# DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

### • CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras originales fueron cuantificadas utilizando el Qubit dsDNA HS Assay Kit de la compañía Invitrogen, en un fluorómetro DeNovix DS-11 de la compañía DeNovix o en un equipo Qubit de la compañía Invitrogen.

### • PREPARACIÓN DE LAS BIBLIOTECAS

La construcción de las bibliotecas se realizó siguiendo detalladamente el protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation de la compañía Illumina. De manera breve, utilizando los oligonucleótidos degenerados 16S Amplicon PCR Forward Primer y 16S Amplicon PCR Reverse Primer se generó un primer amplicón de aproximadamente 550 pb a partir de 12.5 ng de gDNA para cada muestra. Este amplicón se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% y se purificó con un volumen de Ampure XP Beads de Beckman-Coulter para resuspenderse en un volumen final de 50 uL de Elution Buffer (EB). Las muestras se cuantificaron como se menciona líneas arriba. Para la reacción de reamplificación y marcaje de cada muestra, se tomaron 5 uL del primer amplicón y se reamplificó utilizando los oligonucleótidos Nextera XT Index 1 Primer y Nextera XT index 2 Primer. El producto de la reamplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% comparándose con el amplicón original para determinar que los tags se incorporaron de manera adecuada como menciona el protocolo. Las reacciones de este segundo PCR se purificaron con un volumen de Ampure XP Beads como se mencionó anteriormente. El volumen final de resuspensión fue de 15 μL de (EB).

Las bibliotecas fueron analizadas para determinar el tamaño promedio a través de un ensayo de electroforesis en capilar utilizando un equipo Bioanalyzer 2100 de la compañía Agilent, utilizando un chip de DNA 1000. Las bibliotecas se cuantificaron por medio de un método fluorométrico como el descrito anteriormente. Ya cuantificadas por fluorescencia, las muestras se normalizaron a una concentración específica y se combinaron para generar la mezcla final para su secuenciación.

### • SECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS

La mezcla final de bibliotecas, se normalizó a una concentración de 4 nM y se realizaron los cálculos para cargar en el equipo y obtener entre 100 y 150 mil lecturas/muestra en la secuencia final. La secuenciación se realizó en un equipo MiSeq de la compañía Illumina, generando secuencias de 2x300 ciclos. La corrida fue la FIELDBDj.