

## Análisis de microbiota

Una vez hemos clasificado nuestros 'features' de acuerdo con la taxonomía de la base de datos, procedemos a comparar las secuencias con BLAST. Para ello nos fijamos en el ID de la visualización 'taxonomy.qzv', y buscamos aquella secuencia correspondiente a esta en la visualización obtenida anteriormente: 'rep-seqs.qzv'. Utilizando la herramienta BLASTX, con la base de datos non-redundant protein sequences (nr). Procedemos a comparar tres secuencias diferentes obtenidas en QIIME2.

Secuencia 1 a elegir:

aa02991aa081401d6317dd793953657	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Nitrospirum; o__Euzeyales; f__Euzeyaceae; g__Euzeyba; s__	0.999999990834283
---------------------------------	--	-------------------

Fig5. Clasificación taxonómica en QIIME2

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein mgl382 [Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1]	<a href="#">Magnetospirillum gryphis...</a>	84.7	84.7	99%	3e-19	65.33%	78	<a href="#">CAJ30042.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein CSW57_00575 [Williamsia marianensis]	<a href="#">Williamsia marianensis</a>	77.4	77.4	92%	2e-16	72.86%	74	<a href="#">PHV69143.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein [Lactobacillus helveticus]	<a href="#">Lactobacillus helveticus</a>	80.1	80.1	97%	3e-16	63.51%	174	<a href="#">NRO65176.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein [Lactobacillus helveticus]	<a href="#">Lactobacillus helveticus</a>	79.7	79.7	97%	3e-16	62.16%	174	<a href="#">NRO85455.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein [Lactobacillus helveticus]	<a href="#">Lactobacillus helveticus</a>	79.7	79.7	97%	4e-16	62.16%	174	<a href="#">NRN79830.1</a>

Fig6. Imagen parcial de BLASTX para secuencia 2

Podemos observar que las clasificaciones taxonómicas difieren entre ambas herramientas. En QIIME2, dicha clasificación se detiene a nivel de género (g\_\_Euzeyba), mientras que la información obtenida con BLASTX incluye especies específicas, como por ejemplo *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, *Williamsia marianensis* o *Lactobacillus helveticus*, entre otras. Podemos ver diferencias obvias a nivel de Filo, ya que en QIIME2 el filo se indica como Actinobacteria, mientras que en BLASTX existen diferentes filos, como proteobacteria, actinobacteria, firmicutes, chloroflexota y synergistetes. Lo cual indica una discrepancia significativa a nivel filogenético.

Secuencia 2:

3a13b451cd11461181384132971100	k__Bacteria; p__Chloroflexi; c__[Thermobaculaceae]; o__[Thermobaculaceae]; f__[Thermobaculaceae]; g__Thermobaculum; s__	0.8628372006522991
--------------------------------	---	--------------------

Fig7. Clasificación taxonómica en QIIME2

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	<a href="#">hypothetical protein CTZ27_38700 [Streptomyces griseocarnaeus]</a>	<a href="#">Streptomyces griseocarnaeus</a>	97.1	97.1	91%	3e-24	73.91%	74	<a href="#">RLU75935.1</a>
✓	<a href="#">hypothetical protein CTZ27_38710 [Streptomyces griseocarnaeus]</a>	<a href="#">Streptomyces griseocarnaeus</a>	96.7	96.7	91%	6e-24	73.91%	83	<a href="#">RLU75903.1</a>
✓	<a href="#">hypothetical protein CTZ27_38750 [Streptomyces griseocarnaeus]</a>	<a href="#">Streptomyces griseocarnaeus</a>	94.0	94.0	92%	8e-23	72.86%	83	<a href="#">RLU75149.1</a>
✓	<a href="#">hypothetical protein BTO19_26835 [Vibrio parahaemolyticus]</a>	<a href="#">Vibrio parahaemolyticus</a>	92.8	92.8	91%	2e-22	72.46%	74	<a href="#">OUJ21355.1</a>
✓	<a href="#">hypothetical protein CTZ27_39050 [Streptomyces griseocarnaeus]</a>	<a href="#">Streptomyces griseocarnaeus</a>	91.3	91.3	91%	8e-22	72.46%	74	<a href="#">RLU73355.1</a>
✓	<a href="#">hypothetical protein BS624_23885 [Vibrio parahaemolyticus]</a>	<a href="#">Vibrio parahaemolyticus</a>	90.5	90.5	91%	2e-21	69.57%	83	<a href="#">OUD43109.1</a>
✓	<a href="#">hypothetical protein BTZ53_25130 [Vibrio parahaemolyticus]</a>	<a href="#">Vibrio parahaemolyticus</a>	90.5	90.5	92%	2e-21	71.43%	83	<a href="#">OUJ35732.1</a>

Fig8. Imagen parcial de BLASTX para secuencia 2

Podemos observar que las clasificaciones taxonómicas obtenidas en ambas herramientas para la misma secuencia difieren, de nuevo, significativamente. En QIIME2, la secuencia se encuentra asignada al filo *Chloroflex*, e igual que en la secuencia 1, proporciona detalles hasta el nivel de género. La herramienta BLASTX exhibe una diversidad de detalles, proporcionando numerosos filos, y llegando hasta el nivel de especie. Por ende, las diferencias comienzan a nivel de filo (y continúan en niveles más específicos), donde QIIME2 muestra *Chloroflex*, mientras que BLASTX identifica *Actibocacteria*, *Proteobacteria* y *firmicutes*.

Según los resultados obtenidos en QIIME2 a partir de la categoría site-name, Podemos observar diferencias significativas en la abundancia de los géneros *Ammoniphilus*, *Euzebya*, y *DA101*.

	W
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Paenibacillaceae;g_Ammoniphilus	219
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Nitrospirales;o_Euzebyales;f_Euzebyaceae;g_Euzebya	215
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_Spartobacteria;o_Chthoniobacterales;f_Chthoniobacteraceae;g_DA101	199

Fig9. ANCOM Resultados estadísticos

Percentile	0.0	25.0	50.0	75.0	100.0	0.0	25.0	50.0	75.0	100.0	0.0	25.0	50.0
Group	BAQ2420	BAQ2420	BAQ2420	BAQ2420	BAQ2420	BAQ2462	BAQ2462	BAQ2462	BAQ2462	BAQ2462	BAQ2687	BAQ2687	BAQ2687
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Paenibacillaceae;g_Ammoniphilus	33.0	40.0	46.0	161.0	340.0	33.0	128.5	224.0	236.0	248.0	1.0	1.0	1.0
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Nitrospirales;o_Euzebyales;f_Euzebyaceae;g_Euzebya	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_Spartobacteria;o_Chthoniobacterales;f_Chthoniobacteraceae;g_DA101	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Fig10. Percentile abundances of features by group (parcial)

Teniendo en cuenta que un valor W más alto corresponde a un taxón más diferencial en los grupos, podemos ver *Ammoniphilus* exhibe el más alto, el cual es igual a 219. Por otro lado, si evaluamos los valores obtenidos en los percentiles (los cuales revelan la abundancia de estos géneros en cada sitio), podemos observar que este género tiene una alta abundancia en los sitios BAQ2420 Y BAQ2462 en comparación con el resto de los sitios. Para el género *Euzebya*, observamos una abundancia alta y progresiva en el sitio YUN1242. Para el género *DA101*, observamos una abundancia y variabilidad en los sitios BAQ4166 y BAQ2687, especialmente. Esto indica que los géneros *Ammoniphilus*, *Euzebya* y *DA101* son los más diferenciales entre las muestras. Las diferencias podrían estar relacionadas con condiciones

medioambientales del sitio específico, lo cual afecta a la composición microbiana.

En conclusión, debido a la información hallada en este estudio, podemos observar que los resultados denotan que tanto factores locales, como la vegetación o las características específicas del sitio influyen de manera notoria a la composición de la comunidad microbiana que observamos en nuestros datos. Por ende, este análisis nos proporciona información sobre cómo diferentes factores actúan en la microbiota, y su relación con el ecosistema en el que se sitúan.