

**Diversidad Microbiana (Procariota y Eucariota) Asociada a Mantos De *Sargassum*
Pelágico y Agua Circundante En El Mar Caribe**

Edwin Martin Vera Goyeneche

Trabajo de Grado para Optar el título de Biólogo

Director

Dr. Luis Parmenio Suescún Bolívar

Facultad de Ciencias Sociales y Educación, Universidad de Cartagena

Codirector

Dr. Daniel Cerqueda García

Instituto de Ecología A. C.-INECOL

Universidad de Pamplona

Facultad de Ciencias Básicas

Programa de Biología

Pamplona, Colombia

2024

Dedicatoria

A mi madre

Agradecimientos

Especial agradecimiento a mis directores Luis Parmenio Suescun Bolivar y Daniel Cerqueda Garcia por acompañarme y ser partícipes en el desarrollo del trabajo de investigación, por sus consejos, conocimiento, sugerencias y tiempo brindados. Igualmente, aprecio la oportunidad de poder haber trabajado bajo su supervisión y valoro las lecciones aprendidas que serán parte importante en el futuro de mi carrera profesional y académica. Finalmente, agradezco la paciencia y el apoyo frente a los inconvenientes e imprevistos en el desarrollo y finalización de este trabajo.

Al grupo de trabajo del proyecto InvaSAR dirigido por Van Tussenbroek et al. (2022) (Brigitta I. van Tussenbroek; L. Verónica Monroy-Velázquez; Dení Rodríguez; L. Parmenio Suescún-Bolívar; Patricia E. Thomé; Daniel Cerqueda-García; José Q. García-Maldonado; Isis G. Martínez-López; José Antonio López-Portillo; M. Guadalupe Barba-Santos; Miguel Angel Gómez-Reali; J. Edgar Escalante-Mancera) por el aporte de sus datos colectados, para la realización de este trabajo de investigación. Aprecio el esfuerzo por la toma de datos en campo y tabulación, al igual que su confianza para permitir hacer uso de sus datos.

A las instituciones ejecutoras del proyecto InvaSAR: ICML-UNAM, UASA Puerto Morelos; el área técnica: CONABIO y a GEF-PNUD por el financiamiento. También al Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD).

Tabla de Contenido

Resumen.....	10
Abstract.....	11
1. Introducción.....	12
1.1 Descripción de <i>Sargassum</i>	12
1.2 Especies Holopelágicas de <i>Sargassum</i> (Sargazo).....	13
1.3. Los Mantos de Sargazo y su Importancia Ecológica.....	16
1.4. Problemática del Sargazo.....	18
1.5. Interacciones Macroalga-Bacteria.....	21
2. Antecedentes.....	25
2.1. Microbioma de <i>Sargassum</i> Pelágico.....	25
2.2. Microbioma de Agua de Mar.....	29
2.3. Informe InvaSAR.....	31
3. Planteamiento del Problema y Justificación.....	33
4. Objetivos.....	37
4.1 Objetivo General.....	37
4.2 Objetivos Específicos.....	37
5. Métodos.....	38
5.1. Análisis de Diversidad de Bacterioplancton.....	38

5.2 Análisis de Abundancia Diferencial.....	39
5.3 Análisis Bioinformático De Microorganismos Eucariotas.....	40
5.4 Análisis de Diversidad de Microorganismos eucariotas.....	41
6. Resultados.....	42
6.1. Estructura de la Comunidad de Bacterioplancton.....	42
6.2. Estructura de la Comunidad de Microorganismos Eucariontes.....	50
6.3. Abundancia Diferencial de la Comunidad de Bacterioplancton.....	54
7. Discusión.....	59
7.1. Comunidad Microbiana Asociada a Sargazo Pelágico y al Agua de Mar Circundante...	59
7.1.1 Comunidad de Bacterioplancton.....	59
7.1.2 Comunidad de Microorganismos Eucariotas.....	60
7.2 Estructura de las Comunidades Microbianas.....	61
7.2.1. Comunidad de Bacterioplancton.....	61
7.2.2. Comunidad de Microorganismos Eucariontes.....	66
7.3 Diversidad Diferencial del Bacterioplancton.....	68
8. Conclusiones.....	71
9. Recomendaciones.....	72
10. Referencias.....	73
11. Apéndice.....	85

Lista de Tablas

Tabla 1. Análisis PERMANOVA a partir de matriz Unifrac ponderada de comunidades de microorganismos eucariotas, las variables que se tomaron corresponden a el tipo de muestra (sargazo, agua), el sitio (zona frontal y posterior) y la fecha de muestreo (abril, junio; y julio).....	54
Tabla 2. Análisis PERMANOVA a partir de matriz Unifrac ponderada de comunidades de Bacterioplancton, las variables que se tomaron corresponden a el tipo de muestra (sargazo, agua), el sitio (zona frontal y posterior) y la fecha de muestreo (abril, junio; y julio).....	56

Lista de Figuras

Figura 1. Morfotipos de <i>Sargassum</i> pelágico comúnmente usados en estudios. a. <i>S. natans</i> I; b. <i>S. natans</i> VIII; y c. <i>S. fluitans</i> III. Tomado y adaptado de Robledo et al. (2021).....	14
Figura 2. Número de ASVs observados e Índices de diversidad (Shannon, Simpson; y InvSimpson) de la comunidad de bacterioplancton con base en: a. Tiempo (24 de abril; 1 de junio; y 2 de julio), b. Tipo de muestra (sargazo y agua), y c. Espacio (zona arrecifal posterior y frontal).....	44
Figura 3. Abundancia relativa de la comunidad de bacterioplancton a nivel de Filo en muestras de sargazo y agua circundante de zona arrecifal posterior y frontal en los diferentes tiempos de muestreo (24 de abril; 1 de junio; y 2 de julio).....	45
Figura 4. Abundancia relativa de la comunidad de bacterioplancton a nivel de Clase en muestras de sargazo y agua circundante de zona arrecifal posterior y frontal en los diferentes tiempos de muestreo (24 de abril; 1 de junio; y 2 de julio).....	46
Figura 5. Abundancia relativa de la comunidad de bacterioplancton a nivel de Familia en muestras de sargazo y agua circundante de zona arrecifal posterior y frontal en los diferentes tiempos de muestreo (24 de abril; 1 de junio; y 2 de julio).....	48
Figura 6. Abundancia relativa de la comunidad de bacterioplancton a nivel de Género en muestras de sargazo y agua circundante de zona arrecifal posterior y frontal en los diferentes tiempos de muestreo (24 de abril; 1 de junio; y 2 de julio).....	49
Figura 7. Número de ASVs observados e Índices de diversidad (Shannon, Simpson; y InvSimpson) de la comunidad de microorganismos eucariontes con base en: a. Tiempo (24 de abril; 1 de junio; y 2 de julio), b. Tipo de muestra (sargazo y agua), y c. Espacio (zona arrecifal posterior y frontal).....	51

- Figura 8.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la comunidad de microorganismos eucariotas en muestras de sargazo (M1-19, M1-15, M1-13 y M1-09) y agua circundante, basado en: **a.** distancia Unifrac ponderada y **b.** distancia Unifrac no ponderada. Las leyendas representan los tiempos de muestreo (Fecha) con coloración diferente (24 de abril; 1 de junio; y 2 de julio) y el sitio o zona con una figura diferente (zona arrecifal posterior y frontal).....53
- Figura 9.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la comunidad de bacterioplancton en muestras de sargazo (M1-19 y M1-15) y agua circundante, basado en: **a.** distancia Unifrac ponderada y **b.** distancia Unifrac no ponderada. Las leyendas representan los tiempos de muestreo (Fecha) con coloración diferente (24 de abril; 1 de junio; y 2 de julio) y el sitio o zona con una figura diferente (zona arrecifal posterior y frontal).....55
- Figura 10.** Análisis discriminante lineal (LDA) con tamaño del efecto (LEfSe) de la comunidad de bacterioplancton a nivel de Filo, Clase, Familia; y Género. Se tomó como clase el sitio (zona arrecifal posterior (rojo) y zona arrecifal frontal (verde)). Valor de LDA = 2 y P valor < 0.05. **a.** valores de LDA (Análisis discriminante lineal) **b.** Cladograma.....58

Lista de Apéndices

Tabla A1. ASVs observados e Índices de diversidad de Shannon, Simpson y InvSimpson de la comunidad de bacterioplancton. Las muestras corresponden a: muestreo 1 (2021-1, 24 de abril, M1), muestreo 2 (2021-2, 1 de junio, M3) y muestreo 3 (2021-3, 2 de julio, M6). Las muestras de sargazo son las correspondientes a M1-15 y M1-19.....84

Tabla B2. ASVs observados e Índices de diversidad de Shannon, Simpson y InvSimpson de la comunidad de microorganismos eucariotas. Las muestras corresponden a: muestreo 1 (2021-1, 24 de abril, M1), muestreo 2 (2021-2, 1 de junio, M3) y muestreo 3 (2021-3, 2 de julio, M6). Las muestras de sargazo son las correspondientes a M1-15, M1-19, M1-13 y M1-09.....85

Apéndice C3. Script de trabajo de diversidad microbiana procariota. Índices de diversidad de Shannon, Simpson y InvSimpson, ASVs observados, abundancia relativa, PCoA y PERMANOVA. Adaptado de Cerqueda García (2020).....87

Apéndice D4. Script de trabajo de diversidad microbiana eucariota. Índices de diversidad de Shannon, Simpson y InvSimpson, ASVs observados, PCoA y PERMANOVA. Adaptado de Cerqueda García (2020).....97

Resumen

Las especies holopelágicas del género *Sargassum* (*S. fluitans* y *S. natans*; también conocidos como sargazo), están recalando desde 2011 de forma masiva a las costas del Caribe causando

múltiples problemas. Sin embargo, estas algas pardas desempeñan de igual manera un papel importante en los ecosistemas acuáticos; proporcionan alimento y refugio a una gran cantidad de organismos marinos, muchos de los cuales se encuentran asociados a sus mantos. Una de las asociaciones que se destaca es la establecida de bacterias y otros microorganismos. Considerando lo anterior, en este estudio exploratorio se estimó la diversidad del bacterioplancton y microorganismos eucariotas asociados a sargazo pelágico y agua de mar circundante, tomando y comparando variables como la ubicación o zona de muestreo, el tiempo y tipo de muestra. Haciendo uso de las bibliotecas de 16S rADN de datos colectados en el sistema arrecifal de Puerto Morelos en el Caribe mexicano por parte del grupo de trabajo del proyecto InvaSAR se estimaron los índices de diversidad de Shannon, Simpson, InvSimpson, ASVs observados, y análisis complementarios como PCoA, LEfSE, y PERMANOVA. Todo apoyado del uso de herramientas de trabajo como R studio y Galaxy HubLab. Previo a esto todos los ASVs se filtraron para obtener los ASVs plastidicos de microorganismos eucariontes que fueron alineados y asignados haciendo uso del software BLAST + y la base de datos de NCBI. Se encontraron diferencias significativas para las comunidades microbianas de bacterioplancton y microorganismos eucariotas entre el tipo de muestras (sargazo y agua) y solo para bacterioplancton entre los tiempos de muestreo. Alphaproteobacteria fue el grupo más abundante en muestras de agua y Gammaproteobacteria en muestras de sargazo, con un enriquecimiento de *Vibrio*.

Abstract

Holopelagic species of the genus *Sargassum* (*S. fluitans* and *S. natans*; also known as *Sargassum*) have been massively landing on the Caribbean coasts since 2011, causing multiple problems. However, these brown algae also play an important role in aquatic ecosystems; they provide food and shelter to a large number of marine organisms, many of which are associated with their mantles. One of the associations that stands out is that of bacteria and other microorganisms. Considering the above, this exploratory study estimated the diversity of bacterioplankton and eukaryotic microorganisms associated with pelagic *Sargassum* and surrounding water, taking and comparing variables such as location or sampling area, time and type of sample. Using the 16S rDNA libraries of data collected in the Puerto Morelos reef system in the Mexican Caribbean by the InvaSAR project working group, we estimated the diversity indices of Shannon, Simpson, InvSimpson, observed ASVs, and complementary analyses such as PCoA, LEfSE, and PERMANOVA, all supported by the use of tools such as R studio and Galaxy HubLab. Prior to this, all ASVs were filtered to obtain the plastid ASVs of eukaryotic microorganisms that were aligned and assigned using the BLAST + software and the NCBI database. Significant differences were found for the microbial communities of bacterioplankton and eukaryotic microorganisms between the type of samples (*Sargassum* and water) and only for bacterioplankton between the sampling times. Alphaproteobacteria was the most abundant group in water samples and Gammaproteobacteria in *Sargassum* samples, with an enrichment of *Vibrio*.

1. Introducción

1.1 Descripción de *Sargassum*

Sargassum es un género de macroalga multicelular de la Familia Sargassaceae, Orden Fucales, perteneciente al grupo de algas pardas o café (Phaeophyta). Representa el género más diverso de macrófitos marinos con más de 350 especies (Mendonça et al., 2023), de importancia ecológica y económica, ya que diversas especies de este género ofrece refugio y alimento a gran cantidad de organismos y microorganismos, y a los seres humanos que las cultivan, por a su alto contenido en proteínas, aminoácidos, ácidos grasos y minerales (Redmond et al., 2014).

De manera general, este género cuenta con un talo o estipe provisto de una estructura denominada “holdfast” de forma discoide, cónico o rizoidal, que le permite adherirse a un sustrato (ausente en especies pelágicas). Este talo puede ramificarse dando lugar a otras “ramas”, las cuales soportan apéndices foliares denominados “filoides”, receptáculos y vesículas rellenas de aire (neumatocistos) (Mattio & Payri, 2010). Estas últimas estructuras son las encargadas de facilitar la flotabilidad al alga y permiten que se mantenga en posición vertical en la columna de agua (Martin, 2016).

A diferencia de las especies pelagicas que se reproducen por fragmentación vegetativa, el ciclo de reproducción de las especies bentonicas inicia con la producción de orgánulos femeninos (oogonio) y masculinos (anteridios), los cuales son formados en los receptáculos de las algas parentales. Cada anteridio produce cerca de 64 espermatozoides que son liberados al medio, luego se desplazan libremente hasta encontrar un “huevo” cercano para la fertilización. Posteriormente, cada oogonio extruye un espermatozoide encerrándolo en mucilago a partir de

una apertura del conceptáculo. Una vez fusionados los gametos, se forman esporofitos juveniles que se asientan en el sustrato y posteriormente crecen en un alga madura. Durante el crecimiento el holdfast o la base del alga dan lugar a uno o más ejes principales con varias ramas (estipes) que pueden alcanzar los 20 a 200 cm de largo; los estipes producen ramas primarias alargadas con ramas secundarias en disposición dística o en espiral; estas ramas posteriormente producen cuchillas de hojas dentadas (filoides), vesículas y receptáculos (Redmond et al., 2014).

1.2 Especies Holopelágicas de *Sargassum* (Sargazo)

Parr (1939), identificó las dos especies de sargazo pelágico más abundantes presentes en el mar de los sargazos y hasta la fecha las únicas, *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans* (Johns et al., 2020). Igualmente, describe los morfotipos de estas dos especies, *S. natans* I, *S. natans* II, *S. natans* VIII y *S. natans* IX, al igual que *S. fluitans* III y *S. fluitans* X (Martin, 2016; Mendoza-Becerril et al., 2020).

Las dos especies holopelágicas de *Sargassum* presentan rasgos taxonómicos diferentes desde un estipe terete o comprimido, nematocistos elípticos o esféricos y filoides linear a lanceolado, serrados (Camacho et al., 2014; Koffi et al., 2016) o dentados (Oyesiku & Egunyomi, 2014). Igualmente, el tamaño de sus filoides difiere. Los filoides de *S. natans* puede presentar un tamaño entre 1-4mm de ancho (Oyesiku & Egunyomi, 2014; Camacho et al., 2014) y entre 15-20 mm (Oyesiku & Egunyomi, 2014) hasta 80-100 mm de largo (Camacho et al., 2014). Para *S. fluitans* estas medidas están entre 3-8 mm de ancho y entre 20-60 mm de largo (Camacho et al., 2014; Koffi et al., 2016; de Széchy et al., 2012). Dentro de estas diferencias, se encuentra la presencia de espinas en el estipe de *S. fluitans* al igual que un neumatocisto que

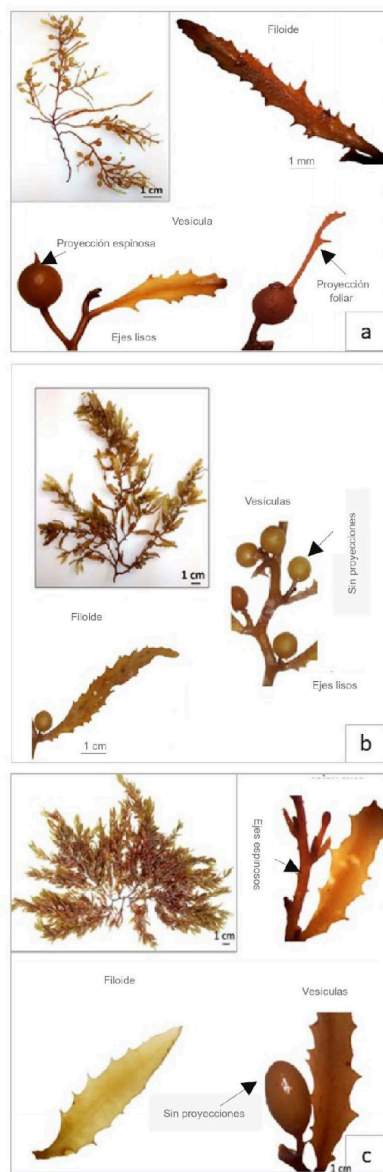


Figura 1.

Morfotipos de Sargassum pelágico comúnmente usados en estudios. a. S. natans I; b. S. natans VIII; y c. S. fluitans III. Tomado y adaptado de Robledo et al. (2021).

carece de proyección o “espina” y el pedúnculo que sostiene al nematocisto es largo y alado (presenta tejido alar). En el caso de *S. natans* su estipe es liso, pedúnculo largo sin tejido alar y su nematocisto presenta una “espina” (algunos de sus morfotipos) (Koffi et al., 2016; Oyesiku & Egunyomi, 2014).

Las diferencias morfológicas que se presentan en las dos especies de *Sargassum* pelágico, como la variación en el tamaño y la forma del filoide, en el número de vesículas y ramificación general, han llevado al reconocimiento de formas morfológicas distintas y fenotipos únicos. Estas distintas formas morfológicas determinan el valor del hábitat para la comunidad de fauna asociada, reflejándose en estas formas, diferencias en las comunidades de microbioma asociado y en su abundancia (Martin, 2016).

Sargassum natans y *S. fluitans* son especies holopelágicas únicas, y a diferencia de las especies bentónicas, estas se reproducen por fragmentación vegetativa, donde a partir de fragmentos del alga que pueden “desprenderse” debido a lesiones físicas o por la edad del filoide, se desarrollan directamente nuevos frondes o estipes ramificados (Koffi et al., 2016; Redmond et al., 2014). Estas dos especies presentan tasas de crecimiento más altas cuando la temperatura es mayor (Martin, 2016); siendo su temperatura óptima de 24° a 30° C y salinidades de 36 y hasta 42 partes por mil. Los requerimientos de nitrógeno y fósforo de estas macroalgas son reducidos por lo tanto encuentran oportunidades de crecimiento en aguas ligeramente enriquecidas como en zonas frontales (Uribe Martínez et al., 2020).

1.3. Los Mantos de Sargazo y su Importancia Ecológica.

El sargazo pelágico circula naturalmente en el mar Caribe, el Golfo de México y particularmente en una zona conocida como el Mar de los sargazos, en aguas oligotróficas tropicales y subtropicales del Atlántico Norte (Uribe Martínez et al., 2020; Marx et al., 2021); se encuentra en ambientes costeros de manera individual o como “mantos” vegetales flotantes, que comúnmente son conglomerados de estas macroalgas (Redmond et al., 2014). Los mantos de sargazo se forman a partir de vientos, olas, corrientes oceánicas, zonas de convergencia a lo largo de frentes, ondas internas y efectos de circulación superficial que se encargan de agrupar y dispersar al sargazo (Martin, 2016; Uribe Martínez et al., 2020) en configuraciones que van desde grandes mantos flotantes de decenas de metros de ancho (Michotey et al., 2020) a grupos aislados, filas largas (Martin, 2016), y hasta líneas de sargazo que se extienden a través de la superficie del océano a decenas de kilómetros (Franks et al., 2016).

En los mantos de sargazo, sin importar mucho su forma o composición de especies, se pueden encontrar asociadas diferentes especies pelágicas de peces en etapa temprana, hasta adultos que incluyen peces picudos, atunes, peces espada y peces delfín (Wells & Rooker, 2004; Wells & Rooker, 2009), así como crías y pequeños juveniles de tortugas marinas de varias especies (Witherington et al., 2012; Maurer et al., 2015; Rodríguez-Martínez et al., 2021), cientos de especies de invertebrados, crustáceos, moluscos, anélidos (Monroy Velázquez et al., 2019) y larvas de especies de los diferentes taxones nombrados anteriormente (Uribe Martínez et al., 2020). Además, más de 658 familias de bacterias y arqueas, distribuidas en 350 órdenes y 57 filos se han asociado con las especies pelágicas de sargazo (Chávez et al., 2020; Hervé et al., 2021). Como ejemplo de lo anterior, se puede mencionar a Coston Clements et al. (1991), donde

reportan más de 100 especies de peces y cuatro especies de tortugas marinas asociadas a sargazo pelágico. Seguidamente, Thiel & Gutow (2005) informan numerosas esponjas, hongos, bacterias, diatomeas y protistas asociadas en los mantos. Igualmente, Trott et al. (2010) reportan un total de más de 145 especies de invertebrados asociados (Huffard et al., 2014; Chávez et al., 2020).

Es claro el papel de los mantos de sargazo en el ecosistema marino del Mar de los Sargazos (Uribe Martínez et al., 2020), al ser un “albergue” de peces. Es por esto que ha sido designado como “hábitat esencial para los peces”, lo que manifiesta la importancia del sargazo como zona de crianza y desarrollo de especies de interés ecológico y comercial (Wells & Rooker, 2004; Uribe Martínez et al., 2020). De igual manera, se hace necesario destacar que existen al menos diez especies de invertebrados y 2 de vertebrados que son endémicos del sargazo (Uribe Martínez et al., 2020), como el pez *Histrion histrio* y *Syngnathus pelagicus* (Mendonça et al., 2023).

Por otra parte, estos mantos, proporcionan importantes zonas de alimentación y desove para peces pelágicos y aves marinas (Huffard et al., 2014), permitiendo el intercambio genético de cientos de especies (Uribe Martínez et al., 2020). También, proveen una entrada de nutrientes significativas a las comunidades bentónicas profundas debido a su hundimiento, suministran nutrientes a las dunas debido a su arribo y descomposición, y evitan la erosión de las playas (Maurer et al., 2015; Martin, 2016), debido a que absorben la energía de las olas y brindan protección contra vientos y huracanes (Williams et al., 2008). En contraparte, grandes volúmenes de sargazo varado en la playa y los lixiviados que se segregan pueden contribuir en la erosión de la misma (Arellano-Verdejo & Lazcano-Hernández, 2021).

1.4. Problemática del Sargazo

El arribo masivo de sargazo en las costas del Atlántico Norte, ha generado impactos económicos negativos, debido a la obstrucción tanto en redes de pescas y como en jaulas de acuicultura, e incluso pueden dificultar la navegación de los barcos (Kim et al., 2019). Igualmente, representa riesgos en la salud humana, debido a los gases que se desprenden como producto de su descomposición. Gases como ácido sulfúrico, sulfuro de hidrógeno y amoníaco, los cuales pueden llegar a provocar dermatitis, conjuntivitis, y afecciones del tracto respiratorio (Martínez-González, 2019). También, pueden derivar otros contaminantes como arsénico, metales pesados, plásticos y microplásticos que se incorporan a la red trófica y finalmente, debido al consumo de mariscos, terminan en el ser humano (Aldana Arana, 2020). El sargazo en descomposición, además de imponer cargas a los residentes como el olor desagradable, ocasiona problemas en el turismo, incluso genera costos en su remoción y remediación (Marx et al., 2021).

Las arribazones de sargazo posiblemente están ligadas a procesos oceánicos de gran escala, cuya dinámica es regida por el fenómeno del cambio climático (Uribe Martínez et al., 2020). Por este motivo, los factores ambientales podrían estar jugando un papel importante en el arribo masivo de sargazo pelágico en los últimos años. Además, se han sugerido otras causas para comprender las floraciones excesivas de esta macroalga en las que se incluyen: aumento en la carga de nutrientes en la cuenca del atlántico a través de descarga de los ríos debido a actividades de deforestación y malas prácticas agrícolas, régimen de viento anormal de 2009 a 2010 en el atlántico central oriental, cambios en la profundidad de la capa de mezcla relacionada con el suministro de nutrientes (Chávez et al., 2020), cambios en el afloramiento en el noreste de

áfrica y mar abierto (Johns et al., 2020) y entrada de polvo de arena rico en hierro y fósforo del desierto del Sahara (Rosellón-Druker et al., 2022). Sin embargo, la falta de datos de sargazo a gran escala dificulta que se logre llegar a una sólida conclusión (Wang et al., 2019).

Una de las mayores floraciones de sargazo pelágico que ocasionó mayor preocupación fue la registrada en 2011, siendo 200 veces más alta que el promedio de ocho años, dispersándose a lo largo del sur del Caribe y a través del Atlántico Norte, alcanzado hasta Sierra Leona y Ghana (Martin, 2016). Esta floración fue la primera registrada fuera del Mar de los sargazos (Uribe Martínez et al., 2020; Alleyne et al., 2023). En 2015 nuevamente se reportó una gran floración a gran escala en el sur del Caribe, 2,360 m³ de sargazo por km de playa (van Tussenbroek et al., 2017). En 2018, se realizaron reportes que superaron los registros históricos (Uribe-Martínez et al., 2020), llegando a alcanzar una densidad de 20 millones de toneladas húmeda en un área de 8,850 km (Rosellón-Druker et al., 2022). Se ha notado que estos eventos estuvieron precedidos por una intensa actividad de huracanes (Carrillo & Sheinbaum Pardo, 2020). Las causas de este arribo masivo aún son inciertas y pocos investigadores han llevado a cabo estudios en estas áreas (Martin, 2016).

Es igual de importante, mencionar los problemas que ocasionan las mareas marrones de sargazo (van Tussenbroek et al., 2017); las cuales se producen debido al lixiviado que emerge de estas macroalgas en descomposición. Como consecuencia de esto, el agua se torna de color marrón y provoca que el oxígeno y el pH disminuya, se reduzca el paso de luz y la calidad del agua empeore (van Tussenbroek et al., 2017; Chávez et al., 2020); igualmente causa altas cargas de materia orgánica y nutrientes (van Tussenbroek et al., 2017). Esta situación provoca la reducción en la fotosíntesis de fitobentos y fitoplancton, e induce la proliferación de bacterias

que pueden alterar la química del agua (Caballero Vázquez et al., 2020). Lo anterior puede llegar a ocasionar condiciones anóxicas e hipóxicas en el medio, desencadenando riesgos en la supervivencia de los peces, crustáceos, tortugas, tiburones pequeños, equinodermos, moluscos y poliquetos (Caballero Vázquez et al., 2020; Carrillo & Sheinbaum Pardo, 2020; Rodríguez-Martínez et al., 2021).

Las comunidades bentónicas de pastos marinos y corales, también pueden verse afectadas debido a las mareas marrón. Como consecuencia, la extensión y aspecto de los prados marinos puede verse afectado, la composición de especies puede cambiar, la densidad de la población puede alterarse y el sistema de enraizamiento llega a ser menos profundo (van Tussenbroek et al., 2017). Igualmente, el deterioro de la calidad de agua elicidado por la marea marrón, aunque aún sin ninguna evidencia directa, podría exacerbar las enfermedades emergentes en comunidades de arrecifes de coral (Chávez et al., 2020). Finalmente, es importante mencionar que las mareas marrones de sargazo afectan igualmente a las dunas, acuíferos, cenotes y al ecosistema de manglar, ocasionando la pérdida de hojas en los mangles, y amenazando la flora y fauna adherida a sus raíces (Chávez et al., 2020; Rosellón-Druker et al., 2022).

No solo los mantos de sargazo pelágico representan un problema para los ecosistemas marinos. Los grupos bacterianos patógenos asociados a macroalgas que se ven favorecidos por la disbiosis de la comunidad microbiana ensamblada y temperaturas elevadas en la superficie del mar (Egan & Gardiner, 2016; Michotey et al., 2020; Mendonça et al., 2023) pueden ser de igual manera una amenaza. *Vibrio* spp. (Michotey et al., 2020; Theirlynck et al., 2023) son un ejemplo de estos grupos, pueden tener estilos de vida patógenos (Egan & Gardiner, 2016; Mincer et al.,

2023) y causar enfermedades en humanos (Reidl & Klose, 2002; Baker-Austin et al., 2021) y en organismos marinos como corales (Rosenberg et al., 2009), bivalvos (Destoumieux-Garzon et al., 2020), camarones, peces (Austin & Zhang, 2006) y macroalgas (Ward et al., 2020).

La disbiosis entendida como un cambio en el microbioma por condiciones estresantes por las que pasa el hospedero, da paso a nuevos colonizadores que pueden convertirse en patógenos oportunistas (Minich et al., 2018). El aumento en la temperatura y concentración de CO₂ son algunas de las condiciones estresantes que desencadenan cambios en el microbioma asociado a la superficie de macroalgas y la columna de agua, que de igual manera responden diferente frente a estos estresantes climáticos (Minich et al., 2018). La contaminación también puede ser una condición estresante; como ejemplo se encuentran la exposición a microplásticos de poliestireno que inducen cambios significativos en la abundancia relativa del microbioma del agua, dando paso a cambios en la estructura y la función del microbioma (Ye et al., 2021).

1.5. Interacciones Macroalga-Bacteria

La superficie de las macroalgas representa un hábitat adecuado para diferentes estadios microscópicos y macroscópicos de epibiontes y microorganismos (Florez et al., 2017) que logran asentarse en la superficie manteniendo así una interacción. El asentamiento y multiplicación de las comunidades bacterianas se ve favorecido por los compuestos orgánicos que liberan las macroalgas, y promueven la formación de biopelículas microbianas, conformadas por comunidades complejas de bacterias, hongos, diatomeas, protozoos, esporas y larvas de invertebrados marinos (Singh & Reddy, 2014).

Las interacciones que mantienen las macroalgas con bacterias son importantes en la morfogénesis, crecimiento, defensa inmunitaria, suministro de nutrientes y protección contra colonización y depredación (Egan et al., 2012; Mei et al., 2019; Glasl et al., 2021). En estas interacciones, las bacterias desempeñan diferentes funciones mediadas por compuestos químicos. Como ejemplo se encuentra la talusina, un metabolito bacteriano implicado en la inducción de la morfogénesis y el crecimiento en algas marinas (Singh & Reddy, 2014), cabe mencionar que la actividad de la talusina se restringe a los grupos bacterianos *Cytophaga*, *Flavobacterium* y *Bacteroides* (Egan et al., 2012). Igualmente, las bacterias proporcionan CO₂, minerales y reguladores de crecimiento como una auxina (IAA) y una citocinina (cinetina); además de compuestos bioactivos como haliangicina, violaceína, pelagiomicina A, korormicina, macrolactinas G y M, y clorofila *d* que tienen propiedades antifúngicas, antiprotozoaria, anticrustante y antibiótica contra bacterias gram negativas y gram positivas (Singh & Reddy, 2014). Además, las bacterias participan en el metabolismo del nitrógeno a través de la fijación del nitrógeno, o la reducción disimilatoria de nitrato a amonio; esto beneficia la floración de algas hospederas frente a la competencia por nutrientes (Mei et al., 2019).

Las macroalgas proporcionan oxígeno y carbohidratos a sus bacterias asociadas, productos de la fotosíntesis. El carbono orgánico disuelto (DOC) liberado por las macroalgas, es asimilado y degradado por bacterias heterótrofas (Kouzuma & Watanabe, 2015; Mei et al., 2019). Igualmente, la macroalga per se, es fuente de carbono y energía para un gran número de bacterias, debido a los compuestos orgánicos que forman su pared celular, como algunos monosacáridos hidrosolubles como ramnosa, xilosa, glucosa, manosa y galactosa (Singh & Reddy, 2014) o carragenina, alginato, fucoidanos, laminarina, celulosa y pectina, que

probablemente son importantes en la colonización bacteriana (Egan et al., 2012). Es posible observar a las macroalgas y bacterias asociadas como una entidad funcional unificada u holobionte, esto bajo la premisa de las interacciones que mantienen, y son importantes para ambas partes (Egan et al., 2012).

Es importante mencionar que la composición y estructura de la comunidad de bacterias asociadas a las macroalgas difiere de aquella que se encuentra en la columna de agua (Michotey et al., 2020); así como en diferentes secciones del talo (Egan et al., 2012). En el caso de algas pardas, esto sucede debido a la diferenciación tisular preliminar. En *Sargassum*, se puede ver reflejado debido a las estructuras altamente especializadas que posee, como vesículas y hojas con distintas funciones de adaptación (Mei et al., 2019). Las condiciones del huésped, y la diversidad de estos microorganismos cambia en el espacio y tiempo (Huffard et al., 2014); cambios mediados posiblemente por condiciones locales cambiantes, como la fisiología del huésped o parámetros físicoquímicos (Egan et al., 2012). Igualmente, parámetros como la distancia de la orilla (ubicación) (Monroy Velázquez et al., 2019), complejidad estructural, punto de origen, edad de los mantos y la temperatura del agua determina la abundancia y diversidad de las comunidades asociadas a los mantos (Martin, 2016). De este modo, el efecto conjunto de diferentes factores a lo largo de la historia de vida de un manto de sargazo determinará su composición biótica, procesos y relaciones ecológicas, permitiendo formar una comunidad única en cada manto (Uribe-Martínez et al., 2020).

Las propiedades fisiológicas y bioquímicas de los diferentes grupos de macroalgas son de igual importancia, debido a que pueden proporcionar alguna explicación para la especificidad de las interacciones bacterias-macroalgas. Por ejemplo, el papel de los metabolitos secundarios

que se encuentran asociado a mecanismos que facilitan el asentamiento de otros microorganismos o a mecanismos de defensa frente a algunos grupos bacterianos (Florez et al., 2017), por medio de compuestos bioactivos con función antibacteriana y antifúngica (Lam & Harder, 2007). Los metabolitos de algas también representan una fuerza selectiva para la composición de la comunidad microbiana. Como ejemplo se encuentra la furanona que puede llegar a disuadir a la epibiotas ecológicamente relevante y alterar la composición de la comunidad de bacterias asociadas (Egan et al., 2012). Para entender mejor la estructura de la comunidad bacteriana asociada a las macroalgas es importante no perder de vista la selectividad, distribución espacial o distribución de los taxones asociados en los tejidos y función de los grupos bacterianos (Mei et al., 2019).

Como ya se había mencionado, los cambios espaciales y temporales que experimenta el sargazo determinan la composición y estructura de su microbioma asociado (Huffard et al., 2014; Serebryakova et al., 2018). Se cree que estas variaciones estacionales están relacionadas con el efecto combinado de los factores bióticos (ciclo de crecimiento y edad de tejido del alga) y abióticos (temperatura del agua de mar). Otros factores bióticos incluyen interacciones (incluida la competencia) entre taxones bacterianos, así como la interacción con otros taxones (pastoreo y alimentación cruzada). En cuanto a los factores abióticos, es probable que el aumento de temperatura del agua en el verano modifique la composición de la comunidad bacteriana; igualmente se espera que el cambio climático y la acidificación de los océanos intensifiquen este cambio (Huffard et al., 2014). En vista de lo anterior, parece que la ecología y el desarrollo de las macroalgas no pueden entenderse completamente sin considerar la interacción con sus microorganismos asociados (Egan et al., 2012; Florez et al., 2017).

2. Antecedentes

2.1. Microbioma de *Sargassum* Pelágico

Han sido pocos los estudios sobre los microorganismos asociados a *Sargassum* pelágico, especialmente sobre los protistas que se ensamblan en la superficie de las especies pelágicas de *Sargassum* (Torralba et al., 2017; Baker et al., 2018; Michotey et al., 2020; Hervé et al., 2021; Theirlynck et al., 2023; Mendonça et al., 2023; Mohapatra, 2023; y Salgado-Hernández et al., 2023).

Torralba et al. (2017) evaluaron el efecto del aceite macondo prospect 252 sobre la comunidad bacteriana asociada a *Sargassum* pelágico y agua de mar, a partir de muestras no engrasadas y engrasadas en el norte del Golfo de México. Los resultados mostraron una composición microbiana similar en muestras de *Sargassum* independientemente a la exposición del aceite. La comunidad microbiana estuvo dominada por Proteobacterias, Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia y bacterias no clasificadas. Igualmente, taxones como Rhodobacteraceae sin clasificar, Saprospiraceae sin clasificar, Sphingobacteriales sin clasificar fueron abundantes en las muestras de *Sargassum* engrasadas y no engrasadas, esto sugirió que el aceite no ejerce un fuerte efecto sobre el cambio en la composición de la comunidad microbiana. Lo opuesto sucede para las comunidades microbianas asociadas a las muestras de agua expuesta al aceite y las que no; las cuales mostraron una variación entre comunidades. Las muestras de agua estaban principalmente dominadas por Proteobacterias, Firmicutes y Bacteroidetes; junto con *Psychrobacter*, *Sulfitobacter* y *Salagentibacter*.

En el estudio de Michotey et al. (2020) los taxones más abundantes asociados con las especies pelágicas de sargazo fueron Rhodobacterales, Alteromonadales, Sphingobacteriales, Flavobacteriales y Vibrionales. En el estudio realizó un análisis de comunidades bacterianas asociadas a tres morfotipos de sargazo pelágico (*S. natans* I, VIII y *S. fluitans* III), sargazo bentónico (*Sargassum hystrix* y *Sargassum furcatum*) y agua de mar en el atlántico central, mar caribe y mar de los sargazos. Se mantuvo el enfoque sobre los factores que favorecen la aparición *Vibrio* en las especies pelágicas de *Sargassum*; y se encontró que las tasas de crecimiento de sargazo, el amonio y nitrito in situ favorecieron la aparición de *Vibrio*. Igualmente, la abundancia de *Vibrio* fue menor en las muestras de agua en comparación con las de sargazo pelágico y bentónico. Se encontró de igual manera, que los morfotipos de *Sargassum* no exhiben un impacto significativo sobre la comunidad bacteriana.

Vibrionales, resulta ser abundante en muestras de sargazo (Michotey et al., 2020; Theirlynck et al., 2023; Mendonça et al., 2023). Esta familia podría contribuir al ciclo del nitrógeno y potencialmente al metabolismo del nitrógeno del huésped, de igual manera contribuye al ciclo del carbono orgánico marino. Sin embargo, algunas especies de este género, representa posibles riesgos sanitarios y podrían desencadenar enfermedades en humanos (Reidl & Klose, 2002; Baker-Austin et al., 2021; Hervé et al., 2021). La presencia de *Vibrio* en sargazo pelágico se registra inicialmente en el estudio de Michotey et al. (2020), puesto que Torralba et al. (2017) no reportan este taxón en su estudio.

Los estudios más recientes que se han realizado sobre las comunidades bacterianas asociadas con sargazo pelágico son cuatro, el de Theirlynck et al. (2023); Mendonça et al. (2023); Mohapatra. (2023) y Salgado-Hernández et al. (2023). En este primer estudio se

colectaron muestras de *S. natans* I, VIII y *S. fluitans* III en diferentes zonas del atlántico central y Martinica, cerca de la costa de México, Mar caribe y aguas cercanas al Área Recreativa Estatal del Cabo Florida. En este estudio encontraron que la abundancia relativa de las comunidades microbianas asociadas a nivel de familia difiere entre genotipos, aunque las familias predominantes siguieron siendo abundante entre los genotipos. Por lo tanto, la composición microbiana asociada a los tres genotipos de sargazo fue significativamente diferente, opuesto a lo registrado en el estudio de Michotey et al. (2020). Las familias más abundantes encontradas correspondieron a Pseudomonadaceae, Rhodobacteraceae, Vibrionaceae, Microtrichaceae, Phormidesmiaceae y Nostocaceae.

En cuanto el estudio de Mendonça et al. (2023) muestra los cambios en la comunidad bacteriana asociada a *S. natans* VIII y *S. fluitans* III bajo un evento de varamiento simulado en tres periodos de tiempo (0, 24 y 48 horas). La abundancia dentro de los órdenes asociados fue similar entre los morfotipos, pero varía en función a los periodos de tiempo. Antes del inicio de la simulación los taxones dominantes fueron Proteobacterias, Actinobacterias, Bacteroidetes, Cianobacterias y Firmicutes. En el inicio de la simulación los taxones dominantes fueron representados por Rhodobacterias, Microtrichales, Firmicutes no identificado, Phormidesmiales y Rhizobiales. Tras las 24 horas, Alteromonadales domino, y luego de 48 horas, Vibrionales fue dominante. Esto refleja la disbiosis que sufre el microbioma después de 24 horas de “varamiento”, lo cual ocasiona un descenso de órdenes bacterianos y un desplazamiento de los grupos dominantes y funcionales. Es importante destacar que los cambios en la estructura y composición de las comunidades bacterianas que se encontraron en este estudio indican que cada especie diferente de *Sargassum* conserva una comunidad microbiana diferente tras el

varamiento.

Mohapatra. (2023) caracterizó la filogenia y funcionalidad y evaluó la composición taxonómica y potencian funcional del microbioma asociado a residuos de *Sargassum* pelágico (*S. fluitans* y *S. Natans*) en dos playas diferentes (Harrismith y Long Beach) frente a la costa de Barbados. Los grupos bacterianos predominantes en las muestras de biomasa descompuesta de sargazo fueron representados por los filos Proteobacteria, Bacteroidetes y Planctomycetes y las familias Flavobacteriaceae, Synergistaceae, Rhodobacteraceae y Spirochaetaceae.

Salgado-Hernández et al. (2023) muestran la comunidad bacteriana asociada a sargazo pelágico involucrada en el rendimiento del metano. Al comparar el inóculo y dos pretratamientos de biomasa de sargazo (lavado de agua y remoción química) obtienen que los filos con mayor abundancia son Bacteroidota, Firmicutes, Thermotota, Planctomycetota, Synergistota, Spirochaetota y Chloroflexi; igualmente no observan diferencias en los taxones dominantes a nivel de filo entre los pretratamientos y el inculó.

Finalmente, importante destacar los protistas asociados con sargazo pelágico (*S. fluitans*, Baker et al. (2018)), entre estos se encuentran representantes de la mayoría de los grupos filogenéticos, pero los flagelados heterótrofos son los más representativos. Entre estos se destacan: criptomonas, apusomonas, taumatomonas, coanoflagelados, estramenopilos, cercoconadas, bodonidos, euglenoideos y dinoflagelados. Igualmente, los rizópodos, foraminíferos, percolozoa y rizarianos (Baker et al., 2018). Es importante también mencionar el informe de Herve et al. (2021) que examinó la comunidad microbiana eucariota y procariota asociada a sargazo en dos islas de las Antillas menores (Guadalupe y Martinica), tomando

muestras de sargazo y de agua de mar; su objetivo, examinar las diferencias entre las comunidades microbianas procariotas y eucariotas de sargazo sp. En su informe registra a Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Spirochaetes y Firmicutes como abundantes en muestras de sargazo y en agua de mar de sitios de marea y del microbioma eucariota a Bacilliophyta (Diatomeas).

2.2. Microbioma de Agua de Mar.

Diferentes regiones oceánicas albergan distintas comunidades de bacterioplancton (Sjöstedt et al., 2014), incluido comunidades eucariotas que forman parte de los ecosistemas microbianos conocidos en océanos, agua dulce y en la tierra (Keeling & del Campo, 2017). Son diferentes las condiciones ambientales físicas y químicas que pueden influir en la estructura (Gill et al., 2022) y composición (Sjöstedt et al., 2014) de la comunidad bacteriana marina. La temperatura, profundidad de mezcla de superficies, salinidad, concentración de nutrientes y las interacciones biológicas son condiciones a tener en cuenta (Sjöstedt et al., 2014; Gill et al., 2022). Gill et al. (2022) informan la influencia de la temperatura en la disimilitud de la comunidad de bacterioplancton y como es una condición importante en la determinación de la estructura de la comunidad; igualmente mencionan que la diversidad de bacterioplancton es más alta en muestras de agua superficial que en profundas. Identificaron también que la densidad de sargazo influye en el ensamblaje de bacterias.

La profundidad también es una condición importante que influye en las comunidades picoeucariotas, ciertos grupos se ven favorecidos por el gradiente de profundidad del agua, como Radiolaria que aumenta con la profundidad, o Stramenopiles que mayormente están representados en zona eufótica (Not et al., 2007). Kim et al. (2011) informa que el

enriquecimiento con nutrientes orgánicos e inorgánicos en un ensamblaje de protistas contenidos e incubados en tres tiempos diferentes (0,24,72 horas) influye en los cambios de la estructura y composición de los protistas, siendo el contenido de nutrientes otra condición importante.

Finalmente, Vigil et al. (2009) haciendo uso del análisis de fragmentos de ADN (Polimorfismos de fragmento de restricción terminal (T-RFLP)) informan sobre la heterogeneidad espacial y temporal dentro de la comunidad microbiana eucariota del agua de mar, con observaciones que se suman para comprender cómo la composición de la comunidad microbiana eucariota puede variar, y considerando cómo los cambios sutiles en las condiciones ambientales pueden dar paso a cambios considerables en los taxones dominantes de esta comunidad eucariota dentro de los estuarios.

Diferentes informes han registrado la microbiota asociada al agua de mar. En el presente trabajo destacamos a Glasl et al. (2020), quienes evalúa las implicaciones funcionales para los microbiomas asociados a esponjas (*Coscinoderma mathewsi*), macroalgas (*Sargassum* spp) y agua de mar en Geoffrey Bay, Magnetic Isla (Gran Barrera de Coral, Queensland, Australia); igualmente informan un enriquecimiento significativo en muestras de agua de Bacteroidetes, SAR324, Marinisomatota Planctomycetes, Verrucomicrobia, Cyanobacteria y Proteobacteria. También se destaca a Sjöstedt et al. (2014) y Gill et al. (2022), los dos trabajos realizados en el mar de los sargazos y con muestras de la masa de agua. Sjöstedt et al. (2014) informa los taxones más abundantes correspondientes a Actinobacteria, Cyanobacteria, Alphaproteobacteria (clado SAR 11), Gammaproteobacteria (Clado SAR 68), Rhodobacterales (*Roseobacter*), y con menor abundancia Bacteroidetes, *Synechococcus* y *Prochlorococcus* y Gill et al. (2022) informan a Proteobacteria, Cyanobacteria y Bacteroidetes con mayor abundancia relativa. Finalmente, Hervé et al. (2021) informan los eucariotas con mayor abundancia en el agua de

mar, estos corresponden a Bacilliophyta, Florideophyceae, Ulvophyceae and Dinophyceae.

2.3. Informe InvaSAR

Como referente es importante mencionar el proyecto InvaSAR dirigido por Van Tussenbroek et al. (2022), llevado a cabo durante el periodo 2020-2022. Proyecto en el que se desarrolla y ejecuta un protocolo para el estudio de la flora y fauna asociada a los mantos de sargazo, los movimientos de los mantos de sargazo cuando se desplazan hacia la costa, igualmente se realiza el monitoreo de la calidad del agua en zonas que han sido afectadas por las mareas marrones de sargazo. El proyecto fue llevado a cabo en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos (PNAPM) en el norte del caribe mexicano. Los resultados de los capítulos que se detallan en el proyecto fueron recopilados siguiendo los protocolos previamente elaborados por Van Tussenbroek et al. (2021).

El proyecto incluye un estudio completo de la composición de *Sargassum* spp. en los mantos, su comunidad de macrofauna, epifauna, epiflora, microbioma y peces, su dinámica (estudio a la deriva de los mantos), y su impacto (calidad de agua). Es igual de importante destacar una de las conclusiones generales del proyecto afines con el trabajo que se plantea desarrollar. “Sargazo tiene un microbioma distinto al agua del mar con una dominancia de *Vibro* spp., y las arribazones de sargazo influyen en la comunidad de bacterioplancton del agua del mar” (VanTussenbroek et al., 2022).

En el capítulo tres del protocolo establecido en el proyecto InvaSAR (Van Tussenbroek et al., 2021) se aborda las comunidades de bacterioplancton y microbioma de sargazo (Suescún-Bolívar et al., 2021 (Cap. 3 del Protocolo 2021 e informe 2022, del proyecto

INVASAR)). En su trabajo se caracterizó la comunidad de bacterias asociadas a las especies de sargazo pelágico y el agua superficial en zona arrecifal frontal y posterior. Es importante mencionar de este trabajo que las muestras de sargazo mantenían una alta abundancia del género *Vibrio*, contrario a las muestras de agua donde fue menor; las comunidad bacteriana asociada al sargazo difiere de las comunidades del agua superficial y las muestras de agua del arrecife frontal exhibieron una mayor diversidad y número de ASVs, aunque sin una diferencia marcada en su dominancia. Lo mismo sucede con las muestras de sargazo del arrecife frontal, que representaron una dominancia en su comunidad de bacterioplancton. Finalmente mencionar las clases más abundantes; para las muestras de agua fueron Alphaproteobacteria, Bacteroidia, Oxyphotobacteria y Thermoplasmata, y para el sargazo Gammaproteobacteria.

3. Planteamiento del Problema y Justificación

Las arribazones masivas de *Sargassum* en las costas del océano Atlántico norte tropical ha despertado interés en la sociedad y en la comunidad científica. Dicho interés se debe a la problemática que generan sobre los arrecifes coralinos, las praderas de pastos marinos, dunas costeras y animales marinos como tortugas, peces, crustáceos y moluscos (van Tussenbroek et al., 2017; Caballero Vázquez, et al., 2020; Uribe-Martínez et al., 2020). Además, ocasionan problemas en la economía local, impidiendo la navegación de los barcos y obstruyendo las redes de pesca (Kim et al., 2019), y generan impactos negativos en el turismo y en la salud de las personas, debido a los gases que se pueden desprender como producto de su descomposición (Marx et al., 2021). Está claro que las floraciones masivas y posterior arribo del sargazo en la costa representa un problema ambiental y económico.

Los mantos pelágicos de sargazo, tienen asociados una gran cantidad de organismos que incluyen peces, crustáceos, algas, bacterias e invertebrados (Uribe-Martínez et al., 2020). Una de las asociaciones más importantes que establece el sargazo es con las bacterias; esto se debe a que estos microorganismos son de gran importancia en la morfogénesis y metabolismo de esta macroalga (Mei et al., 2019). Tanto las algas como las bacterias obtienen un beneficio de esta asociación. Por una parte, las bacterias proporcionan CO₂, minerales y vitaminas a las algas, además, de participar en el metabolismo del nitrógeno, previéndole una ventaja a su hospedero frente a la competencia por nutrientes (Singh & Reddy, 2014; Mei et al., 2019). En contraparte, las algas proporcionan oxígeno, carbohidratos y carbono orgánico disuelto (DOC) (Kouzuma & Watanabe, 2015; Mei et al., 2019).

Los microorganismos asociados a los mantos pelágicos de sargazo, pueden de igual manera representar una problemática. Microorganismos que imponen una amenaza en los ecosistemas costeros y el microbioma local, al ser introducidos y extraños a la comunidad propia de estos ecosistemas (Mendonça et al., 2023). Vibrionales y Alteromonadales órdenes que cuentan con géneros como *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* y *Alteromonas* con algunas especies patógenas son los mayores representantes de esta amenaza, se ven favorecidos por temperaturas elevadas en la superficie del mar, además de ser oportunistas y de crecimiento rápido (Michotey et al., 2020; Mendonça et al., 2023). Además, algunas especies de *Vibrio* pueden ser patógenos (Egan & Gardiner, 2016; Mincer et al., 2023; Michotey et al., 2020; Theirlynck et al., 2023), causando enfermedades en humanos (Reidl & Klose, 2002; Baker-Austin et al., 2021) y organismos marinos como corales (Rosenberg et al., 2009), bivalvos (Destoumieux-Garzon et al., 2020), camarones, peces (Austin & Zhang, 2006) y macroalgas (Ward et al., 2020).

Los grupos bacterianos patógenos oportunistas también se pueden ver favorecidos por la disbiosis del microbioma asociado a macroalgas (Egan & Gardiner, 2016; Theirlynck et al., 2023). La disbiosis da paso a un estado perturbado en el microbioma (Minich et al., 2018), las comunidades microbianas de muestras blanqueadas son un ejemplo de este estado. Estas comunidades de muestras sanas y blanqueadas pueden verse afectadas por la ubicación de las muestras y dar paso a diferencias en su composición y estructura (Zozaya-Valdes, et al., 2015 3). Una de las principales causas de la variación en la composición y estructura de las comunidades de bacterias es el hábitat, al igual que las condiciones del huésped y ubicación geográfica; así mismo, la abundancia de estas comunidades cambia en el espacio y tiempo (Huffard et al., 2014; Theirlynck et al., 2023; Mendonça et al., 2023; Glasl et al., 2021).

Existe una necesidad urgente de estudios de microbioma espacial y temporal más amplios, en particular de especies que forman hábitat como las macroalgas (Egan & Gardiner, 2016). En el presente trabajo de investigación se caracterizó la estructura de la comunidad de bacterioplancton y microorganismos eucariotas asociados a mantos de sargazo pelágico y agua de mar circundante, tomando el espacio (ubicación), el tiempo y el tipo de muestra como variables a comparar, para observar mediante muestras de referencia de sargazo si la comunidad microbiana asociada difiere de las muestras de agua, y a su vez si las comunidades microbianas asociadas al agua circundante sufren cambios espaciales (ubicación) y temporales. Bajo lo anterior se formuló la siguiente pregunta de investigación: ¿la comunidad de bacterioplancton y microorganismos eucariotas asociados al agua de mar circundante del arrecife coralino presentan cambios en el espacio – tiempo, y difiere de aquella comunidad asociada a sargazo?.

Los datos de las comunidades microbianas pueden ser una herramienta eficaz de monitoreo ambiental, pueden permitir identificar microorganismos patógenos que desencadenan enfermedades y entender cómo los cambios en la estructura de las comunidades afectan la salud de los hospederos (Egan & Gardiner, 2016), también son de interés para la conservación biológica, en especial de zonas costeras donde recala el sargazo (Theirlynck et al., 2023). Es importante no solo para la prevención y gestión de riesgos, también por la asociación que mantiene con otros microorganismos, y por la gran diversidad de organismos y microorganismos que alberga. Es así como este trabajo de investigación aporta un registro de la diversidad de bacterioplancton y en especial de microorganismos eucariontes asociados a sargazo pelágico y el agua de mar circundante en el caribe mexicano, Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos

(PNAPM). También informa la gran abundancia de *Vibrio* en comunidad de bacterioplancton ensambladas en los mantos pelágicos de sargazo en el Atlántico Norte.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Estimar la diversidad de la comunidad de bacterioplancton y microorganismos eucariontes asociada a *Sargassum* pelágico y al agua de mar circundante del sistema arrecifal en el Parque Nacional Arrecifes de Puerto Morelos (PNAPM) en el Caribe mexicano.

4.2 Objetivos Específicos

Caracterizar la estructura de la comunidad de bacterioplancton asociada a *Sargassum* pelágico y al agua de mar circundante, en las zonas arrecifales frontal y posterior.

Caracterizar la estructura de la comunidad de microorganismos eucariontes asociados a *Sargassum* pelágico y al agua de mar circundante, mediante secuencias del gen ribosomal 16S de cloroplastos y mitocondrias.

Determinar la variación en la composición de la comunidad de bacterioplancton asociada a *Sargassum* pelágico y al agua de mar circundante, frente al cambio espacial (arrecife frontal y posterior)

5. Métodos

Este trabajo parte de los datos obtenidos por Suescún-Bolívar et al., 2021 (Cap. 3 del Protocolo 2021 e informe 2022, del proyecto INVASAR). Las muestras fueron tomadas en zona arrecifal frontal (2.5 a 4.1 km de la costa) y posterior (0.1 y 2.0 km de la costa) en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos (PNAPM) en las fechas del 21 de abril (2021-1), 1 de junio (2021-3), 2 de julio (2021-6). Luego realizaron la extracción de ADN y amplificación de rADN 16s (PCRs de la region V4-V5, cebadores: 515F:

5'-(TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG)GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3', y el (MiSeq adapter) + 926R

5'-(GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG)CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3'). Finalmente, prepararon las bibliotecas 16S rADN Illumina MiSeq y el procesamiento y análisis de secuencias. Para conocer más detalles del tratamiento de datos previo, ver informe “InvaSAR” (Van Tussenbroek et al., 2022).

Partiendo del tratamiento de datos mencionado y del procesamiento y análisis de secuencias se caracterizó la estructura de la comunidad de bacterioplancton y microorganismos eucariontes asociados al agua de mar circundante y sargazo pelágico y se determinó la variación en la composición de las comunidades de bacterioplancton entre los sitios de muestreo (zona frontal y posterior).

5.1. Análisis de Diversidad de Bacterioplancton.

Los datos obtenidos del procesamiento y análisis de las secuencias hipervariables V y VI del rDNA 16 S por Suescún-Bolívar et al., 2021 (Cap. 3 del Protocolo 2021 e informe 2022, del proyecto INVASAR) se importaron al software R studio vs 4.3.1. Haciendo uso de bibliotecas

como Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013), y ggplot2 (Wickham, 2016) se generó un objeto Phyloseq con el cual se estimaron los índices de diversidad de Shannon, Simpson, InvSimpson y ASVs observados, y la abundancia relativa.

Previo a estimar los índices, se filtraron las secuencias no bacterianas correspondientes a cloroplastos y mitocondrias para analizarlas por separado; de igual manera se estandarizaron las muestras por rarefacción a un esfuerzo de $\geq 7,500$ lecturas los análisis. El esfuerzo de muestreo se ajustó con el fin de conservar dos muestras de sargazo para hacer comparaciones entre las muestras de agua circundante. Después de la rarefacción se eliminaron siete muestras al no cumplir con la profundidad de muestreo, trabajando al final con quince muestras con las que se realizaron los índices de diversidad (Shannon, Simpson, InvSimpson; y ASVs observados) y abundancia relativa para estimar la diversidad alfa. Para la diversidad beta se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) y PERMANOVA (análisis multivariado permutado de la varianza).

Para realizar el PCoA y el PERMANOVA y así determinar diferencias significativas entre las zonas, fechas y tipo de muestra, se construyó una matriz de distancia Unifrac ponderada y no ponderada. El análisis de coordenadas principales (PCoA) se realizó por medio de la librería Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) y ggplot2 (Wickham, 2016). Por último, mediante la librería Vegan (Oksanen, 2024) se realizó un PERMANOVA con permutaciones de 999 a partir de la matriz Unifrac ponderada.

5.2 Análisis de Abundancia Diferencial

Para determinar la variación en la composición de la comunidad de bacterioplancton asociada a sargazo pelágico y agua de mar circundante se realizó un análisis discriminante lineal

(LDA) con tamaño del efecto (LEfSe). Para esto se exportó un archivo .lefse de los datos de bacterioplancton rarefractados y estandarizados, haciendo uso de la biblioteca phyloseqCompanion del software R studio. El archivo se cargó en la página web de Galaxy hub lab (Huttenhower Lab Galaxy Server 2.0). Se tomaron los niveles taxonómicos de Filo, Clase, Familia, y Género, y como clase el sitio de muestreo. Finalmente, se ajustó el valor de LDA = 2 y el P valor < 0.05.

5.3 Análisis Bioinformático de Microorganismos Eucariotas.

Las secuencias de ASVs no bacterianos fueron recuperadas a partir de un filtro inverso haciendo uso del software R studio vs 4.3.1 y las bibliotecas Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) y Biostrings (Pagès et al., 2022). La librería Biostrings también se utilizó para exportar los ASVs recuperados (304). Aunado a lo anterior, con el software BLAST + 2.14.1 se realizó la búsqueda de secuencias homólogas utilizando las bases de datos refseq_rna y luego nt (nucleotido) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) ajustando las secuencias máximas de objetivo a diez y cinco respectivamente, se ajustó de esta manera debido a que la base nt es más grande y por impedimentos de recursos de la CPU del dispositivo de trabajo. Las secuencias homólogas se importaron al software R studio en formato tabular (.txt) donde se filtraron para conservar la secuencia (hit) con mayor porcentaje de identidad para cada ASVs de referencia. El filtro se realizó ordenando las secuencias homólogas de mayor a menor porcentaje de identidad, luego se eliminaron los ASVs de referencia duplicados y se conservó sólo la primera secuencia (hit con mayor porcentaje de identidad) para cada ASVs.

Las secuencias (hits) con mayor porcentaje de identidad se utilizaron para obtener su descripción de parte de su taxonomía y el gen o región genómica haciendo uso de la función

read.GenBank de la librería APE (Análisis de filogenética y evolución, Paradis et al., 2004). A partir de la descripción se filtraron los hits utilizando las palabras "Eukaryota, Chlorobiota group, Viridiplantae " para los hits obtenidos de la base refseq_rna y ""chloroplast, plastid, eukaryote, mitochondrion, mitochondrial"" para la base nt.

Finalmente, se obtuvieron 145 hits correspondientes a microorganismos eucariontes, a partir de estos hits se construyó un objeto phyloseq con la función prune_taxa de la librería phyloseq comparando el Id de los ASVs de los hits obtenidos con el id de los ASVs del objeto phyloseq que contenía a todos los ASVs. Al final se obtuvieron 140 ASVs debido a que 5 hits estaban repetidos.

5.4 Análisis de Diversidad de Microorganismos eucariotas

Partiendo del objeto Phyloseq se estimaron los índices de Shannon, Simpson, InvSimpson y ASVs observados. Debido a que no se puede conocer la taxonomía de los ASVs eucariontes por medio de organelos, no se realizó la abundancia relativa.

Luego los datos se normalizaron (conservando las 22 muestras), con la “Normalización de la escalada de sumas acumuladas” o CSS con la función phyloseq_transform_css de la librería metagMisc (Mikryukov, 2017). Haciendo uso de los datos normalizados se realizó el PCoA y PERMANOVA siguiendo el mismo procedimiento que se realizó con la comunidad de bacterioplancton.

6. Resultados

Como resultado del procesamiento y análisis de secuencias de bibliotecas rADN 16S previamente realizado por Suescún-Bolívar et al., 2021 (Cap. 3 del Protocolo 2021 e informe 2022, del proyecto INVASAR)) se obtuvo un total de 2,515 ASVs (Variantes de secuencias de amplicón), 64 ASVs pertenecen al dominio Archaea, 2,364 al dominio Bacteria y 87 ASVs no asignados. Posterior a aplicar el filtro para excluir secuencias no bacterianas se obtuvo un total de 304 ASVs correspondientes a secuencias de cloroplastos y mitocondrias. Finalmente tras estandarizar la muestras por rarefacción se obtuvo un total de 1,664 ASVs bacterianos, los cuales se tomaron para iniciar a estimar los índices de diversidad (Shannon, Simpson, InvSimpson; y ASVs observados), PCoA, PERMANOVA y LEfSe.

6.1. Estructura de la Comunidad de Bacterioplancton.

El número de ASVs observados (Figura 2a) en el mes de julio mostró ser más alto, seguido del mes de junio y con una menor cantidad el mes de abril. Sin embargo, en el mes de abril se observa el segundo valor de ASVs observados más alto (M1-15 con 316) (Tabla A1), correspondiente a una muestra de sargazo de la zona frontal.

El índice de Shannon, Simpson e InvSimpson (Figura 2a) para las muestras colectadas en el mes de julio mostró ser el más alto, seguido de las muestras de junio y abril. En cuanto a las muestras del mes de junio y julio, presentan índices similares. En el índice de Simpson e InvSimpson (Figura 2c) las muestras del mes de junio y julio en zona posterior y frontal presentan una proximidad entre sí; contrario a las muestras del mes abril, que son más distantes y con los valores más bajos, exceptuando a M1-15. Esta observación es diferente en el índice de Shannon (Figura 2c) donde las muestras del mes de junio y abril en la zona frontal presentan

una proximidad entre sí, son las muestras del mes de julio las más distantes y con valores más altos (exceptuando a M1-15).

La muestra de sargazo de la zona frontal (M1-15 Índice de Shannon de 4,3015) presenta el valor más alto, opuesto a la muestra de sargazo de zona posterior M1-19 que presenta el valor más bajo (3,379) (Tabla A1) y (Figura 2c); esto muestra un gran contraste entre estas dos muestras de sargazo (Figura 2b). Esta observación se puede apreciar del mismo modo en el índice de Simpson e InvSimpson (Figuras 2c y 2b).

De manera general el índice de Shannon, Simpson e InvSimpson (Figura 2c) en la zona posterior fue más alto. El índice de Simpson e InvSimpson (Figura 2b) en muestras de agua fue más alto y el índice de Shannon fue similar entre las muestras de agua y sargazo. En el mes de junio y julio se presentó una mayor riqueza de ASVs distribuída de manera más equitativa, pero con baja dominancia y en el mes de abril se presentó una mayor dominancia de especies (ASVs) y baja equitatividad (Figura 2).

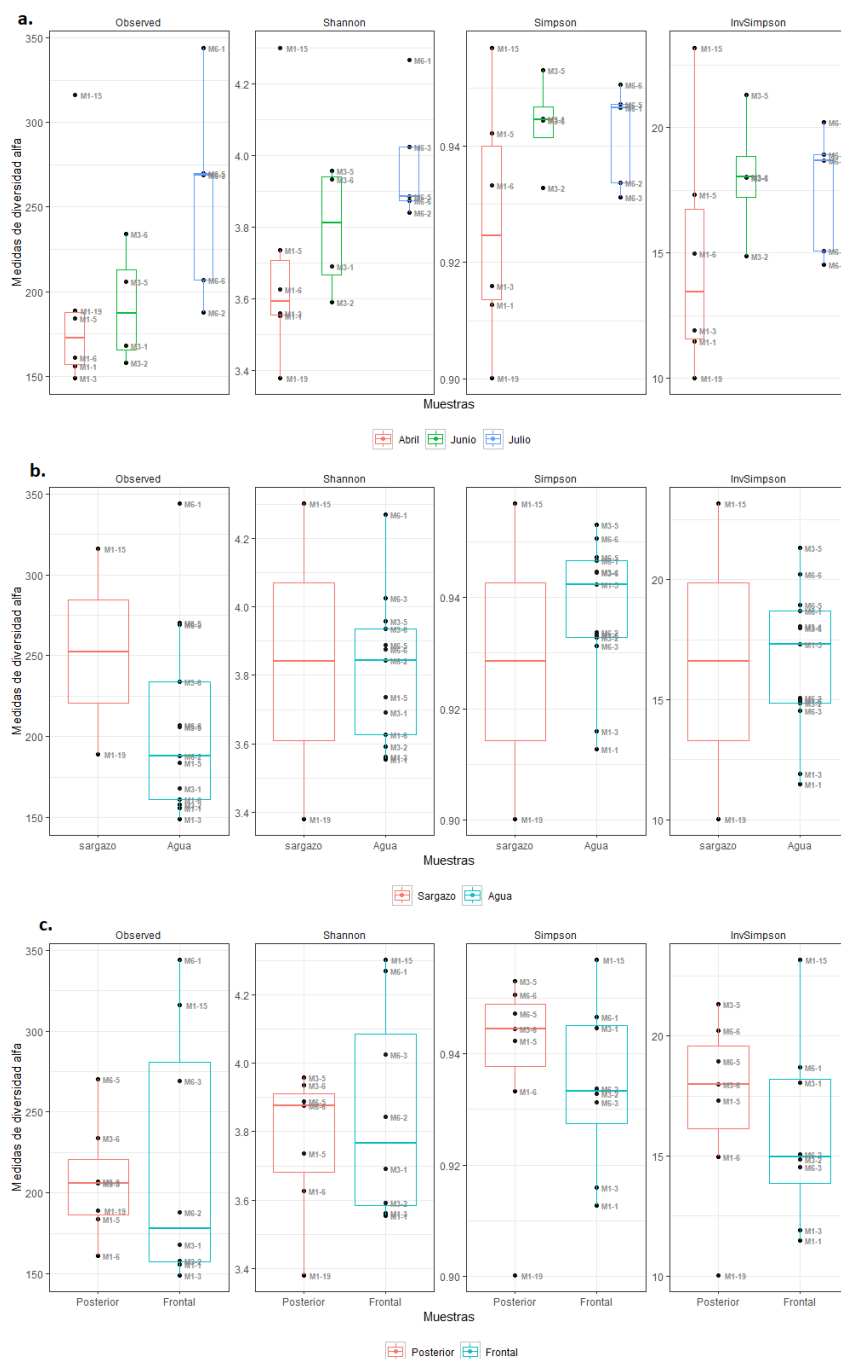


Figura 2

Número de ASVs observados e Índices de diversidad (Shannon, Simpson; y InvSimpson) de la comunidad de bacterioplancton con base en: **a.** Tiempo (24 de abril; 1 de junio; y 2 de julio), **b.** Tipo de muestra (sargazo y agua), y **c.** Espacio (zona arrecifal posterior y frontal).

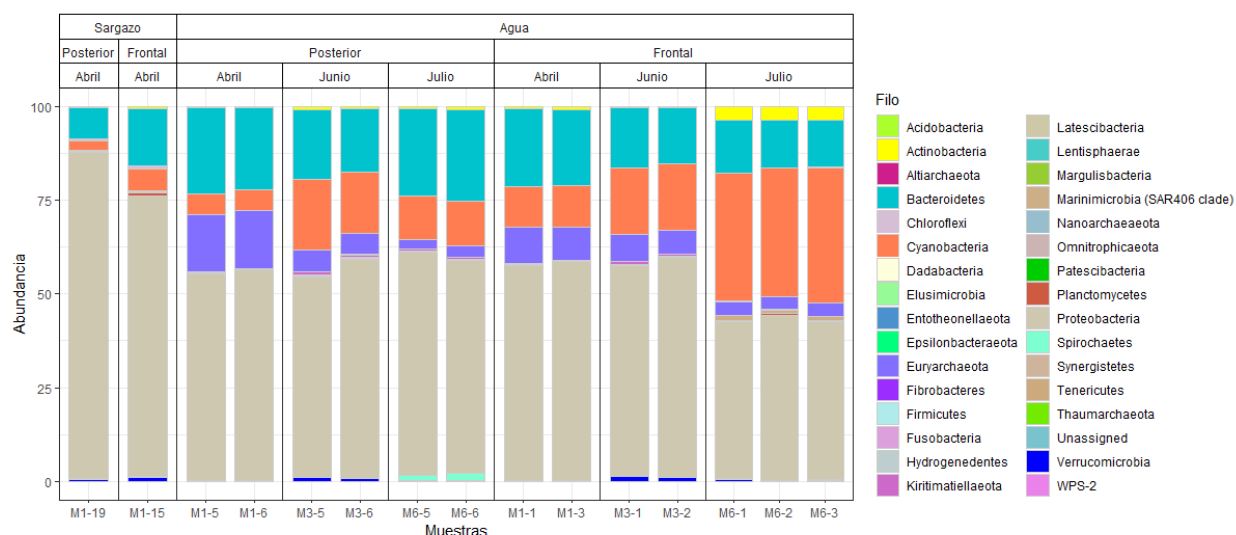


Figura 3

Abundancia relativa de la comunidad de bacterioplancton a nivel de Filo en muestras de sargazo y agua circundante de zona arrecifal posterior y frontal en los diferentes tiempos de muestreo (24 de abril; 1 de junio; y 2 de julio).

El filo con mayor abundancia para las muestras de sargazo y agua, en zona frontal y posterior, en los tres tiempos de muestreo fue Proteobacteria (Figura 3). Para las muestras de agua de la zona frontal en el mes de julio, Cyanobacteria fue el segundo grupo más abundante, seguido de Bacteroidetes y Actinobacterias, y por último Euryarchaeota. Este último filo mostró ser más abundante en las muestras de agua de la zona posterior en el mes de abril; del mismo modo, el grupo de Bacteroidetes fue más abundante que Cyanobacteria en muestras de sargazo de las dos zonas arrecifales, y en muestras de agua de zona posterior en el mes de abril y julio. Incluso esta misma tendencia se observa en las muestras de agua de zona frontal del mes de abril. En junio, en las muestras de agua para las dos zonas se observó que estos dos grupos (Bacteroidetes y Cyanobacteria) comparten una abundancia similar, pero exhiben una baja

abundancia de Verrucomicrobia, al igual que las dos muestras de sargazo. Spirochaetes también mostró baja abundancia en muestras de agua de la zona posterior en el mes de julio.

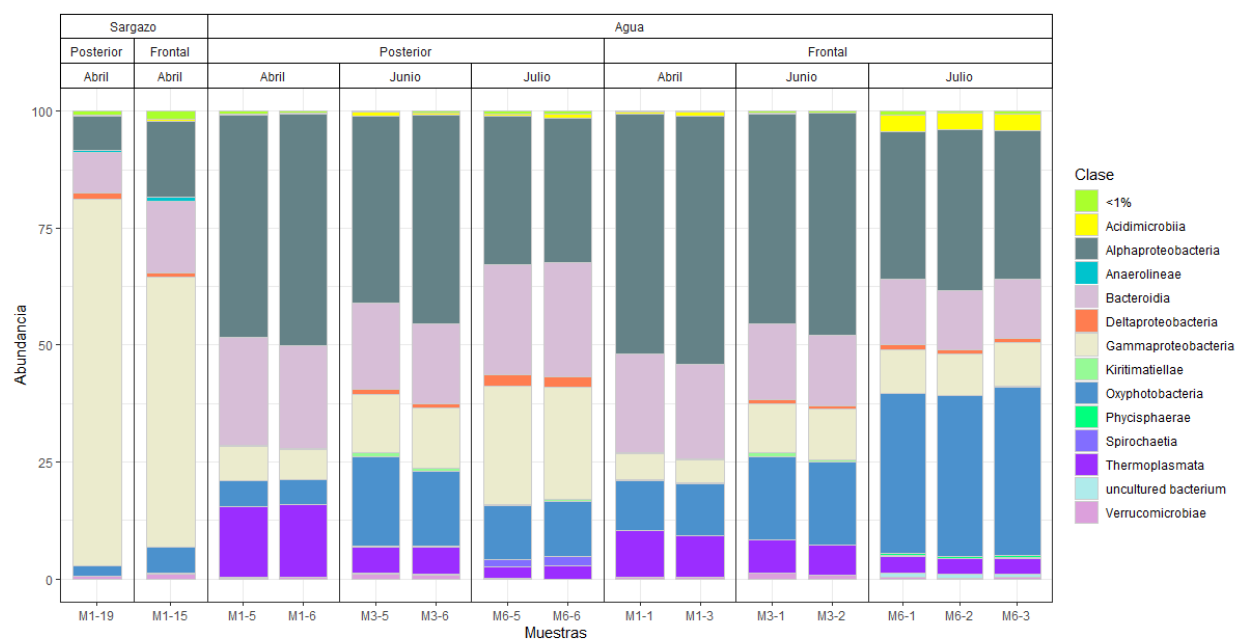


Figura 4

Abundancia relativa de la comunidad de bacterioplancton a nivel de Clase en muestras de sargazo y agua circundante de zona arrecifal posterior y frontal en los diferentes tiempos de muestreo (24 de abril; 1 de junio; y 2 de julio).

La clase con mayor abundancia en las dos muestras de sargazo correspondió a Gammaproteobacteria, seguida por Bacteroidia y Alphaproteobacteria, que exhiben una abundancia similar, y por Oxyphotobacteria, Verrucomicrobiae, Deltaproteobacteria y Anaerolineae, con las menores abundancias (Figura 4).

En todas las muestras de agua, la clase con mayor abundancia fue Alphaproteobacteria, seguida de Bacteroidia en las muestras de agua de la zona posterior en los tres tiempos de muestreo, junto con las muestras de la zona frontal en abril (Figura 4). Este segundo grupo es

menos abundante en las muestras de zona frontal de los muestreos en los meses de junio y julio. En este caso, el segundo grupo más abundante en estas muestras fue Oxyphotobacteria, con una abundancia similar a Alphaproteobacteria en julio y a Bacteroidia en junio. Como cuarto grupo más abundante en las muestras de agua de las dos zonas en el mes de junio y julio se observa a Gammaproteobacteria, seguido de Acidimicrobiia (solo para zona frontal en julio), Thermoplasmata, Deltaproteobacteria (ausente en muestras de agua del mes de abril); y con abundancia similar a este último grupo en las muestras de las dos zonas en junio a Verrucomicrobiae. Thermoplasmata presenta una mayor abundancia que Oxyphotobacteria y Gammaproteobacteria en las muestras de agua de zona posterior en abril. Por otra parte, Gammaproteobacteria fue el grupo con la menor abundancia en muestras de la zona frontal del mes de abril. También se observó una baja abundancia de Spirochaetia en muestras de agua de la zona posterior en julio.

A nivel de familia, en las dos muestras de sargazo se observó en mayor abundancia a Vibrionaceae, seguida de Flavobacteriaceae, Rhodobacteraceae, Terasakiellaceae, Cyclobacteriaceae, Alteromonadaceae, y Saprospiraceae (Figura 5).

En las muestras de agua, familias como Cyanobiaceae, Rhodobacteraceae, Flavobacteriaceae, y Cryomorphaceae junto con SAR116 clade, fueron abundantes. Por otra parte, con una abundancia más baja se encontró a Nitrospiraceae (Figura 5) que exhibió una mayor abundancia que Cyanobiaceae, y abundancia similar a Rhodobacteraceae en muestras de la zona posterior en el mes de julio. Cyanobiaceae mostró una mayor abundancia en muestras de la zona frontal en julio, pero menores abundancias en muestras de abril para las dos zonas. Lo opuesto se observa con Rhodobacteraceae, quien mostró mayor abundancia en el mes de abril

para las dos zonas, pero en las muestras de julio de la zona frontal, su abundancia fue la más baja en muestras de agua; esta misma observación se evidencia para el grupo SAR116 clade.

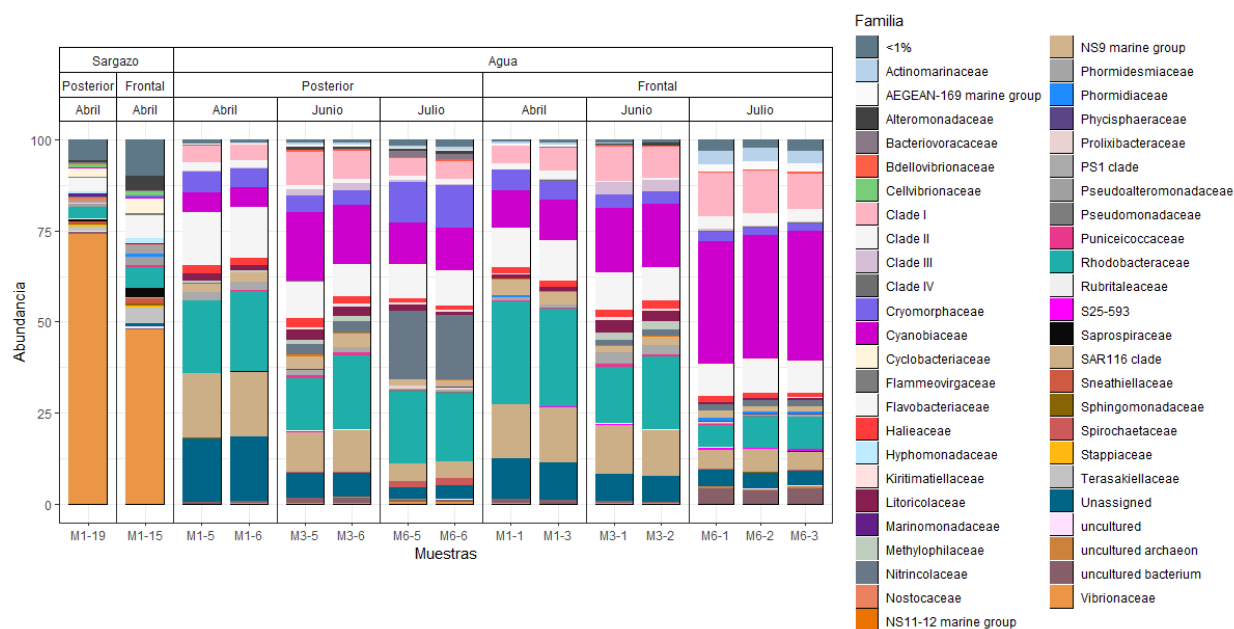


Figura 5

Abundancia relativa de la comunidad de bacterioplancton a nivel de Familia en muestras de sargazo y agua circundante de zona arrecifal posterior y frontal en los diferentes tiempos de muestreo (24 de abril; 1 de junio; y 2 de julio)

En las dos muestras de sargazo, *Vibrio* fue el género con mayor abundancia, mientras que los grupos *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Tenacibaculum*, *Aquimarina*, se observaron en menor abundancia. *Photobacterium* al igual que *Vibrio*, mostraron mayor abundancia en muestras de la zona posterior (Figura 6). En las muestras de sargazo se puede observar que los grupos que forman parte de menos del 1% son más abundantes, en comparación con las muestras de agua; esto indica que hay una mayor cantidad de grupos que no alcanzan el 1 % de abundancia en las muestras de sargazo. Esta observación también puede apreciarse a nivel de Familia (Figuras 5 y 6). Es importante mencionar la presencia del género *Photobacterium*, ya

que este trabajo es una extensión del proyecto InvaSAR donde se reporta por primera vez a este género como parte de la comunidad de bacterioplancton de sargazo pelágico.

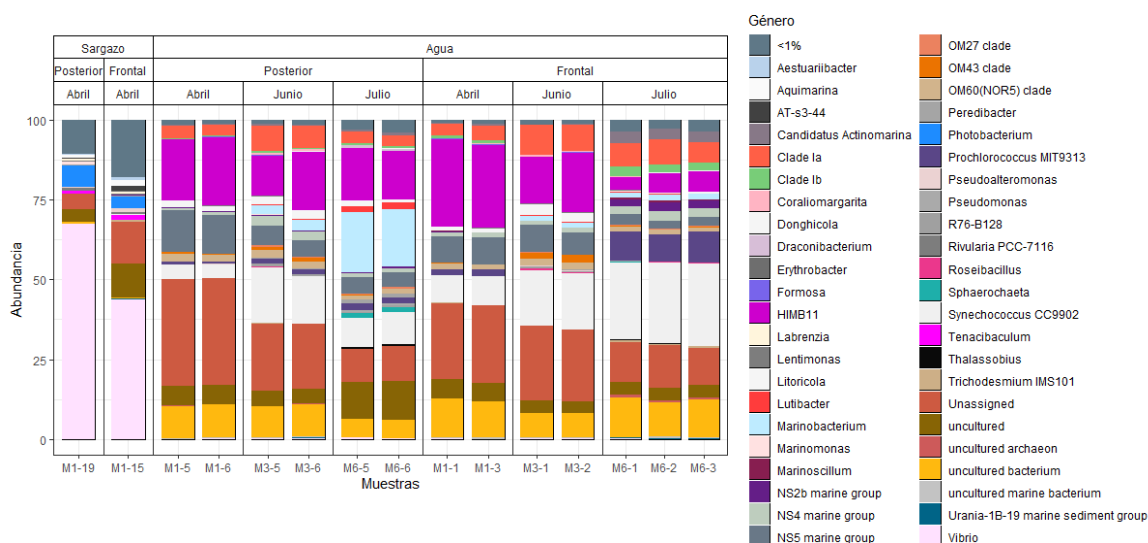


Figura 6

Abundancia relativa de la comunidad de bacterioplancton a nivel de Género en muestras de sargazo y agua circundante de zona arrecifal posterior y frontal en los diferentes tiempos de muestreo (24 de abril; 1 de junio; y 2 de julio).

Los géneros con mayor abundancia en las muestras de agua corresponden a HIMB11, *Synechococcus* CC9902, Grupo Marino NS5, *Marinobacterium* (en zona posterior en julio) y *Prochlorococcus* MIT9313 (en zona frontal en julio) (Figura 6). El contraste en la abundancia de los grupos de la zona frontal y posterior en el mes de julio es notable, en la zona posterior para este mes es mayor la abundancia de HIMB11 y *Marinobacterium*, mientras que en la zona frontal es mayor la abundancia de *Synechococcus* CC9902 y *Prochlorococcus* MIT9313. HIMB11 y el Grupo Marino NS5 en las dos zonas en el mes de abril presentan una mayor

abundancia, pero menor en las muestras de la zona frontal en julio donde se presentan los tres Grupos Marinos NS2b, NS4, y NS5, con baja abundancia (Figura 6).

6.2. Estructura de la Comunidad de Microorganismos Eucariontes

Los 304 ASVs recuperados putativamente correspondientes a eucariotas se filtraron con base en su descripción taxonómica para corroborar los ASVs plastidicos, de este modo se obtuvo un total de 140 ASVs plastidicos a partir de los cuales se creó un objeto Phyloseq que se tomó para iniciar a estimar los índices de diversidad (Shannon, Simpson, InvSimpson; y ASVs observados), PCoA y PERMANOVA.

El número de ASVs observados (Figura 7a) en el mes de junio mostró ser más alto, seguido del mes de abril y con una menor cantidad el mes de julio. Sin embargo, en el mes de julio se observó el número más alto de ASVs (M6-1 con 23. Tabla B2). En el mes de abril la muestra M1-15 con 22 ASVs presenta un valor mayor, seguido de la muestra M1-19 con 14 ASVs, ambas muestras correspondientes a sargazo.

En la zona posterior (Figura 7c) se presenta un mayor número de ASVs, en la cual, la muestra M3-6 (18 ASVs) del mes de junio es la principal representante de ASVs, seguida de la muestra M1-19; en la zona frontal, sobresalen la muestra M6-1 seguida de M1-15. Las muestras de agua M6-1 y M3-6, así como las muestras de sargazo M1-15 y M1-19, fueron las que obtuvieron mayor abundancia de ASVs (Figura 7b).

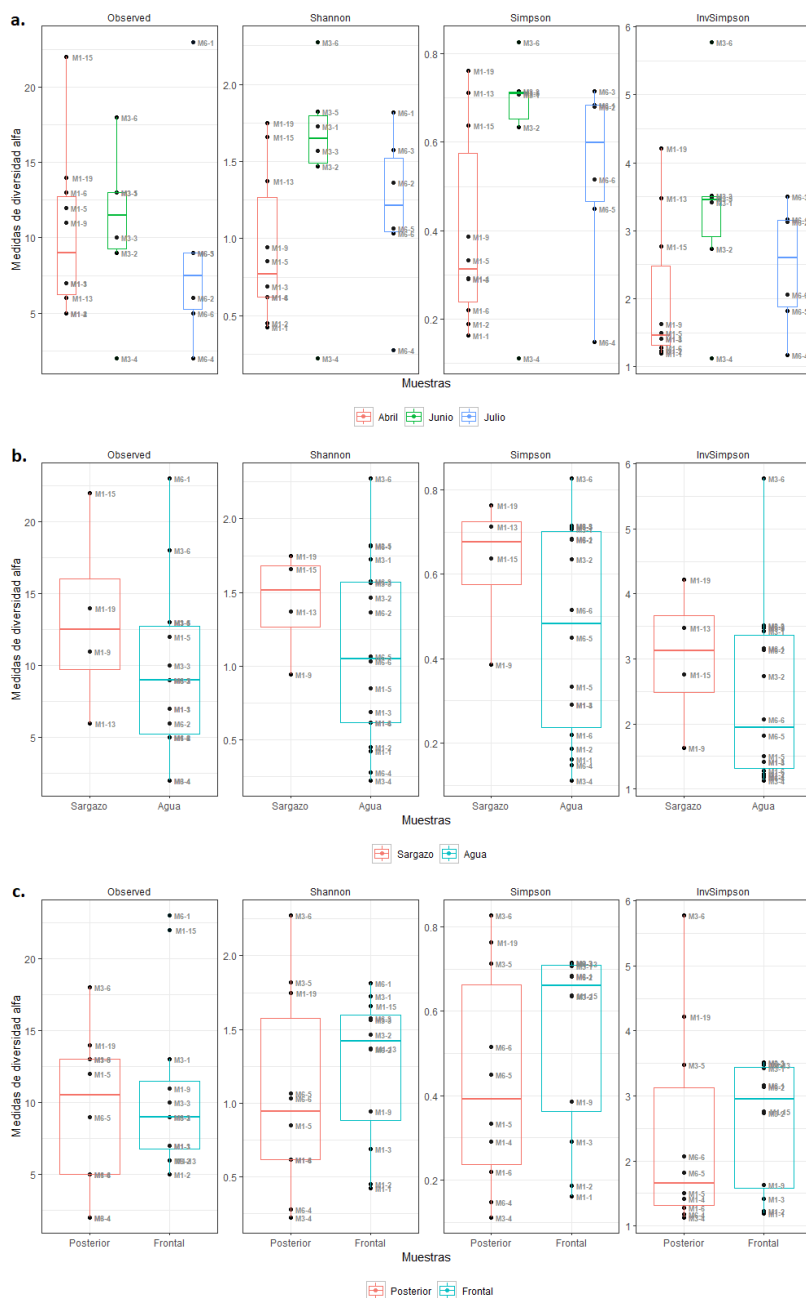


Figura 7

Número de ASVs observados e Índices de diversidad (Shannon, Simpson; y InvSimpson) de la comunidad de microorganismos eucariontes con base en: **a.** Tiempo (24 de abril; 1 de junio; y 2 de julio), **b.** Tipo de muestra (sargazo y agua), y **c.** Espacio (zona arrecifal posterior y frontal).

En el mes de junio (Figura 7a) en promedio, se observa un índice de Shannon superior, la muestra M3-6 (2,2736) presentó el valor más alto en todas las muestras y la muestra M3-4 presentó el valor más bajo (0,2237) (Tabla B2) y (Figura 7). Para el mes de abril las cuatro muestras de sargazo M1-19, M1-15, M1-13 y M1-9 con valores de índice de Shannon de 1,7495, 1,6594, 1,3714, y 0,9453 respectivamente (Figura 7a), mostraron ser mayores respecto a las muestras de agua de este mes. Estas observaciones se pueden apreciar del mismo modo en el índice de Simpson e InvSimpson (Figura 7).

La zona frontal presenta un mayor índice de Shannon, Simpson e InvSimpson. Sin embargo, hay muestras de la zona posterior (Figura 7c) que muestran mayores valores (M3-6, M3-5 y M1-19) que las de la zona frontal, dos de estas muestras del mes de junio. Igualmente en la zona frontal los valores más bajos estuvieron representados por cuatro muestras del mes de abril, que incluye una de sargazo (M1-9). Sargazo también presentan mayor índice de Shannon, Simpson e InvSimpson, e incluso de ASVs observados comparado con las muestras de agua (Figura 7b).

Los análisis de coordenadas principales (PCoA) (Figura 8) permiten observar un agrupamiento diferencial de ASVs entre muestras de agua y muestras de sargazo. La distancia que hay entre estas muestras indica que las comunidades de microorganismos eucariontes son diferentes, una diferencia que es significativa (valor $p=0,001$) según el PERMANOVA (Tabla 1). Entre las fechas de muestreo (valor $p=0,241$) y sitios (valor $p=0,182$) no se encontró un agrupamiento diferencial ni diferencia significativa, como se puede observar las muestras están agrupadas y superpuestas.

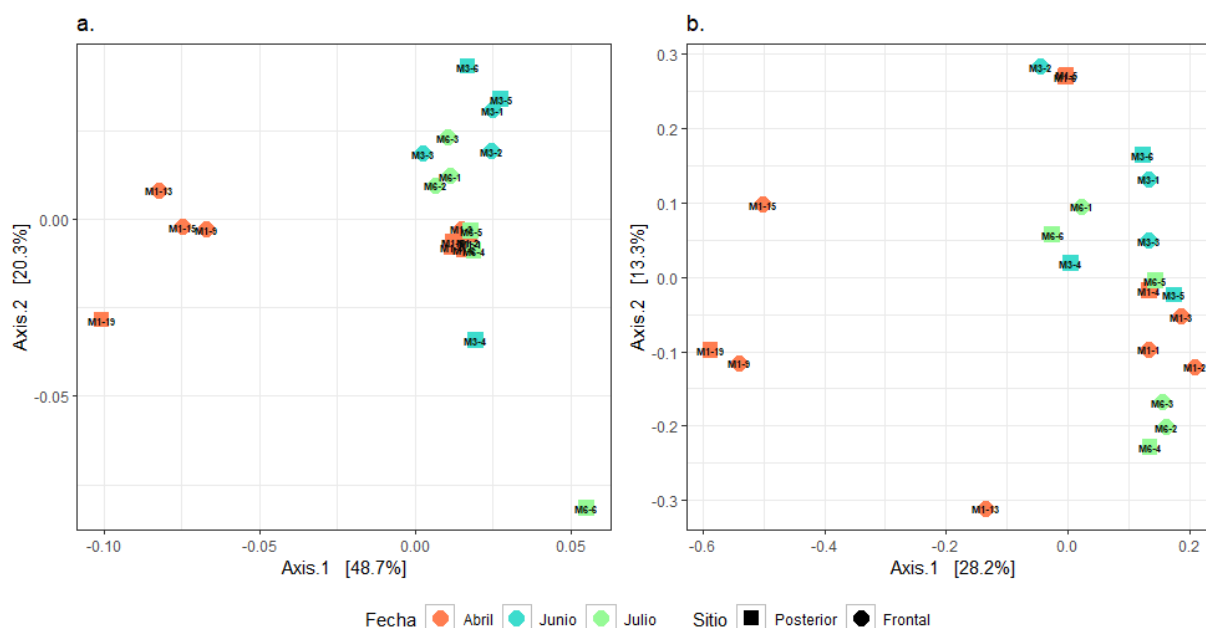


Figura 8

Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la comunidad de microorganismos eucariotas en muestras de sargazo (M1-19, M1-15, M1-13 y M1-09) y agua circundante, basado en: a. distancia UniFrac ponderada y b. distancia UniFrac no ponderada. Las leyendas representan los tiempos de muestreo (Fecha) con coloración diferente (24 de abril; 1 de junio; y 2 de julio) y el sitio o zona con una figura diferente (zona arrecifal posterior y frontal).

La diferencia que hay entre las muestras de agua y sargazo en los PCoA puede estar explicando la mayor parte de la variación en la estructura de las comunidades de microorganismos eucariotas, esto soportado bajo el r^2 cuadrado (r^2) (0.4534) para esta variable (Tipo) (Tabla 1) que es el más alto en el PERMANOVA. Sin embargo, el r^2 residual también es alto (0.4757) demostrando que existen otras variables que no se tomaron en cuenta en este trabajo y que pueden explicar la variación en la estructura de la comunidad de microorganismos eucariontes.

Tabla 1

Análisis PERMANOVA a partir de matriz Unifrac ponderada de comunidades de microorganismos eucariotas, las variables que se tomaron corresponden a el tipo de muestra (sargazo, agua), el sitio (zona frontal y posterior) y la fecha de muestreo (abril, junio; y julio).

	Df	SumOfSqs	R2	F	p valor
Tipo	1	0.032585740948	0.45347200086	17.15701080	0.001*
		1441	4677	48454	
Sitio	1	0.002654692875	0.03694342540	1.397746162	0.182
		37762	17555	0063	
Muestreo	1	0.002431094422	0.03383176874	1.280017334	0.241
		92858	85074	82634	
Residual	18	0.034186802336	0.47575280498		
		27552	506		
Total	21	0.071858330582		1	
		7258			

6.3. Abundancia Diferencial de la Comunidad de Bacterioplancton

Los análisis de coordenadas principales (PCoA) (Figura 9) permite observar un agrupamiento diferencial de ASVs entre muestras de agua y muestras de sargazo. La distancia que hay entre estas muestras indica que las comunidades de bacterioplancton son diferentes, una

diferencia que es significativa (valor $p=0.001$) según el PERMANOVA (Tabla 2). Las muestras del mes de abril, junio y julio también mostraron una diferencia significativa (Valor $p=0.001$), diferencia que también es mediada por la distancia que hay entre las muestras del mes de abril, junio y julio (Figura 9a). Las muestras del mes de julio se agruparon diferencialmente según el sitio (zona frontal y posterior) (Figura 9a), esta diferencia entre las zona frontal y posterior solo se puede observar en las muestras del mes de julio; entre muestras de zona frontal y posterior sin distinguir entre el tipo de muestra y tiempo de muestreo no se observan diferencias significativas (valor $P=0.071$) (Tabla 2) ni agrupamiento diferencial (Figuras 9a y 9b).

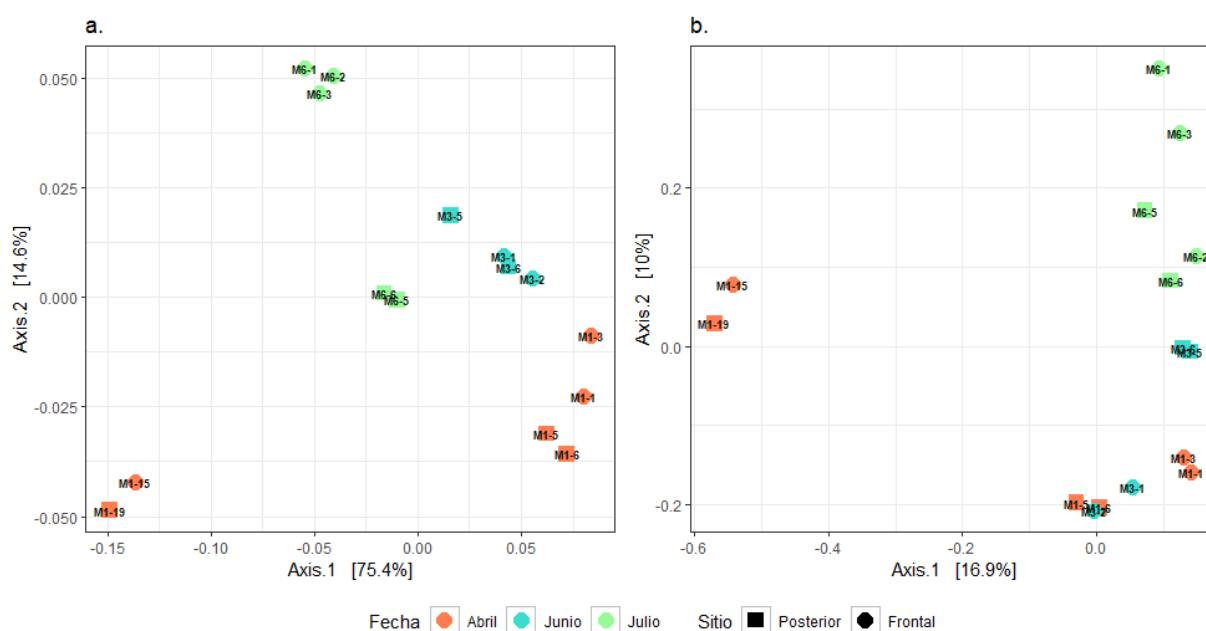


Figura 9

Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la comunidad de bacterioplancton en muestras de sargazo (MI-19 y MI-15) y agua circundante, basado en: a. distancia Unifrac ponderada y b. distancia Unifrac no ponderada. Las leyendas representan los tiempos de muestreo (Fecha) con coloración diferente (24 de abril; 1 de junio; y 2 de julio) y el sitio o zona con una figura diferente (zona arrecifal posterior y frontal).

En el PCoA a partir de la matriz unifrac no ponderada (presencia- ausencia. Figura 9b), muestra el agrupamiento diferencial entre las muestras de sargazo y agua, pero el agrupamiento que se observa entre las muestras del mes de abril, junio y julio es diferente al observado en el PCoA a partir de la matriz unifrac ponderada (abundancia relativa. Figura 9a). En la figura 9b se puede observar que solo las muestras de julio se agrupan diferencialmente; opuesto a lo observado en la figura 9a, donde las muestras del mes de abril, junio y julio se agrupan diferencialmente.

La diferencia que hay entre las muestras de agua y sargazo en los PCoA (Figura 9) es la más notoria, se observó que el tipo de muestra puede estar explicando la mayor parte de la variación en la estructura de la comunidad de bacterioplancton, soportado bajo el r cuadrado (r^2) (0.5053) para esta variable (Tipo) (Tabla 2) que es el más alto en el PERMANOVA; al igual que el tiempo de muestreo (muestreo) con un r^2 (0.3306).

Tabla 2

Análisis PERMANOVA a partir de matriz Unifrac ponderada de comunidades de Bacterioplancton, las variables que se tomaron corresponden a el tipo de muestra (sargazo, agua), el sitio (zona frontal y posterior) y la fecha de muestreo (abril, junio; y julio).

	Df	SumOfSqs	R2	F	P valor
Tipo	1	0.05192464281	0.5053601043	43.005485	0.001*
Sitio	1	0.003565926686	0.03470562308	2.953403207	0.071
Muestreo	1	0.03397588418	0.3306725948	28.13980604	0.001*
Residual	11	0.01328135402	0.1292616778		

Total	14	0.1027478077	1
-------	----	--------------	---

En el Análisis discriminante lineal (LDA) con tamaño del efecto (LEfSe) (Figura 10), se observa diez grupos diferencialmente abundantes para la zona frontal, 4 de ellos distribuidos en bacterias no cultivables y no asignadas; los demás grupos corresponden a la clase Phycisphaerae, las familias Phycisphaeraceae, Sphingomonadaceae, Porticoccaceae, el Género *Erythrobacter* y Clado SAR92. En la zona posterior se observan siete grupos con abundancia diferencial, dos de ellos no asignados, uno no cultivable, los demás corresponden a las familias Marinilabiliaceae, Bacteriovoracaceae y los géneros *Labilibacter* y *Celeribacter*. En la zona frontal la clase Phycisphaerae demuestra ser el grupo más representativo, seguido de la familia Phycisphaeraceae que forma parte de esta clase (Figura 10b); y en la zona posterior las familias Bacteriovoracaceae y Marinilabiliaceae junto con el género *Celeribacter*, son los más representativos, con los valores mayores de LDA (Figura 10)

A nivel taxonómico, el Filo no mostró tener ningún grupo diferencialmente abundante (Figura 10b). A nivel de clase, solo Phycisphaerae demostró ser diferencialmente abundante, mientras que a nivel de familia se observan nueve grupos, y a nivel de género siete grupos, dentro de los cuales se incluyen los grupos de bacterias no cultivables y no asignadas.

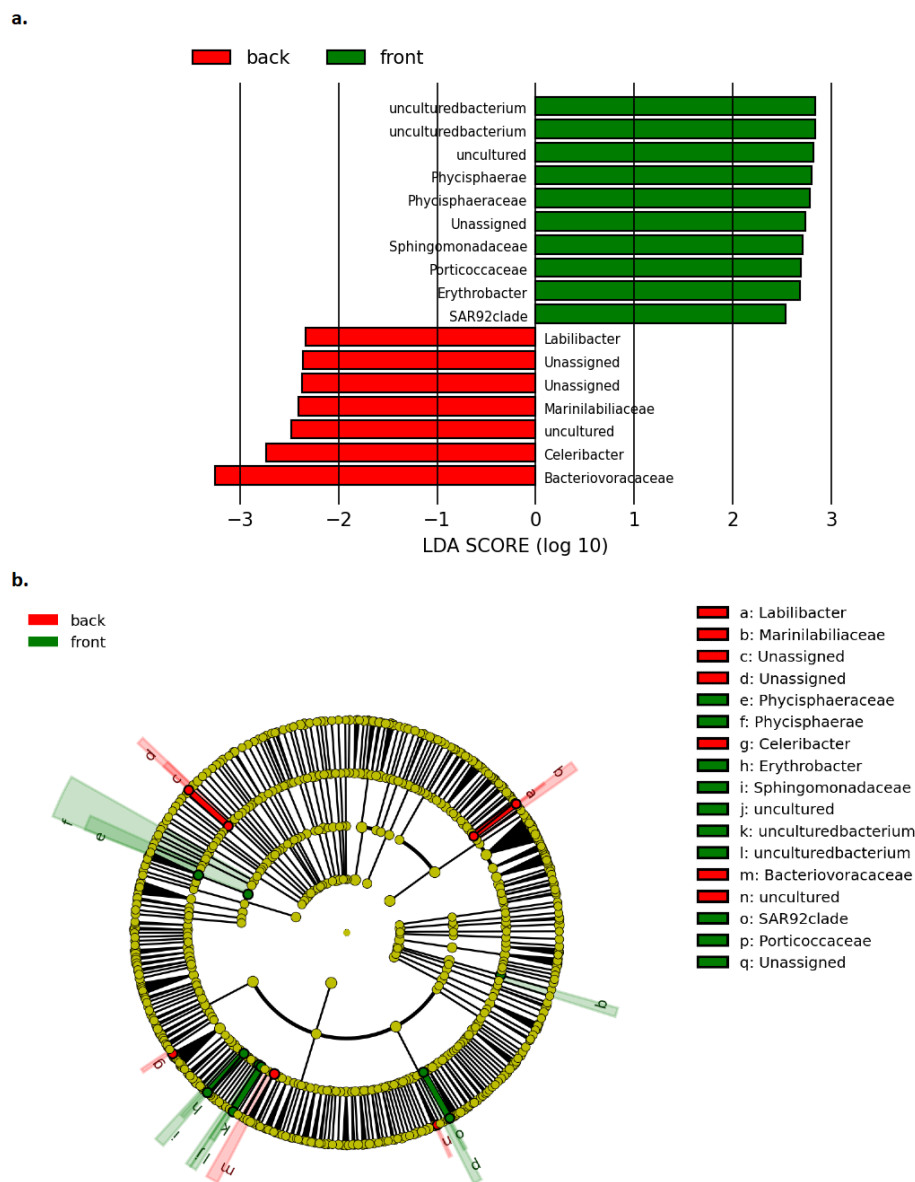


Figura 10

Análisis discriminante lineal (LDA) con tamaño del efecto (LEfSe) de la comunidad de bacterioplancton a nivel de Filo, Clase, Familia; y Género. Se tomó como clase el sitio (zona arrecifal posterior (rojo) y zona arrecifal frontal (verde)). Valor de LDA = 2 y P valor < 0.05. a. valores de LDA (Análisis discriminante lineal) b. Cladograma.

7. Discusión

7.1. Comunidad Microbiana Asociada a Sargazo Pelágico y al Agua de Mar Circundante.

7.1.1 *Comunidad de Bacterioplancton*

El PCoA reveló que la comunidad de bacterioplancton asociada a sargazo pelágico se agrupa de manera diferencial a la comunidad de agua de mar circundante, representando diferencias significativas (PERMANOVA, $P=0.001$) entre las dos comunidades, lo cual es congruente con lo reportada por Torralba et al (2017) y Michotey et al (2020). Estas diferencias entre las dos comunidades apoyan la idea que las macroalgas llegan a albergar grupos bacterianos específicos (Egan et al., 2012), que en una resolución taxonómica menor (Familia o Género) se pueden apreciar de mejor manera (Florez et al., 2017; Theirlynck et al., 2023).

En estos dos niveles, Familia y Género, se puede evidenciar que los grupos compartidos entre muestras de sargazo y agua superficial son pocos, observándose incluso grupos distintivos entre las dos comunidades (Figuras.5 y 6). Los metabolitos de macroalgas pueden llegar a ser promotores para que se establezcan grupos específicos o distintivos asociados a macroalgas. Estos metabolitos pueden influir en la composición de la comunidad bacteriana asociadas a macroalgas, como ejemplo la furanona y fucoxantina son capaces de disuadir y evitar la unión de otros grupos bacterianos, aunque otros metabolitos pueden promover su unión (Egan et al., 2012), actuando de esta manera como una barrera selectiva para el ensamblaje de grupos bacterianos en la superficie de las macroalgas.

7.1.2 Comunidad de Microorganismos Eucariotas

El PCoA reveló que la comunidad de microorganismos eucariotas asociada a sargazo pelágico se agrupa de manera diferencial a la comunidad de agua de mar circundante, representando diferencias significativas (PERMANOVA, $P=0.001$) entre las dos comunidades, diferencias también reportadas por Hervé et al., 2021. Los valores en el índice de Shannon y InvSimpson fueron mayores en las muestras de sargazo que en las muestras de agua, indicando que la comunidad de microorganismos eucariotas de sargazo presenta una mayor riqueza de ASVs y equitatividad. Esta observación es opuesta a lo reportado por Herve et al. (2021), donde la comunidad eucariota fue significativamente mayor para estos índices en muestras de agua que en la de sargazo de marea.

La discrepancia entre lo reportado en el presente estudio y lo reportado por Herve et al. (2021) puede deberse a la diferencia geográfica o bien a la densidad de sargazo presente en los sitios de estudio; con base en esto podemos suponer la dinámica entre las dos comunidades (agua y sargazo) difiere entre regiones geográficas, y que las floraciones de sargazo puede ser responsable de las variaciones de la comunidad de microorganismos eucariotas asociado al agua de mar. También podemos atribuir la diferencia al diseño metodológico entre los dos estudios.

Los protistas asociados a la superficie de *Sargassum* pueden ejercer una presión de pastoreo sobre la biopelícula bacteriana, como ejemplo se encuentran los flagelados que se alimentan del bacterioplancton circundante Baker et al., 2018. Incluso algunos grupos de protistas nanométricos de *Sargassum* flotante que fueron reportados por Baker et al. (2018), registrados en el mar profundo. Lo anterior sugiere que *Sargassum* puede contribuir en el desplazamiento de grupos de protistas nanométricos al sedimento del fondo marino, cuando este se hunde (Baker et al., 2018). A su vez puede estar alterando la dinámica de la biopelícula

microbiana en la columna de agua. La interacción entre las comunidades microbianas eucariota y procariota del sargazo pelágico y del agua de mar circundante puede estar explicando las diferencias observadas. Interacciones como el pastoreo (Baker et al., 2018), herbivoría y bacterivoría (Kim et al., 2011); sin embargo, son solo supuestos, ya que el trabajo no tomó en cuenta estas interacciones. Este supuesto solo se apoya por la prueba de Mantel que realizó Herve et al. (2021), que reveló una fuerte correlación entre las comunidades procariotas y eucariotas, indicando asociaciones bióticas potenciales entre las comunidades microbianas.

7.2 Estructura de las Comunidades Microbianas

7.2.1. Comunidad de Bacterioplancton

El filo Proteobacteria fue el más abundante en muestras de sargazo y agua de mar circundante; la clase Gammaproteobacteria con mayor abundancia en muestras de sargazo y Alphaproteobacteria con mayor abundancia en muestras de agua; con una abundancia más baja en las dos muestras se encuentra Deltaproteobacteria. Estas tres clases se han reportado asociadas a sargazo pelágico y a agua de mar en el atlántico central y el caribe (Hervé et al., 2021, Theirlynck et al., 2023). Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria también se han reportado como abundantes en muestras de agua superficial del mar de los sargazos (Gill et al., 2022; Sjöstedt et al., 2014).

Los filos Bacteroidetes, clase Bacteroidia y Cyanobacteria, clase Oxyphotobacteria también son abundantes en muestras de sargazo y agua de mar circundante. En muestras de agua del mar de los sargazos estos dos filos también están ampliamente representados (Sjöstedt et al., 2014). Salgado-Hernández et al. (2023) han reportado a Bacteroidetes como el filo más

abundante en muestras de sargazo pelágico pretratadas, así como Hervé et al. (2021) reportaron la presencia de Bacteroidia y Oxyphotobacteria asociada a sargazo pelágico y agua de mar. Con abundancia más baja se encuentran los filos Actinobacteria, clase Acidimicrobiia (casi nula en sargazo), Verrucomicrobia, clase Verrucomicrobiae, y solo en muestras de agua se encuentra Euryarchaeota, clase Thermoplasmata y Spirochaetes, clase Spirochaetia (sólo en muestras de julio). Estos filos de baja abundancia también se han reportado asociados a sargazo pelágico (Mohapatra, 2023) junto con agua de mar (Hervé et al., 2021). Hervé et al., 2021 también reportaron a Thermoplasmata y Acidimicrobiia solo asociados a muestras de agua de mar.

En las muestras de sargazo los géneros *Vibrio* y *Photobacterium*, Familia Vibrionaceae, clase Gammaproteobacteria presentan una mayor abundancia. *Vibrio* ya ha sido reportado ampliamente como abundante en muestras de sargazo pelágico (Hervé et al., 2021; Theirlynck et al., 2023; Mendonça et al., 2023) junto con muestras de agua de mar (Michotey et al., 2020). Las Familias Alteromonadaceae (*Pseudoalteromonas*), clase Gammaproteobacteria; Rhodobacteraceae y Terasakiellaceae, clase Alphaproteobacteria son de igual manera abundantes; estas dos primeras familias ya han sido reportadas en muestras de sargazo pelágico (Mohapatra, 2023; Theirlynck et al., 2023). Torralba et al. (2017) también reportan una gran abundancia de Rhodobacteraceae no clasificadas.

Las familias Cyclobacteriaceae, Flavobacteriaceae (*Tenacibaculum*), y Saprospiraceae mostraron menor abundancia; estas dos últimas familias también presentaron baja abundancia en el informe de Theirlynck et al. (2023) y un enriquecimiento significativo en muestras de sargazo costero en el informe de Hervé et al. (2021) .

Las observaciones en el presente estudio sobre la mayor abundancia de Vibrionaceae (*Vibrio*) en la zona posterior se ajustan a lo reportado por Theirlynck et al. (2023), donde la

abundancia relativa de taxones microbianos de *Vibrio* difiere significativamente entre ubicaciones, siendo más abundante en los sitios más costeros del Atlántico. Incluso se informa por Mendonça et al. (2023) que llega a presentar mayor abundancia de *Vibrio* posterior a los eventos de varamiento de sargazo pelágico en la costa, alcanzando el 91% de abundancia relativa tras 24 horas de simulación de varamiento. Esto sugiere que *Vibrio* se ve favorecido en lugares más próximos a la costa, representando un posible riesgo en los ecosistemas costeros por el arrastre de este grupo por parte del sargazo pelágico, esto mismo puede llegar a ocurrir con *Photobacterium* que también mostró una mayor abundancia en la zona posterior.

El género *Vibrio*, Vibrionaceae altamente representado en muestras de sargazo pelágico se ve favorecido por una alta tasa de crecimiento de sargazo, amonio y nitrito según lo reportan Michotey et al. (2020). La gran abundancia de Vibrionaceae en muestras de sargazo pelágico y Rhodobacteraceae en sargazo y agua de mar circundante, posiblemente se ve favorecida por la materia orgánica disuelta (DOM) liberada por sargazo holopelágico, promoviendo la proliferación de estos grupos de bacterias degradadoras de DOM (Hervé et al., 2021; Theirlynck et al., 2023).

Hervé et al. (2021) reportan OTUs asignados a *Vibrio* en muestras de sargazo que podrían contribuir en la reducción de nitratos. De este modo *Vibrio* podría participar en el ciclo del nitrógeno, y metabolismo de nitrógeno del huésped; también en el ciclo del carbono orgánico marino (Hervé et al., 2021). Es importante mencionar que *Vibrio* spp. ensamblado en sargazo pelágico puede tener estilos de vida patógenos, representando riesgos para los humanos y organismos marinos (Hervé et al., 2021; Theirlynck et al., 2023), esto se apoya del informe de Michotey et al. (2020) donde encuentran seis OTUs de *Vibrio* altamente patógenos asociados a sargazo pelágico.

Las muestras de agua de mar circundante del mes de julio entre zona frontal y posterior indican un cambio notable en la abundancia relativa de los taxones. En la zona frontal en julio se presenta una diferencia entre Bacteroidetes, clase Bacteroidia y Cyanobacteria, clase Oxyphotobacteria, llegando Cyanobacteria a presentar una abundancia similar a Proteobacteria. Michotey et al. (2020) también reportan una gran abundancia de Cyanobacteria en muestras de agua de mar. De igual manera, la familia Cyanobiaceae, y los género *Prochlorococcus* MIT9313 y *Synechococcus* CC9902 muestran ser los más abundantes en esta zona (Frontal en julio). Sjöstedt et al. (2014) también reporta a *Prochlorococcus* y *Synechococcus* como abundantes en muestras de agua de mar. En la zona posterior en julio *Marinobacterium*, Familia Nitrincolaceae, se presentan con una abundancia similar a HIMB11, Familia Rhodobacteraceae. Este último género y familia que son los más abundante en muestras de agua a excepción de la zona frontal en julio.

Flavobacteriaceae y Cryomorphaceae del filo Bacteroidetes son de igual manera abundantes en muestras de agua de mar circundante, así como el clado SAR116 a nivel de familia, y el grupo marino NS5 a nivel de género, con mayor abundancia en el mes de abril. El grupo marino NS5 también ha sido reportado como abundante por Hervé et al. (2021), presentando varios géneros de Flavobacteriaceae como abundantes dentro de los que se incluye este grupo.

Filos y clases asociados a muestras de sargazo pelágico y agua de mar circundante se han reportado como partícipes en el metabolismo de carbohidratos de *Sargassum* spp. Glasl et al. (2021) informan la presencia de genes en Bacteroidetes y Cyanobacteria involucrados en el ciclo pentosa fosfato y reducción asimilatoria del sulfato. Genes en Firmicutes (ahora Bacillota),

Spirochaetes y Verrucomicrobia involucrados en la glucólisis, y genes en Gammaproteobacteria involucrados en la vía Entner-Doudoroff.

Glasl et al. (2021), también reportan la presencia de polisacárido liasas (PLs) y glucósido hidrolasas (GHs) en el genoma de Flavobacteriaceae, Bacteroidetes recuperado de la biopelícula de *Sargassum* spp., familia (Flavobacteriaceae) en la que se encuentran altamente representados el grupo marino NS5 y *Lutibacter*, reportados por Hervé et al. (2021). Con base en lo anterior, Flavobacteriaceae podría estar implicada en la degradación de polisacáridos y compuestos derivados de algas (fucoidanos y alginatos) y epifauna, incluso podría intervenir en la degradación de los tejidos de fronde de sargazo spp. (Glasl et al., 2021; Hervé et al., 2021). Esto último se apoya de lo reportado por Mohapatra. (2023), donde Flavobacteriaceae es la familia más abundante en muestras de sargazo pelágico en descomposición. También reporta a Proteobacteria y Verrucomicrobia como filos capaces de producir liasas de alginato para despolimerizar el alginato. Saprospiraceae, es otra familia que podría estar implicada en la descomposición de materia orgánica compleja (Torralba et al., 2017). Esto explica por qué ciertos grupos se ven favorecidos frente a la descomposición de sargazo, y no son tan abundantes cuando aún se encuentra a flote, como el caso de Flavobacteriaceae.

Los cambios en la estructura de las comunidades de bacterioplancton asociadas a sargazo y agua de mar circundante pueden ser explicados por factores ambientales y geográficos (Sjostedt et al., 2014; Glasl et al., 2020; Glasl et al., 2021; Gill et al., 2022). Glasl et al. (2020) reportan una correlación positiva entre la abundancia relativa de MAGs (Genoma ensamblado por metagenoma) de Bacteroidetes y el aumento de temperatura, amonio, fosfato, nitrito y sílice en agua de mar; y entre Alphaproteobacteria y Thermoplasmata con sólidos suspendidos totales (SST), salinidad y carbono orgánico no purgable (NPOC) . Glasl et al. (2021) reporta una

correlación significativa entre concentración de amonio y Rhodobacteraceae, temperatura del agua de mar y Verrucomicrobiae, y para los dos factores una reducción de Flavobacteriaceae. También Cyanobacteria, Gammaproteobacteria y Saprospiraceae, se correlacionan positivamente con un aumento en la concentración de NOPC.

La temperatura parece ser un factor importante en la determinación de la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a sargazo y agua de mar. Gill et al. (2022) informan que la temperatura es uno de los factores individuales significativos que explica la variación en las comunidades bacterianas del agua del mar de los sargazos, opuesto a lo informado por Sjostedt et al. (2014). Sjostedt et al. (2014) muestran que los cambios en la temperatura no explican la abundancia de ninguno de los grupos bacterianos; también informan la relación entre la concentración de clorofila *a* y la abundancia de taxones heterótrofos, incluidos Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Bacteroidetes.

En este trabajo, la ubicación de muestreo no explica la variación en la estructura y composición del bacterioplancton asociado a sargazo pelágico y al agua de mar circundante, aunque el tiempo de muestreo, sí explica parte de esta variación. Parte de la variación sin explicar puede ser atribuida a factores ambientales y físicoquímicos que pueden ejercer una presión sobre las comunidades bacterianas participando en los cambios que puedan experimentar, además de promover el enriquecimiento de grupos específicos.

7.2.2. Comunidad de Microorganismos Eucariontes

El PCoA y PERMANOVA revelaron que las comunidades de microorganismos eucariotas no se agrupan diferencialmente y no exhiben diferencias significativas entre las fechas de muestreo ni entre los sitios (zona arrecifal frontal y posterior). Esto es consistente con

el trabajo de Hervé et al. (2021), quienes encontraron que las comunidades microbianas eucariotas asociadas a sargazo no presentan diferencia significativa entre la ubicación de las muestras (mar y playa). En contraparte Vigil et al. (2009) mostraron una diferencia significativa entre los datos T-RFLP (Polimorfismos de fragmento de restricción terminal) de muestras de agua por ubicación de muestreo. Sin embargo, los resultados de Vigil y colaboradores (2009), también mostraron que en algunas muestras agrupadas por año, las comunidades de microorganismos eucariontes no fueron significativamente diferentes entre las dos estaciones más meridionales, lo cual apoya lo obtenido en el presente estudio en relación a las fechas de muestreo.

Las muestras colectadas en el mes de junio mostraron un mayor índice de Shannon y InvSimpson. Igualmente, en la zona frontal estos dos índices fueron mayores. Vigil et al. (2009) encontraron que la diversidad general (riqueza y uniformidad) del ensamblaje eucariota microbiano asociado al agua de mar permaneció relativamente alto en todos los entornos de su estudio, y que los índices de diversidad (Shannon y Simpson) para las muestras variaron en un rango significativo, pero no hubo relación aparente con la ubicación y el tiempo de recolección de las muestras. Esto sugiere que puede haber otros factores que respondan y expliquen esta variación en los índices y que conduzcan a cambios en la estructura y composición de la comunidad microbiana eucariota.

En el presente trabajo, la ubicación de las muestras ni el tiempo explicaron la variación en la estructura de la comunidad eucariota. Factores a considerar que pueden explicar la variación pueden ser condiciones ambientales, interacciones biológicas (Vigil et al., 2009), la profundidad o estrato de la columna de agua (Not et al., 2007), el enriquecimiento de nutrientes orgánicos e inorgánicos (Kim et al., 2011), entre otros. Esto a su paso puede promover la

presencia de diferentes grupos que se favorecen frente a estos factores. Las interacciones biológicas entre los procariotas y eucariotas asociados al sargazo y agua de mar circundante pueden ser un factor crítico e importante que explique la variación o cambios en el ensamblaje microbiano, esto bajo la premisa de que las comunidades son diferentemente significativas entre sí en los dos casos (sargazo y agua).

7.3 Diversidad Diferencial del Bacterioplancton.

Las muestras del mes de julio presentaron los valores más altos en las medidas de diversidad y ASVs observados, con una mayor riqueza y baja dominancia. Las muestras tomadas en este mes tienen un agrupamiento diferencial entre la zona frontal y posterior (PCoA), esto también es notable en la abundancia relativa donde los taxones difieren. Esto sugiere que el mayor cambio en la composición de la comunidad de bacterioplancton en agua de mar circundante se presenta en el mes de julio, cuando el arribo de sargazo pelágico es mayor (observación del informe InvaSAR). Bajo esta observación se puede proponer que los mantos de sargazo pelágico influyen de alguna manera en el ensamblaje de la comunidad de bacterioplancton del agua de mar circundante. Lo anterior se apoya en el estudio de Gill et al. (2022), donde incluyen la densidad de sargazo como un factor individual significativo que explica la variación de las comunidades bacterianas del agua superficial en el mar de los sargazos, siendo importante en el ensamblaje y estructura de las comunidades microbianas del agua de mar.

Las muestras en los diferentes tiempos de muestreo mostraron diferencias significativas (PERMANOVA, p valor = 0.001), diferencias que son marcadas en el mes de julio, indicando que la composición de las comunidades de bacterioplancton del agua de mar circundante cambia

con el paso del tiempo. Esta observación se sustenta con lo encontrado por Glasl et al. (2020), donde MAGs de muestras de agua de mar y biopelículas de sargazo spp. en barrera arrecifal variaron significativamente entre invierno y verano, con taxones enriquecidos en las diferentes estaciones y cambios en la abundancia relativa de grupos taxonómicos individuales. Esto apoya el cambio marcado en la abundancia relativa de Cyanobiaceae, *Marinobacterium* y *Synechococcus* CC9902 en el mes de julio.

Las muestras de agua de mar circundante y sargazo pelágico no presentan diferencias significativas (PERMANOVA, p valor = 0.071) entre los sitios de muestreo (zona frontal y posterior), consistente con el PCoA que a diferencia de las muestras del mes de julio, no presentó un agrupamiento diferencial entre zonas. Hervé et al. (2021), también mostraron que la comunidad procariota asociada a muestras de sargazo recolectado en agua y en playa no presenta diferencias significativas entre estas dos ubicaciones. Gill et al. (2022) y Mohapatra (2023) en sus investigaciones, de igual manera mencionan que la diversidad de las comunidades microbianas de agua de mar y sargazo pelágico entre los sitios de muestreo, no cambian de manera significativa. Theirlynck et al. (2023) por el contrario, informan que el microbioma de sargazo pelágico difiere a lo largo de su área de distribución, en especial *Vibrio* con diferencias significativas. En la zona posterior la muestra de sargazo presentó una gran dominancia (Simpson), baja riqueza (Shannon) y equitatividad (InvSimpson), esta dominancia podría estar representada por la gran abundancia de *Vibrio* en esta zona.

A pesar de que no hay diferencias significativas entre las ubicaciones, taxones específicos varían en abundancia, Phycisphaeraceae, Sphingomonadaceae, Porticoccaceae, *Erythrobacter* y Clado SAR92 en la zona frontal y Marinilabiliaceae, Bacteriovoraceae, *Labilibacter* y *Celeribacter* en zona posterior son diferencialmente abundante. Esta observación

sugiere que estos taxones pueden estar involucrados en la variación de la composición del bacterioplancton entre las ubicaciones al estar diferencialmente enriquecidos en las dos zonas.

8. Conclusiones

La comunidad de bacterioplancton y de microorganismos eucariotas asociada a sargazo pelágico es diferente a la comunidad del agua de mar circundante. Estas dos comunidades responden diferentes frente a las condiciones medidas, la comunidad de bacterioplancton difiere frente al tiempo de muestreo y la comunidad de microorganismos eucariotas no difiere frente a ninguna condición (ubicación y el tiempo).

La comunidad de bacterioplancton del agua de mar circundante se vio favorecida por Alphaproteobacterias y la comunidad de sargazo pelágico por Gammaproteobacteria con un enriquecimiento de *Vibrio*, y en menor proporción de *Photobacterium*. La abundancia de estos dos géneros puede verse favorecida por la cercanía a la costa (zona posterior).

No se encontró diferencia significativa en la diversidad beta de las comunidades de bacterioplancton y microorganismos eucariotas de la zona arrecifal frontal y posterior. Sin embargo, hubo taxones de bacterioplancton diferencialmente abundantes.

Se caracterizó la diversidad de la microbiota asociada a sargazo pelágico y agua de mar circundante, lo cual aporta información valiosa sobre los grupos microbianos que pueden representar un problema en los ecosistemas marino costeros.

10. Referencias

- Aldana Aranda, D. (2020, diciembre). México ante el sargazo. *Ciencia*, 71(4), 6-7.
- Alleyne, K. S.T., Neat, F., & Oxenford, H. A. (2023, February 15). A baseline assessment of the epiphytic community associated with pelagic sargassum in the Tropical Atlantic. *Aquatic Botany*, 186(103635). <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2023.103635>
- Arellano-Verdejo, J., & Lazcano-Hernández, H. E. (2021, May 13). Collective view: mapping Sargassum distribution along beaches. *PeerJ Comput. Sci.*, 7(528). 10.7717/peerj-cs.528
- Austin, B., & Zhang, X. H. (2006, August 1). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 119-124. doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x
- Baker, P., Minzlaff, U., Schoenle, A., Schwabe, E., Hohlfeld, M., Jeuck, A., Brenke, N., Prausse, D., Rothenbeck, M., Brix, S., Frutos, I., Jörger, K. M., Neusser, T. P., Koppelman, R., Devey, C., Brandt, A., & Arndt, H. (2018, February). Potential contribution of surface-dwelling Sargassum algae to deep-sea ecosystems in the southern North Atlantic. *Deep-Sea Research*, 148, 21-34. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2017.10.002>
- Baker- Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., & Martinez-Urtaza, J. (2018, June 21). *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0005-8>
- Caballero Vázquez, J. A., Acosta González, G., & Hernández Zepeda, C. (2020, diciembre). El sargazo, un fenómeno complejo. *Ciencia*, 71(4), 14-19.
- Camacho, O., Mattio, L., Draisma, S., Fredericq, S., & Diaz- Pulido, G. (2014, December 1). Morphological and molecular assessment of Sargassum (Fucales, Phaeophyceae) from

- Caribbean Colombia, including the proposal of *Sargassum giganteum* sp. nov., *Sargassum schnetteri* comb. nov. and *Sargassum* section *Cladophyllum* sect. nov. *Systematics and Biodiversity*, 13, 105-130.
<https://doi.org/10.1080/14772000.2014.972478>
- Carrillo, L., & Sheinbaum Pardo, J. (2020, diciembre). Sargazo en movimiento. *Ciencia*, 71(4), 20-27.
- Chávez, V., Uribe-Martínez, A., Cuevas, E., Rodríguez-Martínez, R. E., van Tussenbroek, B. I., Francisco, V., Estévez, M., Celis, L. B., Monroy-Velázquez, L. V., Leal-Bautista, R., Álvarez-Filip, L., García-Sánchez, M., Masia, L., & Silva, R. (2020, October 18). Massive Influx of Pelagic *Sargassum* spp. on the Coasts of the Mexican Caribbean 2014–2020: Challenges and Opportunities. *Water*, 12(2908).
<https://doi.org/10.3390/w12102908>
- Coston-Clements, L., Settle, L. R., Hoss, D. E., & Cross, F. A. (1991, October). Utilization of the *Sargassum* habitat by marine invertebrates and vertebrates, a review. *NOAA technical memorandum NMFS-SEFSC*, 296, 12-21.
- Destoumieux-Garzón, D., Canesi, L., Oyanedel, D., Travers, M. A., Charrière, G. M., Pruzzo, C., & Vezzulli, L. (2020, May 3). *Vibrio*–bivalve interactions in health and disease. *Environmental Microbiology*, 22(10), 4323-4341. doi:10.1111/1462-2920.15055
- de Széchy, M. T., Guedes, P. M., Baeta-Neves, M. H., & Oliveira, E. N. (2012, August 1). Verification of *Sargassum natans* (Linnaeus) Gaillon (Heterokontophyta: Phaeophyceae) from the Sargasso Sea off the coast of Brazil, western Atlantic Ocean. *Check List and Authors*, 8(4), 638–641. doi: 10.15560/8.4.638

- Egan, S., & Gardiner, M. (2016, June 21). Microbial Dysbiosis: Rethinking Disease in Marine Ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 7(991). doi: 10.3389/fmicb.2016.00991
- Egan, S., Harder, T., Burke, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S., & Thomas, T. (2012, December 10). The seaweed holobiont: understanding seaweed–bacteria interactions. *Microbiology Reviews*, 37, 462–476. DOI: 10.1111/1574-6976.12011
- Florez, J. Z., Camus, C., Hengst, M. B., & Buschmann, A. H. (2017, December 22). A Functional Perspective Analysis of Macroalgae and Epiphytic Bacterial Community Interaction. *Frontiers in Microbiology*, 8(2561). doi: 10.3389/fmicb.2017.02561
- Franks, J. S., Johnson, D. R., & Ko, D. S. (2016, November 17). Pelagic Sargassum in the Tropical North Atlantic. *Gulf and Caribbean Research*, 27(1), 6-11. DOI: 10.18785/gcr.2701.08
- Gill, J. G., Hill-Spanik, K. M., Whittaker, K. A., Jones, M. L., & Plante, C. (2022, February 28). Sargasso Sea bacterioplankton community structure and drivers of variance as revealed by DNA metabarcoding analysis. *PeerJ*, 10(12835). DOI 10.7717/peerj.12835
- Glasl, B., Haskell, J. B., Aires, T., Serrão, E. A., Bourne, D. G., Webster, N. S., & Frade, P. R. (2021, November 6). Microbial Surface Biofilm Responds to the Growth-Reproduction-Senescence Cycle of the Dominant Coral Reef Macroalgae *Sargassum* spp. *Life*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/life11111199>
- Glasl, B., Robbins, S., Frade, P. R., Maranon, E., Laffy, P. W., Bourne, D. G., & Webster, N. S. (2020, June). Comparative genome-centric analysis reveals seasonal variation in the function of coral reef microbiomes. *The ISME Journal*, 14(6), 1435–1450. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0622-6>

- Hervé, V., Lambourdière, J., René-Trouillefou, M., Devault, D. A., & Lopez, P. J. (2021, October 29). Sargassum Differentially Shapes the Microbiota Composition and Diversity at Coastal Tide Sites and Inland Storage Sites on Caribbean Islands. *Frontiers in Microbiology*, 12(701155). doi: 10.3389/fmicb.2021.701155
- Huffard, C. L., von Thun, S., Sherman, A. D., Sealey, K., & Smith Jr., K. L. (2014, September 14). Pelagic Sargassum community change over a 40-year period: temporal and spatial variability. *Marine Biology*, 161, 2735–2751. <https://doi.org/10.1007/s00227-014-2539-y>
- Johns, E. M., Lumpkin, R., Putman, N. F., Smith, R. H., Muller-Karger, F. E., Rueda-Roa, D. T., Hu, C., Wang, M., Brooks, M. T., Gramer, L. J., & Werner, F. E. (2020, January 16). The establishment of a pelagic Sargassum population in the tropical Atlantic: Biological consequences of a basin-scale long distance dispersal event. *Progress in Oceanography*, 182(102269). <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2020.102269>
- Keeling, P. J., & del Campo, J. (2017, June 5). Marine Protists Are Not Just Big Bacteria. *Current Biology*, 27, 541–549,. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.03.075>
- Kim, D. Y., Countway, P. D., Gast, R. J., & Caron, D. A. (2011, March 4). Rapid Shifts in the Structure and Composition of a Protistan Assemblage During Bottle Incubations Affect Estimates of Total Protistan Species Richness. *Microbial Ecology*, 62, 383–398. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9816-9>
- Kim, H. M., Jo, J., Park, C., Choi, B. Y., Lee, H. G., & Kim, K. Y. (2019, December 15). Epibionts associated with floating Sargassum horneri in the Korea Strait. *ALGAE*, 34(4), 303-313. <https://doi.org/10.4490/algae.2019.34.12.10>
- Koffi, K., Yacouba, S., Bra Yvette, F. N., Abou, B., & Grass-Sessay, S. A. (2016). Taxonomic study of two species of Sargassum: Sargassum fluitans (Børgesen) Børgesen and

- Sargassum natans (Linnaneus) Gaillon (brown algae) collected in Côte d'Ivoire coasts, West Africa. *Nature and Science*, 14(10), 50-56. doi:10.7537/marsnsj141016.09.
- Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2015, June). Exploring the potential of algae/bacteria interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 125–129.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.007>
- Lam, C., & Harder, T. (2007, September 4). Marine macroalgae affect abundance and community richness of bacterioplankton in close proximity. *Journal of Phycology*, 43(5), 874-881. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00385.x>
- Martin, L. M. (2016, May). *Pelagic Sargassum And Its Associated Mobile Fauna In The Caribbean, Gulf Of Mexico, And Sargasso Sea* [Thesis] [Archivo Digital].
- Martínez-González, G. (2019, Septiembre 5). Sargazo: la irrupción atípica de un ecosistema milenario. *Salud Publica de México*, 61(5), 698-700. <https://doi.org/10.21149/10838>
- Marx, U. C., Roles, J., & Hankamer, B. (2021, January 14). Sargassum blooms in the Atlantic Ocean – From a burden to an asset. *Algal Research*, 54.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102188>
- Mattio, L., & Payri, C. E. (2010, September 22). 190 Years of Sargassum Taxonomy, Facing the Advent of DNA Phylogenies. *The Botanical Review*, 77, 31–70.
<https://doi.org/10.1007/s12229-010-9060-x>
- Maurer, A. S., De Neef, E., & Stapleton, S. (2015, September). Sargassum accumulation may spell trouble for nesting sea turtles. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 13(7), 394-395. DOI:10.1890/1540-9295-13.7.394

- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013, April 22). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *Plos One*, 8(4). doi:10.1371/journal.pone.0061217
- Mei, X., Wu, C., Zhao, J., Yan, T., & Jiang, P. (2019, May 28). Community Structure of Bacteria Associated With Drifting *Sargassum horneri*, the Causative Species of Golden Tide in the Yellow Sea. *Frontiers in Microbiology*, 10(1192). doi: 10.3389/fmicb.2019.01192
- Mendonça, I. R., Theirlynck, T., Zettler, E. R., Amaral-Zettler, L. A., & Oliveira, M. C. (2023, February 9). Microbiota changes in a stranding simulation of the holopelagic macroalgae *Sargassum natans* and *Sargassum fluitans*. *Research Square*.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2556643/v1>
- Mendoza-Becerril, M. A., Serviere-Zaragoza, E., Mazariegos-Villarreal, A., Rivera-Perez, C., Calder, D. R., Vázquez-Delfín, E. F., Freile-Pelegrín, Y., Agüero, J., & Robledo, D. (2020, August 24). Epibiont hydroids on beachcast *Sargassum* in the Mexican Caribbean. *PeerJ*, 8(9795). DOI 10.7717/peerj.9795
- Michotey, V., Blanfuné, A., Chevalier, C., Garel, M., Diaz, F., Berline, L., Le Grand, L., Armougom, F., Guasco, S., Ruitton, S., Changeux, T., Belloni, B., Blanchot, J., Ménard, F., & Thibaut, T. (2020, July 29). In situ observations and modelling revealed environmental factors favouring occurrence of *Vibrio* in microbiome of the pelagic *Sargassum* responsible for strandings. *Science of the Total Environment*, 748(141216).
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141216>
- Mikryukov, V. (n.d.). *vmikk/metagMisc: v.0.0.0.9000 [(v.0.0.0.9000)]*.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.571403>

- Mincer, T. J., Bos, R. P., Zettler, E. R., Zhao, S., Asbun, A. A., Orsi, W. D., Guzzetta, V. S., & Amaral-Zettler, L. A. (2023, May 3). Sargasso Sea *Vibrio* bacteria: Underexplored potential pathovars in a perturbed habitat. *Water Research*, 242(120033).
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120033>
- Minich, J. J., Morris, M. M., Brown, M., Doane, M., Edwards, M. S., Michael, T. P., & Dinsdale, E. A. (2018, February 23). Elevated temperature drives kelp microbiome dysbiosis, while elevated carbon dioxide induces water microbiome disruption. *Plos One*, 13(2).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192772>
- Mohapatra, B. R. (2023, June 25). Phylogenetic and functional characterization of the microbiome of Sargassum seaweed waste. *Applied Phycology*, 4(1), 87-98.
<https://doi.org/10.1080/26388081.2023.2220384>
- Monroy-Velazquez, L. V., Rodríguez-Martínez, R. E., van Tussenbroek, B. I., Aguiar, T., Solís-Weiss, V., & Briones-Fourzan, P. (2019, October 7). Motile macrofauna associated with pelagic Sargassum in a Mexican reef lagoon. *Journal of Environmental Management*, 252(109650). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109650>
- Not, F., Gausling, R., Azam, F., Heidelberg, J. F., & Worden, A. Z. (2007, February 16). Vertical distribution of picoeukaryotic diversity in the Sargasso Sea. *Environmental Microbiology*, 9(5), 1233–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01247.x>
- Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., De Caceres, M., Durand, S., ... Weedon, J. (2024, May 21). *Community Ecology Package* [Package 'vegan'].
<https://github.com/vegandevs/vegan>

- Oyesiku, O. O., & Egunyomi, A. (2014, March 5). Identification and chemical studies of pelagic masses of *Sargassum natans* (Linnaeus) Gaillon and *S. fluitans* (Borgessen) Borgesen (brown algae), found offshore in Ondo State, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 13(10), 1188-1193. DOI: 10.5897/AJB2013.12335
- Pagès, H., Aboyoun, P., Gentleman, R., & DebRoy, S. (2022, October 13). *Efficient manipulation of biological strings* [Package ‘Biostrings’].
<https://bioconductor.org/packages/Biostrings>
- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics*, 20(2), 289–290. DOI: 10.1093/bioinformatics/btg412
- Parr, A. E. (1939, December). Quantitative Observations On The Pelagic *Sargassum* Vegetation Of The Western North Atlantic. *Bingham Oceanographic Laboratory*, 5(7).
- Redmond, S., kim, J. k., Yarish, C., Pietrak, M., & Bricknell, I. (2014). Culture of *Sargassum* in Korea: Techniques and Potential for Culture in the U.S. *Maine Sea Grant Publications*, 32. https://digitalcommons.library.umaine.edu/seagrant_pub/32
- Reidl, J., & Klose, K. E. (2002, June 1). *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2), 125-139.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00605.x>
- Robledo, D., Vázquez-Delfín, E., Freile-Pelegrín, Y., Vázquez-Elizondo, R. M., Qui-Minet, Z. N., & Salazar-Garibay, A. (2021, July 22). Challenges and Opportunities in Relation to *Sargassum* Events Along the Caribbean Sea. *Frontiers in Marine Science*, 8(699664).
doi: 10.3389/fmars.2021.699664
- Rodríguez-Martínez, R. E., Quintana-Pali, G., Trujano-Rivera, K. I., Herrera, R., García-Rivas, M. d. C., Ortiz, A., Castañeda, G., Maldonado, G., & Jordán-Dahlgren, E. (2021,

- September 6). Sargassum landings have not compromised nesting of loggerhead and green sea turtles in the Mexican Caribbean. *Journal of Environmental Management*, 299(113614). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113614>
- Rosellón-Druker, J., Calixto-Pérez, E., Escobar-Briones, E., González-Cano, J., Masiá-Nebot, L., & Córdova-Tapia, F. (2022, June 30). A Review of a Decade of Local Projects, Studies and Initiatives of Atypical Influxes of Pelagic Sargassum on Mexican Caribbean Coasts. *Phycology*, 2(3), 254-279. <https://doi.org/10.3390/phycology2030014>
- Rosenberg, E., Kushmaro, A., Kramarsky-Winter, E., Banin, E., & Yossi, L. (2008, November 13). The role of microorganisms in coral bleaching. *The ISME Journal*, 3(2), 139–146. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.104>
- Salgado-Hernandez, E., Ortiz-Ceballos, Á. I., Alvarado-Lassman, A., Martínez-Hernández, S., Rosas-Mendoza, E. S., Velázquez-Fernández, J. B., & Dorantes-Acosta, A. E. (2023, August 17). Energy-saving pretreatments affect pelagic Sargassum composition and DNA metabarcoding reveals the microbial community involved in methane yield. *Plos One*, 18(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289972>
- Serebryakova, A., Aires, T., Viard, F., Serrão, E. A., & Engelen, A. H. (2018, December 5). Summer shifts of bacterial communities associated with the invasive brown seaweed *Sargassum muticum* are location and tissue dependent. *Plos One*, 13(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206734>
- Singh, R. P., & Reddy, C. R.K. (2014, April 1). Seaweed–microbial interactions: key functions of seaweed-associated bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 88(2), 213-230. DOI: 10.1111/1574-6941.12297

- Sjöstedt, J., Martiny, J. B.H., Munk, P., & Riemann, L. (2014, February 21). Abundance of Broad Bacterial Taxa in the Sargasso Sea Explained by Environmental Conditions but Not Water Mass. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(9), 2786–2795.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00099-14>.
- Theirlynck, T., Mendonça, I. I., Engelen, A. H., Bolhuis, H., Collado-Vides, L., van Tussenbroek, B. I., García-Sánchez, M., Zettler, E., Muyzer, G., & Amaral-Zettler, L. (2023). Diversity of the holopelagic Sargassum microbiome from the Great Atlantic Sargassum Belt to coastal stranding locations. *Harmful Algae*, 122(102369).
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102369>
- Thiel, M., & Gutow, L. (2005, July). The Ecology of Rafting in the Marine Environment. Ii. the Rafting Organisms and Community. *Oceanography and Marine Biology*, 43, 279-418.
DOI:10.1201/9781420037449.ch7
- Torralba, M. G., Franks, J. S., Gomez, A., Yooseph, S., Nelson, K. E., & Grimes, D. J. (2017, January). Effect of Macondo Prospect 252 Oil on Microbiota Associated with Pelagic Sargassum in the Northern Gulf of Mexico. *Microbial Ecology*, 73, 91–100.
DOI<https://doi.org/10.1007/s00248-016-0857-y>
- Trott, T. M., McKenna, S. A., Pitt, J. M., Hemphill, A., Ming, F. W., Rouja, P., Gjerde, K. M., Causey, B., & Earle, S. A. (2010, November). Efforts to Enhance Protection of the Sargasso Sea. *Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 282-288.
<http://hdl.handle.net/1834/36068>
- Uribe-Martínez, A., Guzmán-Ramírez, A., Arreguín-Sánchez, F., & Cuevas, E. (2020). El sargazo en el Caribe mexicano, revisión de una historia impensable. In E. Rivera-Arriaga, I. Azuz-Adeath, O. D. Cervantes Rosas,, A. Espinoza-Tenorio, R. Silva

- Casarín, A. Ortega-Rubio, A. V. Botello, & B. E. Vega-Serratos (Eds.), *Gobernanza y Manejo de las Costas y Mares ante la Incertidumbre Una Guía para Tomadores de Decisiones* (pp. 743-768). 978-607-8444-58-8
- van Tussenbroek, B. I., Hernández Arana, H. A., Rodríguez-Martínez, R. E., Espinoza-Avalos, J., Canizales-Flores, H. M., González-Godoy, C. E., Barba-Santos, M. G., Vega-Zepeda, A., & Collado-Vides, L. (2017, September 15). Severe impacts of brown tides caused by *Sargassum* spp. on near-shore Caribbean seagrass communities. *Marine Pollution Bulletin*, 122, 272-281. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.057>
- Van Tussenbroek,, B. I., Monroy Velázquez,, L. V., Rodríguez Vargas,, D. C., Thomé, P. E., Suescún-Bolívar,, L. P., Barba Santos, M. G., Gómez Reali, M. A., & Escalante Mancera, J. E. (2022, Marzo). *INVASAR Establecimiento de un protocolo de detección temprana y diagnóstico de especies exóticas invasoras asociadas al sargazo pelágico en zonas marino-costeras del Caribe mexicano* [Informe Final InvaSAR].
- Vigil, P., Countway, P. D., Rose, J., Lonsdale, D. J., Gobler, C. J., & Caron, D. A. (2009, January 29). Rapid shifts in dominant taxa among microbial eukaryotes in estuarine ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology*, 54, 83–100. doi: 10.3354/ame01252
- Wang, M., Hu, C., Barnes, B. B., Mitchum, G., Lapointe, B., & Montoya, J. P. (2019, July 5). The great Atlantic *Sargassum* belt. *Science*, 365(6448), 83–87. DOI: 10.1126/science.aaw7912
- Ward, G. M., Faisan Jr, J. P., Cottier-Cook, E. J., Gachon, C., Hurtado, A. Q., Lim, P. E., Matoju, I., Msuya, F. E., Bass, D., & Brodie, J. (2020, August). A review of reported seaweed diseases and pests in aquaculture in Asia. *World Aquaculture Society*, 51(4), 815-828. <https://doi.org/10.1111/jwas.12649>

- Wells, R.J. D., & Rooker, J. R. (2004, January). Spatial And Temporal Patterns Of Habitat Use By Fishes Associated With Sargassum Mats In The Northwestern Gulf Of Mexico. *Bulletin Of Marine Science*, 74(1), 81–99.
<https://www.researchgate.net/publication/233686918>
- Wells, R.J. D., & Rooker, J. R. (2009, November). Feeding ecology of pelagic fish larvae and juveniles in slope waters of the Gulf of Mexico. *Journal of Fish Biology*, 75(7), 1719–1732. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02424.x
- Wickham, H. (2016). *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer International Publishing. 10.1007/978-3-319-24277-4
- Williams, B. A., Feagin, R., & Stafford, A. W. (2008, January). Environmental impacts of beach raking of Sargassum spp. on Galveston Island, TX. *Shore & Beach*, 76.
<https://www.researchgate.net/publication/255572831>
- Witherington, B., Hiram, S., & Hardy, R. (2012, August 30). Young sea turtles of the pelagic Sargassum-dominated drift community: habitat use, population density, and threats. *Marine Ecology Progress Series*, 463, 1–22. doi: 10.3354/meps09970
- Ye, G., Zhang, X., Yan, C., Lin, Y., & Huang, Q. (2021, June 20). Polystyrene microplastics induce microbial dysbiosis and dysfunction in surrounding seawater. *Environment International*, 156(106724). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106724>
- Zozaya-Valdes, E., Egan, S., & Thomas, T. (2015, February 24). A comprehensive analysis of the microbial communities of healthy and diseased marine macroalgae and the detection of known and potential bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6(146). doi: 10.3389/fmicb.2015.00146

11. Apéndice

Tabla A1. ASVs observados e Índices de diversidad de Shannon, Simpson y InvSimpson de la comunidad de bacterioplancton. Las muestras corresponden a: muestreo 1 (2021-1, 24 de abril, M1), muestreo 2 (2021-2, 1 de junio, M3) y muestreo 3 (2021-3, 2 de julio, M6). Las muestras de Sargazo son las correspondientes a M1-15 y M1-19.

	Observados	Shannon	Simpson	InvSimpson
M1-01	156	3,55426018989338	0,912775928888889	11,464725129903
M1-15	316	4,30150453476049	0,956854293333333	23,1772771211226
M1-19	189	3,37981324913784	0,900134435555556	10,0134616528033
M1-03	149	3,56142857543495	0,91600992	11,9061679665027
M1-05	184	3,73646481651182	0,942242168888889	17,3136695191386
M1-06	161	3,62728063758734	0,933245084444444	14,980170249302
M3-01	168	3,69182149047568	0,944602168888889	18,0512482157344
M3-02	158	3,59194997241532	0,93273472	14,8665106277711
M3-05	206	3,95735990896741	0,95308384	21,3146173940919
M3-06	234	3,93551946530694	0,944420693333333	17,9923079285144
M6-01	344	4,26816083958773	0,946517048888889	18,6975471477349
M6-02	188	3,84275536487776	0,933664	15,0747708634829
M6-03	269	4,02509635118042	0,9312032	14,5355597934788
M6-05	270	3,88770964149101	0,9471728	18,929642305479
M6-06	207	3,87482131648643	0,950534933333333	20,2162873192664

Tabla B2. ASVs observados e Índices de diversidad de Shannon, Simpson y InvSimpson de la comunidad de microorganismos eucariotas. Las muestras corresponden a: muestreo 1 (2021-1, 24 de abril, M1), muestreo 2 (2021-2, 1 de junio, M3) y muestreo 3 (2021-3, 2 de julio, M6). Las muestras de Sargazo son las correspondientes a M1-15, M1-19, M1-13 y M1-09.

	Observed	Shannon	Simpson	InvSimpson
M1-01	7	0,425808864416158	0,161957733992965	1,19325723840235
M1-13	6	1,37143953689931	0,712231404958678	3,47501435956347
M1-15	22	1,65946963898663	0,638235824785325	2,76423169708993
M1-19	14	1,74950251095749	0,762638319595213	4,21297994813081
M1-02	5	0,450468194121847	0,187443964888138	1,23068435503323
M1-03	7	0,690097115867521	0,290812599692909	1,41006453240283
M1-04	5	0,619988708020993	0,291909002498046	1,41224786577976
M1-05	12	0,850923954835084	0,332762616106483	1,49871698459807
M1-06	13	0,618282431517174	0,219772777901537	1,28167791596715
M1-09	11	0,945303753339108	0,385814805945956	1,62817340711083
M3-01	13	1,72675759302616	0,707725705082194	3,42144354597185
M3-02	9	1,46534511432743	0,634838766558663	2,73851632763928
M3-03	10	1,56689673544696	0,715266617969321	3,51205746536685
M3-04	2	0,223718076065834	0,110726643598616	1,12451361867704
M3-05	13	1,82215924599011	0,712662365154363	3,48022632168327
M3-06	18	2,27365460183114	0,826893849319176	5,77680224571463
M6-01	23	1,81506872414214	0,684417154744174	3,16874004729045

M6-02	6	1,36374430682583	0,681003584229391	3,13483146067416
M6-03	9	1,57415342442613	0,714767264086647	3,50590894413949
M6-04	2	0,278769371768587	0,1472	1,17260787992495
M6-05	9	1,06506461269611	0,449997864069375	1,81817475728155
M6-06	5	1,0346651704026	0,515555555555556	2,06422018348624

Apéndice C3. Script de trabajo de diversidad microbiana procariota. Índices de diversidad de Shannon, Simpson y InvSimpson, ASVs observados, abundancia relativa, PCoA y PERMANOVA. Adaptado de Cerqueda García (2020)

```
#librerias

library(phyloseq)

library(ggplot2)

library(vegan)

library(openxlsx)

library(ggh4x)

library(phyloseqCompanion)

library(Biostrings )

#Diversidad microbiana procariota

#importar el archivo .biom y el árbol .nwk

tab <-import_biom ("new_otu_table.biom", "tree.nwk")

tab

#importar el archivo de metadatos

metadatos <-import_qiime_sample_data("metadata.txt")

metadatos
```

```

#unir los metadatos con la tabla

tab <-merge_phyloseq(tab,metadatos)

tab

#cambiar los nombres de las columnas de clasificación

colnames(tax_table(tab))

colnames(tax_table(tab))<-c("Domain","Phylum","Class","Order","Family",
                             "Genus","Especies")

head(tax_table(tab))

#Filtrar los taxones no procariotes, cloroplasto, mitocondria

#cambiar los NA por Unassigned

tax_table(tab)[is.na(tax_table(tab))]<-"Unassigned"

#Filtrar

tabla <-subset_taxa(tab, Domain != "Unassigned")

tabla <-subset_taxa(tabla, Family != "Mitochondria")

tabla <-subset_taxa(tabla, Order != "Chloroplast")

#revisar la profundidad de secuenciación de cada muestra

```

```

sample_sums(tabla)

#Estandarizar las muestras a la profundidad mínima (muestreo aleatorio
#por rarefacción).

tablaSD <-rarefy_even_depth(tabla, 7500, replace = FALSE)

tablaSD

sample_sums(tablaSD)

# calcular la diversidad alfa

indices <- estimate_richness(tablaSD)

estimate_richness(tablaSD)

#Exportar valores de indices

write.xlsx(indices,"Indices procariotas.xlsx", asTable = TRUE)

#graficar indices de diversidad

#Graficamos los indices en funcion a una variable (sitio, muestreo, tipo)

plot_richness ( tablaSD ,x="sitio" # conjunto de datos
               ,measures = c ( "Shannon", "Simpson", "InvSimpson",
"Observed" ))+
  geom_boxplot(aes(color= sitio), alpha = 0.1) +
  theme_bw () + aes(color = as.factor(muestreo))+
  # modificar el titulos de los ejes

```

```

labs ( x = "Muestras", y = "Medidas de diversidad alfa") +
# eliminar bordes y relleno
theme( strip.background = element_blank ())+
scale_color_discrete(labels = c ( "Abril", "Junio", "Julio",
                                "Posterior", "Frontal"))+
theme ( axis.text.x = element_text ( angle = 360 ), # posicion texto de
eje x
        legend.title = element_blank (), # eliminar titulo de leyenda
        legend.position = "bottom", # posicion de la leyenda
        legend.key = element_rect ( fill = "white", colour = "gray" ))
+
  geom_text(aes (label = sample.ID), size=2.4 ,
            angle=360, fontface="bold", color="gray54",hjust = -0.3)+
  scale_x_discrete(labels = c("Posterior", "Frontal"))

#graficar la abundancia relativa a nivel de filo

#trasformar la abundancia a relativa

tablaRel <- transform_sample_counts (tablaSD, function(x) (x/sum(x))*100)

#graficar a nivel de filo

plot_bar (tablaRel, fill = "Phylum")

#aglomerar los ASVs por filo

tax_glom (tablaRel, "Phylum")

#modificar colores y mejorar el gráfico

#paleta de colores manuales

```

```

colors                                     <-
c("greenyellow","yellow1","lightblue4","turquoise3","thistle","coral",
  "lightyellow2","palegreen",
  "steelblue3","springgreen1","slateblue4","purple1",
  "paleturquoise","brown","green4","orchid3",
  "lemonchiffon3","mediumturquoise",
  "olivedrab3","navajowhite3","lightblue3","red",
  "green3","coral3","cornsilk3","aquamarine1","bisque3",
  "burlywood3","chartreuse2","cadetblue3","blue1",
  "violet","peru","powderblue")

#Graficar nuevamente phylum

# cambiar los nombres de titulos o etiquetas del grafico facetado,creo un

# vector con los nombres para agregarlos a la funcion de facetado

l <- as_labeller(c("sargazo"="Sargazo","water"="Agua","back"="Posterior",
  "front"="Frontal","1"="Abril","3"="Junio","6"="Julio"))

#categorizamos por sitio-tipo-muestreo

plot_bar ( tax_glom ( tablaRel, "Phylum" ), fill = "Phylum") +
  geom_bar(stat = "identity", color="gray82") +
  scale_fill_manual ( values = colors ) + theme_bw () +
  #cambio nombre de etiquetas y leyenda
  labs( x="Muestras", y="Abundancia" ) +
  guides ( fill = guide_legend ( title = "Filo", ncol = 2 )) +
  #agrupar facetas
  facet_nested_wrap (tipo~sitio~muestreo, scales = "free_x", nrow = 1,
    dir = "v",labeller = l) +
  #ajustar tamaño de paneles para un tamaño igual de barras
  force_panelsizes (cols = c ( 0.5, 0.5,0.9 ,0.9, 0.9, 0.9, 0.9,1.25),
    rows = c ( 3.5), respect = TRUE) +
  #tamaño de las barras

```

```

aes ( width= 0.8 ) +
#unir paneles, eliminar el espacio entre ellos
theme ( panel.spacing = unit(0, 'points'),
#eliminar relleno de las casillas con texto
strip.background = element_rect(fill = FALSE, linetype = "solid",
                                color = "black", linewidth = 0.7))

#aglomerar los taxones de baja abundanciaa

clase <- tax_glom(tablaRel, taxrank="Class")

baja_abundancia <- filter_taxa(clase,function(x) sum(x) < 1, TRUE)

clase <- merge_taxa(clase,taxa_names(baja_abundancia))

tax_table(clase)[is.na(tax_table(clase))] <- "<1%"

#graficar a clase

plot_bar (clase, fill = "Class") + scale_fill_manual (values = colors) +
  theme_bw() + geom_bar (stat = "identity", color="gray82") +
  labs ( x="Muestras", y="Abundancia") +
  guides (fill = guide_legend (title = "Clase",ncol = 1))+
  facet_nested_wrap (tipo~sitio~muestreo, scales = "free_x", nrow = 1,
                    dir = "v", labeller = 1) +
  force_panelsizes (cols = c ( 0.5, 0.5,0.9 ,0.9, 0.9, 0.9, 0.9,1.25),
                    rows = c ( 3.5), respect = TRUE) + aes(width= 0.8) +
  theme(panel.spacing = unit(0, 'points'),
  strip.background = element_rect(fill = FALSE, linetype = "solid",
                                color = "black", linewidth = 0.7))

#aglomerar los taxons de baja abundancia

familia <- tax_glom(tablaRel, taxrank="Family")

```

```

baja_abundancia01 <-filter_taxa(familia,function(x) sum(x)< 1, TRUE)

familia <-merge_taxa(familia,taxa_names(baja_abundancia01))

tax_table(familia)[is.na(tax_table(familia))]<-"<1%"

#seleccionar 100 colores al azar

paleta<-sample(colors(),size = 80)

#graficar a familia

plot_bar (familia, fill = "Family") + scale_fill_manual (values = paleta)
+
  theme_bw () + geom_bar (stat = "identity") +
  labs(x="Muestras",y="Abundancia") +
  guides (fill = guide_legend(title = "Familia", ncol = 2)) +
  facet_nested_wrap (tipo~sitio~muestreo, scales = "free_x",nrow = 1,
                     dir = "v", labeller = 1) +
  force_panelsizes (cols = c ( 0.5, 0.5,0.9 ,0.9, 0.9, 0.9, 0.9,1.25),
                   rows = c ( 3.5), respect = TRUE) + aes (width= 0.8) +
  theme (panel.spacing = unit(0, 'points') ,
        strip.background = element_rect (fill = FALSE, linetype =
"solid",
                                         color = "black", linewidth =
0.7))

#graficar a Género

Genero <- tax_glom(tablaRel, taxrank="Genus")

baja_abundancia02 <-filter_taxa(Genero,function(x) sum(x) < 1, TRUE)

```

```

Genero <-merge_taxa(Genero,taxa_names(baja_abundancia02))

tax_table(Genero)[is.na(tax_table(Genero))]<-"<1%"

plot_bar (Genero, fill = "Genus") + scale_fill_manual (values = paleta) +
  theme_bw () + geom_bar (stat = "identity") +
  labs (x="Muestras",y="Abundancia") +
  guides(fill = guide_legend (title = "Género", ncol = 2))+
  facet_nested_wrap (tipo~sitio~muestreo, scales = "free_x", nrow = 1,
                     dir = "v", labeller = 1) +
  force_panelsizes (cols = c ( 0.5, 0.5,0.9 ,0.9, 0.9, 0.9, 0.9,1.25),
                   rows = c ( 3.5), respect = TRUE) + aes (width= 0.8) +
  theme (panel.spacing = unit (0, 'points'),
        strip.background = element_rect(fill = FALSE, linetype = "solid",
                                         color = "black", linewidth = 0.7))

#Guardamos el entorno de trabajo

save.image(file = "Diversidad.RData")

load("Diversidad.Rdata")

#analizar la diversidad beta

#Calcular el PCoA con la distancia unifrac

WU_ord <- ordinate(tablaSD, "PCoA","wunifrac")

UU_ord <- ordinate(tablaSD, "PCoA","uunifrac")

### Graficar el PCoA

```

```

wu_sitio <- plot_ordination (tablaSD, WU_ord, shape = "sitio",
                             title = "a.") +

  theme_bw() +
  aes (color = as.factor (muestreo)) +
  geom_point (size = 4.1) +
  scale_shape_manual (labels = c ( "Posterior", "Frontal" ),
                      values = c (15,16), name = "Sitio") +
  scale_color_manual (labels = c ( "Abril", "Junio", "Julio" ),
                      values = c ("coral", "turquoise", "palegreen"),
                      name = "Fecha")+
  theme (legend.position = "bottom",
         legend.key = element_rect ( fill = "white", colour = "gray" ))
+
  geom_text(aes (label = sample.ID), size=2.4 ,
           angle=360, fontface="bold", color="gray4")

uu_sitio <- plot_ordination (tablaSD, UU_ord, shape = "sitio",
                             title = "b." ) +

  theme_bw() +
  aes (color = as.factor (muestreo)) +
  geom_point (size = 4.1) +
  scale_shape_manual (labels = c ( "Posterior", "Frontal" ),
                      values = c (15,16), name = "Sitio") +
  scale_color_manual (labels = c ( "Abril", "Junio", "Julio" ),
                      values = c ("coral", "turquoise", "palegreen"),
                      name = "Fecha")+
  theme (legend.position = "bottom",
         legend.key = element_rect ( fill = "white", colour = "gray" )) +
  geom_text(aes (label = sample.ID), size=2.4 ,
           angle=360, fontface="bold", color="gray4")

library(gridExtra)

#unimos los graficos que son independientes

```

```

gridExtra::grid.arrange(wu_sitio,uu_sitio)

#Calcular una matriz de distancia unifrac.

WU_distance <- phyloseq::distance(tablaSD, method = "unifrac", weighted =
TRUE)

#Calcular un PERMANOVA con vegan y la matriz de distancia.

PERMANOVA <- adonis2 (WU_distance ~ tipo + sitio + muestreo,
                      as(sample_data(tablaSD),
                          "data.frame"),permutations = 999)

write.csv (PERMANOVA, file = "resultados_permanova.csv")

#Guardamos la tabla con la que trabajamos (tablaSD) en formato .lefse

phyloseq2lefse (ps= tablaSD, covars = "sitio", file.name =
"lefse_data.txt",
               taxa.levels = c("Phylum","Class","Family","Genus"),
               transpose.otus = TRUE)

```

Apéndice D4. Script de trabajo de diversidad microbiana eucariota. Índices de diversidad de Shannon, Simpson y InvSimpson, ASVs observados, PCoA y PERMANOVA. Adaptado de Cerqueda García (2020)

```
#Diversidad microbiana eucariota

#paqueteria

library(phyloseq)

library(ggplot2)

library(vegan)

library(openxlsx)

library(ggh4x)

library(phyloseqCompanion)

library(Biostrings )

library (dplyr)

library(ape)

library(taxize)

#Guardamos nuestra RData

save.image ("Eukariota.RData")
```

```

# filtro inverso (recuperar secuencias)

tablae <- subset_taxa (tab, Domain == "Unassigned" | Order == "Chloroplast"
|
                        Family == "Mitochondria")

otu_tablee <- otu_table(tablae)

#cargamos el archivo con las secuencias

sequences <- readDNAStringSet("DNA Seq.fasta")

# obtenemos los ids(identificadores - ID) de la otu table

nombres_otuse <- rownames(otu_tablee)

# extraemos secuencias de la otu_table (los ID)

Secuenciase <- sequences[nombres_otuse]

# Guardamos nuestro objeto con las secuencias filtradas

writeXStringSet(Secuenciase, "Secuencias euc.fasta")

# Dividir las secuencias en grupos

S16_01_050 <- Secuencias[1:50, ]

## Guardar cada grupo en un archivo FASTA

writeXStringSet(S16_01_050, file="S16_01_50.fasta")

```

```

#Cargamos los resultados de blast

blastn <- read.csv ("Secuencias.txt", header = FALSE, sep = "\t")

#combinamos los blastn de la búsqueda de secuencias homologas
#guardamos en un objeto los objetos anteriores para combinarlos

blastne <- rbind (blastn, blastna, blastnb)

#Exportamos el objeto con formato tabular

write.table (blastne, file = "blastne.txt", sep = "\t", col.names = FALSE,
             row.names = FALSE, quote = FALSE)

#cargamos los Hits ID de Blast

#Hits rs

hitst <- read.table("blastn S16 T10 rs.txt",sep = "\t")

#Hits nt

hitsn <- read.table("blastn S16 T05 nt.txt",sep = "\t")

#Filtramos ahora solo el mejor Hit para cada ASVs

#Ordenar los resultados por porcentaje de identidad de mayor a menor

# rs

blastnHits <- hitst [order(hitst$V3, decreasing = TRUE), ]

```

```

#nt

blastnHitsn <- hitsn [order(hitsn$V3, decreasing = TRUE), ]

# Eliminar duplicados basados en la columna 'query_id'

#rs

blastndup <- blastnHits [!duplicated (blastnHits$V1), ]

#nt

blastndupn <- blastnHitsn [!duplicated (blastnHitsn$V1), ]

# Filtrar los mejores hits (en este caso, los de mayor porcentaje de
identidad)

#rs

bestHits <- subset (blastndup, !duplicated(V1))

#nt

bestHitsn <- subset (blastndupn, !duplicated(V1))

#Guardamos los datos

write.table (bestHitsn, file = "bestHitsn.tsv", sep = "\t", col.names =
FALSE,
            row.names = FALSE, quote = FALSE)

```

```

#Buscamos las secuencias con ape (de los mejores Hits)

#separamos los Hits

#rs

HitsId    <- bestHits[, 2]

#nt

HitsIdn    <- bestHitsn[, 2]

#Guardamos los datos

write.table(HitsId,file = "Hits.tsv", sep = "\t", col.names = FALSE,
            row.names = FALSE, quote = FALSE)

# Descrpcion de ape (discriminar los ASVs de organelos)

#rs

HitsIds <- read.GenBank(HitsId)

Hitsd <- attr(HitsIds, "description")

# Filtro de ASVs de organelos

Hitsf    <-      subset      (HitsIds,      grepl("Eukaryota|Chlorobiota
group|Viridiplantae",

                                                    Hitsd, ignore.case = TRUE))

#nt (Grupos)

hitsId01an    <- HitsIdn [5:50]

```

```

HitsIds01an <- read.GenBank(hitsId01an)

Hitsd01an  <- attr(HitsIds01an, "description")

# Filtro de ASVs de organelos

Hitsf01ans          <-          subset          (Hitsd01an,
grepl("chloroplast|plastid|eukaryote|mitochondrion|mitochondrial",

                                           Hitsd01an, ignore.case = TRUE))

ho01an <- attr(Hitsf01an, "names")

hitsId01bn  <- HitsIdn [51:100 ]

HitsIds01bn <- read.GenBank(hitsId01bn)

Hitsd01bn <- attr(HitsIds01bn, "description")

# Filtro de ASVs de organelos

Hitsf01bns          <-          subset          (Hitsd01bn,
grepl("chloroplast|plastid|eukaryote|mitochondrion|mitochondrial",

                                           Hitsd01bn, ignore.case = TRUE))

ho01bn <- attr(Hitsf01bn, "names")

hitsId02n  <- HitsIdn [101:200 ]

```

```

HitsIds02n <- read.GenBank(hitsId02n)

Hitsd02n <- attr(HitsIds02n, "description")

# Filtro de ASVs de organelos

Hitsf02ns <- subset (Hitsd02n,
grepl("chloroplast|plastid|eukaryote|mitochondrion|mitochondrial",
Hitsd02n, ignore.case = TRUE))

ho02n <- attr(Hitsf02n, "names")

hitsId03n <- HitsIdn [201:300 ]

HitsIds03n <- read.GenBank(hitsId03n)

Hitsd03n <- attr(HitsIds03n, "description")

# Filtro de ASVs de organelos

Hitsf03ns <- subset (Hitsd03n,
grepl("chloroplast|plastid|eukaryote|mitochondrion|mitochondrial",
Hitsd03n, ignore.case = TRUE))

ho03n <- attr(Hitsf03n, "names")

#uno los grupos de nt

```

```

Hitsorganelosd <- c(Hitsf01ans, Hitsf01bns, Hitsf02ns, Hitsf03ns)

# rs (Linaje de Hits de salida, otro grupo)

#cargamos los Hits

outhits <- read.table("output_Hits rs.tsv",header = FALSE, sep = "\t" )

# Filtro de ASVs de organelos

Hitsfil <- subset (outhits, grepl("Eukaryota|Chlorobiota
group|Viridiplantae",
                                V3,ignore.case = TRUE))

hors <- Hitsfil[,1]

#Unir todos los Hits filtrados (rs y nt)

Hitsorganelos <- c(ho01an,ho01bn,ho02n,ho03n,hors )

Hitsorganelos <- data.frame(ID = Hitsorganelos)

#Guardar los datos

write.table (Hitsorganelos,"Hits organelos.tsv", sep = "\t", col.names =
FALSE,
            row.names = FALSE, quote = FALSE)

#obtenemos los id de los ASVs para filtrar en tax_table

```

```

#nt

filnt <- bestHitsn [bestHitsn$V2%in%Hitsorganelos$ID,]

Idant <- filnt [,1]

#rs

filrs <- bestHits  [bestHits$V2%in%Hitsorganelos$ID,]

Idars <- filrs [,1]

#Unir los ID de nt y rs

Idasv <- c(Idant, Idars)

#Filtramos para obtener los ID de los ASVs de plastidos

#creamos el objeto phyloseq para eucariotas

asvse <- prune_taxa(taxa_names(tab)%in%Idasv,tab)

otu_table <- otu_table(asvse)

sample_sums(asvse)

# calcular la diversidad alfa

indicese <- estimate_richness (asvse)

#Guardamos los datos

write.xlsx(indicese,"Indices eucariotas.xlsx", asTable = TRUE) #Exportar
#valores de indices #pendiente

```

```

#Graficamos los indices en funcioin a una variable (sitio, muestreo, tipo)

plot_richness (asvse ,x="muestreo" # conjunto de datos
               ,measures = c ( "Shannon", "Simpson", "InvSimpson",
"Observed"))+
  geom_boxplot(aes(color= as.factor( muestreo)), alpha = 0.1) +
  theme_bw () +
  # modificar el titulos de los ejes
  labs ( x = "Muestras", y = "Medidas de diversidad alfa") +
  # eliminar bordes y relleno
  theme( strip.background = element_blank ())+
  scale_color_discrete(labels = c ( "Abril", "Junio", "Julio"))+
  theme ( axis.text.x = element_text ( angle = 360 ), # posicion texto de
eje x
        legend.title = element_blank (), # eliminar titulo de leyenda
        legend.position = "bottom", # posicion de la leyenda
        legend.key = element_rect ( fill = "white", colour = "gray" )) +
  geom_text(aes (label = sample.ID), size=2.4 ,
            angle=360, fontface="bold", color="gray54",hjust = -0.3)+
  scale_x_discrete(labels = c("Abril", "Junio", "Julio"))

#normalizar los datos : CSS "Normalización de la escalada de sumas
acumuladas"

library(metagMisc)

asvsn <- phyloseq_transform_css (asvse,norm = TRUE, log = FALSE)

otu_table(asvsn)

otu_table(asvse)

#calcular la diversidad beta

### Calcular el PCoA con la distancia unifrac

```

```

WU_orde <- ordinate(asvsns, "PCoA","wunifrac")

UU_orde <- ordinate(asvsns, "PCoA","uunifrac")

### Graficar el PCoA

wu_sitioe <- plot_ordination (asvsns, WU_orde,shape = "sitio",
                             title = "a.") +

  theme_bw() +
  aes (color = as.factor (muestreo)) +
  geom_point (size = 4.1) +
  scale_shape_manual (labels = c ( "Posterior", "Frontal" ),
                      values = c (15,16), name = "Sitio") +
  scale_color_manual (labels = c ( "Abril", "Junio","Julio" ),
                      values = c ("coral","turquoise","palegreen"),
                      name ="Fecha")+
  theme (legend.position = "bottom",
         legend.key = element_rect ( fill = "white", colour = "gray" )) +
  geom_text(aes (label = sample.ID), size=2.0 ,
            angle=360, fontface="bold", color="gray4")

uu_sitioe <- plot_ordination (asvsns, UU_orde,shape = "sitio",
                             title = "b." ) +

  theme_bw() +
  aes (color = as.factor (muestreo)) +
  geom_point (size = 4.1) +
  scale_shape_manual (labels = c ( "Posterior", "Frontal" ),
                      values = c (15,16), name = "Sitio") +
  scale_color_manual (labels = c ( "Abril", "Junio","Julio" ),

```

```

        values = c ("coral", "turquoise", "palegreen"),
        name = "Fecha")+
theme (legend.position = "bottom",
      legend.key = element_rect ( fill = "white", colour = "gray" )) +
geom_text(aes (label = sample.ID), size=2.0 ,
          angle=360, fontface="bold", color="gray4")

#unimos los graficos que son independientes

library(patchwork)

wu_sitioe + uu_sitioe + plot_layout(guides = "collect") & theme(
  legend.position = "bottom")

#Calcular una matriz de distancia unifrac.

WU_distancee <- phyloseq::distance(asvs, method = "unifrac", weighted =
TRUE)

#Calcular un PERMANOVA con vegan y la matriz de distancia.

PERMANOVAe <- adonis2 (WU_distancee ~ tipo + sitio + muestreo,
                      as(sample_data(asvs),
                          "data.frame"), permutations = 999)

#Guardamos los datos

write.csv (PERMANOVAe, file = "resultados_permanova_e.csv")

```