



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA ACADÉMICO DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA

¿Qué hay ahí? Similitudes y diferencias de la microbiota del alga roja

Chondracanthus chamissoi de Ancón y Paracas

TESIS

Para optar el título profesional de Licenciado en Nutrición y Dietética

AUTORES

Pereira Gil, Eiji Leandro (0000-0002-9078-2709)

Vigo Saavedra, Flor de Rosa María (0000-0001-8989-3834)

ASESORES

Milón Mayer, Pohl Luis (0000-0001-6679-5473)

Amado Bustamante, Luciana (0000-0001-7281-6605)

Peñaranda Manrique, Katherin Lizet (0000-0002-5109-4735)

Lima, 19 de Mayo del 2020

DEDICATORIA

A nuestros padres, por su trabajo, sacrificio y apoyo incondicional a lo largo de estos años, gracias a ustedes hemos logrado convertirnos en lo que somos.

A todas las personas que nos han apoyado y por su valioso aporte para que nuestra investigación se realice con éxito. Gracias por compartir sus conocimientos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por ser nuestro guía, brindándonos paciencia y sabiduría para culminar con éxito una de nuestras metas propuestas.

A nuestros padres, por habernos dado la oportunidad de formarnos en esta prestigiosa universidad y haber sido nuestro apoyo incondicional durante todo este tiempo.

De manera especial a nuestros asesores de tesis Luciana Amado, Pohl Milón, Katherin Peñaranda y Sofia Arriarán por habernos guiado y brindado su apoyo incondicional durante el proceso de este trabajo.

Y por supuesto a nuestra querida Universidad y a todas las autoridades, por permitirnos concluir con una etapa nuestras vidas, gracias por habernos brindado tantas oportunidades y haber enriquecido nuestro conocimiento, por guiarnos en el desarrollo de esta investigación.

El presente proyecto fue financiado por el Fondecyt mediante convenio 154-2017-Fondecyt bajo el programa de Investigación de Ciencias Básicas y Aplicadas. La instrumentación utilizada en el presente proyecto fue adquirida gracias al financiamiento de InnóvatePerú y UPC mediante los Convenios 382-PNICP-PIBA-2014 y 297-INNOVATEPERU-EC-2016.

RESUMEN

La gran actividad metabólica que caracteriza la microbiota permite mantener una relación de simbiosis con el ser humano, impactando de forma positiva en el desarrollo vital de ambos. Algunos alimentos aportan a la microbiota, entre estos se encuentran los fermentados, verduras, frutas y algas. La biota de diferentes algas ha sido tipificada, sin embargo no se habían realizado estudios del alga roja más consumida en Perú, *Chondracanthus chamissoi* (Yuyo). En este estudio se tipificó la microbiota de *C. chamissoi* Ancón y Paracas, las cuales fueron extraídas del mar, compradas del mercado del lugar, además se muestreó agua de mar de Ancón (Lima) y Paracas (Ica) mediante secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) del gen 16S rRNA. Como resultado se obtuvo un total de 153 323 secuencias, las cuales fueron asignadas taxonómicamente en 19 filos, 41 clases, 90 órdenes, 193 familias, 484 géneros y 716 especies mediante la plataforma Base Space de Illumina. El filo más encontrado fue Proteobacterias seguido por Bacteroidetes y Cyanobacterias. Se encontraron 24 especies en común entre las muestras de alga. Además, se encontró un número elevado de especies presentes solo en muestras extraídas de los mercados correspondientes, indicando posible contaminación cruzada. Entre el 55,27%-58,87% de especies bacterianas encontradas resultaron no estar clasificadas. El análisis semi-cuantitativo permitió a su vez asignar la representación relativa de cada bacteria en las algas de Ancón y Paracas. Muchas especies que se encontraron en una abundancia significativa han sido previamente estudiadas, muchas de ellas implicadas en la industria alimentaria y/o salud de humanos y animales. Este es el caso de *Psychrobacter namhaensis*; empleada como probiótico para la tilapia del Nilo de manera exitosa. *Lewinella marina* es capaz de utilizar la celulosa como fuente de energía y así degradarla pudiendo ser útil en la industria cervecera. *Pseudoalteromonas rubra* posee poder probiótico al mejorar el cultivo de las larvas del pez dorado *Seriola lalandi* y además *Loktanella* sp. posee ácidos grasos omega 6, 7, 10. En conjunto, el presente estudio describe de manera exhaustiva la riqueza microbiana asociada al yuyo, importante componente de la gastronomía peruana.

Palabras claves: Alga, yuyo, *Chondracanthus chamissoi*, microbiota, Rhodophyta, NGS.

What is there? Similarities and differences in the microbiota of the red algae
Chondracanthus chamissoi from Ancon and Paracas.

ABSTRACT

The great metabolic activity that characterizes the microbiota allows it to maintain a symbiosis relationship with the human being, positively impacting the development of both. Some foods contribute to the microbiota, among these are fermented, vegetables, fruits and algae. The biota of different algae have been typified, however, there are no studies of the most consumed red seaweed in Peru, *Chondracanthus chamissoi*, known as “yuyo”. In this study, the microbiota of *C. chamissoi* from Ancon and Paracas were typified and compared. Samples of the algae were collected from the sea, from the local market as well as a sample of the sea water for analysis by next-generation sequencing (NGS) of the 16S rRNA gene. As a result, we obtained a total of 153,323 sequences which were taxonomically assigned on 19 phyla, 41 classes, 90 orders, 193 families, 484 genera and 716 species using the Illumina Base Space platform. The most commonly found phylum was Proteobacteria followed by Bacteroidetes and Cyanobacteria. Twenty four species were found in common among the algae samples. In addition, a large number of species were found only in samples taken from the corresponding markets, indicating possible cross contamination. Between 55.27% -58.87% of the bacterial species found were not classified previously. A semi-quantitative analysis allowed to assign the relative representation of each bacterium in the algae from both locations, Ancon and Paracas. Many species that were found abundant have been previously studied, many of them involved in the food and / or health industry humans and animals. This is the case of *Psychrobacter namhaensis*; successfully used as a probiotic for Nile tilapia. *Lewinella marina* can use cellulose as a source of energy and, therefore, degrade it and can be useful in the beer industry. *Pseudoalteromonas rubra* has probiotic power by improving the culture of the larvae of the goldfish *Seriola lalandi* and also *Loktanella sp.* It contains omega 6, 7, 10 fatty acids. In summary, this study comprehensively describes for the first time the microbial richness associated with the yuyo, an important component of Peruvian cuisine.

Key words: Seaweed, yuyo, *Chondracanthus chamissoi*, microbiota, Rhodophyta, NGS.

TABLA DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN	1
2	MATERIALES Y MÉTODOS	4
2.1	<i>CHONDACANTHUS CHAMISSOI</i> : TAXONOMÍA Y GENERALIDADES	4
2.2	RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA	4
2.3	PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA	6
2.4	EXTRACCIÓN DE ADN DE LA FLORA SUPERFICIAL DEL <i>CHONDRACANTHUS</i> <i>CHAMISSOI</i>	7
2.5	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR, DE SUS SIGLAS EN INGLÉS)	7
2.6	ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	9
2.7	PURIFICACIÓN DEL ADN	9
2.8	SECUENCIACIÓN	10
2.9	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	11
3	RESULTADOS	12
3.1	DIVERSIDAD PROCARIOTA	12
3.2	ANCÓN	13
3.3	PARACAS	19
3.4	COMPARACIÓN ENTRE GÉNEROS DE LAS MUESTRAS DE ANCÓN Y PARACAS	24
4	DISCUSIÓN	27
5	CONCLUSIONES	36
6	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	38
7.	[ANEXOS]	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Abundancia relativa de las especies clasificadas y sin clasificar de Ancón con el género y filo respectivo	14
Tabla 2 Abundancia relativa de las especies calificadas en las muestras de Ancón.....	17
Tabla 3 Abundancia relativa de especies calificadas y sin calificar en Paracas con el género y filo respectivo	19
Tabla 4 Abundancia relativa de las especies calificadas en las muestras de Ancón.....	22
Tabla 5 Filos más representativos encontrados en diferentes especies de algas y metodologías.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Lugares de muestro del <i>C. chamissoi</i>	5
Figura 2 <i>Chondracanthus chamissoi</i> “yuyo”.....	6
Figura 3 Regiones para el secuenciamiento NGS.....	11
Figura 4 Proceso de recolección y análisis de la muestra.....	12
Figura 5 Abundancia Relativa en los 8 filos más representativos de la microbiota externa de <i>C. chamissoi</i> en las muestras de Ancón y Paracas.....	13
Figura 6 Géneros compartidos entre las muestras obtenidas de Ancón.....	15
Figura 7 Especies compartidas entre las muestras obtenidas de Ancón.....	16
Figura 8 Géneros compartidos entre las muestras obtenidas de Paracas.....	20
Figura 9 Especies compartidas entre las muestras obtenidas de Paracas.....	21
Figura 10 Muestras de alga obtenida del mar de Ancón y de Paracas (P alga y A alga)...	23
Figura 11 Muestras de alga obtenida del mercado de Ancón y de Paracas.....	24
Figura 12 Muestras de alga obtenida del mar de Ancón y de Paracas (P mar y A mar).....	25
Figura 13 Extracción de <i>C. chamissoi</i> en la bahía de Paracas.....	42
Figura 14 Identificación de especie <i>C. chamissoi</i>	42

1 INTRODUCCIÓN

La microbiota es un conjunto de microorganismos que se encuentran asociados generalmente a tejidos (1). La gran actividad metabólica que la caracteriza permite mantener una asociación íntima entre organismos para beneficiarse mutuamente en su desarrollo vital. Los humanos albergan microorganismos en diversos órganos y tejidos, entre los que resaltan, por su alta concentración, la piel, las mucosas y el tracto gastrointestinal (2). La biota intestinal cuenta con alrededor de 10 billones de bacterias (3) capaces de codificar un promedio de 20 000 funciones biológicas, como, por ejemplo, la expresión génica, y el metabolismo de carbohidratos y proteínas (4). Desde el punto de vista bioquímico, la microbiota intestinal actúa como un potenciador de la biodisponibilidad de los nutrientes consumidos en la dieta ya que metaboliza aquellos que el intestino es incapaz de procesar y, además, degrada diversos componentes alimenticios que actúan como anti nutrientes (3).

Las bacterias intestinales se clasifican según su enterotipo en: Bacteroides, Prevotella o Ruminococcus (4); donde la predominancia de cierto grupo dependerá de diversos factores intrínsecos y extrínsecos de la persona, como la microbiota materna durante la gestación, el uso de fármacos, la dieta y el estrés de la vida diaria (2). Según el consorcio del proyecto del microbioma humano (5), los microorganismos predominantes en la flora intestinal pertenecen a los géneros de Bacteroides, Faecalibacterium y Bifidobacterium. Además, cabe mencionar, que aproximadamente se ha encontrado 2 172 especies en los seres humanos (6).

La disbiosis intestinal es el desbalance cuali-cuantitativo de los microorganismos que colonizan el intestino, caracterizándose por un incremento de bacterias patógenas, una disminución de aquellas benéficas y una disminución de la diversidad de microorganismos (7). El impacto negativo que esta condición genera en el desarrollo de diversas enfermedades, como la obesidad, las enfermedades metabólicas y las enfermedades inflamatorias intestinales, ha sido demostrado en estudios recientes (8). Sanz Y. *et al* refieren que la disbiosis intestinal está relacionada con la obesidad y enfermedades asociadas ya que estimula el incremento del peso corporal, la resistencia a la insulina y los estados pro inflamatorios asociados al desarrollo de Diabetes Mellitus. Así, investigaciones en ratones obesos demostraron que la microbiota intestinal de estos animales era rica en Firmicutes (9), con menores cantidades de Bacteroidetes; además,

estudios recientes han comprobado la existencia de Halomonas y Sphingomonas en ratas obesas (10).

Existen alimentos que cuentan con una microbiota propia, como los fermentados, algunas verduras, frutas, algas (11), entre otros. Las algas son organismos autótrofos con capacidad de producir energía a partir del proceso de fotosíntesis oxigénica (12). Según Guiry (13), en el 2012 había 43 918 especies de algas descritas y 28 618 aún por describir. Desde el punto de vista alimenticio, todas las algas son aptas para el consumo humano, pero, por su sabor y olor característico, sólo algunas se consumen de forma frecuente. En el Perú, el alga más conocida es *Chondracanthus chamissoi* “yuyo”, utilizándose como ingrediente para sopas y guisos en el interior del país, y como acompañamiento de preparaciones marinas a lo largo de la costa. *C. chamissoi* es un alga roja (Rhodophyta) que se encuentra en la zona intermareal y submareal, se distribuye desde Paita, Perú hasta Ancud, Chile (14), y se caracteriza por su elevado contenido de ácidos grasos insaturados y carrageninas. Éste último compuesto forma geles en presencia de calcio por lo que se utiliza en la industria alimentaria para brindar consistencia a geles y helados (15).

Se han realizado diversos estudios con el fin de tipificar la microbiota de algunas especies de Rhodophyta, entre ellas, *Porphyra umbilicalis* (16). Los resultados de las investigaciones han confirmado que esta especie presenta microorganismos del filo Bacteriodetes, como las Flavobacterias y Saprospiraceae, y del filo Proteobacteria, como la Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria. Así mismo, evaluaciones realizadas en la especie *Delisea pulchra*, alga roja extraída en la costa de Australia, han confirmado que, al igual que la especie *P. umbilicalis*, es rica en Bacteriodetes y Proteobacterias (17), además de contar con el filo Planctomycete. Los resultados de los estudios antes mencionados deben ser analizados con precaución ya que la composición de la microbiota de las algas cambia según la especie, la estación del año y el lugar (18).

En la literatura se ha encontrado estudios en la biología, identificación tradicional y molecular, usos de *C. chamissoi*, sin embargo, no se ha encontrado estudios que hayan tipificado a *Chondracanthus chamissoi*, por lo que esta investigación propuso caracterizar su microbiota externa. En ese contexto, el presente estudio tuvo como objetivo principal tipificar la composición de la microbiota externa de *Chondracanthus chamissoi* en su hábitat natural, comprada en el mercado y del agua de mar de la zona, de Ancón y Paracas respectivamente. Se escogieron las muestras de Ancón y Paracas debido a que Paracas al

ser una reserva natural recibe mayor control de agentes contaminantes y un constante monitoreo lo que lo hace un ambiente marítimo menos contaminado. Por otro lado, la bahía de Ancón al tener cerca la desembocadura del desagüe podría estar más contaminado. Como objetivo intermedio, se buscó determinar las diferencias en la representación relativa de los microorganismos de la microbiota de cada muestra estudiada.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 *Chondacanthus chamissoi*: Taxonomía y generalidades.

C. chamissoi, conocida como “yuyo” en Perú, “chicorea de mar” en Chile y “Suginori” en Japón, está clasificada taxonómicamente:

Reino	Plantae
Filo	Rhodophyta
Clase	Florideophyceae
Orden	Gigartinales
Familia	Gigartinaceae
Género	Chondracanthus
Especie	<i>Chondracanthus chamissoi</i>

2.2 Recolección de la muestra

Las muestras de *C. chamissoi* fueron recolectadas de las “playa San Francisco” en Ancón y “playa Atenas” de Paracas en el departamento de Ica respectivamente. La muestra de *C. chamissoi* de mercado, fue obtenida del mercado modelo de Ancón, Lima y del terminal pesquero “San Andrés” ubicado en Pisco, Ica (Figura 1).



Figura 1. Lugares de muestreo del *Chondracanthus chamissoi*.

El alga *C. chamissoi* fue identificada por el Proyecto 129-2015-FONDECYT “Diversidad de macroalgas de la costa central del Perú usando código de barras de ADN, en la perspectiva de sus usos potenciales y aplicaciones biotecnológicas”



Figura 2. *Chondracanthus chamissoi* "yuyo"

Con el uso de guantes estériles, se recolectó aproximadamente 10 g del alga en tubos cónicos de 50 mL previamente esterilizados. Al mismo tiempo, se decidió recolectar muestras de agua de la playa, la muestra fue recolectada de la misma manera en tubos estériles. La muestra fue transportada al Centro de Investigación e Innovación de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC) en una caja refrigerada con hielo en su interior. Una vez en el laboratorio las muestras se preservaron a -80C correctamente etiquetadas. En total se obtuvieron 3 muestras por localidad, dando un total de 6 muestras a procesar.

2.3 Procesamiento de la muestra

En el laboratorio se extrajeron muestras de alga de los tubos con ayuda de pinzas previamente esterilizadas. Se procedió a enjuagar las muestras 3 veces con solución salina al 0.9%. Se picó el alga con una cuchilla estéril y se colocó 2 g y 6 g del alga en tubos cónicos estériles de 15 ml. Luego, se añadió 10 ml de solución salina a cada muestra. Después, los tubos se colocaron en un oscilador a 80 revoluciones por minuto (RPM) por

2 horas para luego ser homogenizados por 2 minutos en un vortex.. Se retiró el alga de cada tubo con una pinza y se centrifugó la solución de incubación a 300 g x 15 minutos para lograr separar trazos de algas de la solución. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Extracción de ADN de la flora superficial del *Chondracanthus chamissoi*

2.4 Extracción de ADN de la flora superficial del *Chondracanthus chamissoi*.

Para la extracción del ADN de la flora superficial del *C. Chamissoi* se usó el Quick DNA Universal Kit (Zymo Research). Para esto, el sobrenadante del paso anterior fue centrifugado a 6000 g x 15' a temperatura ambiente, se retiró y almacenó el sobrenadante mientras que el pellet de las muestras, conteniente de las bacterias, se resuspendió en 200 µl ADN Elution Buffer. Esto se mezcló con 200 µl de Big Fluid y 20 µl de proteinasa K. Se incubó a 55°C por 10 minutos. Se agregó 420 µl de Genomic Bind Mix y se homogenizó. Se transfirió a una columna de purificación con un tubo colector y se centrifugó a 12 000 g por 1 minuto. A partir de este punto todas las centrifugaciones fueron a 12 000 g por 1 minuto a temperatura de ambiente. Se vaciaron los tubos colectores, se agregó 400 µl de ADN pre-wash a la columna y se centrifugó, se desechó el tubo colector. Se agregó 700 uL de gDNA wash buffer a la columna y se centrifugó, eliminándose el flow through. Se volvió a añadir 200 µl de gDNA wash buffer a las columnas y se centrifugó. Se desecharon los tubos colectores y se cambiaron por tubos Eppendorf limpios. Finalmente se agregó 50 uL de ADN elution buffer, se dejó reposar por 5 minutos a temperatura de ambiente y se centrifugó. La muestra quedó lista para ser cuantificada y amplificada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés)

2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés)

2.5.1 Diseño y preparación de primers

Se amplificó la región del gen 16S ribosomal. Esta amplificación requiere de primers específicos, conocidos como 16S Amplicon Primers, para las regiones variables V3 y V4 del gen codificante para el ARN ribosomal antes mencionado. El fragmento amplificado fue el de 550 Pb.

La secuencia de los primers empleados, según la nomenclatura IUPAC de los nucleótidos que los componen, es:

16S Amplicon PCR Primer forward =

5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG3'

16S Amplicon PCR Primer reverse =

5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC3'

El stock de primers se encontraba a 100 uM y se diluyó en agua libre de nucleasas para tener una concentración de trabajo de 10 uM.

2.5.2 Amplificación del gen que codifica el 16s rARN

Para amplificar el gen codificante para 16s ARN ribosomal, y analizarlo posteriormente bajo la técnica de Secuenciación de Segunda Generación (NGS, por sus siglas en inglés) se utilizó la técnica de PCR. En este proceso, se utilizaron los primers 16S y las muestras de ADN genómico previamente extraídas como ADN molde. El protocolo de amplificación se desarrolló en base el manual de Maxima™ Hot Start Green 2X PCR Master Mix (Thermo Scientific™)

Para las reacciones de PCR se modificaron los componentes según las diferentes reacciones que se realizaron llegando a distintos volúmenes (de 20 uL a 50 uL). Para el Master Mix de 50 µl de volumen total se utilizaron los siguientes reactivos: 25 uL de 2X Green PCR Master Mix , 2 µM de Primer forward (10 uM), 2 µM de Primer reverse (10 uM), 10 µg - 1 µg de la muestra y la cantidad necesaria de agua libre de nucleasas para llegar a los 50 o 20 µl deseados.

Con el objetivo de verificar que el primer amplifique el gen 16S. Se amplificó cepas de *Escherichia Coli* con los mismos primers internos al 16S, que amplifican una región de 550 Pb. Se realizo una PCR con un gradiente de temperaturas desde 50°C hasta 57°C en el proceso de anillamiento de la PCR. Se concluyó que a 55°C los primers funcionaban mejor.

La PCR tuvo ciertas condiciones físicas que permitieron una adecuada extensión de la cadena polimerasa. En el primer paso de Desnaturalización inicial y activación de enzima polimerasa la temperatura usada fue de 95°C por 4 minutos con una duración de un ciclo; luego 3 pasos se replicaron por 20 ciclos de la PCR, Desnaturalización a 95° C con una duración de 30 segundos; en el caso del Anillamiento la temperatura fue de 55° por 30 segundos; en la Extensión 72°C por 1 minuto. Por último, para la extensión final se utilizó

72° por 5 minutos ocupando el último ciclo de la PCR. El tiempo de duración total de la reacción de PCR fue de 1 hora y 23 minutos y se programaron 22 ciclos en total.

El volumen de ADN determinado para las muestras de Ancón y Paracas las cuales fueron DNA extraído del Alga de mar de Ancón, DNA extraído del Alga del mercado de Ancón, DNA extraído del mar de Ancón, DNA extraído del Alga del mar de Paracas, DNA extraído del Alga del terminal pesquero de Pisco, DNA extraído del mar de Paracas fue de 2 uL.

2.6 Electroforesis en gel de agarosa

Para analizar cualitativamente los ADN amplificados por PCR, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa. Este método es efectivo para separar fragmentos de ADN de diferentes tamaños. Se preparó un gel de agarosa al 1% en TBE 1X. Se prepararon las muestras de PCR para cargar los pocillos del gel mezclando 2 uL de colorante (Run safe) 6x de la marca Thermo Scientific con 10 uL de reacción de PCR. Este se preparó con 2uL de Gene Ruler 1Kb de la marca Thermo Scientific + 6 uL de agua libre de nucleasas + 2uL de dye. La separación de los fragmentos se obtuvo usando 70V en TBE 1X por 50-60 min aproximadamente.

2.7 Purificación del ADN

Para la purificación de las muestras finales se usó el kit de DNA Clean and Concentrator 25™ de Zymo Research. Este método permite la rápida purificación y concentración de hasta 25 µg de ADN de alta calidad de la PCR. Siguiendo el protocolo, se añadió a cada muestra DNA Binding Buffer; el volumen añadido fue 5 veces la cantidad de PCR que se tenía. Se colocó la mezcla en la columna de Zymo Spin en un tubo de colección. Se centrifugó a una velocidad de 10 000 g por 30 segundos. Se descartó el flow through. Luego, se añadió 200 µL de DNA Wash buffer a la columna y se centrifugó nuevamente por 30 segundos. Se repitió este último paso. Finalmente, se colocó la columna a un tubo de microcentrífuga nuevo y se añadió 30 µL de agua libre de nucleasas directamente a la matriz de la columna. Se incubó por unos minutos y se centrifugó por 30 segundos. Se descartó la columna y se conservó el el tubo colector con el DNA purificado. El producto amplificado y purificado se cuantificó por medio del espectrofotómetro de

microvolúmenes NanoDrop™ One (Thermo Scientific) y las concentraciones fueron reportadas en ng/ul.

2.7.1 AMPure XP

El método utilizado para purificar el producto de PCR antes del secuenciamiento fue el Ampure XP de Beckman Coulter. Este utiliza un tampón que selecciona fragmentos mayores a 100 pb de ADN y los une a perlas magnéticas ‘‘Beads’’. Con el uso de un pedestal magnético se logró la separación del producto de PCR unido a beads mientras que los nucleótidos, cebadores, enzimas y sales fueron desechados mediante el proceso de lavado. El producto amplificado y purificado se cuantificó por medio del espectrofotómetro de microvolúmenes NanoDrop™ One (Thermo Scientific) y las concentraciones fueron reportadas en ng/ul.

2.8 Secuenciación

El Secuenciamiento de Segunda Generación o NGS es un método de secuenciación masivo (Figura 3), preciso y de bajo costo en relación a la cantidad informativa que brinda. El protocolo que se utilizó es el descrito en el Kit 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation por la empresa Illumina Inc, el cual se fundamenta en la incorporación de desoxirribonucleotidos trifosfatos (dNTP), marcados con fluorocromos, en las hebras del ADN genómico extraído gracias a la acción de la enzima ADN polimerasa. Durante el periodo de incorporación, los nucleótidos añadidos son identificados gracias a la excitación fluorófora de los mismos. Con el fin de preparar los productos de PCR de la región variable 16S anteriormente obtenidos para ser secuenciados en la plataforma MiSeq 2000 (Illumina Inc.) se añadieron índices en los extremos de cada cadena de ADN. Las seis muestras a secuenciar fueron identificadas con seis combinaciones de indexes usando los primers NexteraXTIndex1Primers(N7XX) y NexteraXTIndex2Primers(S5XX) del kit NexteraXTIndex de Illumina. Se usó el kit de reactivo v2 de Miseq. El protocolo de amplificación en termociclador se realizó siguiendo el manual de Illumina y el producto fue purificado por Ampure beads. Por último las muestras cuantificadas fueron normalizadas y mezcladas en proporciones equivalentes para ser añadidas al chip de cuantificación en la plataforma Miseq.

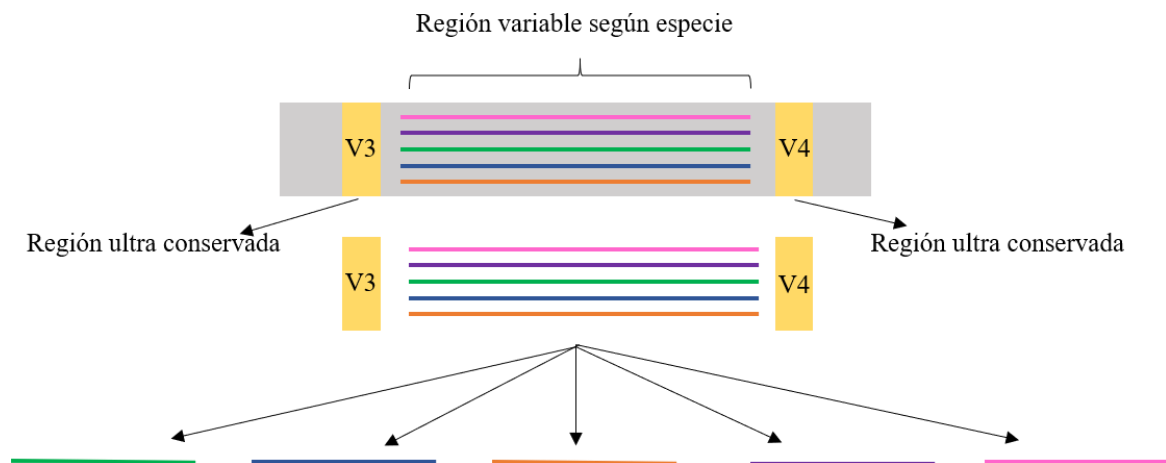


Figura 3 Regiones para el secuenciamiento por NGS.

29 Análisis bioinformático

Para analizar los resultados de la secuenciación se utilizó el programa MiSeq Reporter Software (MSR) de Illumina Inc. EE. UU. Conforme las instrucciones, se utilizó la base de datos 16S ARN ribosomal. La clasificación está basada en la base de datos de Base Space, EE.UU. la cual clasifica la microbiota de *C. Chamissoi* en diferentes niveles taxonómicos desde el reino hasta la especie. La comparación entre muestras fue de forma cualitativa dicotómica de presencia o ausencia del género/especie identificado. Adicionalmente, el análisis proporcionado por Illumina Inc. incorpora la representación relativa de cada especie al interno de cada muestra, permitiendo una aproximación quasi-cuantitativa del estudio.

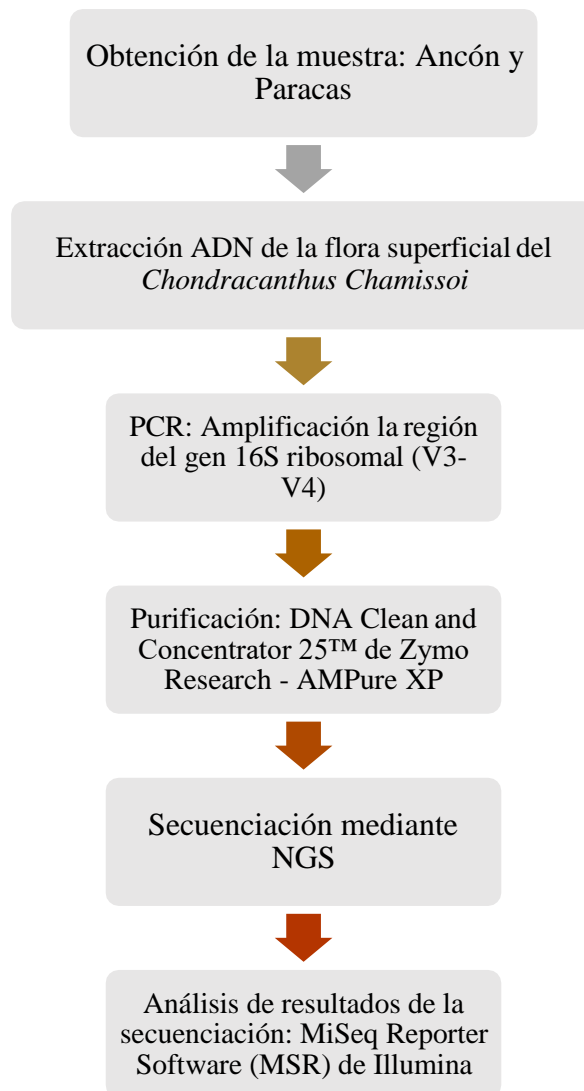


Figura 4 Proceso de recolección y análisis de las muestras.

3 RESULTADOS

3.1 Diversidad Procariota

La microbiota externa del alga roja *Chondracanthus chamissoi* ha sido tipificada por primera vez usando secuenciación de próxima generación. Se usaron 6 muestras en total, 3 de Ancón y 3 de Paracas. De cada lugar, se extrajo una muestra del alga de mar, del mercado de la localidad y por último una muestra del mar en el mismo lugar de donde se extrajo el alga. Se extrajo el ADN externo del alga y se amplificó usando la reacción en cadena de la polimerasa. Se secuenció usando una maquina Miseq de Ilumina y se procedió a realizar el análisis bioinformático usando la plataforma BaseSpace de Ilumina. La tecnología de NGS permite la secuenciación rápida de los pares de bases de las muestras

de ADN, aumenta la cobertura del genoma (número de veces que un nucleótido es representado en un grupo de secuencias crudas al azar).

Se pudo encontrar en las 6 muestras un total de 153 323 lecturas las cuales fueron asignadas taxonómicamente en 19 Filos, 41 Clases, 90 órdenes, 193 Familias, 484 Géneros y 716 Especies. Los 8 filos más abundantes, representan desde un 99,25% a un 99,93% siendo el mayor a menor: Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Thermi, Spirochaetes y Planctomycetes (Figura 5).

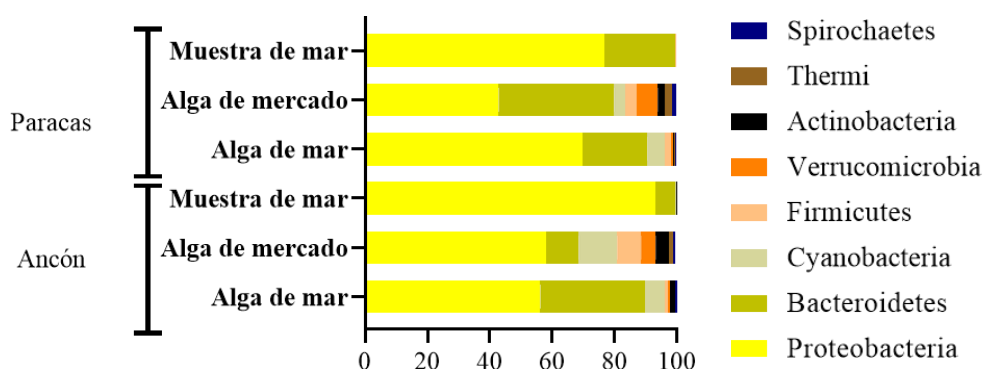


Figura 3 Abundancia Relativa en los 8 filos más representativos de la microbiota externa de *C. chamissoi* en las muestras de Ancón y Paracas

3.2 Ancón

En las muestras de Ancón, se encontraron 71 904 lecturas de ADN, siendo la de mayor población el alga extraída del mar (A_{alga}) con 27 021 lecturas de secuencias, seguida por el agua de mar (A_{mar}) con 25 995 lecturas y por último la muestra de mercado (A_{mercado}) con

18 788 lecturas. Se obtuvieron 17 filos, 37 clases, 76 ordenes, 165 Familias, 369 géneros y 481 especies.

La abundancia relativa de las muestras de Ancón se muestra en la tabla 1. La muestra A_{alga} tiene 60,2% de especies que no han sido clasificadas. A nivel de filo, la mayor presencia se encuentra por parte de las Proteobacterias con 55,43%, seguido por Bacteroidetes con 33,02%, Cyanobacteria con 6,3% y otros filos con 5,24%.

La muestra A_{mercado} tiene 38,83% de muestras sin clasificar. Las especies más abundantes se encuentran en el filo Proteobacteria con 56,96%, seguido por Bacteroidetes con 10,22%, luego Cyanobacteria con 12.16%, Firmicutes con 7,53%, Verrucomicrobia con 4,6%, Actinobacteria con 4,34% y otros filos con 4,19%

La muestra A_{mar} es la que tiene una mayor cantidad de especies sin clasificar presenta con 62,27%. El filo más abundante es Proteobacteria con 92,71%, luego Bacteroidetes con 6,62% y otros filos con 0,67%.

Tabla 1. Abundancia relativa de las especies clasificadas y sin clasificar de Ancón con su filo respectivo.

Muestra	Especie	Abundancia Relativa en %	Filo
Alga obtenida del mar de Ancón (A _{alga}) 27 021 Lecturas	<i>Thiothrix</i> sp.	19,94	Proteobacteria
	<i>Lewinella</i> sp.	9,16	Bacteroidetes
	<i>Lewinella marina</i>	7,90	Bacteroidetes
	<i>Thalassobius</i> sp.	5,59	Proteobacteria
	<i>Loktanella</i> sp.	3,86	Proteobacteria
	<i>Arthronema africanum</i>	3,74	Cyanobacteria
	<i>Leucothrix</i> sp.	3,57	Proteobacteria
	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	3,12	Bacteroidetes
	<i>Hyphomonas oceanitis</i>	2,31	Proteobacteria
	<i>Lewinella lutea</i>	2,29	Bacteroidetes
	<i>Crocospaera watsonii</i>	1,95	Cyanobacteria
	<i>Thalassospira tepidiphila</i>	1,87	Bacteroidetes
	Alga obtenida del mercado de Ancón (A _{mercado})	<i>Psychrobacter namhaensis</i>	22,94
<i>Arthronema africanum</i>		5,84	Cyanobacteria
<i>Crocospaera watsonii</i>		5,30	Cyanobacteria
<i>Delftia tsuruhatensis</i>		4,71	Proteobacteria
<i>Phenylobacterium</i> sp.		4,15	Proteobacteria

18 788 Lecturas	<i>Psychrobacter</i> sp.	4,07	Proteobacteria
	<i>Lewinella marina</i>	3,31	Bacteroidetes
	<i>Leucothrix</i> sp.	2,94	Proteobacteria
	<i>Rhodobacter</i> sp.	2,17	Proteobacteria
	<i>Lewinella</i> sp.	2,08	Bacteroidetes
	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	1,37	Proteobacteria
	<i>Acidimicrobium</i> sp.	1,22	Actinobacteria
	Muestra del Mar de Ancón (A _{mar}) 25 995 Lecturas	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	47,59
<i>Vibrio chagasii</i>		9,44	Proteobacteria
<i>Phaeobacter</i> sp.		7,77	Proteobacteria
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.		4,37	Proteobacteria
<i>Sandarakinotalea</i> sp.		2,88	Bacteroidetes
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.		2,79	Proteobacteria
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.		2,69	Proteobacteria
<i>Umboiibacter</i> sp.		2,54	Proteobacteria
<i>Alteromonas</i> sp.		1,75	Proteobacteria
<i>Aliivibrio</i> sp..		1,25	Proteobacteria

3.2.1 Géneros en las muestras de Ancón

Al analizar los géneros de las tres muestras de Ancón en el diagrama de Venn (Figura 6), se encontraron 89 géneros en común entre las tres muestras analizadas, las cuales representan a un 24% de los géneros encontrados en Ancón. Analizando similitudes; A_{alga} y A_{mercado} son el par de muestras que poseen mayor cantidad de géneros en común con 82,

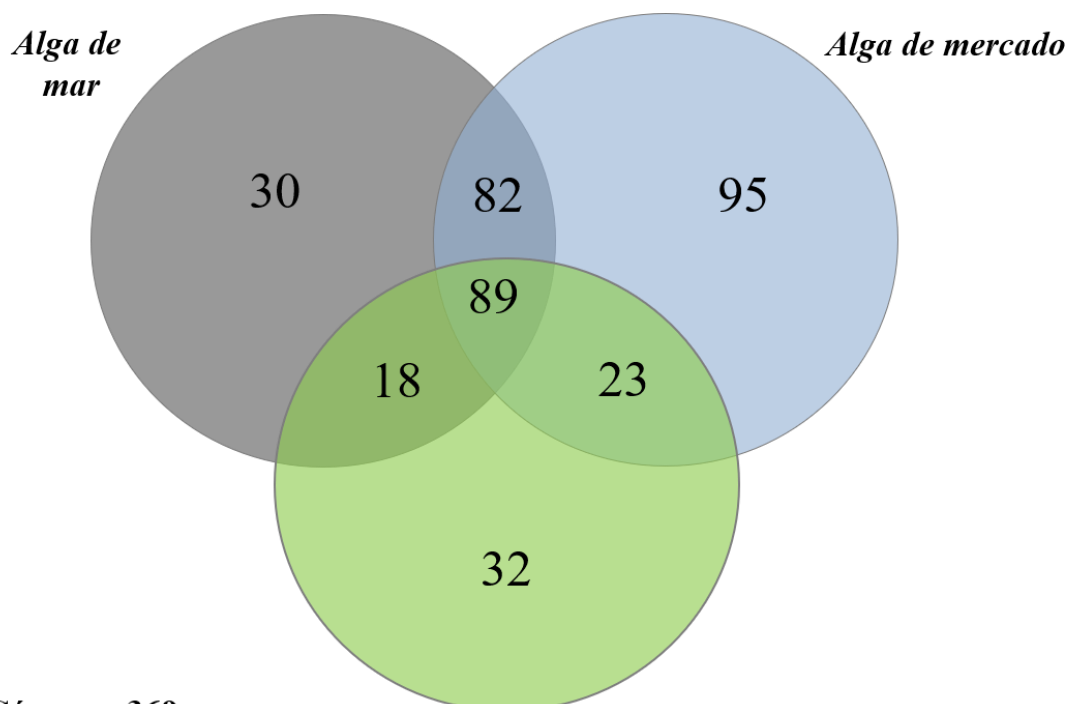


Figura 4 Géneros compartidos entre las muestras obtenidas de Ancón.

siendo el 22,2% de los géneros encontrados en Ancón. A_{mercado} y A_{mar} comparten 23 géneros y, por último, A_{mar} y A_{alga} 18 géneros. Por otro lado, A_{mercado} es la muestra que más géneros tiene independientemente de las otras muestras, con 95 géneros. Esto puede haber sido contaminada por el medio externo al ser transportada o por los otros alimentos que se encontraron alrededor al momento de almacenarlo en el mercado. De manera similar, A_{alga} y A_{mar} , poseen la menor cantidad de géneros individualmente con 30 y 32 respectivamente.

3.2.2 Especies clasificadas en las muestras de Ancón

Al analizar la siguiente categoría taxonómica en el diagrama de Ven (Figura 7), se pudo encontrar un total de 481 especies en las tres muestras de Ancón. En las tres muestras, se encontró que tenían 52 especies en común. En A_{alga} y A_{mercado} exclusivamente, se encontró que comparten 74 géneros, en A_{mercado} y A_{mar} 27, y en A_{alga} y A_{mar} 20 géneros. Por otro lado, A_{mercado} tuvo la mayor cantidad de especies encontrada de forma individual con 163 especies, seguida por A_{mar} con 77 y A_{alga} con 68. Cabe recalcar que hay muchas especies que no han sido calificadas y no han sido incluidas en el presente análisis.

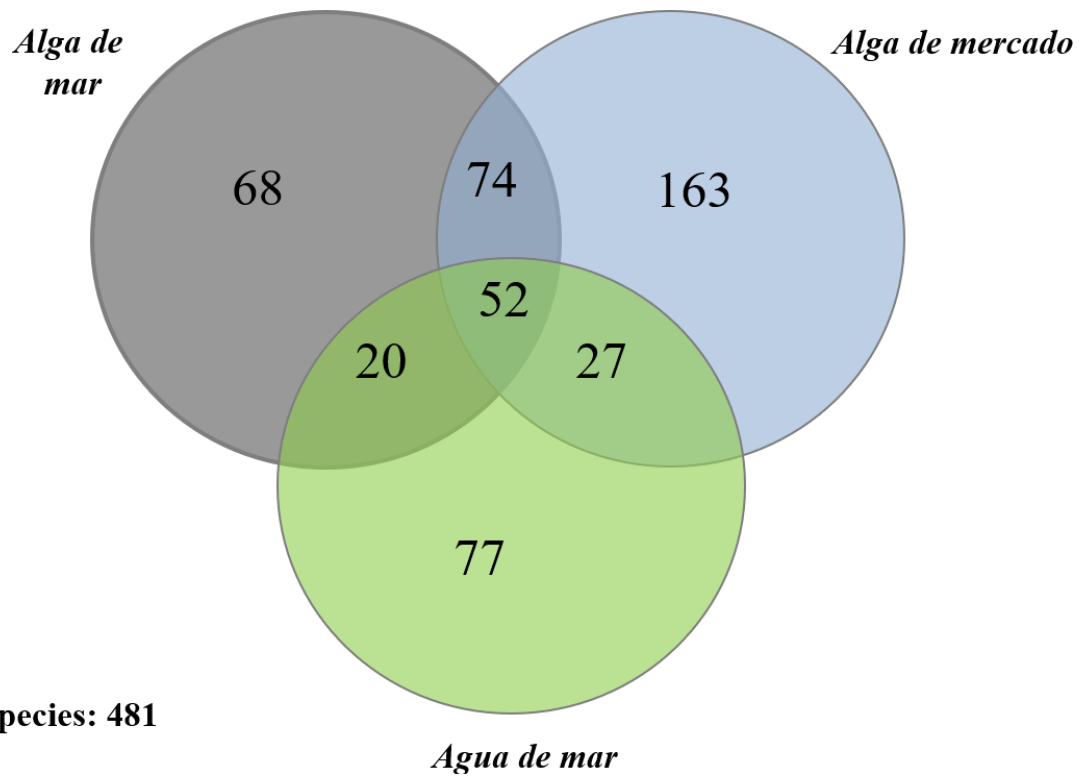


Figura 5 Especies compartidas entre las muestras obtenidas de Ancón.

3.2.3 Abundancia relativa de las especies clasificadas de Ancón.

Tabla 2. Abundancia relativa de las especies clasificadas en las muestras *C. chamissoi* recolectada del mar, del mercado y de la muestra de agua de mar de Ancón.

Especie	Abundancia Relativa en %			
	Alga de mar (A_{alga})	Alga de mercado (A_{mercado})	Muestra de Mar (A_{mar})	Total de lecturas
<i>Psychrobacter namhaensis</i>	0,05	37,50	0	4315
<i>Lewinella marina</i>	19,85	5,40	0,03	2759
<i>Vibrio chagasii</i>	0,02	0,03	24,99	2456
<i>Arthronema africanum</i>	9,39	9,55	0,00	2108
<i>Crocospaera watsonii</i>	4,89	8,66	0,00	1521
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	0,00	0,00	11,56	1134
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	0,23	7,69	1,12	1019
<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	7,84	0,35	0,00	883
<i>Sandarakinotalea sediminis</i>	0,43	0,03	7,62	796
<i>Pseudoalteromonas tunicata</i>	0,00	0,00	7,37	723
<i>Hyphomonas oceanitis</i>	5,79	0,68	0,00	701
<i>Pseudoalteromonas aliena</i>	0,00	0,00	7,11	697
<i>Lewinella lutea</i>	5,76	0,57	0,00	685
<i>Umboniibacter marinipuniceus</i>	0,00	0,00	6,73	660
<i>Maribacter ulvicola</i>	3,77	1,52	0,09	590
<i>Alteromonas addita</i>	0,00	0,00	4,64	455
<i>Chromatium weissei</i>	3,66	0,17	0,03	417
<i>Maricaulis parjimensis</i>	2,78	0,91	0,01	405
<i>Niabella soli</i>	3,05	0,03	0,00	332
<i>Aliivibrio logei</i>	0,00	0,00	3,31	325
<i>Thiothrix nivea</i>	2,70	0,02	0,00	292
<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>	2,13	0,14	0,45	289
<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	0,00	0,00	2,84	279
<i>Lewinella pérsica</i>	2,53	0,00	0,00	272
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	0,00	2,25	0,00	258
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i>	0,01	0,01	2,38	235
<i>Thiothrix fructosivorans</i>	2,03	0,07	0,00	226
<i>Brachyspira Ibaraki</i>	1,04	0,84	0,04	213
<i>Paracoccus sulfuroxidans</i>	1,48	0,41	0,00	206

3.3 Paracas

En las muestras de Paracas, se encontraron 81 519 lecturas de ADN, siendo la de mayor abundancia el alga extraída del mar (P_{alga}) con 28 050 lecturas, seguida de la muestra de alga del mercado (P_{mercado}) con 27 767 lecturas y por último la muestra de agua de mar (P_{mar}) con 25 702 lecturas. Se obtuvieron 18 filos, 38 clases, 86 órdenes, 181 Familias, 421 géneros y 564 especies de bacterias. La abundancia relativa de las especies de Paracas se encuentra en la tabla 2. La muestra P_{alga} tiene 69,37% organismos pertenecientes al filo Proteobacteria, seguido por Bacteroidetes con 20,64%, Cyanobacteria con 5,45%, otros filos con 4,54% y 48,45% de especies sin clasificar. La muestra P_{mercado} tiene 51,59% especies sin clasificar. En cuanto a filos, Proteobacteria es la predominante con 41,62%, seguido por Bacteroidetes con 35,87%, Verrucomicrobia con 6,68%, Firmicutes con 3,52% y otros filos con 12,3%. La muestra P_{mar} es la que tiene más especies sin clasificar, representando un 78,11%. Sin embargo, se sabe que el filo en mayor abundancia es Proteobacteria con 76,41%, seguido por Bacteroidetes con 22,62% y otros filos con 0,97%.

Tabla 3 Abundancia relativa de especies calificadas y sin calificar en Paracas con su filo respectivo.

Muestra	Especie	Abundancia Relativa en %	Filo
Alga obtenida del mar de Paracas (Palga) 28 050 Lecturas	<i>Thiothrix</i> sp.	15,38	Proteobacteria
	<i>Vibrio chagasii</i>	5,30	Proteobacteria
	<i>Maribacter ulvicola</i>	5,00	Bacteroidetes
	<i>Crocospaera watsonii</i>	3,78	Cyanobacteria
	<i>Aliivibrio fischeri</i>	3,48	Proteobacteria
	<i>Lewinella</i> sp.	3,29	Bacteroidetes
	<i>Vibrio comitans</i>	2,82	Proteobacteria
	<i>Vibrio</i> sp.	2,48	Proteobacteria
	<i>Aliivibrio logei</i>	2,35	Proteobacteria
	<i>Lewinella marina</i>	2,30	Bacteroidetes
	<i>Leucothrix</i> sp.	1,85	Proteobacteria
<i>Vibrio rumoiensis</i>	1,69	Proteobacteria	
Alga obtenida del mercado de Paracas (Pmercado) 27 767 Lecturas	<i>Lewinella marina</i>	16,75	Bacteroidetes
	<i>Thiothrix</i> sp.	12,94	Proteobacteria
	<i>Lewinella</i> sp.	8,99	Bacteroidetes
	<i>Rubritalea</i> sp.	3,77	Verrucomicrobia
	<i>Chromatium weissei</i>	3,55	Proteobacteria
	<i>Lewinella lutea</i>	2,93	Bacteroidetes
	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	2,89	Bacteroidetes
	<i>Arthronema africanum</i>	2,07	Cyanobacteria
	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	1,60	Proteobacteria
	<i>Loktanella</i> sp.	1,43	Proteobacteria
<i>Deinococcus</i> sp.	1,24	Thermi	
Muestra del Mar de Paracas (Pmar) 25 702 Lecturas	<i>Glaciecola</i> sp.	38,60	Proteobacteria
	<i>Polaribacter</i> sp.	9,33	Bacteroidetes
	<i>Loktanella</i> sp.	5,93	Proteobacteria
	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	4,25	Proteobacteria
	<i>Tenacibaculum</i> sp.	3,75	Bacteroidetes
	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	2,31	Proteobacteria
	<i>Nautella itálica</i>	2,02	Proteobacteria
	<i>Sediminicola</i> sp.	1,88	Bacteroidetes
	<i>Phaeobacter</i> sp.	1,68	Proteobacteria
	<i>Octadecabacter</i> sp.	1,61	Proteobacteria
<i>Thalassobius</i> sp.	1,58	Proteobacteria	

3.3.1 Géneros en las muestras de Paracas

El diagrama de Venn (Figura 8) representa 139 géneros en común en las 3 muestras analizadas, del *Chondracanthus Chamissoi* y P_{mar} ; estas significan 33% un del total de 421 géneros de bacterias. Verificando similitudes, se encontró para la muestra P_{alga} y P_{mercado} 65 géneros iguales. En el caso del P_{mercado} y la muestra de P_{mar} se encontraron 16 géneros compartidos. En la muestra de P_{mar} y del P_{alga} se hallaron 32 lecturas en común. Similarmente a Ancón, se puede observar que hay muchos géneros que solo se encuentran en las algas más no tienen relación con el mar del que provienen. Individualmente el análisis fue el siguiente; en la muestra del P_{mar} se encontraron 36 lecturas, siendo esta la muestra con menor cantidad de bacterias encontradas. La muestra del P_{alga} de Paracas contaba con 59 lecturas. Por último, la muestra del *C. chamissoi* del mercado de dicho distrito, contaba con el mayor número de géneros, 74 para ser exactos.

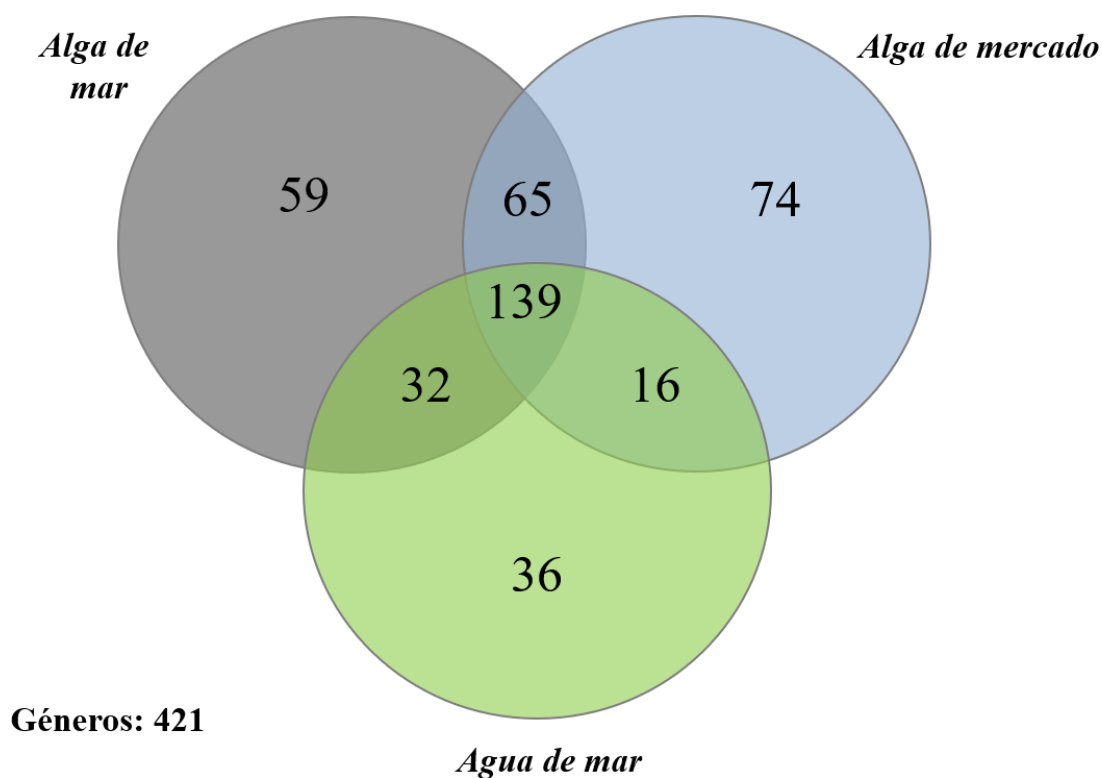


Figura 6 Géneros compartidos entre las muestras obtenidas de Paracas.

3.3.2 Especies en las muestras de Paracas

Respecto a las especies clasificadas que se encontraron en el distrito de Paracas, se halló un total de 564 (Figura 9). De este total, el 17%, es decir 96 de ellas eran las mismas en las tres muestras: P_{alga} , P_{mercado} , y P_{mar} . Si se comparan las especies en común entre cada una de las muestras tenemos lo siguiente: Para la muestra P_{mercado} y la muestra P_{mar} se hallaron 18 especies, menor cantidad de especies en común. Seguido por la muestra de P_{mar} y P_{alga} donde se encontraron 72 especies equivalentes. La mayor cantidad de especies en común fueron 81 entre P_{alga} y P_{mercado} . De manera individual se puede identificar que la menor cantidad de especies se encontró en P_{mar} , seguido por la muestra de P_{alga} y la muestra con mayor cantidad de especies; P_{mercado} con un total de 116 especies encontradas.

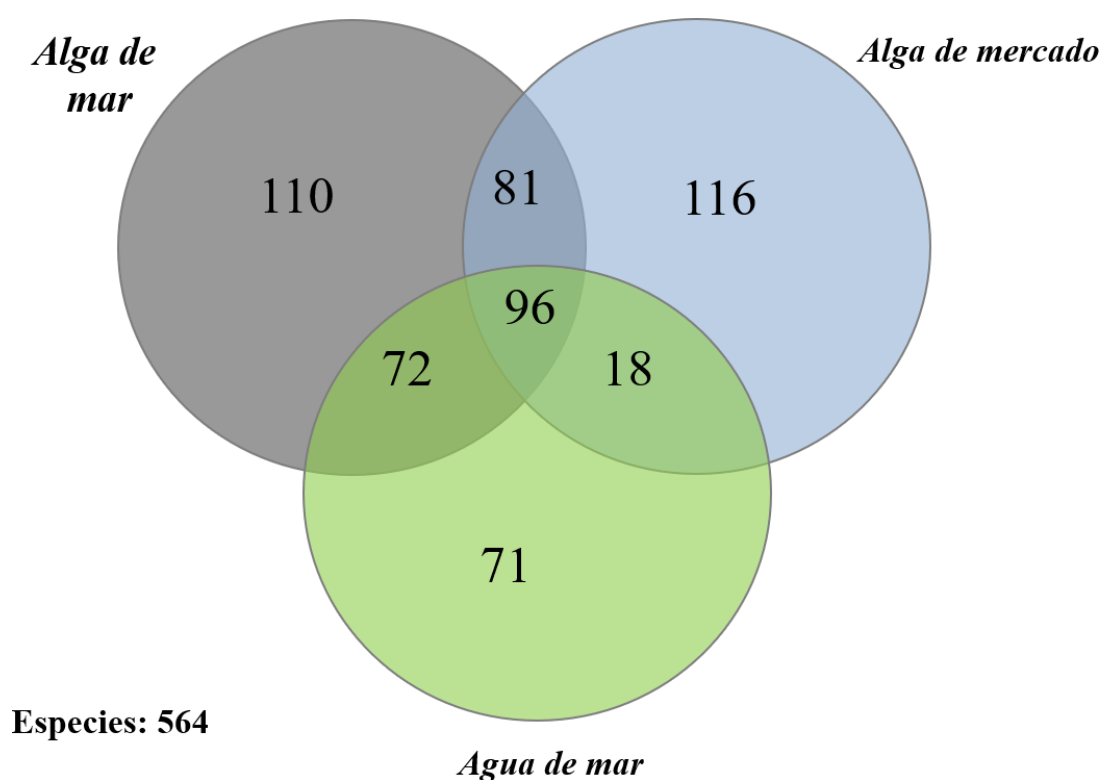


Figura 7 Especies compartidas entre las muestras obtenidas de Paracas.

3.3.3 Abundancia relativa de las especies clasificadas de Paracas.

Tabla 4. Abundancia relativa de las especies calificadas en las muestras *C. chamissoi* recolectada del mar, del mercado y de la muestra de agua de mar de Paracas.

Especie	Abundancia Relativa en %			Total de lecturas
	Alga de mar (P_{alga})	Alga de mercado (P_{mercado})	Muestra de mar (P_{mar})	
<i>Lewinella marina</i>	4,46	34,60	0,07	5300
<i>Vibrio chagasii</i>	10,29	0,00	2,97	1655
<i>Maribacter ulvicola</i>	9,70	0,74	0,14	1509
<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	2,87	5,97	0,02	1218
<i>Crocospaera watsonii</i>	7,34	0,99	0,02	1195
<i>Chromatium weissei</i>	1,36	7,34	0,02	1185
<i>Octadecabacter antarcticus</i>	0,55	3,30	10,58	1118
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	3,20	2,45	4,73	1058
<i>Aliivibrio fischeri</i>	6,76	0,00	0,11	983
<i>Lewinella lutea</i>	0,78	6,05	0	926
<i>Vibrio comitans</i>	5,48	0	0,75	834
<i>Aliivibrio logei</i>	4,56	0	0,59	693
<i>Arthronema africanum</i>	0,10	4,28	0,02	591
<i>Methylostrum kenyense</i>	1,47	2,54	0,57	586
<i>Nautella itálica</i>	0	0	9,24	520
<i>Vibrio rumoiensis</i>	3,28	0	0,68	513
<i>Polaribacter dokdonensis</i>	0,14	0	7,09	419
<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	0,87	0,07	4,69	400
<i>Glaciecola punicea</i>	0,10	0	6,51	381
<i>Acaryochloris marina</i>	1,21	1,33	0	354
<i>Legionella shakespearei</i>	0,53	1,96	0,18	349
<i>Paracoccus sulfuroxidans</i>	0,68	1,62	0	316
<i>Erythrobacter aquimaris</i>	1,02	1,17	0,11	310
<i>Brachyspira ibaraki</i>	0,07	2,16	0	300
<i>Deinococcus piscis</i>	0,20	1,99	0	296
<i>Pseudoalteromonas aliena</i>	0,41	0,01	3,75	273
<i>Sandarakinotalea sediminis</i>	1,69	0,08	0,18	265
<i>Vibrio litoralis</i>	1,65	0,04	0,27	260
<i>Vibrio owensii</i>	1,76	0	0,09	260
<i>Rubritalea marina</i>	0,09	1,80	0	255
<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	0,01	0,00	4,18	236
<i>Hyphomonas oceanitis</i>	1,10	0,46	0,16	230

34 Comparación entre géneros de las muestras de Ancón y Paracas

Diversos géneros que se pudieron encontrar en las muestras de Ancón, también se pudieron observar en Paracas. En las muestras de alga obtenidas del mar de Ancón y Paracas, se pueden observar géneros que se encuentran en común (Figura 10), como *Thiothrix*. En A_{alga} se pudo encontrar una mayor proporción con 23,48% y en P_{alga} 17,24%. Otro género representativo para ambas muestras es *Lewinella*, en la que se encontró 22,21% en A_{alga} y 6,54% en P_{alga} . El género *Vibrio* se encontró más abundante en P_{alga} , con 17,7% en comparación a A_{alga} .

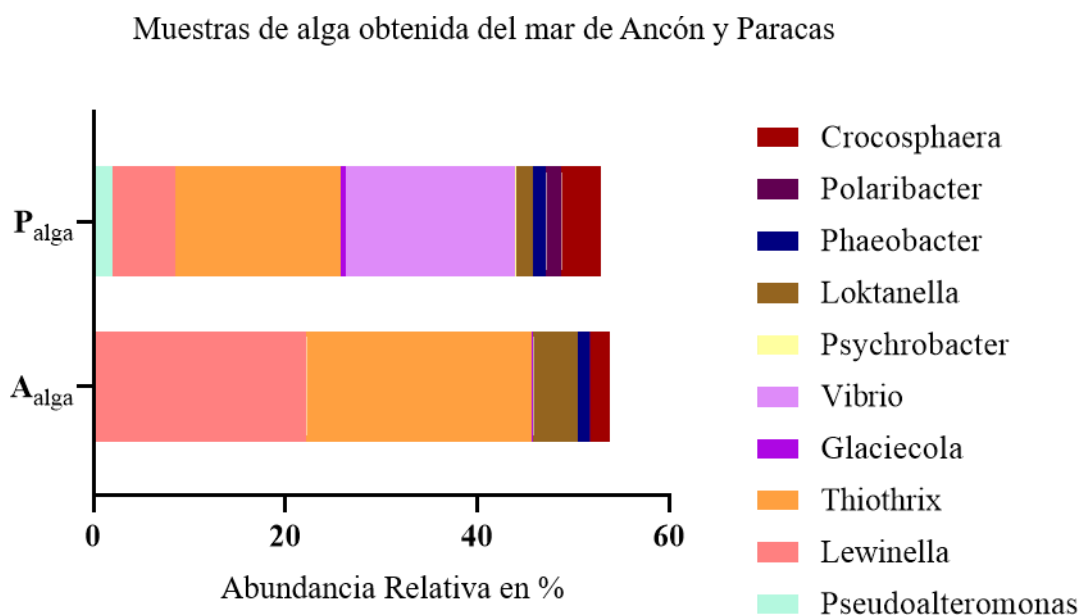


Figura 8 Géneros del alga obtenida del mar de Ancón y Paracas

En las muestras de alga del mercado de Ancón y de Paracas, *Lewinella* se encuentra en mayor abundancia (Figura 11) en la muestra P_{mercado} con 32,7% en contraste con A_{mercado} la cual tiene 6,26% de abundancia relativa. El género *Psychrobacter* se encuentra en gran medida en la muestra A_{mercado} , con 31,99% de abundancia relativa en comparación a la muestra P_{mercado} la cual solo tiene 0,11%. El género *Thiothrix* se encontró en ambas muestras, sin embargo, solo es representante en P_{mercado} , su abundancia relativa es 15% y la de A_{mercado} es 0,748%.

Muestras de alga obtenida del Mercado de Ancón y Paracas

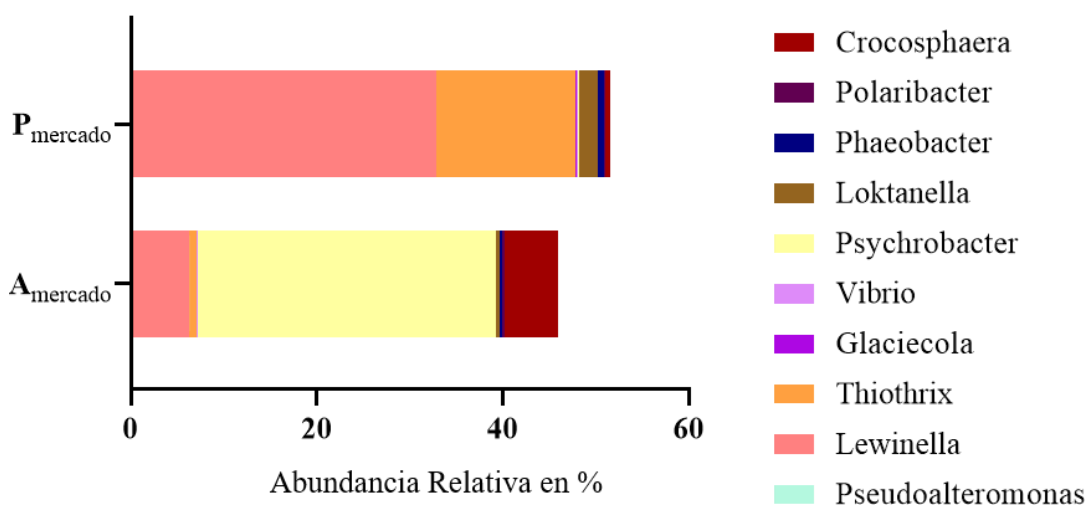


Figura 9 Géneros del alga obtenida del mercado de Ancón y Paracas

En las muestras de mar de Ancón y Paracas, se puede observar que el género que comparte en común de manera representativa es *Pseudoalteromonas*, teniendo la muestra A_{mar} mayor abundancia relativa con 61,3% comparado a P_{mar} con 7,28%. La muestra P_{mar} contienen en mayor cantidad el género *Glaciecola* con 41,29%, en comparación a A_{mar} con 0,15% (Figura 12).

Muestra de mar obtenida del mar de Ancón y de Paracas

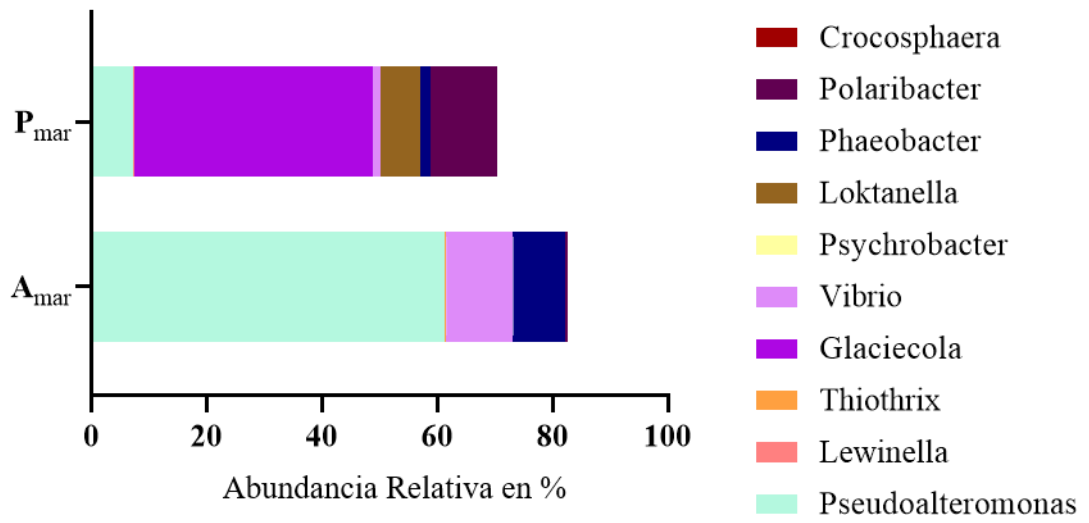


Figura 10 Géneros obtenidos de la muestra del mar de Ancón y Paracas

4 DISCUSIÓN

En el presente estudio, la microbiota de la superficie del *C. chamissoi* ha sido tipificado por primera vez usando la tecnología NGS de Illumina. Se pudo identificar diversos filos de comunidades procariotas bacterianas. Al ser una macroalga roja, se encontraron resultados similares a los encontrados por Brodier J, Barker G, et al (19) al estudiar el alga roja *Corallina Officinalis* en Combe Martin, Inglaterra donde Bacteriodetes, Cyanobacteria y Proteobacterias fueron los 3 filos más abundantes. De manera similar, al tipificar las muestras del alga roja *Delisea Pulchra* en Bare Island en Sydney, Australia, se pudo encontrar Proteobacterias, Bacteriodetes y Planctomycetes (17). El filo Planctomycetes, también se encontró en *C. officinalis*, siendo el tercer más abundante. Sin embargo, en el presente estudio se encontró menos abundante, siendo el décimo con un máximo de 0,23% de abundancia relativa. Dicha diferencia entre filos, se puede deber a las condiciones ambientales y su locación (20).

De igual manera, un estudio realizado por Miranda L en Maine, Estados Unidos, tipificó la microbiota de la *Porphyra Umbilicalis* pudiéndose encontrar que las *Proteobacterias* eran los microorganismos en mayor proporción, seguido por Planctomycetes y Chloroflexi en las muestras que se secuenciaron las regiones V5 a V7; y Proteobacterias y Chloroflexi en las muestras que se secuenciaron en las regiones V8-V9 (16). Dentro de esta división, destacaban los *Alphaproteobacteria* y los *Gammaproteobacteria* (Tabla 5). La mayor parte de las especies identificadas especialmente en las muestras de alga de mar y alga de mercado pertenecían al filo de *Proteobacterias* (*Vibrio chagasii*, *Chromatium weissei*, *Delftia tsuruhatensis*, *Aliivibrio fischeri*, *Vibrio comitans*, *Aliivibrio logei*, *Methylostrum kenyense*, *Psychrobacter namhaensis* entre otras). Estas integran uno de los filamentos más extensos y versátiles en el mundo de las bacterias (21).

Tabla 5. Filos más representativos encontrados en diferentes especies de algas y su metodología de secuenciación.

Especie	<i>C. chamissoi</i> (A alga y P alga)	<i>Corallina officinalis</i>	<i>Delisea pulchra</i>	<i>Porphyra umbilicalis</i>	
Autores	Este estudio	Brodie <i>et al.</i> (19)	Longford <i>et al.</i> (17)	Miranda <i>et al.</i> (16)	
Metodología	Región V3-V4 del gen 16s de ADNr, NGS.	V6 de 16s ARNr, Secuenciación por síntesis.	16s ADN4, DGGE	Región V5-V7	V8-V9 Gen 16s, ADNr, Pirosecuenciación
Filo	Proteobacteria Bacteroidetes Cyanobacteria Firmicutes Verrucomicrobia Actinobacteria	Proteobacteria Cyanobacteria Bactroidetes Actinobacteria Planctomycetes Acidobacteria	Proteobacteria Bacteroidetes Planctomycetes Chloroflexi Cyanobacteria Actinobacteria	Bacteroidetes Planctomycetes Chloroflexi Proteobacteria Actinobacteria Firmicutes	Bacteroidetes Proteobacteria Chloroflexi Actinobacteria Deinococcus- Thermus Firmicutes

Respecto a lo encontrado en los estudios antes mencionados, cabe recalcar que se usaron diferentes métodos de secuenciamiento para tipificar la microbiota del alga, como secuenciación pirosecuenciación 545 (primera NGS en salir entre el año 2004 y 2005) (22). Sin embargo, en el presente estudio, se usó la tecnología NGS de Illumina. Esta tiene cierta ventaja y desventaja a comparación al método mencionado anteriormente. NGS se recomienda por su costo efectividad al secuenciar genomas y por completar más genes al secuenciar. Sin embargo, la secuenciación 454 puede ser mejor al secuenciar estructuras repetitivas, de particular importancia para la secuenciación de genomas enteros mas no para estudios de tipificación (23).

El segundo lugar de abundancia lo ocuparía el filo Bacterioidetes donde se hallaron especies pertenecientes a este tales como *Lewinella marina*, *Maribacter ulvicola*, *Haliscomenobacter hydrossis*, *Lewinella lutea*, entre otros. A excepción de la muestra A_{mercado} donde el segundo filo más representativo era las Cyanobacterias. Los Bacteroidetes son abundantes en espacios acuáticos, en el tracto gastrointestinal humano e

incluso en la tierra, según el lugar donde habitan realiza diferentes funciones siendo la principal la degradación de materia orgánica polimérica como son los carbohidratos y proteínas (24). Estudios indican que el 98% del gen 16 RNA en la microbiota mamífera es perteneciente a Bacteroidetes y Firmicutes (25). Miembros del filo Bacteroidetes son conocidos por su capacidad de colonizar el colon y participan en la activación de las respuestas mediadas por células T para defender de manera correcta el sistema inmune, siendo esta una relación de mutualismo entre las bacterias y microbiota del individuo (24). Kim y Milner refieren que los bacteroidetes intestinales producen butirato tras la fermentación colónica. El butirato es la principal fuente de energía de los colonocitos; las células que recubren el epitelio del intestino grueso, para poder realizar sus funciones como la absorción agua, electrolitos y ácidos grasos de cadena corta provenientes de nuestra alimentación y secreciones. Este buen funcionamiento se traduce en la prevención de enfermedades relacionadas a la inflamación intestinal e incluso el cáncer al colon (26). Por esta razón, se podría relacionar simbiosis entre el consumo de alimentos que contengan Bacteroidetes y la mejora de la microbiota y de la salud humana (24)

La microbiota es definida como una población de microorganismos vivos presentes en un espacio ecológico determinado como mucosas, conjuntiva, piel, tracto gastrointestinal, etc. Respecto a la mucosa intestinal, en la actualidad se cuenta con evidencia suficiente que indica que la función adecuada del tracto gastrointestinal no solo va a depender de su estructura fisiológica, sino también de la concurrencia y actividad de los microorganismos que la habitan (27). Cabe resaltar que está colonizada por el filo Bacteroidetes a pesar de las condiciones de pH, nutrientes, etc (24), siendo este filo, el segundo más representativo en las muestras obtenidas a excepción de A_{mercado} . Gracias a ella podrá ejercer beneficios tales como la fermentación de poli y oligosacáridos no digeribles, síntesis de algunas vitaminas como la K, B12, ácido fólico y ácido pantoténico, protección del sistema inmune, entre otros (28). Una mayor proporción de Bacteroidetes se asocia a una menor capacidad extractiva de energía del quimo digestivo, generadora de señales proinflamatorias, una menor liberación de glucosa, así como una mejor respuesta del organismo a la acción de la insulina (24). A su vez, las bacterias de la microbiota pueden influir en la secreción entero hormonal, y con ello, modificar el apetito y la cuantía de los ingresos alimentarios (24).

Pero ¿Qué tipo de bacterias habitan en la microbiota? En los seres humanos, la microbiota está compuesta por casi 100 trillones de células de las cuales la mayoría pertenecen a

Firmicutes y Bacteroidetes. Estos filos representan más del 98% del gen 16s RNA identificado en los mamíferos (25). Los investigadores Ley R y col. pudieron identificar que la flora intestinal de humanos y de ratones con peso elevado poseían mayor cantidad de Firmicutes y menor presencia de Bacteroidetes, este hecho deja dos posibilidades, los Bacteroidetes pueden prevenir la obesidad o ellos sencillamente están presentes por las características que posee la flora intestinal de un persona sin obesidad (29).

Microorganismos del género *Lactobacillus* (30) y *Bifidobacterium* (31) son usados con el propósito de la pérdida de peso y masa grasa. En los resultados obtenidos de la tipificación de *C. chamissoi* se encontraron ambos géneros, *Lactobacillus* se pudo encontrar en todas las muestras. Sin embargo, *Bifidobacterium* se encontró solo en 4 de las 6 muestras, siendo A_{mercado}, A_{mar}, P_{alga} y P_{mercado}. Dentro del género *Lactobacillus*, se pudo identificar *L. fermentum*. Reid G y colaboradores (32) mencionan que el consumo de esta especie puede alterar la flora vaginal de forma positiva, reduciendo la incidencia de infecciones vaginales, especialmente por hongos.

Vibrio chagasii se encontró de manera representativa en 2 muestras, en A_{mar} con 24,99% y Palga con 10,29% de las especies clasificadas (Tabla 2 y 4). Esta especie fue identificada desde 1990, sin embargo, recién en el 2003 por F. L. Thompson y colegas (33) le dieron un nombre. Estudios previos, lo han podido encontrar en especies marinas como crustáceos como *Artemia sp*, rotíferos, en la larva de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y en el mar de Grecia. No se sabe mucho sobre este microorganismo, sin embargo, pertenece al género de *Vibrio*, en el cual hay varias especies que son patógenas para los humanos como *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. fluviales*, *V. metschnikovi*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, entre otras (34). Debido a la representación relativa de *V. chagasii* en el mar de Ancón, se puede deducir que esta especie ha contaminado a las muestras A_{alga} y A_{mercado}, representando 0,02% y 0,03% respectivamente..

Delftia Tsuruhatensis se encontró de forma significativa en A_{mercado} con 7,69%. Y en P_{mar} con 4,73% de las especies clasificadas (Tabla 2 y 4). Esta especie fue aislada por primera vez en lodo de una planta de tratamiento de agua doméstica (35). Se descubrió que este microorganismo era capaz de digerir tereftalato de polietileno, siendo un tipo de plástico que en el año 2015 su producción fue de 27,8 millones de toneladas y se espera

que su producción aumente en un 70% para el año 2020. Siendo China productora de un 27%, Norteamérica y Europa cada una con 17% y Sudamérica un 7% (36). En el ámbito de salud, en el 2011 se publicó un caso clínico sobre una paciente el cual presentó una infección por *D. tsuruhatensis* y *D. lacustris* (37). Se pudo identificar que estos microorganismos provenían del catéter venoso central del paciente.

La especie *Psychrobacter Namhaensis* fue encontrada en A_{mercado} con 37,5% de las especies clasificadas (Tabla 2). Esta especie fue aislada por primera vez en el mar de Namhae, Corea (38). Se ha realizado un estudio en Egipto para poder determinar si este microorganismo se podría emplear como probiótico para la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), el cual resulto ser efectivo, aumentando su desarrollo y crecimiento (39). Otra especie encontrada en la muestra A_{mercado} es *Crocospaera Watsonii* con 8,66%. También se encontró en A_{alga} con 1,89% y en A_{mercado} con 8,66% de las especies clasificadas (Tabla 2 y 4). Es una cianobacteria fijadora de nitrógeno que suele encontrarse en océanos oligotróficos. Tiene una función muy importante en el fijamiento de nitrógeno en los mares tropicales y subtropicales (40).

Se encontró *Lewinella marina* en P_{mercado} con 34,60%, A_{alga} con 19,85%, A_{mercado} con 5,40% y P_{alga} con 4,46%. Un estudio publicado en la Revista "Systematic and Evolutionary Microbiology" usó muestras de sedimento marino y de caracol recolectados en la costa del Pacífico de Japón y se analizaron mediante aislamientos basados en secuencias del gen 16S rRNA (41). Dicho estudio pudo identificar el género *Lewinella* (Gram-negativos, aeróbicos) mientras que nuestro estudio identificó como especies resaltantes a *Lewinella marina* y *Lewinella lutea*. Esta última especie también se ha encontrado en P_{mercado} y en A_{alga} . Por otro lado, nuestro estudio en comparación al de Japón indica que especies del género *Lewinella* son comunes en muestras marinas. El estudio antes mencionado reporta que ambas especies son capaces de degradar ADN, celulosa, gelatina y almidón. Esta capacidad de degradación de celulosa fue analizada en un estudio realizado por Blifernez-Klassen O, Klassen V, et al en el año 2012 donde encontró que el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* poseía la capacidad de degradar celulosa y por ende utilizarla como fuente secundaria de energía; gracias a ello se pensó en la obtención de biocombustibles (42). Anteriormente, en la industria cervecera era necesario utilizar enzimas a partir de hongos para poder degradar celulosa pero gracias a esta capacidad del

alga el proceso podría ser más simple lo que nos indica que el *Chondracanthus Chamissoi* posiblemente posee esta capacidad (41) (42).

Por otro lado, Khan ST, et al, en su estudio denominado ‘‘Metabolitos de membrana de cepas de *Arthronema africanum* en hábitats extremos’’ (43) identificaron que la alta composición cualitativa de la especie *Arthronema africanum* era típica en algas verdeazuladas. Esta información podría ser válida de igual manera en algas rojas como es el caso del *Chondracanthus Chamissoi* ya que en el análisis se encontró en Amercado con 9,55%, Aalga con 9,39% y P_{mercado} con 4,28%.

Entre las especies más representativas de P_{alga} con 9,70% y Aalga con 3,77% de las especies clasificadas (Tabla 2 y 4), se halló *Maribacter ulvicola*. Un estudio realizado en Suecia pudo identificar que esta especie pertenecía a la familia de *Flavobacterias* (*Flavobacteriaceae*) luego de analizar el gen 16S rRNA de muestras del mar de Japón (44). Las muestras analizadas en dicho estudio fueron: alga verde denominada *Ulva fenestrata*, agua de mar y sedimento del fondo del mar recolectada en el Golfo de Pedro el Grande, Mar de Japón; muestras similares a las usadas en la presente investigación (44).

Se encontraron diferentes especies pertenecientes al género *Pseudoalteromonas*. en A_{mar} con 61,30% y en P_{mar} con 7,28%. Un estudio realizado en el año 2016 en la Universidad de Antofagasta de Chile, analizó la microbiota del pez dorado *Seriola lalandi*; una especie marina con alta demanda comercial nacional e internacional, con el fin de identificar bacterias que cumplan con características de potenciales probióticos que permitan la mejora del cultivo de las larvas de esta especie (45). El estudio encontró que de las bacterias aisladas el 42% pertenecía al género *Pseudoalteromonas* las cuales tenían actividad inhibitoria a bacterias patógenas humanas y del alga. Por esta razón se incluyeron bacterias de este género como probiótico junto a microalgas para potenciar el cultivo de esta especie (45). Esto nos refiere que la especie *Pseudoalteromonas rubra* podría desempeñar un papel importante en la industria alimentaria como probiótico de peces y por ende a mejorar su desarrollo (45).

Cabe resaltar que diversas investigaciones han demostrado que las algas poseen la propiedad de capturar metales pesados presentes en el agua, por esta razón a lo largo del tiempo estas han sido utilizadas como indicadores de contaminación en ecosistemas marinos y para mejorar el estado de contaminación de mares, lagos, etc (46). Por esta razón,

no todos los resultados encontrados respecto a microorganismos son positivos o benéficos para nuestra salud o para la salud de seres vivos como son los peces que de igual manera dentro de su alimentación están las algas.

Muchas especies fueron identificadas y clasificadas ya sea por especie, género, clase, filo, etc. Sin embargo, algunos microorganismos se encuentran fuera de este grupo. Estos microorganismos denominados dentro del grupo de "sin clasificar" no han sido encontrados o analizados en estudios previos. Sin embargo, logramos identificar a que género pertenecerían.

En *A_{alga}*, dentro de las especies sin clasificar se pudo identificar que estas en su mayoría pertenecían al género *Thiothrix*. Las bacterias de este género pueden ser gram negativas o gram positivas (47). Muchos estudios, entre ellos uno de la Universidad de Antioquia-Chile; encontró que en plantas con tratamiento de aguas residuales existía gran proliferación bacteriana donde el género predominante era *Thiothrix* (47). Esta proliferación se relaciona a una baja temperatura, baja relación sustrato/microorganismo y bajas concentraciones de oxígeno; ambiente donde este grupo de bacterias se desarrolla mejor (47) (48). El segundo género predominante en esta muestra fue *Lewinella*; perteneciente al filo de Bacterioidetes; bacterias gram negativa aeróbica (52). Este género es común en océanos ya que requiere del ambiente marítimo para desarrollarse. Las bacterias pertenecientes a *Lewinella* producen pigmentos carotenoides anaranjados o amarillos. Por otro lado, es incapaz de hidrolizar almidón (49). Otro género encontrado fue *Hyphomonas* con un 3,17%. Según Fukui (50), este género permite una morfogénesis normal a una especie de alga roja, *Porphyra yezoensis*, sintetizando la pared celular o diferenciándose de los protoplastos.

Respecto a las especies sin clasificar de *A_{mercado}*, se encontró que gran parte de estas bacterias pertenecían al género *Phenylobacterium* con una abundancia relativa de 4,55%. Este género es gram negativo y pertenece al filo de Proteobacterias. Por otro lado se encuentra el género *Psychrobacter* con una abundancia relativa de 31,99%. Este pertenece al filo de Proteobacterias; son gram negativas aeróbicas las cuales se desarrollan mejor entre los -10 y 42 °C. La primera especie encontrada de este género se identificó en gran cantidad en ambientes salinos con gran humedad y baja temperatura. Cabe resaltar que algunos estudios demostraron que al aislar en humanos estas bacterias causaron infecciones como endocarditis y peritonitis (51).

En la muestra de A_{mar} gran parte de las especies no identificadas pertenecen al género de *Pseudoalteromonas* con 61,30 % de abundancia relativa. Estas bacterias gram negativas aeróbicas están presentes en habita marítima como aguas costeras, profundas y sedimentadas (52). También, se encuentran en especies marinas tales como algas, peces y en algunos invertebrados (52). Este género es capaz de crecer en bajas temperaturas, por esta razón son comúnmente estudiadas para identificar mecanismos biológicos de adaptación al frío. Una de las características destacables de este género es su potencial biotecnológico. Posee la capacidad de producir metabolitos secundarios con una gran actividad antimicrobiana y antitumoral (52). Uno de ellos antibióticos que produce es el thiomarinol, el cual tiene afinidad en contra de *Staphylococcus aureus* siendo este una especie resistente a la meticilina (53).

Otro género mayoritario en las especies sin clasificar fue *Phaeobacter* perteneciente al filo de Proteobacterias con 9,09% de abundancia relativa. La Universidad New South Wales en Australia realizó un estudio con este género donde destacan como influye la naturaleza marítima, presencia de microorganismos con el desarrollo del microbioma de las algas (54). Cabe destacar que Seyedsayamdost, et al (2011) al relacionar una especie de este género denominada *Phaeobacter gallaeciensis* al alga *Emiliania huxleyi* pudieron identificar que existía una relación de mutualismo. Ellos describen que cuando el alga es joven, la bacteria produce antibióticos protegiendo al alga de infecciones; además produce ácido fenilacético que favorece el desarrollo de esta (55). Cuando el alga envejece, esta especie produce toxinas que matan al alga lo que le permite a la bacteria poder buscar un nuevo hospedador para continuar su ciclo. Esto nos da el indicio de que las especies dentro de este género son beneficiosas para el correcto desarrollo y protección de las algas (54) (55).

En la muestra P_{alga} las especies más representativas sin clasificar pertenecen al género *Vibrio*, con 11,44% de abundancia relativa. Este pertenece al filo de Proteobacterias, las especies pertenecientes a este género son gram negativas anaerobias capaces de sobrevivir en medios alcalinos y altas en concentraciones salinas (56). Por esta razón suelen estar en aguas saladas y dulces, rocas húmedas, aguas estancadas y están presentes como parte de la microbiota de peces y otros animales acuáticos (56). Gran parte de las especies pertenecientes son patógenas capaces de provocar infecciones gastrointestinales como por ejemplo el cólera (*V. cholerae* o también la conocida diarrea inflamatoria auto limitada que se transmite por el consumo de mariscos por la especie *V. vulnificus* (56). Sin embargo,

cabe resaltar que muchas especies pertenecientes a este género son indispensables para que organismos marinos sean capaces de subsistir por lo que sería benéfica para el hábitat marino (56).

Otro género predominante dentro de este grupo de bacterias es *Leucothrix* con 2,21 % de abundancia relativa. Género de bacterias aerobias perteneciente al filo de Proteobacterias comunes en hábitat marino, en plantas, algas y también adheridas a superficies de crustáceos como langostas (57).

En la muestra P_{mercado} el género ubicado en el puesto 4 de géneros identificados como representantes de las especies no identificadas fue *Rubritalea* con 5,54% de abundancia relativa. Este es un género gramnegativo que posee metabolismo aeróbico. Este género hasta la actualidad posee 6 especies identificadas. Scheuermayer, et al refieren que este género posee lípidos polares donde predomina el fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina y el difosfatidilglicerol (58).

Otro género identificado es la *Loktanella* con 2,09 % de abundancia relativa. Como características principales tenemos que son bacterias gram negativas aeróbicas, la temperatura óptima para su desarrollo correcto es de 25°C (59). Un estudio publicado en el 2004 en la Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva de Bélgica, describe la presencia de ácidos grasos en este género tales como el omega 6, 7 y 10, donde dos de ellos aún no son ácidos grasos conocidos (59).

En la muestra P_{mar} el género representativo dentro de las especies sin clasificación fue *Glaciecola* con 41,29% de abundancia relativa. Género de bacterias aerobias gramnegativas del filo de Proteobacterias. Para su supervivencia requieren agua salada de mar (60). Estudios reportan que pueden desarrollarse entre los 4° a 15°C siendo 12° la temperatura ideal por lo que serían adecuados para indagar mecanismos bacterianos de adaptación al frío (60). Especies de este género han sido encontradas en zonas costeras en la Antártida y en algunos invertebrados marinos. Este género posee 9 especies reconocidas hasta ahora (60).

Otro género predominante en la muestra del agua de mar de Paracas fue el género *Polaribacter* con 11,55% de abundancia relativa. Este es gram negativo y aeróbico, posee pigmento carotenoides (61). Hasta el momento, son 21 las especies identificadas de este género donde gran parte de ellas poseen algún tipo de ácido graso, muchos de ellos aún no

identificados. A comparación de otros géneros, este es capaz de vivir en climas templados de ambientes marinos (61).

Respecto a los resultados obtenidos en cuanto a proporción y tipos de microorganismos que componen la microbiota de *C. Chamissoi* pueden afectarse por contaminación no controlada con agentes externos. Además, se debe tener en cuenta que las variaciones en las condiciones climáticas, como la temperatura afectan la composición de la microbiota del alga. Por otro lado, la presente investigación sólo analiza organismos procariotas, por lo que no se podrá determinar la presencia de los organismos Eucariota que integren el microbioma del alga analizada.

5 CONCLUSIONES

Se logró caracterizar la microbiota externa del *Chondracanthus chamissoi* por primera vez y se mostró las similitudes y diferencias entre las muestras obtenidas de Ancón y Paracas, al igual que su abundancia relativa comparada a otras algas. Se identificaron 19 Filos, 41 Clases, 90 órdenes, 193 Familias, 484 Géneros y 716 Especies.

Se pudo encontrar especies tanto en Ancón como en Paracas, como *Lewinella Marina*, *Vibrio Chagasii*, *Delftia tsuruhatensis*, *Crocospaera watsonii*, *Maribacter ulvicola*, *Haliscomenobacter hydrossis*, *Sandarakinotalea sediminis*, *Hyphomonas oceanitis*, *Chromatium weissei*, *Aliivibrio logei*, *Pseudoalteromonas rubra*, *Paracoccus sulfuroxidans*. Especies representativas como *Psychrobacter namhaensis*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Umboniibacter marinipuniceus*, *Alteromonas addita*, *Maricaulis parjimensis*, *Niabella soli*, fueron únicas en Ancón. Por el contrario, *Octadecabacter antarcticus*, *Vibrio comitans*, *Methylostratum kenyense*, *Nautella itálica*, *Polaribacter dokdonensis*, *Glaciecola punicea*, *Acaryochloris marina*, fueron especies representativas únicas en Paracas.

Hubo muchas especies que no se pudieron clasificar, en las muestras de Ancón, A_{alga} con 60.2%, A_{mercado} con 38.83%, A_{mar} con 62.27%. En las muestras de Paracas, P_{alga} con 48.45%, P_{mercado} con 51,59%, P_{mar} con 78,11%. Sin embargo, se pudieron clasificar a su género.

Se encontraron algunas especies benéficas como *Psychrobacter Namhaensis*; empleada como probiótico para la tilapia del Nilo de manera exitosa pudiendo contribuir al desarrollo de la especie. *Lewinella marina* la cual es capaz de utilizar la celulosa como fuente de energía y así degradarla pudiendo ser útil en la industria cervecera. *Pseudoalteromonas rubra* la cual posee poder probiótico al mejorar el cultivo de las larvas del pez dorado *Seriola lalandi* y además *Loktanella* la cual posee ácidos grasos omega 6, 7, 10. Se encontró *Vibrio chagasii*, el cual se obtuvo mayormente en el mar de Ancón, pertenece al género *Vibrio* la cual es conocida por su patogenia en los humanos. Otra especie resaltante fue *Glaciecola* la cual se ha usado en diferentes estudios para identificar mecanismos de adaptación al frío.

De igual manera, se requieren futuras investigaciones para poder determinar la relación de los microorganismos con su anfitrión, al igual su posible rol en la nutrición humana.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015;3(1):31.
2. Icaza- Chavez M. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*. 2013; 78(4) :240-248
3. Guarner F. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutr Hosp*. 2007;22(Supl.2):14–9.
4. Robles-Alonso V, Guarner F. Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana. *Nutr Hosp*. 2013;28(3):553–7.
5. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012 Jun 13;486(7402):207-14.
6. Hugon P, Dufour JC, Colson P, Fournier PE, Sallah K, Raoult D. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *Lancet Infect Dis*. 2015 Oct;15(10):1211-1219.
7. Degroot AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22(5):1137–50.
8. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Heal Dis [Internet]*. 2015;26(0).
9. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1027-31.
10. Waldram A, Holmes E, Wang Y, Rantalainen M, Wilson ID, Tuohy KM, et al. Top-down systems biology modeling of host metabotype-microbiome associations in obese rodents. *J Proteome Res*. 2009 May;8(5):2361-75.
11. Ramanan R, Kim BH, Cho DH, Oh HM, Kim HS. Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnol Adv [Internet]*. 2016;34(1):14–29.
12. Edding M, Fadia T, Vásquez J. Fisiología Vegetal. Fotosíntesis, productividad y algas marinas. Chile. Ediciones Universidad de La Serena. 2006.
13. Guiry MD. How many species of algae are there? *J Phycol*. 2012 Oct;48(5):1057-63.

14. Gil-Kodaka, Patricia. Colonización de *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales) sobre sustratos calcáreos en Playa Mendieta, Reserva Nacional de Paracas. 72. 19-26. (2011)
15. Ścieszka S, Klewicka E. Algae in food: a general review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59(21):3538-3547.
16. Miranda LN, Hutchison K, Grossman AR, Brawley SH. Diversity and Abundance of the Bacterial Community of the Red Macroalga *Porphyra umbilicalis*: Did Bacterial Farmers Produce Macroalgae? *PLoS One.* 2013;8(3).
17. Longford SR, Tujula NA, Crocetti GR, Holmes AJ, Holmström C, Kjelleberg S, et al. Comparisons of diversity of bacterial communities associated with three sessile marine eukaryotes. *Aquat Microb Ecol.* 2007;48(3):217–29.
18. Lachnit T, Meske D, Wahl M, Harder T, Schmitz R. Epibacterial community patterns on marine macroalgae are host-specific but temporally variable. *Environ Microbiol.* 2011 Mar;13(3):655-65.
19. Brodie J, Williamson C, Barker GL, Walker RH, Briscoe A, Yallop M. Characterising the microbiome of *Corallina officinalis*, a dominant calcified intertidal red alga. *FEMS Microbiol Ecol.* 2016;92 (8)
20. Brothers Cecilia J., Van Der Pol William J., Morrow Casey D., Hakim Joseph A., Koo Hyunmin and McClintock James B. Ocean warming alters predicted microbiome functionality in a common sea urchin *Proc. R. Soc. B* 285
21. Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, and Erko Stackebrandt. *The Prokaryotes: Vol. 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses.* 2013.
22. Aguilar L, Falquet L. Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. *Rev. Salud Anim.* Vol. 37 No. 2 125-132.
23. Luo C, Tsementzi D, Kyrpides N, Read T, Konstantinidis KT. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS One.* 2012;7(2):e30087.
24. Thomas, François & Hehemann, Jan-Hendrik & Rebuffet, Etienne & Czjzek, Mirjam & Michel, Gurvan. (2011). Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection. *Front. Microbiol.* 2011; 2: 93.
25. Ley R. E, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):837-48.

26. Kim YS, Milner JA. Dietary modulation of colon cancer risk. *J Nutr.* 2007. Nov;137(11 Suppl):2576S-2579S.
27. Guarner F. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. Unidad de Investigación de Aparato Digestivo. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. España. *Nutr Hosp.* 2007;22(Supl. 2):14-9
28. Mariño A, Núñez M, et al. Microbiota, probióticos, prebióticos y simbióticos. *Rev Acta Médica* 2016; 17 (1).
29. Ley R, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone C, Knight R, Gordon J. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 2;102(31):11070-5.
30. Kadooka Y, Sato M, Tsuchida T, et al Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 2010 Jun;64(6):636-43.
31. Bernini LJ, Simão AN, Alfieri DF, Lozovoy MA, Mari NL, de Souza CH, et al. Beneficial effects of *Bifidobacterium lactis* on lipid profile and cytokines in patients with metabolic syndrome: A randomized trial. *Effects of probiotics on metabolic syndrome. Nutrition.* 2016 Jun;32(6):716-9.
32. Reid G, Charbonneau D, Erb J, Kochanowski B, Beuerman D, Poehner R, Bruce AW. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003 Mar 20;35(2):131-4.
33. Thompson FL, Thompson CC, Li Y, Gomez-Gil B, Vandenberghe J, Hoste B, Swings J. *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003 May;53(Pt 3):753-9.
34. Osunla CA, Okoh AI. *Vibrio* Pathogens: A Public Health Concern in Rural Water Resources in Sub-Saharan Africa. *Int J Environ Res Public Health.* 2017;14(10):1188. Published 2017 Oct 7. doi:10.3390/ijerph14101188
35. Shigematsu T, Yumihara K, Ueda Y, Numaguchi M, Morimura S, Kida K. *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003 Sep;53(Pt 5):1479-83.
36. Plasticsinsight. Global PET Resin Production Capacity. 2016. <https://www.plasticsinsight.com/global-pet-resin-production-capacity/>. (citado el 10 de septiembre del 2019).

37. Preiswerk B, Ullrich S, Speich R, Bloemberg GV, Hombach M. Human infection with *Delftia tsuruhatensis* isolated from a central venous catheter. *J Med Microbiol.* 2011 Feb;60(Pt 2):246-8.
38. Yoon JH, Lee CH, Yeo SH, Oh TK. *Psychrobacter aquimaris* sp. nov. And *Psychrobacter namhaensis* sp. nov., isolated from sea water of the South Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005 May;55(Pt 3):1007-13.
39. Makled SO, Hamdan AM, El-Sayed AM, Hafez EE. Evaluation of marine psychrophile, *Psychrobacter namhaensis* SO89, as a probiotic in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets. *Fish Shellfish Immunol.* 2017 Feb; 61:194-200.
40. Großkopf T, LaRoche J. Direct and indirect costs of dinitrogen fixation in *Crocospaera watsonii* WH8501 and possible implications for the nitrogen cycle. *Front. Microbiol.* 2012(3):236.
41. Khan ST, Fukunaga Y, Nakagawa Y, Harayama S. Emended descriptions of the genus *Lewinella* and of *Lewinella cohaerens*, *Lewinella nigricans* and *Lewinella persica*, and description of *Lewinella lutea* sp. nov. and *Lewinella marina* sp. nov. *International Int J Syst Evol Microbiol* 2007 (57):2946–2951
42. Blifernez-Klassen O, Klassen V, Doebbe A, Kersting K, Grimm P, Wobbe L, Kruse O. Cellulose degradation and assimilation by the unicellular phototrophic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nat Commun.* 2012; 3: 1214
43. Iliev, G. Petkov, S. Furnadzhieva¹, R. Andreeva, Lukavsky J. Membrane metabolites of *Arthronema africanum* strains from extreme habitats. *Gen. Appl. Plant physiology, special issue.* 2006, 117-123
44. Olga I. Nedashkovskaya, Seung Bum Kim, Suk Kyun Han, et al. *Maribacter* gen. nov., a new member of the family Flavobacteriaceae, isolated from marine habitats, containing the species *Maribacter sedimenticola* sp. nov., *Maribacter aquivivus* sp. nov., *Maribacter orientalis* sp. nov. and *Maribacter ulvicola* sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol* (2004), 54, 1017–1023
45. Sayes C, Leyton Y, Riquelme C. *Pseudoalteromonas* sp. potencial probiótico de peces. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 44(1): 76-84, 2016.
46. Gutiérrez R, González K, Hernández Y, Acosta Y, et al. Algas Marinas, fuente potencial de macronutrientes. *Invest. Mar.* 2017:16-28.
47. Balcárcel L, Erazo P, Vides A, Ramirez A. Parámetros fisicoquímicos asociados a la proliferación de bacterias filamentosas (Bulking filamentoso) en las plantas de tratamiento

de aguas residuales mediante lodos activados: revisión sistemática. *Hechos Microbiol.* 2012; 3(2); 47-58.

48. Zornoza A, Romera V, Lledías M, et al. Microscopía convencional vs. FISH: identificación de bacterias filamentosas tipo 021N de Eikelboom y grupo *Thiothrix nivea* en fangos activos. *Tecnoaqua.* 2016 (22): 64-72

49. Lindsay I, Fegan M. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.* Lewinella. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.* 2015:1-5.

50. Fukui Y, et al. Isolation of hyphomonas strains that induce normal morphogenesis in protoplasts of the marine red alga *Pyropia yezoensis*. *Microbial ecology.* 2014 68(3):556-566.

51. Kim SJ, Shin SC, Hong SG, Lee YM, Choi IG, Park H. Genome sequence of a novel member of the genus *Psychrobacter* isolated from Antarctic soil. *J Bacteriol.* 2012. May;194(9):2403.

52. Murphy AC, Fukuda D, Song Z, Hothersall J, Cox RJ, Willis CL, Thomas CM, Simpson TJ. Engineered thiomarinol antibiotics active against MRSA are generated by mutagénesis and mutasynthesis of *Pseudoalteromonas SANK73390*. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011 Mar 28;50(14):3271-4.

53. Bosi E, Fondi M, Orlandini V, Perrin E, Maida I, de Pascale D, et al. The pangenome of (Antarctic) *Pseudoalteromonas* bacteria: evolutionary and functional insights. *BMC Genomics* (2017) 18:93

54. Seyedsayamdost, M.R., Case, R.J., Kolter, R., Clardy, J. (2011) The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. *Nat Chem* 3: 331– 335.

55. Majzoub ME, Beyersmann PG, Simon M, Thomas T, Brinkhoff T, Egan S. *Phaeobacter inhibens* controls bacterial community assembly on a marine diatom. *FEMS Microbiol Ecol.* 2019 Jun 1;95(6).

56. Leyton Y, Riquelme C. Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Rev. biol. mar. oceanogr.* 2008 Dic; 43(3): 441-456

57. Harold R, Stainer RY. The genera *Leucothrix* and *Thiothrix*. *Bacteriol Rev.* 1955 Jun;19(2):49-64.

58. Scheuermayer M, Gulder TA, Bringmann G, Hentschel U. *Rubritalea marina* gen. nov., sp. nov., a marine representative of the phylum 'Verrucomicrobia', isolated from a sponge (Porifera). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006 Sep;56(Pt 9):2119-24.

59. Van S, Mergaert J, Swings J. *Loktanella salsilacus* gen. nov., sp. nov., *Loktanella fryxellensis* sp. nov. and *Loktanella vestfoldensis* sp. nov., new members of the *Rhodobacter* group, isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004(54) 1263–1269.
60. Yin J, Chen J, Liu G, Yu Y, Song L, Wang X, Qu X. Complete Genome Sequence of *Glaciecola psychrophila* Strain 170T. *Genome Announc.* 2013 May 2;1(3).
61. Nedashkovskaya OI, Kim SG, Balabanova LA, Zhukova NV, Bakunina IY, Mikhailov VV. *Polaribacter staleyi* sp. nov., a polysaccharide-degrading marine bacterium isolated from the red alga *Ahnfeltia tobuchiensis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018 Feb;68(2):623-629.

7. [ANEXOS]



Figura 11. Extracción de *C. chamissoi* en la bahía de Paracas.



Figura 12. Identificación de especie *C. chamissoi*.