro del filo *Archaeplastida* fue un árbol del género *Populus* (1.1%) (ver anexo, tabla 3), este tipo de árbol suele medir de 25 a 30 metros, generalmente oriundos de Europa, norte de América y México. Se conocen aproximadamente 40 especies de *Populus* y los

centros de distribución geológicos son las regiones templadas y subárticas del norte<sup>46</sup>. Este árbol es usado para madera y es un modelo notable en biología vegetal, su existencia en el manglar es netamente terrestre, se encontró su secuencia en concentraciones de 3.0%, 3.9% y 2.9% en las zonas muestreadas S4: Caño Salado, S6: Caño Muerto, S9: Fondo Desembocadura río Sinú-Tinajones respectivamente, pero no creció en la zona muestreada S2: Caño Dago (0.0%), esto se debe a que *Populus* crece con un pH de 5.5 a 7.3 (en promedio 6.3)<sup>47</sup>, las tres zonas en las que se localizó cumplían con el pH adecuado para su crecimiento (ver tabla 12), sin embargo, la Zona Caño Dago (S2), tenía un pH de 4 (ácido), por lo cual no cumplía con el ambiente requerido para su crecimiento.

Este árbol llamó la atención en la investigación, debido a su crecimiento en un manglar de Colombia, ya que estos árboles crecen en continentes distintos; específicamente se encontró en el manglar el álamo negro o *Populus trichocarpa* (*black cottonwood*), que es nativo del oeste de América del Norte, una posible explicación para este hallazgo es que este árbol llegó al manglar por medio de la dispersión eólica, puesto que la semilla del *Populus* es pequeña y liviana, generalmente provistas de un mechón de pelos sedosos y largos<sup>46</sup>.

Como se menciona en la tabla 9, el segundo filo más abundante pertenece al supergrupo SAR (8,6%), su nombre son las siglas de (*Stramenopiles*, *Alveolata*, *Rhizaria*) en esta clasificación se encuentran ciliados, flagelados, parásitos, algas entre otros organismos diversos<sup>48</sup>.

En este supergrupo se encuentra *Chaetoceros* como uno de los géneros con más predominancia dentro de este filo (1,3%) (ver anexo, tabla 3), son diatomeas planctónicas marinas, hacen parte del fitoplancton y se dice que podrían contribuir hasta con el 91% de células del mismo, también se menciona que pueden producir aproximadamente el 40% del carbono orgánico generado en el mar cada año<sup>49</sup>; la identificación de estas diatomeas suele ser compleja ya que cuenta con más de 400 especies y tienen gran similitud morfológica; en las muestras de agua se hallaron en porcentajes de 2,9% para caño Salado, 2,2% Caño Dago, 0,3% Caño Navio, 0,7% Caño Muerto y 5,6% para la Desembocadura del río Sinú-Tinajones, este último resultado se puede correlacionar con la presencia de dos tipos de agua ( Marina y

dulce) que pueden contribuir con la aparición de estos microorganismos en mayor proporción.

De este mismo modo, otro género de diatomeas fue hallado en las muestras de agua, *Cyclotella* (0,9%) (ver anexo, tabla 3) suelen vivir en ecosistemas marino costeros, aguas salobres y algunos ecosistemas dulceacuícolas<sup>50</sup>, esta característica se evidencia con la presencia de las mismas en los caños Salado (0,4%), Dago (0,3%), Navío (3,3%), Muerto (3,1%) y desembocadura del río Sinú- Tinajones (0,6%).

Así mismo, *Scuticociliate* como la subclase más predominante dentro de este filo (0,9%) (ver anexo, tabla 3), son microorganismos ciliados que suelen ser parásitos de peces, caballitos de mar y algunos crustáceos, se encuentran mayoritariamente en lagos y ecosistemas eutróficos marino costeros, suelen ser parásitos oportunistas facultativos, se pueden hallar en sedimentos blandos acumulados en el fondo de estos hábitats, corroborando así su presencia en la muestra de sedimento de caño Dago (5,5%), caño salado (0,3%), caño Muerto (1,1%) y en la desembocadura del río Sinú-Tinajones, estos microorganismos además pueden sobrevivir en condiciones anóxicas<sup>51</sup>, y cuentan con tres tipos diferentes de superóxido dismutasas que le confieren dicha capacidad, son importantes para todos los propietarios de piscícolas, en la caso del manglar de la Bahía de Cispatá es un factor que se debe tratar con especial cuidado, ya que las familias de la región dependen de la pesca de mojarras, del cultivo de mejillones entre otros.

Hay que mencionar además, otro grupo de diatomeas que se destacan por su aporte dentro de los ciclos biogeoquímicos de nutrientes, y minerales de vital importancia, y se encontraron en las muestras de agua en un porcentaje de 0,9%, se denominan *Skeletonema*, contribuyen también a la fotosíntesis global; como característica particular este género de diatomeas establece consorcios bacterianos donde se proveen de capacidades especiales para la supervivencia de cada una, tales como el crecimiento en condiciones ambientales donde hay bajas concentraciones de hierro, fluctuaciones drásticas en la temperatura y cambios en el pH<sup>52</sup>; en las muestras de agua se evidenciaron porcentajes significativamente altos en los caños Navío (1,0%) y Muerto (6,9%), esto indica que con respecto a la abundancia del resto de muestras,

la disponibilidad de nutrientes es mucho más limitada en estas zonas, y que podría ser la causa del crecimiento de este tipo de microorganismos que cuentan con características especiales para desarrollarse allí.

Habría que hablar también, del porcentaje que presentó el género *Granofilosea* (0,9%), un conjunto de protozoos que cuenta con reticulopodios con los cuales se alimenta, las muestras con mayor abundancia fueron las correspondientes a sedimento de los caños Salado (1,7%), Muerto (5,5%) y fondo de la desembocadura del río Sinú-Tinajones (0,7%), estos son microorganismos poco estudiados y se encuentran clasificados dentro del filo Cercozoa y Rhizaria, este estudio sugiere que el hábitat de estos microorganismos podrían ser suelos, con altas concentraciones salinas y que pueden resistir cambios de temperatura<sup>53</sup>.

Otro porcentaje importante hallado fue en *Mediophyceae* (0.5%), un grupo de algas diatomeas que suelen ser herramientas biológicas para determinar la biodiversidad de protistas, por lo general son líneas investigativas no abordadas<sup>54</sup>; al encontrar este microorganismo en cifras significativas en las muestras de agua de Caño Salado (0,3%), Caño Dago (0,2%), Caño Navío (0,9%), Caño Muerto (2,6%) y desembocadura del Río Sinú- Tinajones (0,5%) sugiere nuevos campos de estudio en estos sistemas acuíferos, en especial en el caño Muerto donde se encuentra la mayor proporción de estas diatomeas que pueden ser utilizadas para denotar índices de evolución.

El tercer filo más abundante encontrado en este estudio fue *Opisthokonta* (4.7%) (ver tabla 9), este supergrupo encierra una gran diversidad de organismos, como los metazoarios<sup>55</sup> (animales), hongos y varios linajes de organismos unicelulares, este grupo se divide en dos linajes principales, *Holomycota*, que contiene hongos y sus parientes unicelulares, como los *Nucleariides* y *Fonticula alba*, y el *Holozoa* que incluye Metazoa y sus parientes unicelulares, como *Choanoflagellata*, *Filasterea* e *Ichthyosporea*<sup>56</sup>.

El nombre *Opisthokonta* alude a que el flagelo, singular cuando está presente, ocupa una posición posterior, avanzando la célula por delante de él, como se ve en los

espermatozoides de los animales. En los grupos clásicos de hongos no existen fases flageladas, pero éstas abundan en los quitridios (hongos primitivos).

Dentro de este supergrupo, el orden más abundante encontrado fue *Actiniaria* (1.0%) (ver anexo, tabla 3), el cual comprende aproximadamente 1.200 especies de pólipos solitarios, sin esqueleto y carecen de sinapomorfia anatómica<sup>57</sup>. Típicamente se encuentra con la columna enterrada, la base fija al sustrato (arena, rocas, conchas de crustáceos o moluscos) y el disco oral expandido sobre el fondo haciendo visible un collar de pseudoesférulas marginales<sup>58</sup>. Por otra parte, estos animales realizan un mutualismo con otros animales que viven entre sus tentáculos, de esta manera, los animales se protegen de sus predadores entre los tentáculos urticantes de la anémona, y ésta se beneficia de la limpieza de su disco oral y tentáculos como consecuencia de los continuos movimientos de éstos<sup>59</sup>.

Estos pólipos, o más conocidos como anémonas de mar, fueron encontrados únicamente en las muestras de Caño Navío y Caño Muerto en una abundancia de 8.6% y 0.4%, respectivamente. Las anémonas de mar habitan aguas con una temperatura de 23°C a 27°C y un pH de 8 a 8.3, por lo cual se puede deducir que crecieron en mayor proporción en el Caño Navío, debido a que era el lugar donde más se acercaba a las características establecidas para que pudieran sobrevivir, con un pH de 7 y una temperatura de 30°C (ver tabla 11).

El segundo organismo más encontrado es *Porpolomopsis* (0.8%), es un género de hongo muy poco estudiado, circunscrito por Andreas Bresinsky en el 2008; Bresinsky lo separó del género *Hygrocybe* en función de su color y la ausencia de pigmentos DOPA<sup>60</sup>. Este hongo se encontró en una abundancia de 5.4%, 0.4%, 0.3% y 0.7% en las zonas muestreadas Caño Dago, Caño Salado, Caño Muerto y el Fondo Desembocadura río Sinú-Tinajones, respectivamente, con esto se puede deducir que este tipo de hongo crece en zonas con un pH ácido, aproximadamente de 4, y a una temperatura de 30°C, ya que se evidenció mayor abundancia en la zona Caño Dago (S2) (ver tabla 11).

El tercer grupo más encontrado fue la subclase *Copepoda* (0.7%), estos crustáceos representan la mayor biomasa de todos los animales en la tierra<sup>61</sup>, se han descrito

más de 13.000 especies de esta subclase y cada año se agregan más<sup>62</sup>, son de tamaño pequeño (0.3 a 1 mm), colonizan ecosistemas acuáticos bentónicos y planctónicos, desde los océanos de aguas profundas, hasta las grietas de los glaciares del Himalaya, de igual manera pueden comportarse como parásitos en peces y otros vertebrados<sup>63</sup>. Los copépodos son esenciales para el reciclaje de nutrientes, y sus gránulos fecales son una fuente central para los alimentadores de detritos, pero también los animales mismos son una fuente de alimentación abundante para la macrofauna<sup>64</sup>. En Colombia se conocen actualmente 69 especies y subespecies de *Copepoda* (14 *Calanoida*, 41 *Cyclopoida* y 14 *Harpacticoida*)<sup>65</sup>. Estos crustáceos también juegan un papel importante en el control biológico, ya que poseen una notable capacidad para depredar a numerosas larvas de mosquito en un breve lapso de tiempo, por lo tanto, se disminuyen las poblaciones de mosquitos vectores de enfermedades<sup>66</sup>. El estudio reveló que en las muestras Caño Navío (A3) y Caño Muerto (A4) se encontró una abundancia del 0.1% y del 6.2%, respectivamente, siendo más significativa su presencia en en la zona Caño Muerto (A4) (ver anexo, tabla 3).

Aunque el estudio metagenómico nos confiere información para entender qué tipo de organismos y microorganismos se pueden encontrar en el manglar, aún nos queda una brecha extensa para la investigación del resto de organismos que no se pudieron asignar, como lo podemos ver en el mapa de calor según filo (Figura 4) y el mapa de calor según orden (Figura 5), nos demuestra que la mayor cantidad de secuencias tanto en el agua como el sedimento no pudieron ser asignadas a ningún taxón.

El manglar de la Bahía de Cispata, comprende zonas de preservación, y de uso sostenible, pero sin duda, algunas zonas como caño Dago, presenta ciertos grados de alteración, algunos de ellos relacionados con procesos naturales como la erosión marina, y otros relacionados con las alteraciones antrópicas, por ejemplo la tala selectiva e indiscriminada de árboles de mangle, la sobreexplotación de los recursos hidrobiológicos, la alteración de los flujos hídricos, el cambio de uso de los suelos, en donde se destacan la actividad turística, y la industria camaronera<sup>67</sup>. La tala de árboles lleva a la acidificación de los suelos por la incapacidad del sistema para retener y reciclar los nutrientes, en ausencia del bosque, <sup>68</sup> por lo cual se puede explicar el por qué el caño Dago presenta un pH de 4 (ácido).

En las gráficas de alfa y beta diversidad ( gráfica 3 y 4) se pueden destacar puntos importantes dentro del estudio del manglar de la bahía de Cispatá; para el caso de la diversidad alfa se pudo observar que todas las muestras contaron con cifras similares de secuencias obtenidas, denota que todas las muestras son ricas en microorganismos, y que a pesar de variaciones en salinidad, pH y demás factores que influyen dentro de la supervivencia de los eucariontes, éstos logran sobrevivir y generan algunas características destacables como las que son mencionadas a lo largo de esta discusión, cabe también mencionar que la diversidad más alta encontrada corresponde la muestra del Caño Muerto (S6), esto es indicativo de la riqueza de esta área y además evidencia la disponibilidad de nutrientes que se encuentran en este y los sedimentos restantes, que permiten la supervivencia y desarrollo de eucariontes.

Por otra parte, los resultados de la diversidad Beta (gráfica 4) evidencian la variabilidad hallada dentro de las especies que cohabitan las aguas de Caño Salado (A1), Caño Dago (A2) y Desembocadura del río Sinú-Tinajones (A9), siendo estas tres muestras las que obtienen una tasa de cambio en la composición de distintas especies más altas, esto podría explicar por qué muchas de las secuencias encontradas se clasificaron como no asignadas, puede que aún haya especies que aún no han sido secuenciadas o posiblemente no las hayan subido a un GenBank, otra relación estrecha corresponde a la variabilidad entre especies de las muestras de sedimento de Caño Salado (S4), Caño Muerto (S6) y Fondo Desembocadura río Sinú-Tinajones (S9), teniendo estas una tasa de cambio en la composición de distintas especies menor a las mencionadas anteriormente (muestras de agua), sin embargo, Caño Dago (S2), demostró tener la menor tasa de cambio entre especies como se puede evidenciar en el gráfico 4.

Es importante mencionar los resultados obtenidos en las muestras de agua para el análisis de metales pesados (ver tabla 13), estos arrojaron valores muy bajos, aunque para el caso del Mercurio este presenta un nivel más alto del permitido; puede deberse a actividades humanas que afectan los afluentes del manglar, dentro de estas la minería legal e ilegal que se presenta en la cuenca alta del río Sinú; se sugiere analizar las muestras de sedimento, tejido de crustáceos y moluscos para determinar

cuánto afecta la presencia de metales pesados a la fauna de la zona, ya que el agua tiene un flujo constante desde el río y se mezcla con la del Mar Caribe y por esto también se evidenciaron valores bajos en el agua, mientras que en la fauna de la zona se pueden hallar niveles de metales e incluso en el hombre que es el último integrante de la cadena trófica.

Según todas las características mostradas, y la evidencia aportada, el Manglar de la Bahía de Cispatá es un albergue de especies eucariotas de todo tipo, microbiológicamente hablando, que ha sufrido diferentes cambios en su conformación estructural y la distribución de los nutrientes debido a las actividades antropogénicas, un ejemplo claro es la minería ilegal en la cuenca alta del río Sinú, que desemboca en este ecosistema, además de la ganadería y actividades turísticas que limitan las posibilidades de estos microorganismos de sobrevivir en condiciones adecuadas, es por ello que muchos generan adaptaciones a estas variables, que se ven reflejadas dentro de su genoma, pero que visto desde otra perspectiva puede generar aportes dentro de diferentes proyectos investigativos tales como los basados en microorganismos capaces de degradar materia orgánica, detritus, sobrevivir en aguas contaminadas con metales pesados, fluctuaciones drásticas en el pH y concentraciones de sal, entre otras; en términos más simples también puede aportar dentro de líneas taxonómicas, ya que muchas de las especies encontradas aquí han sido poco o no estudiadas y que ayudan a construir líneas evolutivas, además indican como la alta abundancia de secuencias está relacionada con el metabolismo de nutrientes y a su vez este se relaciona con la replicación, supervivencia y adaptación.

Los estudios relacionados con los organismos y microorganismos eucariotas tanto de agua como de sedimento, son muy escasos, debido a la dificultad de la clasificación de estos mismos, y a su vez, la casi siempre imposibilidad de cultivo que se tiene de estos. Estos estudios realizados son para la obtención de datos moleculares que en el futuro permitan reducir el número de OTU no identificadas en este tipo de ecosistemas y en otros, como lo demuestra este estudio, hace falta mucho por realizar en cuanto a eucariotas.

### 13. Conclusiones.

- El estudio metagenómico de las muestras de sedimento de la bahía de Cispatá, San Antero, Córdoba, mostró una alta diversidad eucariota, con la presencia de los supergrupos como *Archaeplastida*, *SAR* y *Opisthokonta*, donde la mayor abundancia fue la de *Archaeplastida*, que incluye las plantas superiores y las algas verdes y rojas.
- Se pudo observar diferentes filos, géneros y especies en las muestras de agua, esto evidenciando que a pesar de las condiciones salobres y cambios en el pH que presentan las cinco fuentes de agua analizadas, pueden convertirse en el hábitat de muchas especies de algas, diatomeas, protistas, tales como los pertenecientes al grupo *Archaeplastida*, *SAR* y *Opisthokonta*, los más relevantes dentro de este estudio.
- Logramos comparar por análisis estadístico la diversidad microbiana de las cinco zonas de manglar, los resultados obtenidos en las diferentes zonas estudiadas demuestran que los sedimentos presentan una mayor diversidad que

las aguas, y que la zona con mayor intervención antropogénica ha sido ampliamente afectada en su diversidad, disponibilidad de nutrientes, entre otros.

- Es importante resaltar el alto número de OTU sin identificar, esto debido a la poca investigación, tanto de microbiología clásica como de biología molecular, de eucariontes en manglares, por lo tanto, la información en las bases de datos es insuficiente y dificulta la determinación taxonómica de las mismas.

#### 14. Referencias bibliográficas

1. Santos HF, Juliano CC, Carmo FL, Rosado AS, Peixoto RS, 18S rDNA Sequences from Microeukaryotes Reveal Oil Indicators in Mangrove Sediment. Plos One [internet].2010 [Citado 23 de febrero de 2018];5(8). Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0012437>
2. Andreote FD , Jiménez DJ, Chaves D, Franco AC, Luvizotto DM, Andreotei FD, et al. The Microbiome of Brazilian Mangrove Sediments as Revealed by Metagenomics. Plos One [internet].2012 [Citado 23 de febrero 2018];7(6). disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0038600>
3. Ghizelini A, Hagler L,Macrae A, Microbial Diversity in Brazilian Mangrove Sediments.Brazilian Journal of Microbiology [internet].2012 [citado el 29 de enero de 2019];1242-1254. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3769006>
4. Thompson CE, Beys-da-Silva WO, Santi L, Berger M, Vainstein MH, Guima Rães JA, et al. A Potential Source for Cellulolytic enzyme discovery and environmental aspects Revealed Through Metagenomics of Brazilian mangroves. SpringerOpen Journal [internet]. 2013 [Citado 23 de febrero de 2018];3. Disponible en: <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/2191-0855-3-65>

5. Polanía J, Vanegas J, Galindo T, Pérez A, Campos S, Sánchez J, et al. Grupos funcionales de microorganismos asociados al manglar del Caribe colombiano. Universidad nacional de Colombia. 2013 (citado 22 octubre 2018). Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Camilo\\_Garcia6/publication/312164438\\_Investigacion\\_en\\_Ciencias\\_del\\_Mar\\_Aportes\\_de\\_la\\_Universidad\\_Nacional\\_de\\_Colombia\\_Red\\_de\\_Estudios\\_del\\_Mundo\\_Marino\\_REMAR/links/58739b6008ae329d621cf7b9/Investigacion-en-Ciencias-del-Mar-Aportes-de-la-Universidad-Nacional-de-Colombia-Red-de-Estudios-del-Mundo-Marino-REMAR.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Camilo_Garcia6/publication/312164438_Investigacion_en_Ciencias_del_Mar_Aportes_de_la_Universidad_Nacional_de_Colombia_Red_de_Estudios_del_Mundo_Marino_REMAR/links/58739b6008ae329d621cf7b9/Investigacion-en-Ciencias-del-Mar-Aportes-de-la-Universidad-Nacional-de-Colombia-Red-de-Estudios-del-Mundo-Marino-REMAR.pdf)
6. Samper J, Silva A. Complejidad estructural de los manglares de Playa Blanca, Escondido y Rincón de Osa, Golfo Dulce, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* [internet]. 2014 [citado el 29 de Enero de 2019]; vol (63). Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44943930012>
7. Simões MF, Antunes A, Ottoni CA, Amini MS, Alam I, Alzubaidy H. Soil and Rhizosphere Associated Fungi in Gray Mangroves (*Avicennia marina*) from the Red Sea — A Metagenomic Approach. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* [internet]. 2015. [Citado 26 de mayo de 2018]; 13(5). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1672022915001382>
8. Pachiadaki MG, Rédou V, Beaudoin DJ, Burgaud G, Edgcomb VP. Fungal and prokaryotic activities in the marine subsurface biosphere at the Peru margin and Canterbury basin inferred from RNA based analyses and microscopy. *Frontier in microbiology* [internet] 2016 [ Citado 23 de febrero de 2018]; vol 7 (846). Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00846/full>
9. Loganathachetti DS, Poosakkannu A, Muthuraman S, Fungal community assemblage of different soil compartments in mangrove ecosystem. *Scientific Reports journal* [internet]. 2017 [ Citado 14 de marzo de 2018]; vol 7 (8560). Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-09281-3>
10. Gnani G, Garzoli L, Poli A, Prigione V, Burgaud G, Varese GC. The culturable mycobiota of *Flabellia petiolata*: First survey of marine fungi associated to a Mediterranean green alga. *PLoS One*. 2017 . [ Citado 26 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5398637/>
11. Mendes L, Tsai S. Distinct taxonomic and functional composition of soil microbiomes along the gradient forest-restinga-mangrove in southeastern Brazil. Springer International Publishing [Internet] 2018 [ citado el 17 de febrero de 2019];

Vol 111 ( 101-114). Disponible en :  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28831604>

12. Frąç M, Hannula SE, Bełka M, Jędryczka M. Fungal Biodiversity and Their Role in Soil Health. *Front Microbiol* [Internet]. 13 de abril de 2018 [citado 6 de junio de 2019];9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5932366/>
13. Imchen, M., Kumavath, R., Barh, D., Azevedo, V., Ghosh, P., Viana, M., & Wattam, A. Searching for signatures across microbial communities: Metagenomic analysis of soil samples from mangrove and other ecosystems. *Scientific reports*. [internet] 2017 [ Citado 22 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5562921/#MOESM1>
14. Bahram M, Vanderpool D, Pent, Hiltunen M, y Ryberg M. The genome and microbiome of a dikaryotic fungus (*Inocybe terrigena*, *Inocybaceae*) revealed by metagenomics. *Informes de microbiología ambiental*, 10 2 , 155-166. (2017) [Citado 26 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-genome-and-microbiome-of-a-dikaryotic-fungus-by-Bahram-Vanderpool/6c945da2835499e3e3626cefd0fdfcef91511fd>
15. Cannicci S, Fusi M, Cimó F, Dahdouh-Guebas F, Fratini S. Interference competition as a key determinant for spatial distribution of mangrove crabs. *BMC Ecol* [Internet]. 15 de febrero de 2018 [citado 14 de abril de 2019];18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5815208>
16. Colombia. Alcaldía Municipal de San Antero en Córdoba. Reseña histórica [internet]. 2017. [citado 16 de abril de 2019]. Disponible en: <http://www.sanantero-cordoba.gov.co/municipio/resena-historica>
17. Colombia. Centros de documentación e información municipal. Plan de Desarrollo Municipal “Haciendo de San Antero el Mejor Lugar de Colombia”. 2012. [citado 16 de abril de 2019]. Disponible en: <http://cdim.esap.edu.co/bancomedios/documentos%20pdf/sananterocordobapd2012-2015.pdf>
18. Sánchez Páez H, Tavera Escobar HA, Ulloa Delgado GA. Manejo integral de los manglares por comunidades locales: Caribe de Colombia. Bogotá, D.C: CONIF; 2004. 335 p.
19. Colombia. Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible. Manglares. *minambiente* [internet]. 2016 [Citado 06 de mayo de 2018]. Disponible en: <http://www.minambiente.gov.co/index.php/bosques-biodiversidad-y-servicios-ecosistematicos/ecosistemas-estrategicos/manglares>.

- 20.** Mejía LM, Molina MP, Sanjuan A, Grijalba M, Niño LM. 2014. Bosque de manglar, un ecosistema que debemos cuidar. Universidad Jorge Tadeo Lozano, Instituto Colombiano de Desarrollo Rural. Cartagena D. T. 27p. [ citado 26 de mayo de 2018]. Disponible en:  
[http://observatorioirsb.org/cmsAdmin/uploads/cartilla-manglar-28pg-\(1\)\\_001.pdf](http://observatorioirsb.org/cmsAdmin/uploads/cartilla-manglar-28pg-(1)_001.pdf)
- 21.** Diaz J.M. Una revisión sobre los manglares: características, problemáticas y su marco jurídico. Ra Ximhai, Vol. 7, Número 3. [Internet] 2011 [citado 20 de abril de 2019]; Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/461/46121063005.pdf>
- 22.** Colombia. Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible. Manglares. minambiente [internet]. 2016 [Citado 06 de mayo de 2018]. Disponible en:  
<http://www.minambiente.gov.co/index.php/bosques-biodiversidad-y-servicios-ecosistematicos/ecosistemas-estrategicos/manglares>
- 23.** Martínez F.J, Piñeros N.G. Métodos para purificación de metagenoma para estudios de diversidad biológica, biomedicina y biotecnología con base al gen arn ribosomal 16s. Innovaciencia [Internet] 2014, [citado 20 de abril de 2019]; Disponible en: [https://revistas.udes.edu.co/innovaciencia/article/view/253/pdf\\_11](https://revistas.udes.edu.co/innovaciencia/article/view/253/pdf_11)
- 24.** Vasquez GDC. Metagenómica Revelación de comunidades microbianas [Internet]. BIOINFORMÁTICA EN COLOMBIA. [citado 26 de octubre de 2018]. Disponible en:  
<https://bioinformaticaencolombia.blogspot.com/2017/06/metagenomica-revelacion-de-comunidades.html>
- 25.** Reyes L, Rodríguez I, Valdés J, Kameyama L, Cardenas O, Martínez F.A.A Versatile Metagenome Purification Method to Identify Uncultivable Bacteria by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) from Sediments and Soils. Mexico: J Bacteriol Parasitol 2012 [citado 25 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.longdom.org/open-access/a-versatile-metagenome-purification-method-to-identify-uncultivable-bacteria-2155-9597.1000147.pdf>
- 26.** Escalante AE. Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas:32. [Citado el 26 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://micrositios.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap12.pdf>
- 27.** Op De Beeck M, Lievens B, Busschaert P, Declerck S, Vangronsveld J, Colpaert JV. Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. PLoS One [Internet]. 16 de junio de 2014 [citado 2 de

octubre de 2019];9(6). Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4059633/>

28. Gonzales L, Carmen D et al. Herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias en el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. INHRR [online]. 2016, vol.47, n.1-2 [citado 25 Abril 2019]. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-04772016000100011&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772016000100011&lng=es&nrm=iso). ISSN 0798-0477
29. Hiraoka S, Yang CC, Iwasaki W. Metagenomics and Bioinformatics in Microbial Ecology: Current Status and Beyond. Microbes Environ. 2016 [citado 25 Abril 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5017796/#idm140454570546848title>
30. BLAST (biotechnology). En:Wikipedia [Internet].2019 [citado 3 de mayo de 2019]. Disponible en: [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=BLAST\\_\(biotechnology\)&oldid=915621744](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=BLAST_(biotechnology)&oldid=915621744)
31. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat Methods. mayo de 2010;7(5):335-6.[Internet]. [citado 25 de abril de 2019]. Disponible en: <http://bioinf.ibun.unal.edu.co/documentos/Blast/blast.php>.
32. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat Methods. julio de 2016;13(7):581-3[citado 27 de junio de 2019]. Disponible en:<https://www.nature.com/articles/nmeth.3869>
33. Jazayeri SM, Melgarejo Muñoz LM, Romero HM. RNA-SEQ: A GLANCE AT TECHNOLOGIES AND METHODOLOGIES. Acta Biológica Colombiana. mayo de 2015;20(2):23-35. [citado 27 de junio de 2019]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-548X2015000200003](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2015000200003)
34. Escribano AV, García CG. TRABAJO FIN DE GRADO: Técnicas de secuenciación de nueva generación para el estudio del microbioma humano.[citado 27 de junio de 2019]. Disponible en: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ANDREA%20VAZQUEZ%20ESCRIBANO.pdf>

35. Maduranga, Kasun et al. "Molecular phylogeny and bioprospecting of Endolichenic Fungi (ELF) inhabiting in the lichens collected from a mangrove ecosystem in Sri Lanka." PLoS one vol. 13,8 e0200711. 29 Agosto 2018. [Internet]. [citado 27 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6114277/>
36. Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya [Internet]. [citado 27 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0198446>
37. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 27 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25110630>
38. Potential of fungi isolated from the dumping sites mangrove rhizosphere soil to degrade polythene | Scientific Reports [Internet]. [citado 27 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-41448-y>
39. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. Science Direct [Internet]. [citado el 27 de junio de 2019]. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1405888X13720849?token=9A82065A72948E6F109FE25BC9A51AC92E5C1EEC2C22EB3D44AEFEF554A5BB5BD88D383AEC6008DC2908EE5B952CFE0>
40. Hadziavdic K, Lekang K, Lanzen A, Jonassen I, Thompson EM, Troedsson C. Characterization of the 18S rRNA Gene for Designing Universal Eukaryote Specific Primers. 2014. PLoS ONE 9(2): e87624.[citado el 27 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.00876>
41. Yáñez-Arancibia A, Twilley RR, Lara-Domínguez AL. Los ecosistemas de manglar frente al cambio climático global. MYB. 5 de septiembre de 2016;4(2):3.[citado el 12 de septiembre de 2019]. Disponible en : <https://www.redalyc.org/pdf/617/61740202.pdf>
42. Bonilla-Rosso G. METAGENÓMICA, GENÓMICA Y ECOLOGÍA MOLECULAR: LA NUEVA ECOLOGÍA EN EL BICENTENARIO DE DARWIN. 2008;11(1):12.[citado el 12 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/432/43211943005.pdf>
43. Carranza, C, Teixeira De Mello, F & Pacheco, JP. 2013. Diversidad Biológica. Licenciatura en Gestión Ambiental. Apuntes de Curso. CURE - UdelAR.[citado el

12 de septiembre de 2019]. Disponible en: [https://eva.udelar.edu.uy/pluginfile.php/312451/mod\\_forum/intro/Licenciatura%20en%20Gesti%C3%B3n%20Ambiental%20%E2%80%93%20Ciclo%20de%20Profundizaci%C3%B3n.pdf](https://eva.udelar.edu.uy/pluginfile.php/312451/mod_forum/intro/Licenciatura%20en%20Gesti%C3%B3n%20Ambiental%20%E2%80%93%20Ciclo%20de%20Profundizaci%C3%B3n.pdf)

44. Dynamic evolution of mitochondrial genomes in Trebouxiophyceae, including the first completely assembled mtDNA from a lichen-symbiont microalga (*Trebouxia* sp. TR9) [Internet]. [citado 12 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6547736/>
45. Turmel M, Otis C, Lemieux C. Dynamic Evolution of the Chloroplast Genome in the Green Algal Classes Pedinophyceae and Trebouxiophyceae. *Genome Biol Evol.* 1 de julio de 2015;7(7):2062-82. [Internet]. [citado 12 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4524492/>
46. Cerda Lumus M. E. Alamos y Sauces del estado de Aguascalientes, investigación y ciencia. [Internet], [citado 28 de septiembre de 2019]; Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6146626.pdf>
47. La aforestación neutraliza el pH del suelo | CREA F [Internet]. [citado 28 de septiembre 2019]. Disponible en: <http://blog.creaf.cat/es/noticias/la-aforestacion-neutraliza-el-ph-del-suelo/>
48. Supergrupo SAR. En: Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. 2019 [citado 28 de septiembre 2019]. Disponible en: [https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Supergrupo\\_SAR&oldid=117703325](https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Supergrupo_SAR&oldid=117703325)
49. Hamsher SE, LeGresley MM, Martin JL, Saunders GW. A Comparison of Morphological and Molecular-Based Surveys to Estimate the Species Richness of Chaetoceros and Thalassiosira (Bacillariophyta), in the Bay of Fundy. *PLoS One* [Internet]. 9 de octubre de 2013 [citado 28 de septiembre 2019];8(10). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3794052/>
50. Rivera P, Cruces F, Vila I. CYCLOTELLA OCELLATA PANTOCSEK (BACILLARIOPHYCEAE): PRIMERA CITA EN CHILE Y COMENTARIOS SOBRE SU VARIABILIDAD MORFOLOGICA. *Gayana Botánica.* 2003;60(2):123-31. [Internet]citado 28 de septiembre 2019]. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-66432003000200007](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-66432003000200007)

- 51.** Identification and Molecular Characterization of Superoxide Dismutases Isolated From A Scuticociliate Parasite: Physiological Role in Oxidative Stress Scientific Reports [Internet]. [citado 28 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-49750-5>
- 52.** Johansson ON, Pinder MIM, Ohlsson F, Egardt J, Töpel M, Clarke AK. Friends With Benefits: Exploring the Phycosphere of the Marine Diatom *Skeletonema marinoi*. *Front Microbiol.* 2019;10:1828. [Citado 28 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31447821>
- 53.** Cavalier-Smith T, Chao EE, Lewis R. Multigene phylogeny and cell evolution of chromist infrakingdom Rhizaria: contrasting cell organisation of sister phyla Cercozoa and Retaria. *Protoplasma.* septiembre de 2018;255(5):1517-74.[Citado el 28 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29666938>
- 54.** De Luca D, Kooistra WHCF, Sarno D, Gaonkar CC, Piredda R. Global distribution and diversity of Chaetoceros (Bacillariophyta, Mediophyceae): integration of classical and novel strategies. *PeerJ.* 2019;7:e7410. [Citado el 28 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31489261>
- 55.** Gallegos-Neyra EM, Lugo-Vázquez A, Calderón-Vega A, Sánchez-Rodríguez M del R, Mayén-Estrada R. Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* enero de 2014;85:10-25.[Citado el 28 de septiembre de 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmbiodiv/v85sene/v85senea2.pdf>
- 56.** Torruella G, Derelle R, Paps J, Lang BF, Roger AJ, Shalchian-Tabrizi K, et al. Phylogenetic Relationships within the Opisthokonta Based on Phylogenomic Analyses of Conserved Single-Copy Protein Domains. *Mol Biol Evol.* febrero de 2012;29(2):531-44.[Citado el 28 de septiembre de 2019].Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3350318/>
- 57.** Rodríguez E, Barbeitos MS, Brugler MR, Crowley LM, Grajales A, Gusmão L, et al. Hidden among Sea Anemones: The First Comprehensive Phylogenetic Reconstruction of the Order Actiniaria (Cnidaria, Anthozoa, Hexacorallia) Reveals a Novel Group of Hexacorals. *PLoS One* [Internet]. 7 de mayo de 2014 [citado 29 de septiembre de 2019];9(5). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4013120/>

58. Moreno AH, Betancourt Fernández L. ANEMONAS (ANTHOZOA: ACTINIARIA, CORALLIMORPHARIA, EuzANTHARIA, ZOANTHIDEA) CONOCIDAS PARA LA HISPANIOLA. :15. [citado 29 de septiembre de 2019] Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/870/87027305.pdf>
59. Actiniaria. En: Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. 2019 [citado 29 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Actiniaria&oldid=119098972>
60. *Porpolomopsis*. En: Wikipedia [Internet]. 2018 [citado 29 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Porpolomopsis&oldid=831696335>
61. Phylogenomic analysis of Copepoda (Arthropoda, Crustacea) reveals unexpected similarities with earlier proposed morphological phylogenies [Internet]. [citado 29 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5244711/>
62. Morales-Ramírez Á, Suárez-Morales E, Corrales-Ugalde M, Garrote OE. Diversity of the free-living marine and freshwater Copepoda (Crustacea) in Costa Rica: a review. Zookeys. 25 de noviembre de 2014;(457):15-33. ]. [citado 29 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4283362/>
63. Molecular Phylogeny and Revision of Copepod Orders (Crustacea: Copepoda) [Internet]. [Citado el 29 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5567239/>
64. Gollner S, Ivanenko VN, Arbizu PM, Bright M. Advances in Taxonomy, Ecology, and Biogeography of Dirivultidae (Copepoda) Associated with Chemosynthetic Environments in the Deep Sea. PLoS One [Internet]. 31 de agosto de 2010 [Citado el 29 de septiembre de 2019];5(8). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2868908/>
65. Gaviria S. Especies de vida libre de la subclase Copepoda (Arthropoda, Crustacea) en aguas continentales de Colombia. :17. [Citado el 29 de septiembre de 2019];5(8). Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/491/49180103.pdf>

66. Suarez-Morales, E.2000. Copépodos, seres ubicuos y poco conocidos. CONABIO. Biodiversitas 29:7-11[Citado el 29 de septiembre de 2019] Disponible en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv29art2.pdf>
67. Torres WOG, Delgado GAU. CARACTERIZACION, DIAGNOSTICO Y ZONIFICACION DE LOS MANGLARES DEL DEPARTAMENTO DE CORDOBA. 2001;198. [Citado el 29 de septiembre de 2019] Disponible en: [http://cinto.invemar.org.co/alfresco/d/d/workspace/SpacesStore/d3b714de-d8f8-4afa-a611-9f8746105623/Caracterizaci%C3%B3n,%20diagn%C3%B3stico%20y%20zonificaci%C3%B3n%20de%20los%20manglares%20de%20C%C3%B3rdoba?ticket=TICKET\\_f71c77acad0c221d17760130911f8d9859f42dd9](http://cinto.invemar.org.co/alfresco/d/d/workspace/SpacesStore/d3b714de-d8f8-4afa-a611-9f8746105623/Caracterizaci%C3%B3n,%20diagn%C3%B3stico%20y%20zonificaci%C3%B3n%20de%20los%20manglares%20de%20C%C3%B3rdoba?ticket=TICKET_f71c77acad0c221d17760130911f8d9859f42dd9)
68. Roa Castañeda JJ, Núñez Dueñas J, Kolumbien, editores. Coca: deforestación, contaminación y pobreza: acercamiento a la actividad agronómica y la problemática ambiental de los cultivos de coca en Colombia. Bogotá, D.C: Policía Nacional, Dirección de Antinarcóticos; 2014. 212 p. [Citado el 29 de septiembre de 2019] Disponible en: <http://www.odc.gov.co/Portals/1/publicaciones/pdf/oferta/estudios/OF5022014-coca-deforestacion-contaminacion-pobreza.pdf>
69. Abril Flórez A.L, Alfonso Moyano L.D, Arango López D.R, Bermúdez Macías M.Y, Estudio metagenómico de la diversidad procariota del ecosistema de manglar de la bahía de Cispatá, San Antero, Córdoba, Colombia. UCMC; 2018.

## 15. Anexos.

**Anexo 1.** Extracción de ADN usando kit ZymoBIOMICSTM DNA Mini Kit (ZymoResearch, USA)

## PRE PROTOCOLO:

-Alistar columnas tapa verde ZYMO-SPIN IV-HCR SPIN FILTERS

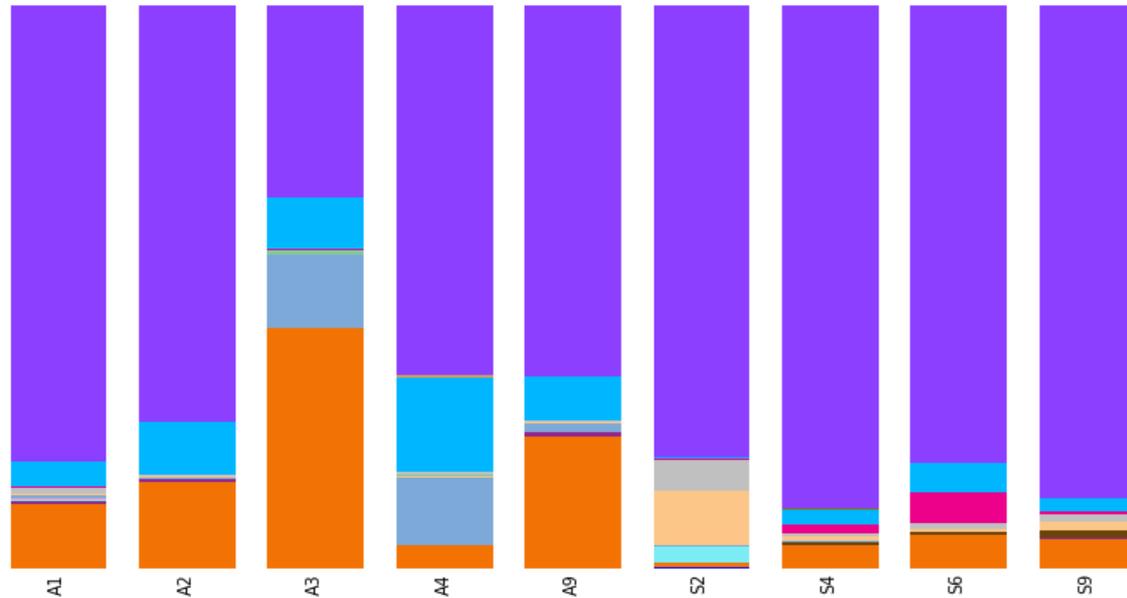
1. Cortar la base del tubo
2. Poner un tubo de recolección
3. Centrifugar exactamente 8000 g por 3 minutos (Añadir 300-400 ul de agua estéril antes de centrifugar)

## PROTOCOLO:

1. Añadir 250 mg de muestra a un tubo ZR BASHINGBEAD LYSIS. Añadir 800 ul de LYSIS SOLUTION al tubo
2. Procesar vortex por 40 min.
3. Centrifugar 10000 g/min por 1 min.
4. Transferir 400 ul de sobrenadante a un ZYMO SPIN IV SPIN FILTER (Tapa naranja) en un tubo de recolección y centrifugar 7000 g por 1 min, quitar base del tubo.
5. Agregar 1200 ul de SOIL DNA BINDING BUFFER a el filtrado en el tubo de recolección del paso 4.
6. Transferir 800 ul de la mezcla del paso 5 a un tubo de recolección ZIMO SPIN IIC y centrifugar a 10000 g por 1 min.
7. Descartar el filtrado y repetir el paso 6.
8. Agregar 200 ul de DNA PRE-WASH BUFFER al ZIMO SPIN IIC COLUMN en un nuevo tubo de recolección y centrifugar 10000 g por 1 min.
9. Agregar 500 ul de DNA WASH BUFFER al ZIMO SPIN IIC COLUMN y centrifugar 10000 g por 1 min.
10. Transferir el ZYMO SPIN IIC COLUMN a un tubo ependorf de 1.5 ml y agregar 100 ul (35 ul mínimo) de DNA ELUTION BUFFER directamente a la matriz de la columna. Centrifugar 10000 g por 1 min.

11. Transferir el DNA eludado del paso 10 al preparado ZYMO SPIN IV-HCR SPIN FILTER (Tapa Verde) en un ependorf limpio y centrifugar exactamente 8000 g por 1 min

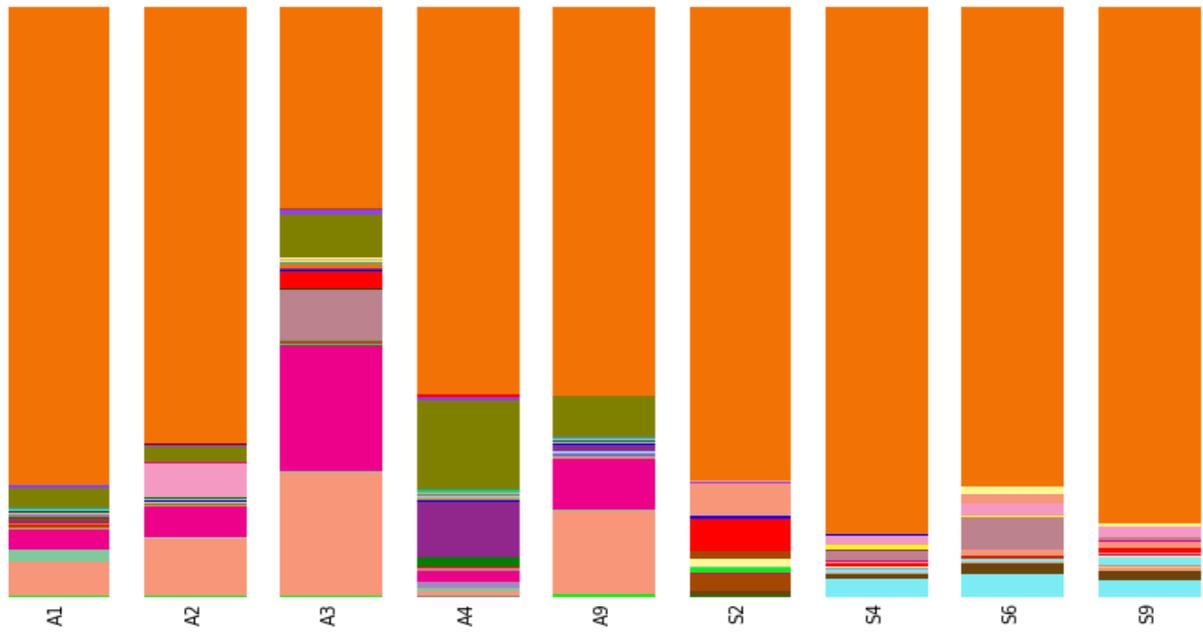
Anexo 2. Gráfica 1. Composición microbiana según clase.



Anexo 3. Tabla 1. Composición microbiana según clase.

Legend	Taxonomy	Total %	A1 %	A2 %	A3 %	A4 %	A9 %	S2 %	S4 %	S6 %	S9 %
	D_0_Eukaryota;D_1_Amoebozoa;D_2_Discosea	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Amoebozoa;D_2_Schizoplasmodiida	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Archaeplastida;D_2_Chloroplastida	12.6%	11.5%	15.4%	42.6%	4.1%	23.4%	0.9%	4.0%	6.0%	5.3%
	D_0_Eukaryota;D_1_Archaeplastida;D_2_Rhodophyceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Cryptophyceae;D_2_Cryptomonadales	0.2%	0.4%	0.4%	0.0%	0.0%	0.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Cryptophyceae;D_2_P1-31	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Excavata;D_2_Discoba	0.4%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	2.8%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Haptophyta;D_2_Pavlovophyceae	0.0%	0.1%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Haptophyta;D_2_Prymnesiophyceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Incertae Sedis;D_2_Ancyromonadida	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.7%	0.5%	1.4%
	D_0_Eukaryota;D_1_Incertae Sedis;D_2_Apusomonadidae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Incertae Sedis;D_2_Palpitomonas	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Freshwater Opisthokonta	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa	3.1%	0.6%	0.3%	13.1%	11.9%	1.5%	0.1%	0.2%	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nucleomycea	1.5%	0.2%	0.1%	0.0%	0.2%	0.2%	9.7%	0.8%	0.4%	1.5%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;Other	0.1%	0.0%	0.0%	0.6%	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_RT5iin25;D_2_Colobanthus quitensis	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_RT5iin25;D_2_uncultured eukaryote	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata	1.2%	1.1%	0.3%	0.2%	0.5%	0.4%	5.6%	0.4%	1.1%	1.2%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Rhizaria	1.0%	0.2%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.2%	1.7%	5.6%	0.7%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles	6.4%	4.4%	9.4%	9.1%	16.8%	7.8%	0.3%	2.7%	5.1%	2.3%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;Other	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Eukaryota;Other;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Unassigned;Other;Other	73.2%	81.1%	73.9%	34.1%	65.5%	65.8%	80.1%	89.4%	81.3%	87.5%

Anexo 4. Gráfica 2. Composición microbiana según familia.



**Anexo 5. Tabla 2.** Composición microbiana según familia.

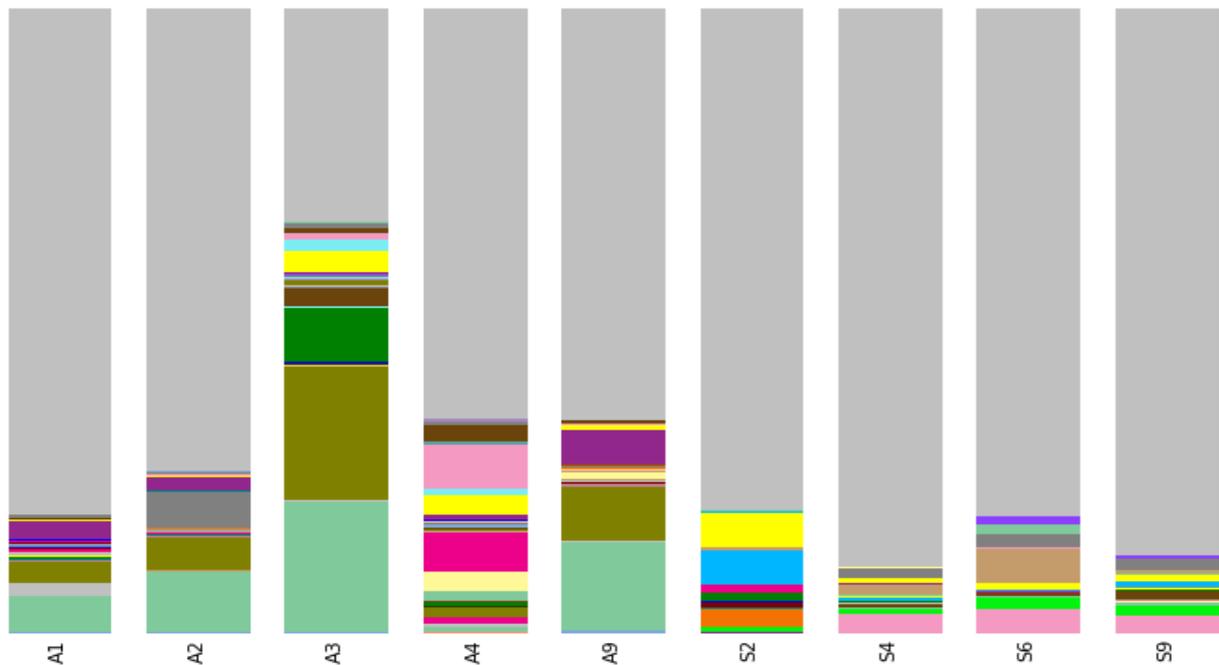
		Total	A1	A2	A3	A4	A9	S2	S4	S6	S9
Legend	Taxonomy	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	D_0 Eukaryota;D_1 Amoebozoa;D_2 Discosea;D_3 Flabellinia;D_4 Dactylopodida	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Amoebozoa;D_2 Discosea;D_3 Flabellinia;D_4 Vannellida	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Amoebozoa;D_2 Discosea;D_3 Longamoebia;D_4 Centramoebida	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Amoebozoa;D_2 Schizoplasmodiida;D_3 uncultured eukaryote;D_4 uncultured eukaryote	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Amoebozoa;D_2 Schizoplasmodiida;Other;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Archaeplastida;D_2 Chloroplastida;D_3 Charophyta;D_10 Malpighiales	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3.0%	3.9%	2.9%
	D_0 Eukaryota;D_1 Archaeplastida;D_2 Chloroplastida;D_3 Charophyta;D_10 Malvales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Archaeplastida;D_2 Chloroplastida;D_3 Charophyta;D_11 Poales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Archaeplastida;D_2 Chloroplastida;D_3 Charophyta;D_8 Bryales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
	D_0 Eukaryota;D_1 Archaeplastida;D_2 Chloroplastida;D_3 Charophyta;Other	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.8%	1.0%	1.9%	1.5%
	D_0 Eukaryota;D_1 Archaeplastida;D_2 Chloroplastida;D_3 Chlorophyta;D_4 Chlorophyceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Archaeplastida;D_2 Chloroplastida;D_3 Chlorophyta;D_4 Prasinophytae	0.2%	0.2%	0.3%	0.2%	0.1%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Archaeplastida;D_2 Chloroplastida;D_3 Chlorophyta;D_4 Trebouxiophyceae	5.8%	5.7%	9.7%	20.9%	0.7%	13.9%	0.0%	0.0%	0.1%	0.6%
	D_0 Eukaryota;D_1 Archaeplastida;D_2 Chloroplastida;D_3 Chlorophyta;D_5 Chlamydomonadales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Archaeplastida;D_2 Chloroplastida;D_3 Chlorophyta;D_5 Chlorellales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
	D_0 Eukaryota;D_1 Archaeplastida;D_2 Chloroplastida;D_3 Chlorophyta;D_5 Chlorodendrales	0.3%	1.9%	0.0%	0.1%	0.5%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Archaeplastida;D_2 Chloroplastida;D_3 Chlorophyta;D_5 Mamiellales	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.9%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Archaeplastida;D_2 Chloroplastida;D_3 Chlorophyta;D_5 Nephroselmidales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Archaeplastida;D_2 Chloroplastida;D_3 Chlorophyta;D_5 Sphaeropleales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Archaeplastida;D_2 Chloroplastida;D_3 Chlorophyta;Other	4.5%	3.5%	5.4%	21.3%	1.6%	8.7%	0.0%	0.0%	0.1%	0.2%
	D_0 Eukaryota;D_1 Archaeplastida;D_2 Rhodophyceae;D_3 Porphyridiophyceae;D_4 Porphyridium	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Cryptophyceae;D_2 Cryptomonadales;D_3 Guillardia;Other	0.1%	0.3%	0.3%	0.0%	0.0%	0.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Cryptophyceae;D_2 Cryptomonadales;D_3 Hanusia;D_4 Hanusia phi	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Cryptophyceae;D_2 Cryptomonadales;Other;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Cryptophyceae;D_2 P1-31;D_3 uncultured marine eukaryote;D_4 uncultured marine eukaryote	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Excavata;D_2 Discoba;D_3 Discicristata;D_5 Tetramitia	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Excavata;D_2 Discoba;D_3 Discicristata;D_6 Incertae Sedis	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Excavata;D_2 Discoba;D_3 Discicristata;D_7 Eubodonida	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Excavata;D_2 Discoba;D_3 Discicristata;D_7 Neobodonida	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.7%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Excavata;D_2 Discoba;D_3 Discicristata;D_8 Euglenaceae	0.1%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Excavata;D_2 Discoba;D_3 Jakobida;D_4 Andalucia	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Haptophyta;D_2 Pavlovophyceae;D_3 Exanthemachrysis;Other	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Haptophyta;D_2 Pavlovophyceae;D_3 Rebecca;Other	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Haptophyta;D_2 Prymnesiophyceae;D_3 Coccolithales;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Haptophyta;D_2 Prymnesiophyceae;D_3 Prymnesiales;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0 Eukaryota;D_1 Incertae Sedis;D_2 Ancyromonadida;D_3 Ancyromonas;D_4 Ancyromonas sp. 3b	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.7%	0.5%	1.3%

D_0_Eukaryota;D_1_Incertae Sedis;D_2_Ancyromonadida;D_3_Ancyromonas;D_4_Planomonas elongata	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
D_0_Eukaryota;D_1_Incertae Sedis;D_2_Apusomonadidae;D_3_Amastigomonas;D_4_Amastigomonas sp. Millport	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Incertae Sedis;D_2_Palpitomonas;D_3_marine microheliozoan TCS-2002;D_4_marine microheliozoan TCS-2002	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Freshwater Opisthokonta;D_3_uncultured eukaryote;D_4_uncultured eukaryote	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Choanomonada;D_5_Acanthoecidae	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Choanomonada;D_5_Codonosigidae	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Choanomonada;D_5_Salpingoecidae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Choanomonada;D_5_Stephanoecidae	0.1%	0.0%	0.2%	0.1%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Choanomonada;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Ichthyosporia;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_10_Tetrapoda	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_11_Neopterygii	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_6_Gastrotricha	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_7_Anoplia	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_7_Bdelloidea	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_7_Chromadoreia	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_7_Coloniales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_7_Gastropoda	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_7_Gymnolaemata	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_7_Hexacorallia	1.0%	0.0%	0.0%	8.6%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_7_Myxosporea	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_8_Arachnida	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_8_Ascidiacea	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_8_Enoplia	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_8_Heteroconchia	0.4%	0.0%	0.0%	3.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_8_Palpata	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_8_Pteriomorphia	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_8_Scolecida	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	1.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_9_Copepoda	1.2%	0.5%	0.0%	0.4%	9.4%	0.9%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nucleomycea;D_3_Discicristoidea;D_4_Incertae Sedis	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nucleomycea;D_3_Discicristoidea;D_5_Nucleariidae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nucleomycea;D_3_Fungi;D_4_Cryptomycota	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nucleomycea;D_3_Fungi;D_7_Eurotiomycetes	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nucleomycea;D_3_Fungi;D_7_Microbotryomycetes	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.7%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nucleomycea;D_3_Fungi;D_7_Saccharomycetes	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nucleomycea;D_3_Fungi;D_7_Tremellomycetes	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nucleomycea;D_3_Fungi;D_8_Blastocladiaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nucleomycea;D_3_Fungi;D_9_Ajellomycetaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nucleomycea;D_3_Fungi;D_9_Cystofilobasidiaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%



D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Rhizaria;D_3_Cercozoa;D_5_Paradiniidae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Rhizaria;D_3_Cercozoa;D_7_Paulinellidae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Rhizaria;D_3_Retaria;D_6_Rotallida	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Bicosoecida;D_4_Cafeteria	0.1%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Bicosoecida;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Labyrinthulomycetes;D_4_Thraustochytriaceae	0.1%	0.1%	0.0%	0.2%	0.1%	0.0%	0.0%	0.8%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Labyrinthulomycetes;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_MAST-11;D_4_uncultured eukaryote	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_MAST-12;D_4_MAST-12A	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_MAST-12;D_4_MAST-12D	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_MAST-3;D_4_MAST-3J	1.3%	0.0%	5.8%	0.2%	0.3%	0.1%	0.0%	1.5%	2.2%	1.8%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta;D_4_Chrysomerothyceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta;D_4_Chrysophyceae	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.1%	1.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta;D_5_Chattoneolales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta;D_5_Chromulinales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta;D_5_Eustigmatales	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta;D_5_Incertae Sedis	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta;D_5_Ochromonadales	0.2%	0.0%	0.0%	0.2%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	1.2%	0.5%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta;D_5_Rhizochromulinales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta;D_5_Synurales	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta;D_6_Bacillariophyceae	0.1%	0.2%	0.0%	0.1%	0.4%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta;D_6_Fragilariiales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta;D_6_Mediophyceae	4.0%	3.5%	2.8%	7.3%	15.1%	7.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta;Other	0.2%	0.4%	0.1%	0.8%	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Peronosporomycetes;D_4_Halocrusticida	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Peronosporomycetes;D_4_Phytophthora	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Placididea;D_4_Stramenopile sp. ME8	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Placididea;D_4_uncultured stramenopile	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;Other;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;D_1_SAR;Other;Other;Other	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D_0_Eukaryota;Other;Other;Other;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Unassigned;Other;Other;Other;Other	73.2%	81.1%	73.9%	34.1%	65.5%	65.8%	80.1%	89.4%	81.3%	87.5%	0.0%	0.0%	0.0%

Anexo 6. Gráfica 3. Composición microbiana según género



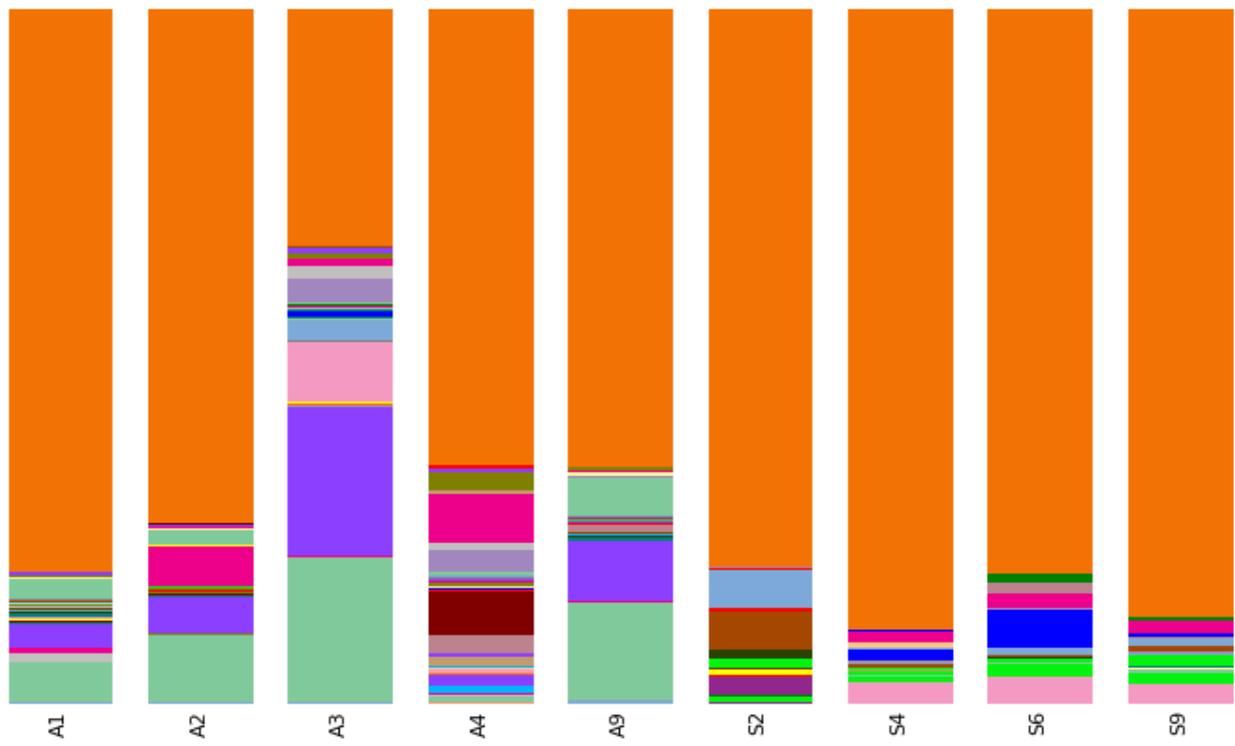
Anexo 7. Tabla 3. Composición microbiana según género











Anexo 9. Tabla 4. Composición microbiana según especies.







